



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Campus de Araraquara  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**COMBINAÇÃO DE METFORMINA E LICOPENO E IMPACTOS  
SOBRE PARÂMETROS FISIOMETABÓLICOS E  
BIOMARCADORES DO ESTRESSE GLICO-OXIDATIVO EM  
SISTEMA-MODELO *IN VIVO* DE OBESIDADE E RESISTÊNCIA À  
INSULINA**

**Bruno Pereira Motta**

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

**Araraquara, SP**

**2022**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Campus de Araraquara  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**COMBINAÇÃO DE METFORMINA E LICOPENO E IMPACTOS  
SOBRE PARÂMETROS FISIOMETABÓLICOS E  
BIOMARCADORES DO ESTRESSE GLICO-OXIDATIVO EM  
SISTEMA-MODELO *IN VIVO* DE OBESIDADE E RESISTÊNCIA À  
INSULINA**

**Bruno Pereira Motta**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

**Araraquara, SP**

**2022**

---

**M921c** Motta, Bruno Pereira.  
Combinação de metformina e licopeno e impactos sobre parâmetros fisiometabólicos e biomarcadores do estresse glicoxidativo em sistema-modelo *in vivo* de obesidade e resistência à insulina / Bruno Pereira Motta. – Araraquara: [S.n.], 2021.  
72 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Amanda Martins Baviera.

1. Obesidade. 2. Resistência à insulina. 3. Diabetes mellitus. 4. Estresse glicoxidativo. 5. Metformina. 6. Licopeno. I. Baviera, Amanda Martins, orient. II. Título.

---

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP - Campus de Araraquara

**CAPES: 33004030078P6**  
**Esta ficha não pode ser modificada**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Combinação de metformina e licopeno e impactos sobre parâmetros fisiometabólicos e biomarcadores do estresse glico-oxidativo em sistema-modelo in vivo de obesidade e resistência à insulina

**AUTOR: BRUNO PEREIRA MOTTA**

**ORIENTADORA: AMANDA MARTINS BAVIERA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. AMANDA MARTINS BAVIERA (Participação Virtual)  
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara UNESP

Profa. Dra. SILVIA DE PAULA GOMES (Participação Virtual)  
Departamento de Ciências Biológicas / Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto

Profa. Dra. RENATA PIRES DE ASSIS (Participação Virtual)  
Instituto de Ciências da Saúde / Universidade Paulista - UNIP - Araraquara

Araraquara, 17 de dezembro de 2021

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me concedido saúde, força e determinação para desempenhar seus planos e concretizar a sua vontade.

Deixo minha eterna gratidão a todos os meus familiares, em especial meus avós, Evázia Maria Botelho (*in memorian*) e Rubens Botelho Motta, por aceitarem assumir, já em idade avançada, o compromisso de me formar e educar e por sempre terem torcido e continuarem torcendo por mim em todos os momentos de minha vida. Agradeço também à minha tia, Mararrubia Botelho, por sempre me aconselhar, apoiar minhas decisões e ter sido minha inspiração tanto para escolha da profissão farmacêutica como para decisão de seguir na carreira acadêmica.

Agradeço a meu melhor amigo e colega de apartamento Guilherme Augusto de Góes Dias, que soube me ouvir nos dias que cheguei em casa estressado e também comemorar as pequenas vitórias que tive. Obrigado por todo apoio, pela ajuda nos meus momentos difíceis e por permitir que eu também estivesse por perto quando você precisou. Sua companhia foi e continua sendo muito importante para mim.

Agradeço à Fundação Municipal Irene Siqueira Alves – Vovó Mocinha, por me permitir o exercício da minha profissão e me presentear com novos amigos, que fizeram o possível para me ajudar a conseguir conciliar o trabalho com a Pós-Graduação. Obrigado aos farmacêuticos Pedro Sérgio dos Santos Lima, Daiane Aparecida Ribeiro, Camila Garcia da Silva, Rodrigo Passos Evangelista, Isabela Jacob Moro, Patrícia Silva Martins, Ana Paula de Oliveira Uliana, Vanessa Oliveira e Naly Morgana Gomes da Silva Constante e à nossa gestora técnica hospitalar Paula Santos da Silva Lima, que compreendeu meus horários malucos e me ajudou a organizar minha escala de trabalho, para poder me dedicar aos assuntos da Pós-Graduação quando necessário.

Deixo aqui minha gratidão à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara e a seus funcionários, por continuar me acolhendo como aluno e contribuir para cada etapa de minha formação.

Agradeço eternamente a todos do Laboratório de Bioquímica & Enzimologia Clínicas, o local onde me encontrei, descobri minha vocação para pesquisa e adotei como meu segundo lar. Professor Iguatemy Lourenço Brunetti, obrigado pelos ensinamentos, pelas novas ideias que agregaram grande valor ao meu trabalho e também pelas conversas mais

pessoais e descontraídas. Renata Pires de Assis, Maiara Destro Inácio e Mariana de Campos da Costa, obrigado pela paciência que tiveram em cada momento de ensinamento que vivemos. Agradeço à minha “parceira do licopeno”, Ingrid Delbone Figueiredo, que além de colega de laboratório, se tornou uma grande amiga, com quem pude contar e sei que posso continuar contando para todos os momentos. Obrigado Camila Graça Pinheiro, por ter sido minha amiga e parceira nas vezes que entrei em biotério nas análises que fizemos juntos, sempre com empenho e alegria. Agradeço ainda à “menina” Juliana Oriel de Oliveira, pessoa que entrou comigo nessa jornada do Mestrado e com quem sigo junto até agora; obrigado por ter entrado em várias frias junto comigo (as disciplinas que a gente cursou que o digam), por toda ajuda tanto em laboratório quanto em minha vida pessoal e pelas risadas (que sabemos que não foram poucas) e momentos de descontração, que me ajudaram a não surtar (pelo menos não muito) e conseguir continuar com minhas atividades. Deixo ainda meu agradecimento a Felipe Nunes Cardoso, Beatrice Morceli e Leticia, alunos de iniciação científica que tive o prazer de co-orientar e aos demais alunos com quem tive contato nesses anos, especialmente Tassiana Cristina Talpo e Taina.

Por fim, agradeço à minha amiga e Professora Amanda Martins Baviera, por ter me dado a chance de participar do universo da pesquisa e me orientar durante toda a minha iniciação científica (que gerou meu Trabalho de Conclusão de Curso e meu primeiro artigo científico), meu Estágio Curricular Supervisionado II e, é claro, no desenvolvimento do projeto que originou esta Dissertação de Mestrado. Saiba que não tenho palavras para agradecer pelos seus ensinamentos, pela confiança e por me apoiar e aceitar enfrentar comigo, mesmo com a necessidade de me dedicar a outras atividades, todos os desafios que surgiram pelo caminho. Serei imensamente feliz se conseguir, um dia, me tornar um professor semelhante a você.

Agradeço à CNPq e FAPESP pelo incentivo financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

*“Não são nossas atitudes que mostram quem realmente somos; são nossas escolhas.”*

Harry Potter e a Câmara Secreta

*“A felicidade pode ser encontrada mesmo nas horas mais difíceis, se você se lembrar de acender a luz”*

Harry Potter e o Prisioneiro de Askaban

*“Embora venhamos de lugares diferentes e falemos línguas diferentes, nossos corações batem como um só.”*

Harry Potter e o Cálice de Fogo

## RESUMO

A manutenção da hiperglicemia por longos períodos é considerada um dos principais fatores responsáveis pelo estabelecimento do estresse glico-oxidativo no diabetes mellitus (DM), e este tem participação no desenvolvimento e progressão das complicações da doença, especialmente via aumento na geração dos produtos finais de glicação avançada (AGEs). Portanto, a exposição à hiperglicemia pode gerar alterações em longo prazo nas células, desencadeando uma série de eventos conhecidos como “memória metabólica”, caracterizada pela persistência das complicações do DM mesmo após a conquista do controle glicêmico. A metformina tem sido o agente antidiabético oral de primeira linha para o tratamento do DM tipo 2. Apesar de seu uso permitir aos indivíduos com DM tipo 2 um efetivo controle glicêmico, variações nas respostas individuais à terapia antihiperglicêmica são frequentes. Logo, estratégias terapêuticas baseadas na combinação de fármacos antidiabéticos com compostos bioativos naturais são interessantes na prevenção e/ou atenuação dos efeitos relacionados à memória metabólica e ao estresse glico-oxidativo. Dentre os compostos bioativos com potencial para associação com a metformina, destaca-se o licopeno. Diversos benefícios do licopeno no combate às disfunções metabólicas têm sido descritos; em sistemas-modelos *in vivo* de obesidade e DM, o tratamento ou a suplementação com licopeno ou com alimentos ricos em licopeno é capaz de promover aumento da tolerância a glicose, diminuição da resistência à insulina, inibição do desenvolvimento de esteatose hepática, diminuição nos níveis de LDL-oxidada e do risco cardiovascular, atenuação da nefropatia diabética via atenuação do estresse oxidativo, entre outros benefícios. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações em parâmetros fisiometabólicos e biomarcadores do estresse glico-oxidativo de camundongos sob sistema-modelo *in vivo* de obesidade/resistência à insulina e tratados com metformina ou licopeno, sozinhos ou co-administrados. Foram utilizados camundongos C57BL/6J machos alimentados com dietas normolipídica (P) ou hiperlipídica (HL). Após 9 semanas de oferta das dietas, os tratamentos com água, sistema lipídico nanoestruturado (SLN; veículo) e SLN contendo metformina e/ou licopeno foram iniciados e duraram 8 semanas. Peso corporal foi monitorado duas vezes por semana. Ao término dos tratamentos, os animais foram eutanasiados e diversos tecidos foram retirados e pesados. O plasma foi utilizado para as análises de biomarcadores relacionados ao metabolismo de carboidratos e lipídeos, integridade hepática, função renal e estresse glico-oxidativo [biomarcadores de glicação

avançada (AGEs fluorescentes), biomarcadores de peroxidação lipídica (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBARS)] e atividade da enzima antioxidante paraoxonase 1 (PON 1). Os níveis de AGEs e TBARS também foram determinados em fígado e rins. Após 17 semanas, houve maior ganho de peso corporal e aumento nas massas dos tecidos adiposos brancos (epididimal, retroperitoneal) nos animais alimentados com dieta HL, quando comparados aos animais alimentados com dieta P, confirmando assim a instalação da obesidade devido à maior ingestão energética. As massas dos tecidos adiposos e os valores de peso corporal final foram diminuídos em animais em dieta HL e tratados com metformina e/ou licopeno. Intolerância à glicose e resistência à insulina foram observadas em animais alimentados com dieta HL. Os tratamentos com metformina e/ou licopeno melhoraram a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina em animais alimentados com dieta HL. Além disso, os tratamentos com metformina e/ou licopeno foram capazes de diminuir os níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol-HDL, ALT, ALP e a glicemia de jejum. Foram observados aumentos nos níveis de AGEs fluorescentes e de TBARS em plasma, fígado e rins de animais HL. Os tratamentos de animais em dieta HL com metformina e/ou licopeno promoveram diminuição nos níveis desses biomarcadores do estresse glico-oxidativo em plasma, fígado e rins. A atividade de PON 1 em plasma de animais HL apresentou-se diminuída, em relação ao grupo P. O tratamento de animais em dieta HL com metformina foi capaz de impedir a diminuição na atividade da PON 1, mantendo-a em níveis semelhantes àqueles observados em animais P. Já os tratamentos com licopeno ou licopeno+metformina promoveram significativos aumentos nas atividades de PON 1, as quais alcançaram valores superiores àqueles de animais P. Pode-se concluir que os tratamentos com metformina e/ou licopeno são eficazes na promoção de melhorias das complicações observadas na obesidade, com ênfase na diminuição do peso corporal, aumento da tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina, diminuição nos níveis plasmáticos de colesterol total e colesterol-HDL, diminuição nos níveis plasmáticos, hepáticos e renais de AGEs fluorescentes e TBARS e aumento na atividade de PON 1.

**Palavras-chave:** obesidade; resistência à insulina; diabetes mellitus; estresse glico-oxidativo; metformina; licopeno.

## ABSTRACT

The maintenance of hyperglycemia for long periods is considered one important factor in the establishment of the glycoxidative stress in diabetes mellitus (DM), which participates in the onset and progression of various complications, mainly via increased generation of advanced glycation end products (AGEs). Therefore, the exposure to hyperglycemia can generate long-term changes in cells, triggering a series of events known as “metabolic memory”, characterized by the persistence of the diabetic complications even after achieving the glycemic control. Metformin has been the first-line oral antidiabetic agent for the treatment of type 2 DM. Although the use of metformin allows individuals with type 2 DM an effective glycemic control, variations in individual responses to this antihyperglycemic therapy are frequent. Therefore, therapeutic strategies based on the combination of antidiabetic drugs with natural bioactive compounds are interesting in preventing and/or mitigating the effects related to the metabolic memory and glycoxidative stress. Among the bioactive compounds with potential for association with metformin, it can be cited the lycopene. Several benefits of lycopene in contrast the metabolic disorders have been described; in *in vivo* model systems of obesity and DM, treatment or supplementation with lycopene or with foods rich in lycopene is able to increase the glucose tolerance, decrease the insulin resistance, inhibit the development of fatty liver disease, decrease the levels of oxidized-LDL and the cardiovascular risk, attenuate the diabetic nephropathy by decreasing oxidative stress, among other benefits. The aim of this study was to evaluate the changes in physiometabolic parameters and biomarkers of glycoxidative stress in mice under an *in vivo* model system of obesity/insulin resistance and treated with metformin or lycopene, alone or in combination. Male C57BL/6J mice fed with control diet (C) or high-fat diet (HFD) were used. After 9 weeks of diet offering, treatments with water, nanostructured lipid system (NLS; vehicle) and NLS containing metformin and/or lycopene were started and performed during 8 weeks. Body weight was monitored twice a week. At the end of the treatments, the animals were euthanized and several tissues were removed and weighed. Plasma samples were used for the analysis of biomarkers related to carbohydrate and lipid metabolism, liver integrity, renal function, in addition to biomarkers of glycoxidative stress [biomarkers of advanced glycation (fluorescent AGEs) and lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)], and the activity of the antioxidant enzyme paraoxonase 1 (PON 1). The levels of AGEs and TBARS were also determined in the liver and kidneys. After 17 weeks, increases in the body weight gain and

in the weights of white adipose tissues (epididymal, retroperitoneal) were observed in animals fed a HFD, when compared to animals fed a C diet, thus confirming the onset of the obesity. The weights of adipose tissues and the terminal values of body weight were decreased by the treatments of mice fed a HFD with metformin and/or lycopene. Glucose intolerance and insulin resistance were observed in animals fed a HFD. Treatments with metformin and/or lycopene improved the glucose tolerance and increased the insulin sensitivity in animals fed a HFD. In addition, treatments with metformin and/or lycopene were able to decrease the plasma levels of total cholesterol, HDL-cholesterol, ALT, ALP and fasting blood glucose levels. Increases in the levels of fluorescent AGEs and TBARS were observed in plasma, liver and kidneys of untreated HFD mice. Treatments of mice fed a HFD with metformin and/or lycopene promoted a decrease in the levels of these biomarkers of glycoxidative stress in plasma, liver and kidneys. The activity of PON 1 in plasma from animals fed a HFD was decreased in comparison to the corresponding values in C mice. The treatment of mice fed a HFD with metformin was able to prevent the decrease in the PON 1 activity, maintaining PON 1 activity at values similar from those observed in C mice. In addition, the treatments with lycopene or lycopene+metformin promoted significant increases in the activity of PON 1, which reached values higher than those of C mice. It can be concluded that the treatments with metformin and/or lycopene are effective in promoting improvements of various complications observed in obesity, with emphasis on decreasing the body weight gain, increasing the glucose tolerance and insulin sensitivity, decreasing the plasma levels of cholesterol and HDL-cholesterol, decreasing the levels of fluorescent AGEs and TBARS (plasma, liver, kidneys) and increasing the PON 1 activity.

**Keywords:** obesity; insulin resistance; diabetes mellitus; glycoxidative stress; metformin; lycopene.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química da metformina.....	<b>26</b>
<b>Figura 2.</b> Estrutura química do licopeno.....	<b>28</b>
<b>Figura 3.</b> Curva de calibração de 1,1'3,3'-tetrametoxipropano e leitura realizada em espectrofluorímetro (A) e em espectrofotômetro (B).....	<b>37</b>
<b>Figura 4.</b> Curva de calibração de albumina sérica bovina (BSA) para dosagem de proteínas totais em plasma e sobrenadantes de fígado e rim.....	<b>39</b>
<b>Figura 5.</b> Evolução do peso corporal (g) (A) e ganho de peso corporal total (g) (B) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com metformina e/ou licopeno.....	<b>42</b>
<b>Figura 6.</b> Ingestão alimentar (g/dia) (A) e ingestão energética média (a partir da 10ª semana de experimento) (kcal/dia) (B) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com metformina e/ou licopeno.....	<b>43</b>
<b>Figura 7.</b> Massas (mg) dos tecidos adiposos epididimal (A), retroperitoneal (B) e marrom (C) corrigidas pelo comprimento de tibia (mm) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com metformina e/ou licopeno.....	<b>44</b>
<b>Figura 8.</b> Teste tolerância à glicose oral (A), área sob a curva (ASC) da glicemia no TTGO (B) e glicemia de jejum de 12 horas (C) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com metformina e/ou licopeno.....	<b>49</b>
<b>Figura 9.</b> Teste tolerância à insulina (A) e área sob a curva (ASC) da glicemia no ITT (B) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com metformina e/ou licopeno.....	<b>51</b>
<b>Figura 10.</b> Estimativa de AGEs fluorescentes (A), níveis de TBARS (B) e atividade de PON 1 corrigida pelos níveis de colesterol-HDL (C) no plasma de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com metformina e/ou licopeno.....	<b>52</b>

**Figura 11.** Estimativa de AGEs fluorescentes (A) e níveis de TBARS (B) no fígado de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com metformina e/ou licopeno.....**53**

**Figura 12.** Estimativa de AGEs fluorescentes (A) e níveis de TBARS (B) nos rins de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com metformina e/ou licopeno.....**54**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição das dietas padrão (P) e hiperlipídica (HL).....	<b>32</b>
<b>Tabela 2.</b> Massas (mg) de fígado, rim, coração e músculo esquelético <i>gastrocnemius</i> , corrigidas pelo comprimento da tíbia (mm) de animais alimentados com as dietas P e HL e tratados com metformina e/ou licopeno.....	<b>45</b>
<b>Tabela 3.</b> Níveis plasmáticos de colesterol total (mg/dL), colesterol-HDL (mg/dL), triacilgliceróis (mg/dL), creatinina (mg/dL), ácido úrico (mg/dL), albumina (g/dL), ALT (U/L) e ALP (U/L) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com metformina e/ou licopeno.....	<b>47</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AGEs</b>	Produtos finais de glicação avançada
<b>AGE-R1</b>	<i>AGE receptor R1</i>
<b>AGL</b>	Ácidos graxos livres
<b>AKT</b>	Proteína quinase B
<b>ALP</b>	Fosfatase alcalina
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AMP</b>	Adenosina monofosfato
<b>AMPc</b>	Adenosina 3,5-monofosfato cíclico
<b>AMPK</b>	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
<b>ASC</b>	Área sob a curva
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CREB</b>	Proteína de ligação responsiva ao AMPc
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>ERO</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>GLO 1</b>	Glioxalase 1
<b>GLUT</b>	Transportador de glicose
<b>GSH</b>	Glutathiona reduzida
<b>GSH-Px</b>	Glutathiona peroxidase
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>HMG-CoA</b>	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA
<b>IDF</b>	<i>International Diabetes Federation</i>
<b>IRS-1</b>	Substrato do receptor de insulina 1
<b>ITT</b>	Teste de tolerância à insulina
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>LDL-ox</b>	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotática de monócito do tipo 1
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma oxidada
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma oxidada
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida

<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator de transcrição nuclear kappa B
<b>PKA</b>	Proteína quinase dependente de AMPc
<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>PON 1</b>	Paraoxonase 1
<b>RAGE</b>	<i>Receptor for AGEs</i>
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>TBARS</b>	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
<b>TLR</b>	<i>Toll like receptor</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
<b>TTGO</b>	Teste de tolerância à glicose oral

## SUMÁRIO

**AGRADECIMENTOS**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE TABELAS**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
2.1 Diabetes mellitus e obesidade.....	21
2.2 Estresse glico-oxidativo.....	23
2.3 Metformina .....	26
2.4 Licopeno .....	28
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
3.1 Objetivo Geral .....	30
3.2 Objetivos Específicos .....	30
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
4.1 Preparação do sistema lipídico nanoestruturado (SLN) contendo metformina e/ou licopeno .....	31
4.2 Animais, dietas e desenho experimental.....	31
4.3 Biomarcadores do metabolismo de carboidratos, lipídeos, função e integridade hepáticas e função renal.....	34
4.4 Biomarcadores de peroxidação lipídica.....	36
4.4.1 Preparo de amostras de fígado e rim.....	36
4.4.2 Determinação dos níveis de TBARS .....	37
4.5 Atividade da enzima paraoxonase 1 (PON 1).....	38
4.6 Biomarcador de glicação avançada .....	38
4.6.1 Estimativa de AGEs em plasma .....	38
4.6.2 Estimativa de AGEs em fígado .....	38
4.6.3 Estimativa de AGEs em rim .....	39

4.7 Dosagem de proteínas totais em plasma e sobrenadantes de homogenatos de fígado e rim.....	39
4.8 Análise estatística .....	40
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
5.1 Parâmetros fisiológicos.....	41
5.2 Parâmetros bioquímicos plasmáticos.....	45
5.3 Estudo da tolerância à glicose oral e da sensibilidade à insulina.....	48
5.4 Parâmetros relacionados ao estresse glico-oxidativo e potencial antioxidante em plasma .....	51
5.5 Parâmetros relacionados ao estresse glico-oxidativo em fígado .....	53
5.6 Parâmetros relacionados ao estresse glico-oxidativo em rins.....	53
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>
<b>9. ANEXO.....</b>	<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma doença endócrina caracterizada por deficiência na produção/secreção de insulina pelas células beta do pâncreas e/ou por resistência insulínica nos tecidos alvo (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2020). O aumento na prevalência de DM tipo 2 está intimamente associado ao aumento na prevalência de obesidade (HOSSAIN et al., 2007). Em quadros descontrolados do DM, há maiores chances de desenvolvimento de várias complicações, incluindo as doenças cardiovasculares e complicações microvasculares (retinopatia, neuropatia e nefropatia diabéticas) (FOWLER, 2008). Estas complicações são as principais responsáveis pelos elevados índices de morbimortalidade associados ao DM (*INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION*, 2019).

O estresse glico-oxidativo participa do início e da progressão das complicações do DM, especialmente via aumento na geração de produtos finais de glicação avançada (AGEs, do inglês *advanced glycation end products*); a glicação de proteínas e a formação de AGEs desempenham um papel importante na patogênese de complicações diabéticas (NOWOTNY et al., 2015). Durante a formação dos AGEs, também são produzidas espécies reativas de oxigênio (ERO) que, por sua vez, potencializam os efeitos deletérios que levam à disfunção de diversas biomoléculas (BROWNLEE, 2005). A formação de ERO, bem como a glicação de proteínas e subsequente geração excessiva de AGEs e seu acúmulo nos tecidos, em conjunto, contribuem para o estabelecimento das complicações do DM (GOH e COOPER, 2008).

Considerando ser a hiperglicemia um dos fatores envolvidos no estabelecimento das complicações do DM, o tratamento da doença tem como principal objetivo a manutenção dos níveis glicêmicos próximos à normalidade. A metformina (dimetilbiguanida) tem sido o agente antidiabético oral de primeira linha para o tratamento do DM tipo 2 (SANCHEZ-RANGEL e INZUCCHI, 2017). Suas ações antihiperglicêmicas encontram-se associadas aos seus efeitos no fígado, inibindo a gliconeogênese; também inibe a lipogênese e estimula a oxidação de ácidos graxos no fígado, reduzindo os estoques de lipídeos, o que contribui para o aumento na sensibilidade hepática à insulina (RENA; HARDIE; PEARSON, 2017).

Apesar de o uso da metformina permitir aos indivíduos com DM tipo 2 um efetivo controle glicêmico, manifestações gastrointestinais (diarréia, náuseas, vômitos, dor abdominal) podem ser observadas, em intensidade proporcional à dose do fármaco

(OKAYASU et al., 2012). Episódios de acidose láctica também são associados ao uso crônico da metformina, especialmente em indivíduos com doença renal crônica (INZUCCHI et al., 2014). Baixa biodisponibilidade e reduzida meia-vida da metformina também devem ser citadas como fatores negativos associados ao fármaco (SCHEEN, 1996).

Todos estes fatores reiteram a importância de estudos centrados no desenvolvimento de formulações de liberação prolongada, e que assim podem melhorar a biodisponibilidade da metformina, contribuindo para a diminuição na frequência de dosagem e no risco de surgimento de efeitos adversos, culminando em maior adesão do paciente ao tratamento. Uma estratégia interessante é a associação de metformina com compostos ou preparações de origem natural com atividade antidiabética e/ou antioxidante. Diversos estudos demonstram os benefícios da terapia combinada de agentes farmacológicos clássicos com compostos bioativos naturais, reduzindo, inclusive, os efeitos adversos dos fármacos (PRABHAKAR; KUMAR; DOBLE, 2014). Dentre os compostos bioativos naturais com potencial para associação com a metformina, temos o licopeno, um carotenoide isômero acíclico do  $\beta$ -caroteno, extremamente insaturado, responsável pela coloração vermelha de tomates e seus produtos processados (AGARWAL e RAO, 1998). Estudos têm evidenciado o potencial do licopeno em atenuar diversas alterações observadas em animais sob modelos experimentais de DM, obesidade e resistência à insulina, incluindo dislipidemia, hiperglicemia e estresse oxidativo (ZHU; WANG; XU, 2011; BERNAL et al., 2013; ASSIS et al., 2017).

Diante do exposto, e tendo em vista que muitas das complicações observadas no DM estão relacionadas com a manutenção do estresse glico-oxidativo, torna-se interessante o estudo dos efeitos da combinação de metformina e licopeno no tratamento de animais em sistema-modelo *in vivo* de obesidade/resistência à insulina.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Diabetes mellitus e obesidade

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica caracterizada por deficiência na produção/secreção de insulina pelas células beta do pâncreas e/ou resistência insulínica em tecidos alvo, culminando em diversos prejuízos no controle do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2020). Estima-se que o DM afeta cerca de 463 milhões de pessoas no mundo, tendo sido a causa de morte de 4,2 milhões de pessoas em 2019 (*INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION*, 2019). Vale destacar que o Brasil é o quinto país com o maior índice de casos de DM, com cerca de 16,8 milhões de brasileiros diabéticos (*INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION*, 2019; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2020).

A hiperglicemia é uma das principais manifestações do DM, bem como elevados níveis de glicose no fluido intersticial e em células de diversos tecidos (rins, nervos, endotélio e retina, por exemplo) que captam glicose de maneira independente de insulina (LYONS e JENKINS, 1997). Altas taxas de morbidade e mortalidade são observadas em quadros descontrolados do DM, principalmente devido à ocorrência de complicações microvasculares (retinopatia, neuropatia e nefropatia diabéticas) e macrovasculares (aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, disfunção endotelial, doença vascular periférica) (FOWLER, 2008; RAMKISSON et al, 2013). A retinopatia diabética resulta do dano aos capilares responsáveis pela vascularização da retina, podendo resultar deficiência visual (SANTOS et al., 2011). O DM também provoca deterioração gradual das fibras nervosas sensoriais e motoras do sistema nervoso periférico e, em última instância, pode causar amputação de membros (PAZDRO e BURGESS, 2010; OBROSOVA, 2009). Na nefropatia diabética, ocorre um declínio progressivo na velocidade de filtração glomerular, sendo uma das principais causas de doença renal crônica no mundo (JAIN, 2012). O DM também é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, principais responsáveis pela mortalidade devido às complicações do DM (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2018).

A classificação do DM é baseada em sua etiologia (*AMERICAN DIABETES ASSOCIATION*, 2017; SKYLER et al., 2017): (i) DM tipo 1, uma doença autoimune, poligênica, decorrente da destruição das células beta do pâncreas, culminando em deficiência absoluta na produção de insulina; pode ser subclassificada em DM tipo 1A,

quando é confirmada a presença de um ou mais autoanticorpos circulantes, e DM tipo 1B ou idiopática, quando os autoanticorpos não são detectáveis na circulação sanguínea (CHIANG et al., 2014; INSEL et al., 2015); (ii) DM tipo 2, no qual se observa resistência tecidual à insulina combinada à disfunção pancreática e deficiência relativa de insulina; possui etiologia complexa e multifatorial, envolvendo componentes genéticos e ambientais, destacando-se como principais fatores de risco os hábitos dietéticos e a inatividade física, ambos contribuintes para a obesidade (RAO, 2015); (iii) DM gestacional, caracterizado por intolerância à glicose que tem início durante a gestação, em mulheres sem diagnóstico prévio de DM; (iv) outros tipos de DM, onde se enquadram as formas menos comuns da doença, incluindo alterações genéticas que resultam em disfunção das células beta do pâncreas, alterações genéticas em componentes da sinalização da insulina, doenças do pâncreas exócrino e outras condições (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2018).

A sinalização intracelular da insulina tem início com a ligação deste hormônio a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades  $\alpha$ , que inibem a atividade tirosina quinase de duas subunidades  $\beta$ . A ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  permite que a subunidade  $\beta$  adquira atividade quinase, o que leva a alteração conformacional e autofosforilação, aumentando ainda mais a atividade quinase do receptor (VELLOSO et al., 1998; TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006). A ativação do receptor de insulina leva à fosforilação de diversos substratos intracelulares, incluindo os substratos do receptor de insulina 1 (IRS-1). Após a fosforilação em resíduo de tirosina, o IRS-1 funciona como proteína de ancoramento para diversas moléculas, entre elas a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (SALE e SALE, 2008). Ao se tornar ativa, a PI3K medeia a fosforilação do fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PIP2), gerando o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), local de ancoramento da proteína quinase B (AKT). Após fosforilação em seus resíduos de treonina (Thr308) e serina (Ser473), a AKT torna-se ativa, sendo capaz de fosforilar diversos substratos, sendo efetora das ações intracelulares da insulina (VANHAESEBROECK; STEPHENS; HAWKINS, 2012; BRUHN et al., 2013). A diminuição na resposta à insulina pelos tecidos alvo, característica da resistência à insulina, normalmente está associada à redução na capacidade de ativar IRS-1, culminando em diminuição na atividade de PI3K e menor ativação da AKT (PRADA e SAAD, 2011).

O aumento na prevalência de DM tipo 2 está intimamente associado ao aumento na prevalência de obesidade (HOSSAIN et al., 2007). O consumo excessivo de calorias associado ao sedentarismo promove o acúmulo de lipídeos nos tecidos adiposos, o que causa hipertrofia dos adipócitos (FELBER e GOLAY, 2002; HOSSAIN et al., 2007). Esta hipertrofia suprime o aporte local de oxigênio, gerando hipóxia e subsequente ativação de vias que desencadeiam uma resposta inflamatória. Nesta resposta inflamatória, macrófagos do tipo M1 secretam citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). O TNF- $\alpha$  é capaz de estimular a lipólise, com subsequente liberação de ácidos graxos livres (AGL) (LOIS e KUMAR, 2009). Os AGL podem retroalimentar a resposta inflamatória, via receptores do tipo *toll-like* (TLR) (Maury e Brichard, 2010), ou ainda serem esterificados em triacilgliceróis em outros tecidos, principalmente fígado, pâncreas, musculatura esquelética e cardíaca (SCHAFFER, 2003; HOSSAIN et al., 2007). Os triacilgliceróis, nestes tecidos, podem ser metabolizados à diacilglicerol (DAG) e ceramida, os quais ativam diversas proteínas do tipo quinase que promovem a fosforilação de diversos substratos, dentre eles o substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) em resíduo de serina, a qual é uma fosforilação do tipo inibitória. Assim, ocorre a inibição da cascata de sinalização da insulina em tecidos anteriormente responsivos ao hormônio, contribuindo, portanto, para o estabelecimento de resistência insulínica. Uma das principais consequências é o aumento dos níveis circulantes de glicose devido ao menor estímulo à captação de glicose (LOIS e KUMAR, 2009).

Há diversos fatores contribuintes para a gênese e progressão das complicações do DM; evidências indicam que o estresse glico-oxidativo, causado pela manutenção da hiperglicemia por longos períodos, seja de fundamental importância (MONNIER; SELL; GENUTH, 2005; NOWOTNY et al., 2015).

## **2.2 Estresse glico-oxidativo**

A manutenção da hiperglicemia por longos períodos tem papel fundamental na gênese e progressão das complicações do DM, já que desencadeia o estresse glico-oxidativo (MONNIER; SELL; GENUTH, 2005; NOWOTNY et al., 2015). A hiperglicemia participa do estabelecimento das complicações do DM por diversos mecanismos, incluindo aumento no fluxo de substratos pela via dos polióis; aumento na geração dos produtos finais de glicação avançada (AGEs, do inglês *advanced glycation end products*); ativação da proteína quinase

C (PKC); estimulação da via da hexosamina (PACKER; KRAEMER; RIMBACH, 2001; BROWNLEE, 2005; ROLO e PALMEIRA, 2006; JAY; HITOMI; GRIENGLING, 2006).

A via dos polióis é constituída por enzimas do tipo aldo-redutases, que reduzem diversos compostos carbonílicos a seus respectivos álcoois, às custas do poder redutor da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH). Com a hiperglicemia, o excesso de glicose é convertido em sorbitol pela ação da aldose redutase, com subsequente oxidação de NADPH. Posteriormente, a enzima sorbitol desidrogenase, utilizando nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada ( $\text{NAD}^+$ ) como cofator, converte o sorbitol em frutose (REIS et al., 2008; Aghadavod et al., 2016). O NADPH é uma coenzima importante para a regeneração de glutatona reduzida (GSH); com a ativação da via dos polióis, NADPH encontra-se menos disponível, resultando em diminuição nos níveis de GSH, o que compromete os sistemas de defesas antioxidantes (BLACKER e DUCHEN, 2016).

A produção de AGEs se inicia com o processo de glicação de biomoléculas, especialmente as proteínas, via reação não enzimática entre grupos carbonilas de carboidratos redutores (principalmente glicose e frutose) e grupos amino livres nas proteínas (especialmente em resíduos de lisina e arginina), sendo denominada reação de Maillard. A reação inicia uma complexa cascata de condensações, rearranjos e modificações oxidativas, resultando na formação de intermediários instáveis, conhecidos como bases de Schiff (imina); tais intermediários sofrem rearranjos e formam produtos mais estáveis, conhecidos como produtos de Amadori (cetoamina). Durante estes rearranjos, os produtos de Amadori podem sofrer processos de oxidação, gerando compostos dicarbonílicos altamente reativos (glioxal, metilglioxal, 3-deoxiglicosona), os quais podem reagir com outros resíduos de aminoácidos e gerar AGEs, com destaque para carboxietilisina (CEL), carboximetilisina (CML), dímero de lisina-3-deoxiglicosona (DOLD), dímero de glioxal-lisina (GOLD), dímero de metilglioxal-lisina (MOLD). As dicarbonilas também podem ser geradas como intermediários ou subprodutos da auto-oxidação dos açúcares redutores, da lipoperoxidação ou a partir de intermediários da via dos polióis (LAPOLLA; TRALDI; FEDELE, 2005; BUREN e LEWINTER, 2011; MEEPROM et al, 2013; SINGH et al. 2014).

A glicação de proteínas e a formação de AGEs desempenham importante papel na patogênese das complicações diabéticas (SINGH et al., 2014). Durante a formação dos AGEs, também são produzidas espécies reativas de oxigênio (ERO) que, por sua vez, potencializam os efeitos deletérios que levam à disfunção de diversas biomoléculas (BONNEFONT-ROUSSELOT, 2002; BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008). Por esta

razão, a formação de ERO, bem como a glicação de proteínas e subsequente geração de AGEs nos tecidos, em conjunto, contribuem de maneira significativa para o estabelecimento das complicações tardias do DM, incluindo retinopatia, nefropatia e neuropatia diabéticas, além de contribuírem em diversas etapas das complicações macrovasculares (AHMED, 2005; GOH e COOPER, 2008).

Outro caminho através dos quais os AGEs podem contribuir para o desenvolvimento das complicações diabéticas ocorre via ativação de receptores específicos presentes nas membranas plasmáticas, os receptores de AGE (RAGE) (SINGH et al., 2014). A interação AGE-RAGE está relacionada com a promoção de estresse oxidativo, via ativação de diversos componentes intracelulares que desencadeiam a expressão de citocinas e mediadores pró-inflamatórios (via ativação do fator nuclear  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B), pró-oxidantes e pró-apoptóticos, resultando em danos celulares e contribuindo para o estabelecimento das complicações do DM (HO et al., 2010; OTT et al., 2014; OU; HUANG; WANG; OU, 2017). NF- $\kappa$ B, quando ativado, induz a expressão de RAGE e inibe a expressão de glioxalase 1 (GLO 1) (enzima que detoxifica metilglioxal), perpetuando assim os eventos pró-oxidantes e pró-inflamatórios participantes das complicações do DM (BIERHAUS e NAWROTH, 2009).

Dentre os sistemas que participam da detoxificação dos AGEs, destacam-se o sistema da glioxalase e os receptores do complexo AGE-receptor (AGE-R). O sistema da glioxalase participa da detoxificação de dicarbonilas, em especial o metilglioxal, e compreende duas enzimas: glioxalase 1 (GLO 1), que catalisa a isomerização do hemitioacetal (espontaneamente produzido na reação entre metilglioxal e GSH) à S-D-lactoilglutationa; e a glioxalase 2 (GLO 2), que catalisa a hidrólise de S-D-lactoilglutationa à D-lactato (Rabbani e Thornalley, 2012). O complexo AGE-R consiste dos receptores AGE-R1 (OST-48), AGE-R2 (80K-H) e AGE-R3 (galectina-3). AGE-R1 é ativado quando se liga a proteínas modificadas por AGEs, promovendo sua captação endocítica e degradação (OTT et al., 2014).

Tendo em vista os efeitos deletérios do estresse glico-oxidativo, a manutenção da hiperglicemia por longos períodos pode gerar, portanto, alterações em longo prazo nas células, desencadeando um fenômeno conhecido como “memória metabólica”, definida como a persistência das complicações do DM mesmo após a conquista do controle glicêmico (CERIELLO, 2012). Diversos mecanismos estão envolvidos no estabelecimento da memória metabólica, incluindo aumento na produção de AGEs, superexpressão de RAGE, aumento na produção de ERO, glicação de proteínas mitocondriais e ativação da via dos polióis, com

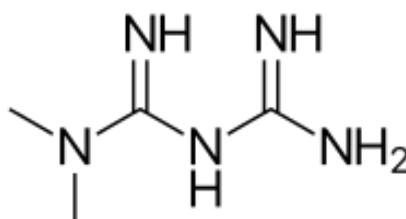
subsequente ativação da proteína quinase C (PKC) (RUSSEL e COOPER, 2015; TESTA et al., 2017). Períodos prolongados de exposição à hiperglicemia também estão associados à desregulação de genes inflamatórios em células musculares lisas endoteliais, via promoção de alterações epigenéticas que podem contribuir para a memória metabólica (MISRA e BLOOMGARDEN, 2018). Tais mudanças epigenéticas, por sua vez, contribuem para a manutenção da produção exacerbada de AGEs e ERO, responsáveis por aumentar a expressão de diversos genes, dentre eles os que codificam a subunidade p65 do NF-κB, MCP-1 (do inglês *monocyte chemoattractant protein-1*) e VCAM-1 (do inglês *vascular cell adhesion molecule-1*) (BEREZIN, 2016).

O surgimento da memória metabólica sugere a necessidade de intervenções precoces, visando a rápida capacidade de controle das disfunções observadas no DM. Além disso, intervenções que sejam capazes de reduzir os impactos deletérios do estresse oxidativo, bem como as consequências da glicação, além de normalização dos níveis glicêmicos em indivíduos diabéticos, podem ser interessantes no combate à memória metabólica, minimizando-se assim as complicações em longo prazo do DM (CERIELLO, 2012).

### 2.3 Metformina

Considerando ser a hiperglicemia um dos principais promotores das complicações do DM, o tratamento da doença tem como principal objetivo a manutenção dos níveis glicêmicos próximos à normalidade. A metformina (dimetilbiguanida) tem sido o agente antidiabético oral de primeira linha para o tratamento do DM tipo 2 (SANCHEZ-RANGEL e INZUCCHI, 2017), bem como tem sido utilizada *off-label* no tratamento do DM tipo 1 com o intuito de redução das doses de insulina (LIVINGSTONE et al., 2017).

**Figura1.** Estrutura química da metformina.



Fonte: adaptado de Beissweiger e Ruggiero, 2003.

As ações antihiperlipidêmicas da metformina resultam de seus efeitos especialmente no fígado. Após atravessar a membrana plasmática dos hepatócitos e a membrana mitocondrial interna, a metformina inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons, promovendo aumento na razão ADP: ATP e AMP: ATP, e conseqüentemente ocorre ativação da enzima AMPK (proteína quinase dependente de AMP). O aumento na razão AMP: ATP também inibe a enzima frutose-1,6-bisfosfatase, culminando em inibição aguda da gliconeogênese. Em relação à AMPK, uma vez ativada, esta fosforila a enzima ACC (acetil-CoA carboxilase), inibindo a lipogênese e conseqüentemente ocorre aumento na oxidação de ácidos graxos, reduzindo assim os estoques de lipídeos no fígado, que em última instância aumenta a sensibilidade hepática à insulina. AMPK também fosforila e ativa a enzima fosfodiesterase PDE4B, levando à redução nos níveis de AMPc, não havendo, portanto, ativação da proteína quinase dependente de PKA (induzida por glucagon) e assim também ocorre inibição da gliconeogênese. Por fim, AMPK também fosforila CRTC2 (*CREB-regulated transcriptional coactivator-2*), um fator de transcrição que, fosforilado, é inibido (retido no citoplasma) e assim não promove a transcrição de genes que codificam para PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinase) e G6Pase (glicose-6-fosfatase), enzimas chave da gliconeogênese (RENA; HARDIE; PEARSON, 2017).

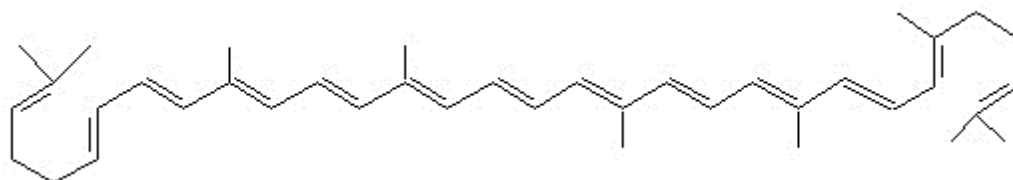
Além de suas ações no fígado, tem sido também demonstrado que a metformina pode limitar os efeitos negativos dos elevados níveis de ceramidas em músculos esqueléticos de indivíduos com DM (VALENCIA et al., 2017). Sabe-se que, na musculatura esquelética, elevados níveis de ceramidas encontram-se associados a um fenótipo de senescência (DE LA MAZA et al., 2015), bem como têm participação no estabelecimento de resistência à insulina (GALADARI et al., 2013).

Apesar de o uso da metformina permitir aos indivíduos com DM tipo 2 um efetivo controle glicêmico, promovendo reduções de cerca de 1 a 1,5% na hemoglobina glicada (HbA1c) (DEFRONZO et al., 2010), variações nas respostas individuais à terapia antihiperlipidêmica são frequentes nos indivíduos fazendo uso deste fármaco (ZHOU et al., 2016). Estratégias terapêuticas baseadas na combinação de fármacos antidiabéticos com compostos bioativos naturais são interessantes na prevenção e/ou atenuação dos efeitos relacionados ao estresse glico-oxidativo e impactos deletérios da memória metabólica (PRABHAKAR et al., 2014; GUPTA et al., 2017).

## 2.4 Licopeno

Dentre os compostos bioativos naturais com potencial para associação com a metformina, pode ser citado o licopeno, um carotenoide isômero acíclico do  $\beta$ -caroteno, extremamente insaturado, responsável pela coloração vermelha de tomates e seus produtos processados. Também pode ser encontrado em outros vegetais (melancia, mamão, goiaba) e em alguns microrganismos. Depois de absorvido, o licopeno é transportado no sangue via lipoproteína LDL, podendo atuar como potente antioxidante *in vivo* (AGARWAL e RAO, 1998).

**Figura 2.** Estrutura química do licopeno.



Fonte: adaptado de Cefali et al., 2009.

Estudos têm evidenciado o potencial do licopeno em atenuar diversas alterações observadas em animais sob modelos experimentais de DM, obesidade e resistência à insulina, incluindo dislipidemia, hiperglicemia e estresse oxidativo. Zidani e colaboradores (2017) demonstraram que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (modelo de obesidade/resistência insulínica) e tratados durante 12 semanas com extrato de tomate (rico em licopeno) apresentaram elevação nos níveis plasmáticos do carotenoide, acompanhada de diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol, colesterol-HDL e triacilgliceróis, além de diminuição da resistência insulínica e da intolerância à glicose. Bernal et al. (2013) observaram diminuição no desenvolvimento de esteatose hepática acompanhada de redução nos níveis séricos de triacilgliceróis e nos níveis urinários de isoprostano (marcador de peroxidação lipídica) de ratos em dieta hiperlipídica/hipercolesterolêmica tratados com suco de tomate (fonte natural de licopeno) por 5 semanas.

Em estudo de Assis e colaboradores (2017), ratos em modelo de DM estreptozotocínico foram tratados durante 50 dias com misturas de curcumina e carotenoides. O tratamento com curcumina + licopeno preservou os benefícios alcançados com os bioativos isolados, ou até mesmo apresentou efeitos aditivos: houve redução em biomarcadores de distúrbios do metabolismo de carboidratos e lipídeos (efeitos da

curcumina), aumento nos níveis de HDL-colesterol (efeito do licopeno), diminuição em marcadores de lesão oxidativa e aumento nas defesas antioxidantes endógenas (efeitos da curcumina e do licopeno), com ênfase na enzima antioxidante paraoxonase 1 (PON 1).

Zhu e colaboradores (2020) observaram que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com licopeno por 12 semanas apresentaram menor ganho de peso corporal, diminuição da resistência insulínica, aumento da tolerância à glicose, além de diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol total, triacilgliceróis, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar as alterações em parâmetros fisio-metabólicos e biomarcadores do estresse glico-oxidativo em camundongos submetidos a um sistema-modelo *in vivo* de obesidade/resistência à insulina e tratados com metformina e licopeno, sozinhos ou co-administrados.

#### 3.2. Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos do tratamento de camundongos submetidos a um sistema-modelo *in vivo* de obesidade/resistência à insulina com metformina e/ou licopeno em sistema lipídico nanoestruturado, monitorando:

- Parâmetros fisiológicos: peso corporal, ingestão alimentar, ingestão calórica e massas de tecidos adiposos brancos (epididimal e retroperitoneal) e marrom (interescapular), músculos esqueléticos *gastrocnemius*, fígado, rins e coração;
- Níveis plasmáticos de biomarcadores relacionados ao metabolismo de carboidratos e lipídeos, função e integridade hepáticas e função renal: glicose, triacilgliceróis, colesterol total, colesterol-HDL, alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), albumina, creatinina e ácido úrico;
- Tolerância oral à glicose e sensibilidade à insulina;
- Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em plasma, fígado e rim;
- Níveis de AGEs fluorescentes em plasma, fígado e rim;
- Atividade da enzima PON 1 em plasma.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Preparação do sistema lipídico nanoestruturado (SLN) contendo metformina e/ou licopeno

O SLN foi sintetizado de acordo com Freitas et al. (2014). Sua constituição é de 5% de óleo de girassol como fase oleosa, 10% de uma mistura de tensoativos [Brij O20 + fosfatidilcolina de soja (2:1)] e 85% de tampão fosfato (pH 7,4) como fase aquosa.

As preparações contendo licopeno e/ou metformina foram produzidas quinzenalmente. Licopeno e metformina foram incorporados, isoladamente ou em associação, à fase oleosa e mistura de tensoativos. Em seguida, a fase aquosa foi adicionada e as misturas foram colocadas em sonicador de haste (Q500 de QSonica®, Newtown, CT, EUA) em modo descontínuo por 25 minutos com intervalos de 30 segundos a cada minuto, com banho de gelo durante todo o processo. Em seguida cada SLN foi centrifugado a 11180 x g por 15 minutos, afim de eliminar partículas liberadas pela haste de titânio do sonicador. Foram obtidas apresentações contendo 9 mg/mL de licopeno e/ou 10 mg/mL de metformina.

Os SLN foram produzidos no Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica, do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP), Câmpus de Araraquara, sob supervisão do Professor Doutor Marlus Chorilli.

### 4.2. Animais, dietas e desenho experimental

Para realização do experimento, foram utilizados camundongos C57BL/6J machos com aproximadamente 22 g (seis semanas de idade) provenientes da Anilab Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda. (Paulínia/SP). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (30 cm x 20 cm x 13 cm) no Biotério do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Câmpus de Araraquara, UNESP, com ciclo de claro/escuro de 12 horas e temperatura de (23°C ± 1°C), sendo alimentados com ração comercial para animais de laboratório (Presence®) e água *ad libitum*.

Após duas semanas de adaptação, os animais passaram a ser alimentados com dietas manipuladas (PragSoluções Biociências, Domeneghrtti & Corrêa LTDA., Jaú/SP), sendo

uma dieta controle (normolipídica) denominada padrão (P; 3,85 kcal/g; 4% de lipídeos) e a outra dieta hiperlipídica (HL; 5,40 kcal/g; 35% de lipídeos).

**Tabela 1.** Composição das dietas padrão (P) e hiperlipídica (HL).

<b>Ingredientes</b>	<b>Dieta Padrão (P) (g /100 g)</b>	<b>Dieta Hiperlipídica (HL) (g /100 g)</b>
Amido	42,75	11,75
Caseína	20	20
Dextrina	13,2	13,2
Sacarose	10	10
Óleo de soja	4	4
Banha	--	31
Celulose	5	5
<b>Mix de minerais <sup>(1)</sup></b>	3,5	3,5
<b>Mix de vitaminas <sup>(2)</sup></b>	1	1
L-cistina	0,30	0,30
Bitartarato de colina	0,25	0,25
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

<sup>(1)</sup> Mix de minerais: cálcio, fósforo, potássio, magnésio, ferro, manganês, selênio, zinco, cromo, níquel, lítio, enxofre, cobre, iodo, molibdênio, silício, cloreto, fluoreto, boro, vanádio. <sup>(2)</sup> Mix de vitaminas: ácido nicotínico, pantotenato de cálcio, piridoxina, tiamina, riboflavina, ácido fólico, vitamina K, D-biotina, vitamina B12, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, colina.

Os animais permaneceram nas dietas P ou HL durante 17 semanas. O peso corporal dos animais foi monitorado semanalmente e a ingestão alimentar foi monitorada diariamente, durante todo o experimento.

Os camundongos foram distribuídos em 6 grupos experimentais (12 animais/grupo):

1. Grupo P: animais alimentados com dieta P e que receberam água por gavagem;
2. Grupo HL: animais alimentados com dieta HL e que receberam água por gavagem;
3. Grupo V: animais alimentados com dieta HL e que receberam veículo (SLN) por gavagem;
4. Grupo M: animais alimentados com dieta HL e tratados com 50 mg/kg de metformina;
5. Grupo L: animais alimentados com dieta HL e tratados com 45 mg/kg de licopeno;

6. Grupo LM: animais alimentados com dieta HL e tratados com 45 mg/kg de licopeno + 50 mg/kg de metformina.

É válido ressaltar que as doses de licopeno e metformina foram estabelecidas com base na literatura e estudos prévios realizados por nosso laboratório. Assim, as doses escolhidas para o experimento foram 45 mg/kg para o licopeno (ASSIS et al., 2017; ZHU; WANG; XU, 2011) e 50 mg/kg para metformina (KIM et al., 2016; LI et al., 2016).

Após 9 semanas de oferecimento das dietas P e HL aos camundongos, e antes do início dos tratamentos, os animais foram pareados utilizando os valores de peso corporal, culminando em valores médios que apresentavam a melhor semelhança possível, o que proporcionou o início do tratamento em condições sem diferença estatística de peso corporal entre os animais alimentados com dieta HL. O pareamento é de extrema importância, pois permite a comparação temporal intra e intergrupos dos efeitos causados pelos tratamentos avaliados. Os tratamentos com água, SLN (veículo), metformina (50 mg/kg; Abhilash Chemicals) em SLN, licopeno (45 mg/kg; Florien) em SLN e metformina + licopeno em SLN foram então iniciados. Todos os tratamentos foram administrados por via oral (gavagem) diariamente, no período da manhã (8 – 9 horas), durante 8 semanas.

Após 6 semanas de tratamentos (15 semanas de experimento) foi realizado o teste de tolerância oral à glicose (TTGO). Os animais foram jejuados por 12 horas e a glicemia foi determinada antes (0 minutos) e depois (15, 30, 60, 90 e 120 minutos) da sobrecarga de glicose (1,5 g/kg; Oxoid ®; via oral), através da obtenção de uma pequena gota de sangue por punção da porção distal da cauda do animal. A glicemia foi determinada com a utilização de um glicosímetro (Abbott, Freestyle Optium ®).

Após 7 semanas de tratamentos (16 semanas de experimento) foi realizado o teste de tolerância à insulina (ITT). Os animais foram jejuados por duas horas e a glicemia foi determinada antes (0 minutos) e depois (15, 30, 45 e 60 minutos) da administração de insulina (0,4 U/kg; Novolin R®; via intraperitoneal), da mesma maneira que no TTGO.

Após 8 semanas de tratamento (17 semanas de experimento) houve a finalização do experimento. Para isso, os animais foram jejuados por 6 horas, sendo, em seguida, anestesiados com uma mistura de quetamina (90 mg/kg; Dopalen ®) e xilazina (16 mg/kg; Anasedan ®). Depois de anestesiados, metade dos animais de cada grupo recebeu insulina (3,8 U/kg; Novolin R®; via intraperitoneal) para posterior estudo dos níveis de fosforilação de proteína quinase B (AKT; intermediário da sinalização insulínica), enquanto a outra

metade dos animais recebeu solução salina (NaCl 0,85%; Synth ®; via intraperitoneal) para serem o controle do mesmo estudo. Após 10 minutos da administração de insulina ou salina, a eutanásia dos animais foi realizada via punção cardíaca e exsanguinação total. O sangue foi coletado em microtubo de centrifugação na presença do anticoagulante heparina (Hemofol ®). As amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas, obtendo-se o plasma para posteriores análises. Além do sangue, os tecidos adiposos brancos (epididimal e retroperitoneal) e marrom (interescapular), fígado, rins, coração e músculo esquelético *gastrocnemius* foram removidos, pesados e armazenados para análises posteriores. A pata traseira direita também foi removida para medida do tamanho da tíbia, após sua manutenção durante 12 horas em solução de KOH 2% (Synth ®) a 37°C; a medida foi utilizada para correção das massas dos tecidos e órgãos retirados na eutanásia.

O experimento foi realizado de acordo com os princípios regulamentados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, Brasil) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP, Câmpus de Araraquara/SP, protocolo CEUA/FCF/CAR n° 43/2018 (Anexo 1).

### **4.3 Biomarcadores do metabolismo de carboidratos, lipídeos, função e integridade hepáticas e função renal**

Para as determinações dos biomarcadores plasmáticos relacionados ao metabolismo de carboidratos, lipídeos, função e integridade hepática e função renal foram utilizados kits comerciais da Labtest Diagnóstica S. A. e Biotécnica, Biotecnologia Avançada Ltda.

- Glicose – método da glicose oxidase (TRINDER, 1969):  
A reação de oxidação da glicose é catalisada pela enzima glicose oxidase, gerando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4 aminoantipirina e fenol (reação catalisada pela peroxidase), formando antipirilquinonimina, de coloração vermelha, cuja intensidade de cor é lida a 505 nm após 10 minutos de reação, sendo proporcional à concentração de glicose na amostra. Os resultados foram expressos em mg/dL.
- Triacilgliceróis – método enzimático de reações acopladas (RIFAI e WARNICK, 2006):  
A lipase lipoproteica catalisa a hidrólise do triacilglicerol, liberando ácido graxo e glicerol, este último é convertido em glicerol-3-fosfato pela ação da gliceroquinase.

O glicerol-3-fosfato é oxidado pela enzima glicerofosfato oxidase a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio. Esta reação é acoplada a outra catalisada pela peroxidase, onde o peróxido de hidrogênio reage com 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, produzindo quinoneimina (vermelha), cuja intensidade de cor é lida a 505 nm após 10 minutos de reação, sendo proporcional à concentração de triacilglicerol na amostra. Os resultados foram expressos em mg/dL.

- Colesterol total – método da colesterol oxidase (MROZ, 2003):

Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela enzima colesterol esterase gerando ácidos graxos e colesterol livre, o qual é oxidado pela colesterol oxidase à colest-4-enona e peróxido de hidrogênio. Este último reage com 4-aminoantipirina e fenol (reação catalisada pela peroxidase), formando antiúrilquinonimina, de coloração vermelha, cuja intensidade de cor é lida a 505 nm após 10 minutos de reação, sendo proporcional à concentração de colesterol total na amostra. Os resultados foram expressos em mg/dL.

- Colesterol-HDL – método direto (WARNICK e WOOD, 1995):

Primeiramente, um detergente específico solubiliza seletivamente o colesterol das lipoproteínas do tipo não-HDL. O colesterol dessas lipoproteínas é em seguida oxidado pela colesterol oxidase na presença de acelerador, e o peróxido de hidrogênio formado é consumido em uma reação com dissulfobutilmetatoluidina (DSBmT) na presença de peroxidase, resultando em um produto incolor. Em seguida, outro detergente específico solubiliza o colesterol das lipoproteínas do tipo HDL. O colesterol é então hidrolisado pela colesterol esterase e oxidado pela colesterol oxidase, com acoplamento à reação com 4-aminoantipirina e cromogênio DSBmT na presença de peroxidase, gerando um produto cuja intensidade de cor é lida a 500 nm após 10 minutos, sendo proporcional à concentração de colesterol-HDL na amostra. Os resultados foram expressos em mg/dL.

- Alanina aminotransferase (ALT) – monitoramento cinético acoplado à lactato desidrogenase (WROBLEWSKI e LADUE, 1956):

A alanina aminotransferase (ALT) presente na amostra catalisa a transferência do grupo amino da alanina para o  $\alpha$ -cetoglutarato, formando glutamato e piruvato, O piruvato é reduzido a lactato pela enzima lactato desidrogenase, às custas de oxidação de NADH a NAD<sup>+</sup>. Ocorre, portanto, uma diminuição no valor de absorvância em

340 nm (após um e três minutos), que é diretamente proporcional à atividade de ALT na amostra. Os resultados foram expressos em U/L.

- Fosfatase alcalina (ALP) – monitoramento da hidrólise de p-nitrofenolfosfato (SCANDINAVIAN SOCIETY FOR CLINICAL CHEMISTRY, 1974):

A fosfatase alcalina (ALP) presente na amostra hidrolisa o p-nitrofenilfosfato em pH alcalino, gerando fosfato inorgânico e p-nitrofenol, cuja intensidade de cor é lida a 590 nm após 10 minutos de reação. A quantidade de p-nitrofenol produzida é diretamente proporcional à atividade da enzima. Os resultados foram expressos em U/L.

- Creatinina – método do picrato alcalino (COOK, 1971):

A creatinina reage com picrato alcalino, formando picrato de creatinina, de coloração vermelha, cuja intensidade de cor é lida a 510 nm após 30 e 90 segundos, sendo a diferença entre os valores de absorvância proporcional à concentração de creatinina na amostra. Os resultados foram expressos em mg/dL.

- Ácido úrico – método da uricase (TRINDER, 1969):

O ácido úrico é oxidado pela ação da enzima uricase, formando alantoína e peróxido de hidrogênio. Esta reação é acoplada a outra catalisada pela peroxidase, onde o peróxido de hidrogênio reage com 4-aminoantipirina e cromogênio DHBS, produzindo antipirilquinonimina (vermelha), cuja intensidade de cor é lida a 505 nm após 5 minutos de reação, sendo proporcional à concentração de ácido úrico presente na amostra. Os resultados foram expressos em mg/dL.

- Albumina – método do verde de bromocresol (BARTHOLOMEW e DELANEY, 1966):

A albumina presente na amostra liga-se ao corante complexo verde de bromocresol, desviando seu pico de absorvância máxima. A cor gerada após 2 minutos de reação é lida a 630 nm, sendo proporcional à concentração de albumina na amostra. Os resultados foram expressos em g/dL.

#### **4.4 Biomarcadores de peroxidação lipídica**

##### **4.4.1 Preparo de amostras de fígado e rim**

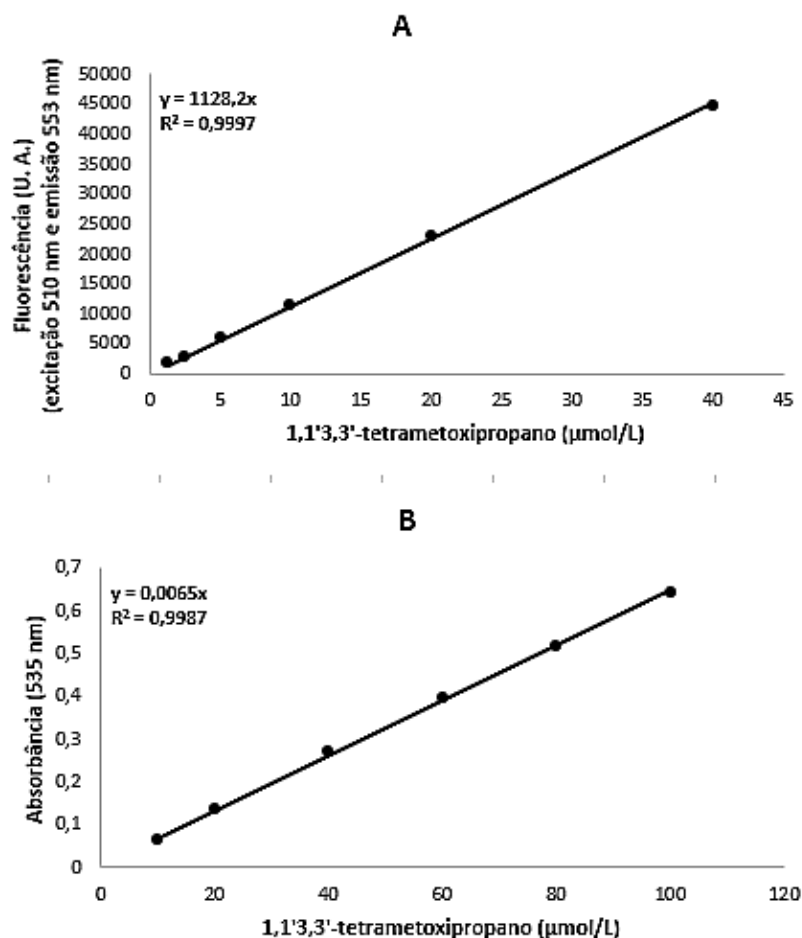
Amostras de fígado e rim foram homogeneizadas na proporção de 250 mg de tecido para 0,1 mL de solução de KCl 1,15% (Reagen). Em seguida, os homogenatos foram

centrifugados a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

#### 4.4.2 Determinação dos níveis de TBARS

Amostras de plasma e de sobrenadantes de fígado e rim foram desproteinizadas (PILZ; MEINEKE; GLEITER, 2000) para serem utilizadas na determinação dos níveis de TBARS (KOHN e LIVERSEDGE, 1944). Os níveis do complexo formado foram monitorados espectrofotometricamente a 535 nm (fígado e rim) ou fluorimetricamente nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 510 e 553 nm, respectivamente. Foi realizada uma curva de calibração com 1,1'3,3'-tetrametoxipropano (Figura 3) para a quantificação de TBARS nas amostras. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de TBARS/L (plasma) ou  $\mu\text{mol}$  de TBARS/g de tecido (fígado e rim).

**Figura 3.** Curva de calibração de 1,1'3,3'-tetrametoxipropano e leitura realizada em espectrofluorímetro (A) e em espectrofotômetro (B).



Fonte: própria do autor

#### **4.5 Atividade da enzima paraoxonase 1 (PON 1)**

A atividade da enzima paraoxonase 1 (PON 1) no plasma foi determinada via hidrólise de paraoxon e subsequente liberação de p-nitrofenol (COSTA et al., 1990; ASSIS et al., 2017). O ensaio foi constituído de 10 µL de plasma em tampão Tris-HCl (15 mM; pH 8,5), contendo CaCl<sub>2</sub> (0,15 mM) e NaCl (0,3 M) e paraoxon (1,2 mM). A formação de p-nitrofenol foi monitorada a 37°C por 5 minutos e os resultados calculados assumindo o coeficiente de extinção molar do produto de 18000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (RICHTER et al., 2008). A atividade de PON 1 foi expressa em unidades (U; µmoL paraoxon hidrolisado/min) por miligrama de colesterol-HDL.

#### **4.6 Biomarcadores de glicação avançada**

##### **4.6.1 Estimativa de AGEs em plasma**

Amostras de plasma foram tratadas com clorofórmio (1,2 M), hidróxido de sódio (NaOH; 0,1 M) e ácido tricloroacético (TCA; 0,12 M) (ZILIN et al., 2001). As amostras tratadas foram então homogeneizadas, mantidas durante 30 minutos a temperatura entre 8 e 10°C e em seguida centrifugadas a 10000 g durante 10 minutos a 10°C. A fase aquosa obtida foi transferida para uma microplaca e os AGEs fluorescentes foram estimados pela medida da fluorescência com comprimentos de onda de excitação e emissão de 370 e 440 nm, respectivamente. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (U.A.)/mg de proteína.

##### **4.6.2 Estimativa de AGEs em fígado**

Amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) na proporção de 100 mg de tecido para 1 mL de tampão e centrifugadas a 12860 g durante 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram tratados com clorofórmio (2,4 M), hidróxido de sódio (NaOH; 0,1 M) e ácido tricloroacético (TCA; 0,12 M) (Zilin et al., 2001). Os sobrenadantes tratados foram então homogeneizados, mantidos durante 30 minutos a temperatura entre 8 e 10°C e em seguida centrifugados a 10000 g durante 10 minutos a 10°C. A fase aquosa obtida foi transferida para uma microplaca e os AGEs fluorescentes foram estimados pela medida da fluorescência com comprimentos de onda de excitação e emissão

de 370 e 440 nm, respectivamente. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (U.A.)/mg de proteína.

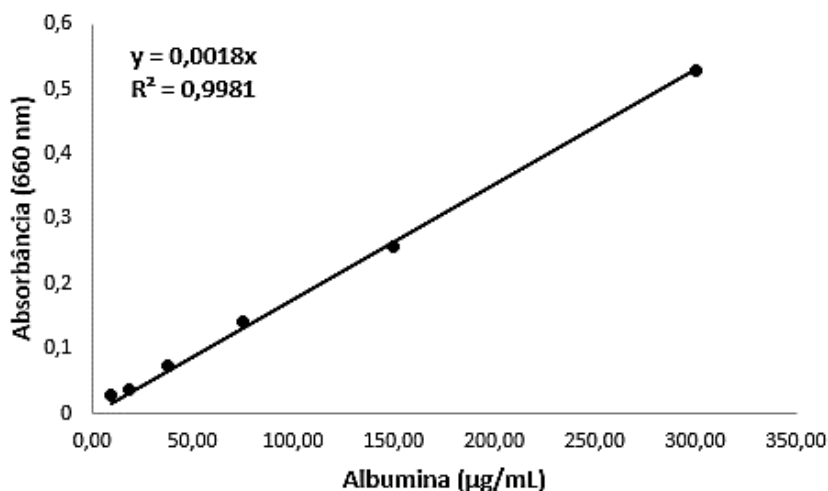
#### 4.6.3 Estimativa dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) em rim

Amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) na proporção de 100 mg de tecido para 1 mL. Os homogenatos obtidos foram tratados com hidróxido de sódio (NaOH; 0,1 M), homogeneizados e centrifugados a 10000 g durante 10 minutos a 10°C. (POKUPEC et al., 2003). O sobrenadante obtido foi transferido para uma microplaca e os AGEs fluorescentes foram estimados pela medida da fluorescência com comprimentos de onda de excitação e emissão de 370 e 440 nm, respectivamente. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (U.A.)/mg de proteína.

#### 4.7 Dosagem de proteínas totais em plasma e sobrenadantes de fígado e rins

As concentrações de proteínas no plasma e nos sobrenadantes de fígado e rim foram determinadas segundo Lowry et al. (1951). O reagente Folin-Ciocalteu (mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico) sofre redução quando reage com proteínas, na presença de cobre (II) produzindo um cromóforo azul monitorado espectrofotometricamente a 660 nm. Foi realizada uma curva de calibração com albumina sérica bovina (BSA) (Figura 4) para a quantificação de proteínas nas amostras.

**Figura 4.** Curva de calibração de albumina sérica bovina (BSA) para dosagem de proteínas totais em plasma e em sobrenadantes de fígado e rim.



Fonte: própria do autor.

#### **4.8 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Os dados foram submetidos a análise de variância uma via (ANOVA) seguido por teste Newman-Keuls para comparação dos resultados. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . O programa utilizado nas análises estatísticas foi o GraphPad Prism® 6 (Version 6.01, GraphPad Software, Inc, USA).

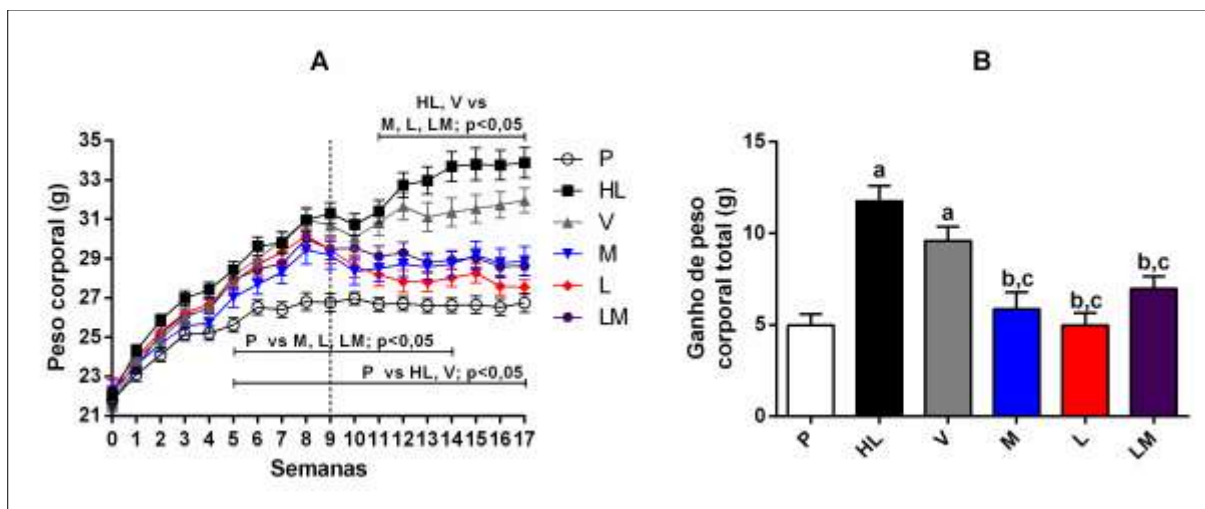
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Parâmetros fisiológicos

Antes do início da oferta das dietas P ou HL, observou-se que os camundongos apresentavam valores médios de peso corporal semelhantes entre si (Figura 5A). A partir da 5ª semana de oferta das dietas, todos os animais alimentados com a dieta HL apresentaram aumento significativo no peso corporal semanal, quando comparados com animais em dieta P (Figura 3A). Após 17 semanas, animais dos grupos HL e V apresentaram um aumento ainda mais evidente no peso corporal, em comparação ao grupo P. Ao final do experimento, animais HL e V apresentaram aumento de 2,4 vezes (grupo HL) e 2 vezes (grupo V) no ganho de peso corporal total, em comparação aos animais do grupo P (Figura 5B). Estes resultados permitem afirmar que a oferta de dieta HL é capaz de promover aumento no ganho de peso corporal dos animais, permitindo assim o desenvolvimento da obesidade.

Com relação aos impactos dos tratamentos no peso corporal dos camundongos, animais em dieta HL pertencentes aos grupos M (tratados com metformina), L (tratados com licopeno) e LM (tratados com metformina+licopeno) apresentaram menores valores médios de peso corporal, quando comparados aos animais do grupo HL (Figura 5A), especialmente a partir da 2ª semana de tratamento (11ª semana de experimento), culminando em menores valores de ganho de peso corporal total, de 56% (grupo M), 64% (grupo L) e 47% (grupo LM), em relação aos animais do grupo HL (Figura 5B). Assim, pode-se sugerir que todos os tratamentos foram capazes de diminuir o ganho de peso corporal em animais mantidos em dieta HL (Figura 5).

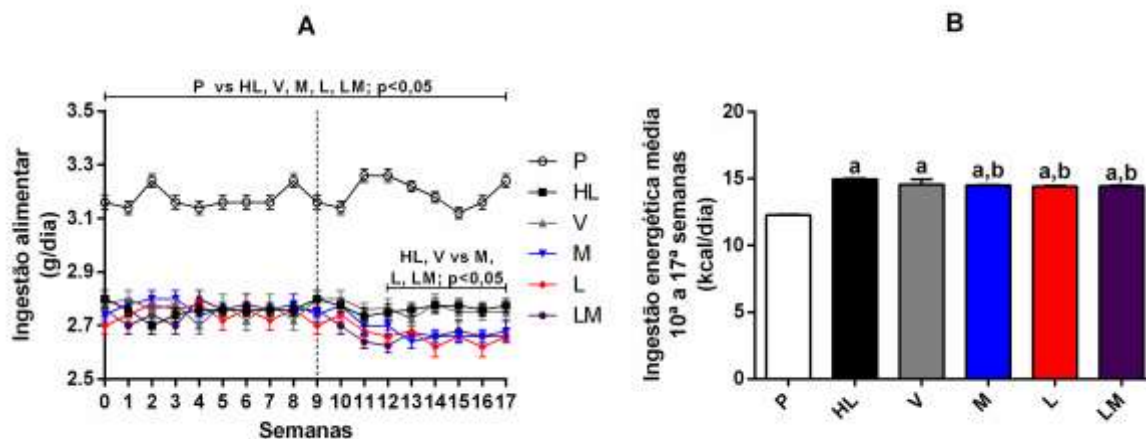
**Figura 5.** Evolução do peso corporal (g) (A) e ganho de peso corporal total (g) (B) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com metformina e/ou licopeno.



Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas: a, diferenças com P; b, diferenças com HL; c, diferenças com V ( $p < 0,05$ ). Fonte: própria do autor.

Todos os animais alimentados com dieta HL apresentaram uma ingestão alimentar diária menor em relação a animais alimentados com dieta P (Figura 6A), ao longo de todo o período experimental. Apesar dos menores valores de ingestão alimentar, todos os animais em dieta HL, não tratados ou tratados, apresentaram maiores valores de ingestão energética média, em comparação aos animais mantidos em dieta P (Figura 6B), tendo em vista que a dieta HL possui 5,40 kcal/g de ração, enquanto a dieta P possui 3,85 kcal/g de ração. Após o início dos tratamentos, houve uma discreta diminuição na ingestão alimentar nos animais mantidos em dieta HL e tratados com metformina, licopeno ou licopeno+metformina, especialmente a partir da 12<sup>a</sup> semana de experimento (o equivalente à 4<sup>a</sup> semana após o início dos tratamentos) (Figura 6A). Consequentemente, os animais desses grupos (M, L e LM) também apresentaram uma discreta diminuição na ingestão energética média, em relação a animais do grupo HL (Figura 6B).

**Figura 6.** Ingestão alimentar (g/dia) (A) e ingestão energética média (a partir da 10<sup>a</sup> semana de experimento) (kcal/dia) (B) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com metformina e/ou licopeno.

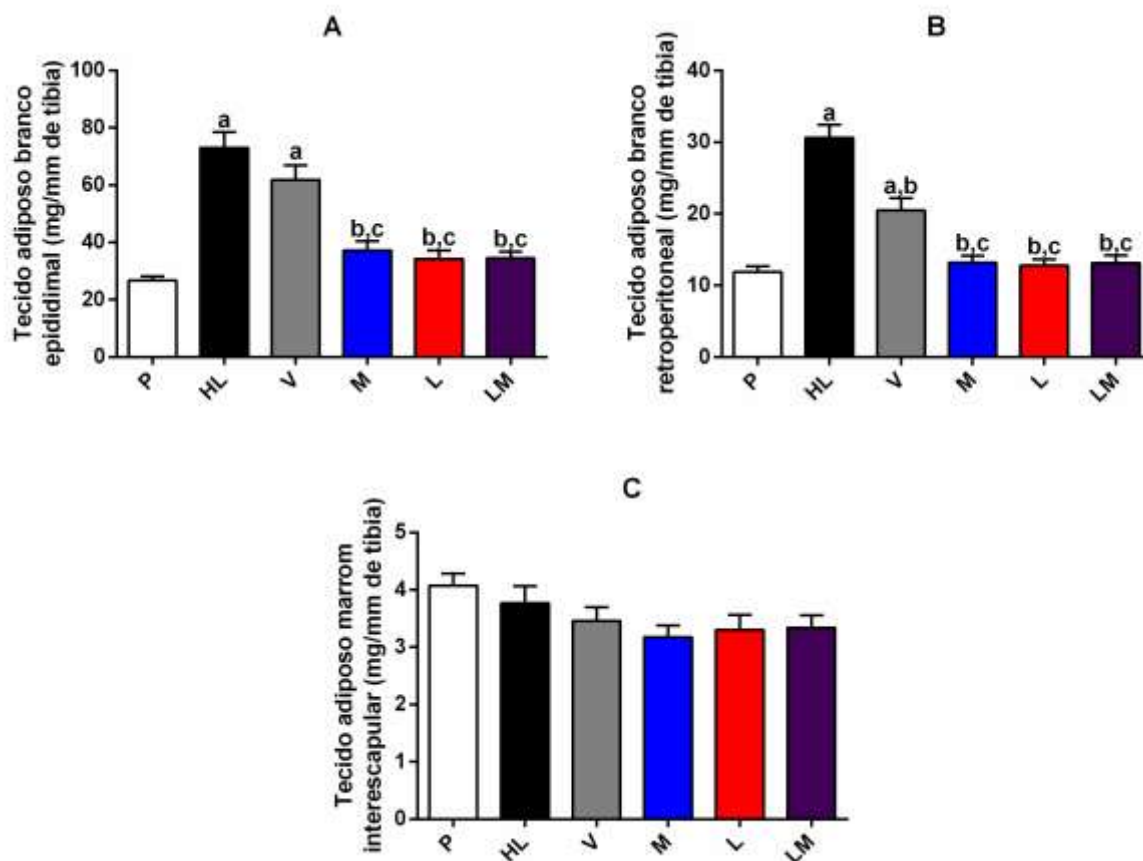


Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas: a, diferenças com P; b, diferenças com HL ( $p < 0,05$ ). Fonte: própria do autor.

Corroborando o perfil de resposta observado no peso corporal dos animais, foram observados aumentos significativos nas massas dos tecidos adiposos brancos (epididimal e retroperitoneal) nos animais do grupo HL, em comparação às massas adiposas dos animais em dieta P (Figuras 7A e 7B). Animais do grupo V (tratados com veículo, SLN) também apresentaram aumentos nas massas dos tecidos adiposos epididimal (2,3 vezes) e retroperitoneal (1,9 vezes), em relação às massas adiposas de animais do grupo P. Estes resultados reiteram a instalação da obesidade nos animais alimentados com dieta HL.

Os tratamentos de animais em dieta HL com metformina e licopeno, sozinhos ou co-administrados, foram capazes de promover diminuição nas massas dos tecidos adiposos brancos, de 49% (grupo M), 53% (grupo L) e 53% (grupo LM) no tecido adiposo epididimal, e de 57% (grupo M), 58% (grupo L) e 57% (grupo LM) no tecido adiposo retroperitoneal, em relação às massas de tecidos adiposos de animais do grupo HL (Figuras 7A e 7B). Observou-se também uma tendência de diminuição nas massas de tecido adiposo marrom interescapular de animais dos grupos M, L e LM, no entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 7C).

**Figura 7.** Massas (mg) dos tecidos adiposos epididimal (A), retroperitoneal (B) e marrom (C) corrigidas pelo comprimento de tibia (mm) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com metformina e/ou licopeno.



Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas: a, diferenças com P; b, diferenças com HL; c, diferenças com V ( $p < 0,05$ ). Fonte: própria do autor.

As massas de coração, músculo esquelético *gastrocnemius* e o comprimento ósseo da tibia não sofreram alterações, seja pela oferta das diferentes dietas, seja pelos diferentes tratamentos (Tabela 2). Observou-se, porém, um discreto aumento nas massas de fígado em animais do grupo HL (animais em dieta HL, não tratados) e nas massas de rim em animais dos grupos HL (animais em dieta HL, não tratados) e V (animais em dieta HL, tratados com veículo) quando comparadas às respectivas massas dos tecidos de animais do grupo P.

**Tabela 2.** Massas (mg) de fígado, rim, coração e músculo esquelético *gastrocnemius* corrigidos pelo comprimento de tíbia (mm) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com metformina e/ou licopeno.

Grupos	Fígado (mg/mm)	Rim (mg/mm)	Coração (mg/mm)	Músculo <i>Gastrocnemius</i> (mg/mm)	Tíbia (mm)
P	60,344 ± 1,222	9,174 ± 0,560	6,960 ± 0,205	8,084 ± 0,079	17,798 ± 0,141
HL	66,607 ± 1,832 (a)	11,235 ± 0,636 (a)	7,422 ± 0,150	8,415 ± 0,174	17,950 ± 0,164
V	60,659 ± 2,079 (b)	10,103 ± 0,766 (a)	7,107 ± 0,172	8,107 ± 0,140	17,820 ± 0,090
M	57,372 ± 1,805 (b)	8,781 ± 0,579 (b)	7,127 ± 0,160	8,116 ± 0,103	17,682 ± 0,083
L	57,083 ± 1,380 (b)	8,817 ± 0,719 (b)	7,037 ± 0,140	8,158 ± 0,103	17,453 ± 0,010
LM	57,689 ± 1,516 (b)	8,542 ± 0,324 (b)	7,143 ± 0,180	8,377 ± 0,156	17,749 ± 0,152

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas: a, diferenças com P; b, diferenças com HL ( $p < 0,05$ ). Fonte: própria do autor

## 5.2 Parâmetros bioquímicos plasmáticos

Animais dos grupos HL e V apresentaram aumentos significativos nos níveis plasmáticos de colesterol total e colesterol-HDL e diminuição nos níveis plasmáticos de triacilgliceróis, em relação aos valores encontrados em animais do grupo P (Tabela 3). Os tratamentos de animais alimentados com dieta HL com metformina e/ou licopeno foram capazes de diminuir os níveis plasmáticos de colesterol total e de colesterol-HDL, quando comparados com animais HL (Tabela 3). Também houve uma tendência de diminuição nos níveis plasmáticos de triacilgliceróis de animais tratados com veículo (V) e animais tratados com metformina e/ou licopeno (M, L e LM) em relação aos animais do grupo HL, no entanto, esta diminuição não foi estatisticamente significativa (Tabela 3).

Os níveis plasmáticos de creatinina não foram diferentes entre os grupos experimentais (Tabela 3). Também não foram observadas diferenças quanto aos níveis plasmáticos de ácido úrico de animais dos grupos P, HL e V, entretanto animais em dieta HL e tratados com metformina e/ou licopeno (grupos M, L e LM) apresentaram discreta diminuição nos níveis deste biomarcador (Tabela 3).

Observou-se um aumento nos níveis plasmáticos de ALT e de ALP (biomarcadores de injúria hepatocelular) em animais dos grupos HL e V quando comparados ao grupo P. Os tratamentos com metformina e/ou licopeno promoveram diminuição significativa nos níveis

de ALT e ALP, em relação aos animais HL. Os níveis plasmáticos de albumina (biomarcador de função hepática) não foram diferentes entre os grupos experimentais (Tabela 3).

**Tabela 3.** Níveis plasmáticos de colesterol total (mg/dL), colesterol-HDL (mg/dL), triacilgliceróis (mg/dL), creatinina (mg/dL), ácido úrico (mg/dL), albumina (g/dL), ALT (U/L) e ALP (U/L) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com metformina e/ou licopeno.

Grupos	Colesterol total (mg/dL)	Colesterol-HDL (mg/dL)	Triacilgliceróis (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Ácido úrico (mg/dL)	Albumina (g/dL)	ALT (U/L)	ALP (U/L)
	98,3 ± 3,25				0,409 ± 0,029		24,8 ± 2,29	41,7 ± 1,96
<b>P</b>	137,3 ± 3,28 (a)	79,3 ± 2,51	52,1 ± 2,06	0,155 ± 0,003	0,394 ± 0,025	2,13 ± 0,021	32,9 ± 2,47 (a)	54,6 ± 3,49 (a)
<b>HL</b>	127,8 ± 4,88 (a)	108,6 ± 2,42 (a)	43,2 ± 2,05 (a)	0,152 ± 0,002	0,330 ± 0,029	2,12 ± 0,028	27,3 ± 2,35 (a)	52,3 ± 1,74 (a)
<b>V</b>	107,2 ± 4,33 (b,c)	100,6 ± 2,33 (a)	40,0 ± 2,37 (a)	0,157 ± 0,004	0,321 ± 0,030 (a,b)	2,14 ± 0,025	20,5 ± 1,22 (b,c)	42,4 ± 2,60 (b,c)
<b>M</b>		87,9 ± 4,00 (b,c)	34,8 ± 3,71 (a)	0,153 ± 0,003		2,09 ± 0,043	19,5 ± 1,39 (b,c)	42,0 ± 2,75 (b,c)
<b>L</b>	108,3 ± 3,13 (b,c)	74,8 ± 7,57 (b,c)	39,0 ± 2,97 (a)	0,158 ± 0,004	0,280 ± 0,013 (a,b)	2,08 ± 0,028	21,5 ± 1,67 (b,c)	45,8 ± 1,08 (b,c)
<b>LM</b>	110,5 ± 3,16 (b,c)	80,7 ± 3,84 (b,c)	41,0 ± 3,06 (a)	0,153 ± 0,003	0,271 ± 0,009 (a,b)	2,12 ± 0,027		

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com  $p < 0,05$ . a, diferenças com P; b, diferenças com HL; c, diferenças com V ( $p < 0,05$ ). Fonte: própria do autor.

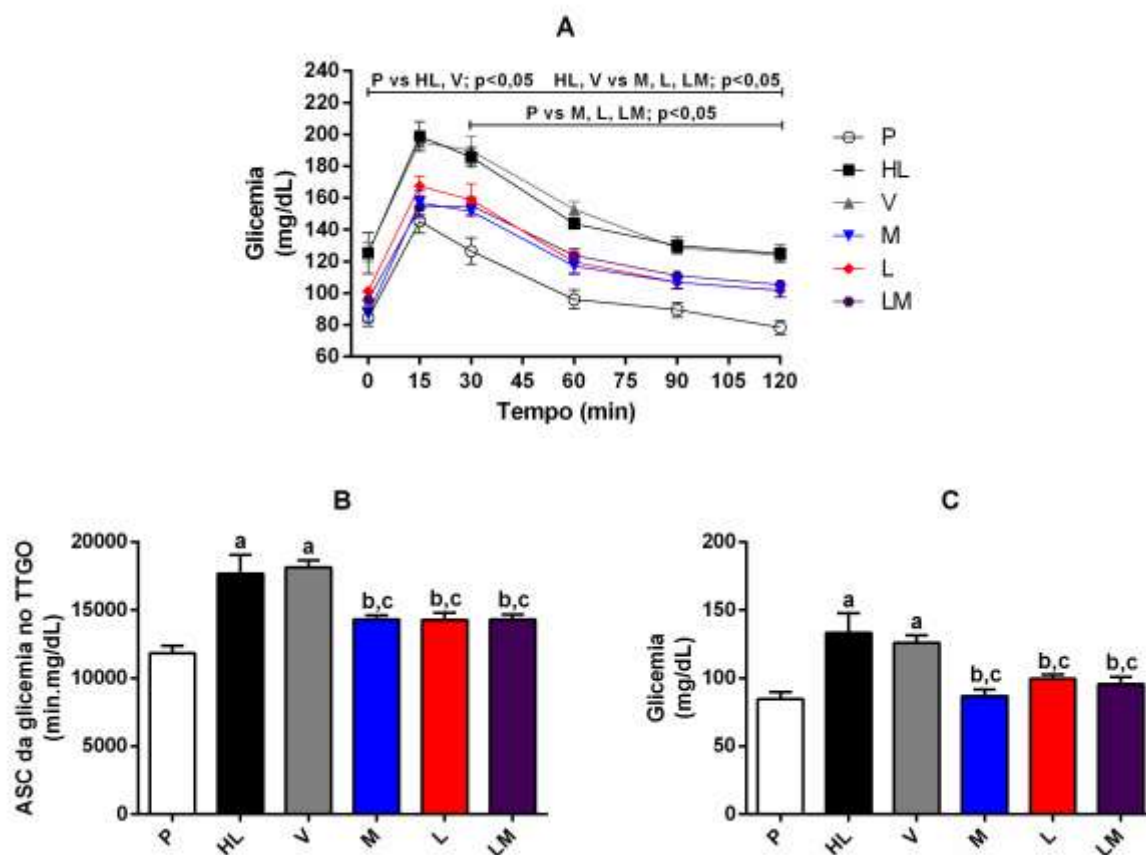
### 5.3 Estudo da tolerância à glicose oral e da sensibilidade à insulina

No teste de tolerância à glicose oral (TTGO), observou-se aumento na glicemia de jejum (12 horas) de animais HL e animais V, em relação aos animais P, sendo este aumento de 59% e 50%, respectivamente (Figura 8C). Após a sobrecarga de glicose, animais dos grupos HL e V apresentaram picos glicêmicos maiores, em 37% e 34%, respectivamente, em comparação aos valores encontrados em animais do grupo P. Após 120 minutos da sobrecarga de glicose, animais dos grupos HL e V permaneceram com valores de glicemia superiores em relação aos animais do grupo P (60% e 59%, respectivamente) (Figura 6A). Tais resultados contribuíram para o aumento observado na área sob a curva (ASC) da glicemia no TTGO, de 50% para animais do grupo HL e 53% para animais do grupo V, quando comparados com a ASC do grupo P (Figura 8B). Em conjunto, estes resultados demonstram a instalação do quadro de intolerância à glicose em animais dos grupos HL e V.

Todos os tratamentos (licopeno ou metformina, sozinhos ou co-administrados) promoveram uma melhoria significativa na tolerância à glicose em animais mantidos em dieta HL (Figura 8A), sendo observada diminuição de 19% na ASC da glicemia no TTGO de todos os grupos tratados (Figura 8B). Animais dos grupos M, L e LM apresentaram diminuição de 36% (grupo M), 26% (grupo L) e 29% (grupo LM) na glicemia de jejum (12 horas) (Figura 5C), e diminuição de 21% (grupo M), 16% (grupo L) e 23% (grupo LM) no pico glicêmico após a sobrecarga de glicose (Figura 8A). Após 120 minutos da sobrecarga de glicose, animais tratados com metformina e/ou licopeno apresentaram, ainda, valores de glicemia 17% menores em relação aos valores observados em animais HL, não tratados (Figura 8A).

Assim, podemos inferir que os tratamentos com metformina, licopeno e licopeno+metformina foram capazes de melhorar significativamente a tolerância à glicose de animais alimentados com dieta HL.

**Figura 8.** Teste de tolerância à glicose oral (TTGO) (A), área sob a curva (ASC) da glicemia no TTGO (B) e glicemia de jejum de 12 horas (C) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com metformina e/ou licopeno.



Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas: a, diferenças com P; b, diferenças com HL; c, diferenças com V ( $p < 0,05$ ). Fonte: própria do autor.

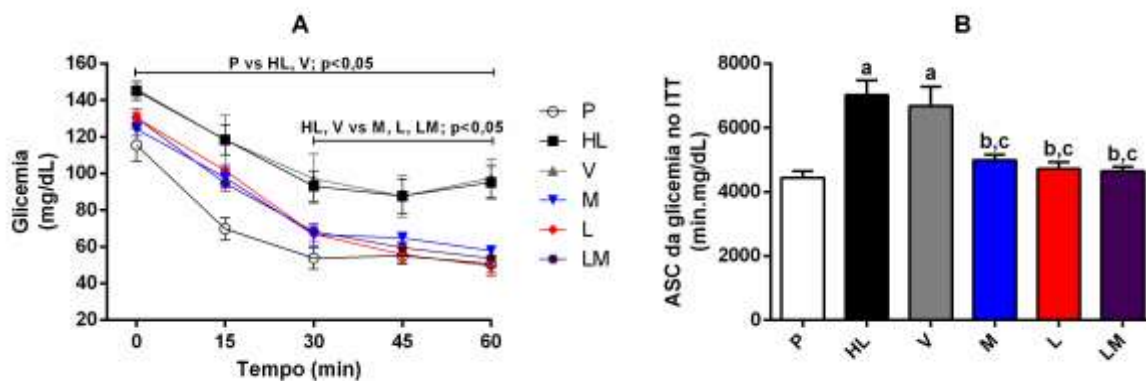
Corroborando o estabelecimento da intolerância à glicose, observou-se uma diminuição na sensibilidade à insulina em camundongos dos grupos HL e V, os quais apresentaram níveis glicêmicos significativamente maiores em relação aos animais do grupo P, em todos os tempos monitorados no teste de tolerância à insulina (ITT) (Figura 9A). No ITT, a glicemia do tempo 0 minutos (isto é, antes do desafio com insulina) corresponde aos valores de glicemia no estado alimentado. Animais dos grupos HL e V apresentaram valores de glicemia no tempo 0 maiores (27%) em relação aos animais do grupo P (Figura 9A). Animais do grupo P apresentaram uma média de glicemia no tempo 0 de  $115,5 \pm 8,68$  mg/dL e, após o desafio com insulina, os níveis glicêmicos sofreram rápida diminuição, atingindo  $50,6 \pm 4,77$  mg/dL após 60 minutos da administração de insulina. Já em animais dos grupos

HL e V, observou-se uma média de glicemia no tempo 0 de  $146,0 \pm 5,08$  mg/dL (grupo HL) e  $146,0 \pm 2,73$  mg/dL (grupo V); após 45 minutos do desafio com insulina, os níveis glicêmicos dos animais de ambos os grupos atingiram seus valores mínimos de  $87,7 \pm 8,34$  mg/dL (grupo HL) e  $87,6 \pm 8,53$  mg/dL (grupo V); entretanto, após 60 minutos do desafio com insulina, os valores médios de glicemia foram de  $95,2 \pm 8,91$  mg/dL (grupo HL) e  $97,5 \pm 8,53$  mg/dL (grupo V) (Figura 9A); em ambos os tempos, os valores médios de glicemia de animais HL e V foram maiores que aqueles observados em animais P. Estes resultados de glicemia no ITT contribuíram para o aumento na ASC da glicemia no ITT de animais dos grupos HL (58%) e V (51%), em relação aos valores observados em animais do grupo P (Figura 9B), reiterando a diminuição na sensibilidade à insulina apresentada pelos animais dos grupos HL e V.

Todos os tratamentos (licopeno e metformina, sozinhos ou co-administrados) promoveram melhoria significativa na sensibilidade à insulina de animais mantidos em dieta HL (Figura 9A). Animais dos grupos M (alimentados com dieta HL e tratados com metformina), L (alimentados com dieta HL e tratados com licopeno) e LM (alimentados com dieta HL e tratados com licopeno + metformina) apresentaram níveis glicêmicos 27% menores em relação a animais do grupo HL 30 minutos após o desafio com insulina, e diminuição nos valores de glicemia de 39% (grupo M), 48% (grupo L) e 44% (grupo LM), 60 minutos após o desafio, alcançando valores de glicemia semelhantes aos encontrados em animais do grupo P (Figura 9A). Tais resultados contribuíram para a diminuição da ASC da glicemia no ITT de animais dos grupos M (29%), L (33%) e LM (34%), quando comparados aos animais do grupo HL (Figura 9B).

Assim, os tratamentos com metformina, licopeno e licopeno+metformina promoveram melhoria na sensibilidade à insulina em animais alimentados com dieta HL.

**Figura 9.** Teste de tolerância à insulina (ITT) (A) e área sob a curva (ASC) da glicemia no ITT (B) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com metformina e/ou licopeno.



Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas: a, diferenças com P; b, diferenças com HL; c, diferenças com V ( $p < 0,05$ ). Fonte: própria do autor.

#### 5.4 Parâmetros relacionados ao estresse glico-oxidativo e potencial antioxidante em plasma

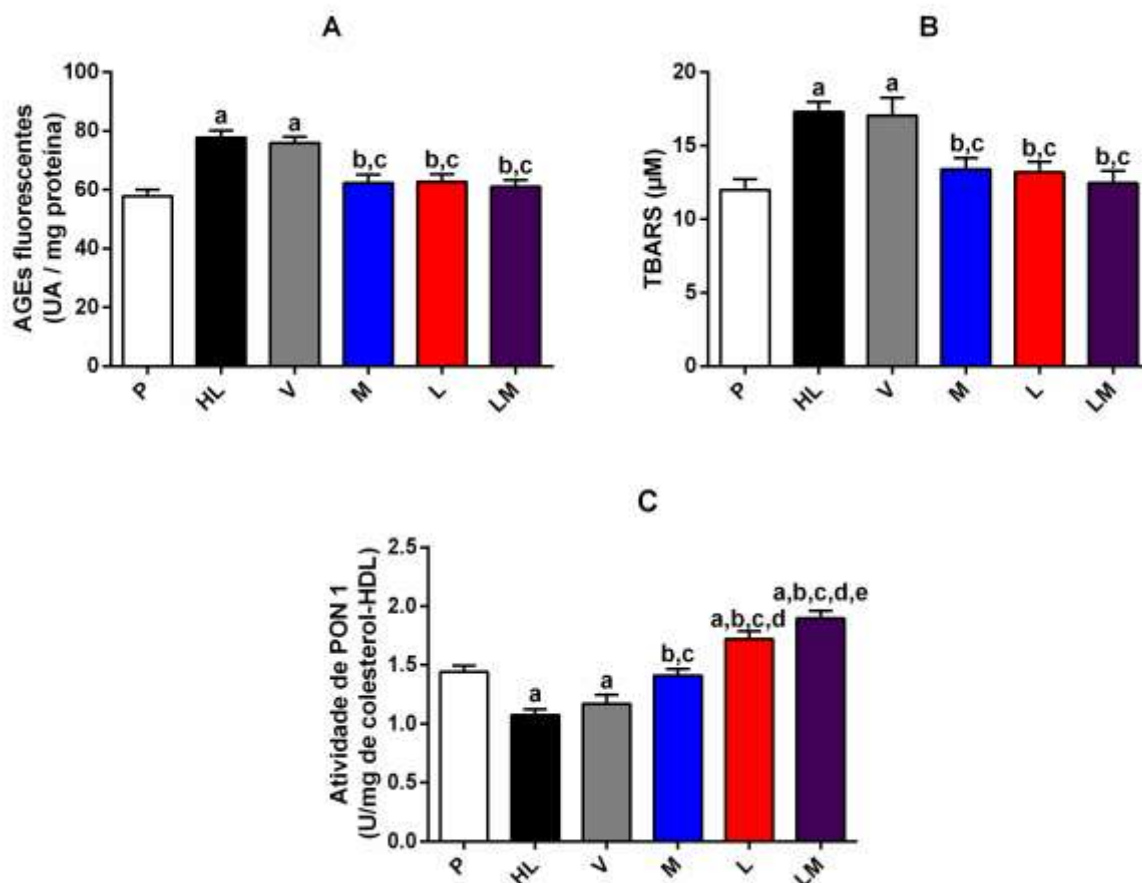
Animais alimentados com dieta hiperlipídica não tratados (grupo HL) ou que receberam SLN (grupo V) apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de AGEs fluorescentes (36% e 31%, respectivamente) (Figura 10A) e de TBARS (45% e 43%, respectivamente) (Figura 10B) em relação aos animais alimentados com dieta normolipídica (grupo P). Também foi observada uma diminuição na atividade da enzima PON 1 em plasma de animais dos grupos HL (24%) e V (19%), em relação aos valores encontrados em animais do grupo P (Figura 10C).

Todos os tratamentos foram capazes de diminuir os níveis plasmáticos de AGEs fluorescentes e de TBARS, bem como aumentaram a atividade de PON 1 dos animais mantidos em dieta HL. O tratamento com metformina (grupo M) promoveu diminuição de 20% nos níveis plasmáticos de AGEs fluorescentes e de 22% nos níveis de TBARS (Figuras 10A e 10B). Os tratamentos com licopeno (grupo L) e licopeno+metformina (grupo LM) também promoveram diminuição nos níveis plasmáticos de AGEs fluorescentes (20% e 22%, respectivamente) e de TBARS (24% e 28% respectivamente) em relação aos animais do grupo HL (Figuras 10A e 10B).

A atividade de PON 1 no plasma de animais mantidos em dieta HL foi significativamente aumentada pelos tratamentos, especialmente aqueles que continham

licopeno. Animais tratados com metformina (grupo M) apresentaram aumento de 32% na atividade de PON 1 em relação aos animais HL, atingindo atividade semelhante àquela de animais do grupo P (Figura 10C). Já animais tratados com licopeno (grupo L) ou metformina+licopeno (grupo LM) apresentaram aumento expressivo da atividade de PON 1 (61% e 78%, respectivamente), quando comparados aos animais HL, culminando em valores de atividade de PON 1 que foram inclusive superiores (19% e 32%, respectivamente) aos apresentados pelos animais alimentados com dieta normolipídica (grupo P) (Figura 10C).

**Figura 10.** Estimativa de AGEs fluorescentes (A), níveis de TBARS (B) e atividade de PON 1 (C) no plasma de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com metformina e/ou licopeno.

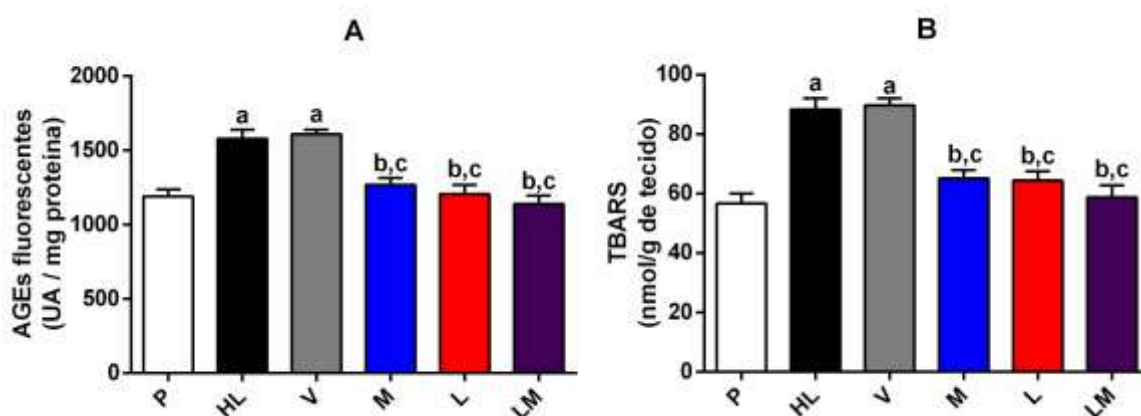


Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas: a, diferenças com P; b, diferenças com HL; c, diferenças com V; d, diferenças com M; e, diferenças com L ( $p < 0,05$ ). Fonte: própria do autor.

### 5.5 Parâmetros relacionados ao estresse glico-oxidativo e potencial antioxidante em fígado

Animais dos grupos HL e V apresentaram aumento dos níveis de AGEs fluorescentes (33% e 35%, respectivamente) e de TBARS (56% e 58% respectivamente) no fígado, em relação aos valores encontrados em fígado de animais P (Figura 11). Em animais tratados com metformina (grupo M), licopeno (grupo L) e licopeno+metformina (grupo LM), observou-se diminuição nos níveis hepáticos de AGEs fluorescentes (20%, 24% e 28%, respectivamente) e de TBARS (26%, 27% e 33%, respectivamente) quando comparados aos valores encontrados em fígado de animais HL, não tratados (grupo HL) (Figura 11).

**Figura 11.** Estimativa de AGEs fluorescentes (A) e níveis de TBARS (B) no fígado de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com metformina e/ou licopeno.

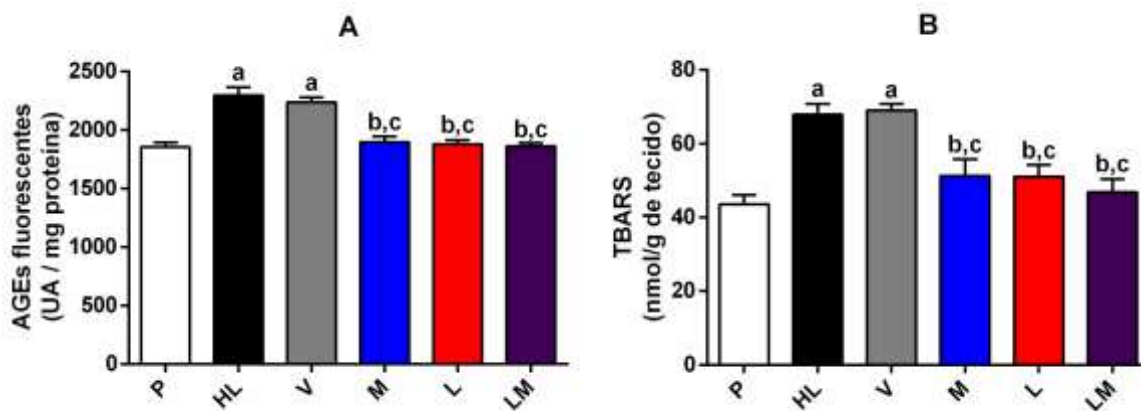


Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas: a, diferenças com P; b, diferenças com HL; c, diferenças com V ( $p < 0,05$ ). Fonte: própria do autor.

### 5.6 Parâmetros relacionados ao estresse glico-oxidativo e potencial antioxidante em rim

Animais dos grupos HL e V apresentaram um aumento nos níveis de AGEs fluorescentes (24% e 21%, respectivamente) e de TBARS (56% e 58% respectivamente) nos rins, em relação aos valores encontrados em rins de animais do grupo P (Figura 12). Animais tratados com metformina (grupo M), licopeno (grupo L) e licopeno+metformina (grupo LM) apresentaram diminuição nos níveis renais de AGEs fluorescentes (17%, 18% e 19%, respectivamente) e de TBARS (24%, 25% e 31%, respectivamente), quando comparados aos valores encontrados em rins de animais HL, não tratados (grupo HL) (Figura 12).

**Figura 12.** Estimativa de AGEs fluorescentes (A) e níveis de TBARS (B) nos rins de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com metformina e/ou licopeno.



Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas: a, diferenças com P; b, diferenças com HL; c, diferenças com V ( $p < 0,05$ ). Fonte: própria do autor.

## 6. DISCUSSÃO

Assim como os estudos prévios de nosso laboratório conduzidos por Costa e colaboradores (2020) e Inácio e colaboradores (2020), a instalação do sistema-modelo *in vivo* de obesidade induzida pela oferta de dieta hiperlipídica a camundongos C57BL/6J foi confirmada, via observação de aumento no ganho de peso corporal nos animais alimentados com dieta HL e não tratados, bem como pelos aumentos nas massas de tecidos adiposos brancos (epididimal e retroperitoneal). Essas alterações podem ser explicadas pela maior ingestão energética observada em animais alimentados com dieta HL, em comparação aos animais alimentados com dieta P. Estes animais também apresentaram resistência à insulina e intolerância à glicose, além de aumentos nos níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol-HDL (caracterizando dislipidemia) e aumento nas atividades de ALT e ALP (caracterizando injúria hepatocelular) no plasma. Podemos verificar também a instalação do estresse glico-oxidativo em animais alimentados com a dieta HL, com aumento nos níveis de AGEs fluorescentes (biomarcadores de glicação avançada) e de TBARS (biomarcadores de peroxidação lipídica) em plasma, fígado e rins, e diminuição na defesa antioxidante enzimática no plasma (diminuição na atividade de PON 1).

O menor ganho de peso corporal e as menores massas de tecidos adiposos brancos (epididimal e retroperitoneal) em animais mantidos em dieta HL e tratados com metformina e/ou licopeno confirmou o potencial anti-obesogênico destes bioativos, tal como demonstrado por diversos estudos, tanto para a metformina (MATSUI et al., 2010) quanto para o licopeno (NI; ZHUGE; NAGATA, 2019; ZHU; WANG; XU, 2020). A obesidade é caracterizada por um estado de inflamação crônica de baixo grau, e possui etiologia multifatorial (MONTEIRO e AZEVEDO, 2010), apresentando aumento de citocinas pró-inflamatórias (HENRY et al., 2012). Estudos vêm demonstrando que o aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias promovido pela hipertrofia dos tecidos adiposos brancos contribui para a diminuição da oxidação de lipídeos em tecidos sensíveis à insulina, resultando em aumento da lipotoxicidade e da resistência à insulina (ZHANG e ZHANG, 2010). Diversos estudos indicam o potencial anorexígeno da metformina, visualizado pela diminuição das massas dos tecidos adiposos (SOUZA-MELLO et al., 2010; TOKUBUSHI et al., 2017). A metformina é capaz ativar a enzima AMPK, promovendo aumento na expressão de UCP (do inglês, *uncoupling protein*) e na velocidade de oxidação de lipídeos

(SANTOMAURO-JUNIOR et al., 2008; TOKUBUSHI et al., 2017), o que contribui para a diminuição nas massas dos tecidos adiposos, bem como diminuição no ganho de peso corporal. O licopeno é um carotenoide conhecido por suas propriedades antioxidantes (DIMASCIO; KAISER; SIES, 1989; FERREIRA et al., 2007; ASSIS et al., 2017; FIGUEIREDO et al., 2020), mas também apresenta ações antiinflamatórias (GOURANTON et al., 2011; MARCOTORCHINO et al., 2012). Luvizotto e colaboradores (2013) observaram uma diminuição na expressão gênica em tecido adiposo epididimal e nos níveis plasmáticos de IL-6, leptina e resistina em ratos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com licopeno, o que justifica a diminuição nas massas dos tecidos adiposos e no ganho de peso corporal.

Os tratamentos com metformina e/ou licopeno promoveram melhorias na tolerância à glicose e na sensibilidade à insulina. Além de suas ações no fígado, a metformina pode limitar os efeitos negativos dos elevados níveis de ceramidas (metabólito de ácidos graxos que participa no estabelecimento da resistência à insulina) em músculos esqueléticos de indivíduos com DM (GALADARI et al., 2013; VALENCIA et al., 2017). O licopeno, como um potente antioxidante, atenua o estresse oxidativo, prevenindo seus efeitos deletérios tanto na função pancreática (PARK et al., 2009) quanto na capacidade responsiva dos tecidos periféricos em captar a glicose de maneira dependente de insulina (HERIKSEN et al., 2011). Diversos estudos também demonstraram melhoria na tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina em ratos tratados com metformina (IBRAHIM; AHMED; EL-DIN, 2008) e em camundongos tratados com licopeno (NI; ZHUGE; NAGATA, 2019; ZHU; WANG, XU, 2020).

Assim como o presente estudo, diversos trabalhos têm demonstrado o papel benéfico do tratamento com licopeno (AHUJA; PITTAWAY; BALL, 2010; ALSHATWI et al., 2010; ZIDANI, 2017; FIGUEIREDO et al., 2020) ou com metformina (MATSUI et al., 2010; IBRAHIM; AHMED; EL-DIN, 2008; FIGUEIREDO et al., 2020) na melhoria do perfil lipídico, com diminuição nos níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol-HDL e triacilgliceróis. A melhoria no perfil lipídico observada em animais tratados com metformina e/ou licopeno neste estudo pode ser explicada por alguns mecanismos. A ativação da AMPK pela metformina inibe a transcrição de algumas enzimas chave da síntese de colesterol e de triacilgliceróis, devido a sua capacidade de modulação da proteína reguladora do esterol-1c (SREBP-1c, do inglês *sterol regulatory element-binding protein-1c*), regulando negativamente sua ação (SANTOMAURO-JUNIOR et al., 2008). O licopeno também

contribuiu de forma importante nesta diminuição da dislipidemia, visto que o carotenoide é capaz de inibir a HMG-CoA redutase, enzima chave do processo de biossíntese do colesterol (HSU et al., 2008). A principal lipoproteína em humanos é a LDL, enquanto que em camundongos prevalece a lipoproteína HDL (GETZ, 2007), o que pode explicar o aumento observado nos níveis de colesterol-HDL em plasma de animais do grupo HL, bem como sua diminuição em plasma de animais dos grupos M, L e LM (alimentados com dieta HL e tratados com metformina, licopeno e licopeno + metformina, respectivamente). A diminuição observada nos níveis de triacilgliceróis em animais alimentados com dieta hiperlipídica (tratados e não tratados) pode estar correlacionada com o aumento observado nas massas adiposas (sugerindo maior acúmulo de triacilgliceróis), bem como devido à deposição ectópica de lipídeos, principalmente no fígado, o que pode levar à esteatose (GUO; LIU; WANG, 2009).

A hiperglicemia crônica desempenha um papel importante na promoção do estresse glico-oxidativo, via ativação de diversas vias, incluindo a via dos polióis, processos de auto-oxidação da glicose e as vias de geração de AGEs (BROWNLEE, 2005). Assim, as respostas antihiperlipidêmicas apresentadas tanto pela metformina quanto pelo licopeno certamente contribuíram para a diminuição dos níveis plasmáticos e teciduais de AGEs e TBARS em animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com esses bioativos, em comparação aos animais alimentados com a mesma dieta e não tratados.

Estudos têm demonstrado aumento na atividade da enzima PON 1 em plasma de ratos diabéticos tratados com metformina (ROXO et al., 2019; FIGUEIREDO et al., 2020) ou com licopeno (YEGIN et al., 2013; ASSIS et al., 2017; SARHAT e SAEED, 2017; FIGUEIREDO et al., 2020). Animais alimentados com dieta HL e não tratados apresentaram uma diminuição na atividade de PON 1 no plasma, que pode ter relação com alterações pós-traducionais na enzima, especialmente o aumento na glicação desta enzima devido ao estresse glicativo observados em animais HL. A glicação de componentes proteicos da HDL, incluindo a PON 1, pode resultar em dissociação da enzima da lipoproteína ou em inativação da PON 1; ambas as situações resultam em perda de função da PON 1. Além do mais, o aumento do estresse oxidativo também presente no sistema-modelo *in vivo* de obesidade/resistência à insulina está relacionado a um aumento em processos de peroxidação lipídica, tanto de lipídeos das membranas celulares quanto dos constituintes de lipoproteínas. Logo, o ataque de componentes da lipoproteína HDL por ERO também pode

impactar na função da lipoproteína e culminar em diminuição na atividade da PON 1 (WEI et al., 2017; ROXO et al., 2019).

Contrapondo os efeitos deletérios da dieta HL em camundongos, observamos neste estudo que o tratamento com metformina foi capaz de impedir a diminuição na atividade de PON 1; a atividade de PON 1 observada em animais M foi semelhante à atividade encontrada em animais P (isto é, alimentados com dieta normolipídica). Este efeito pode ser explicado pela capacidade da metformina de diminuir os níveis glicêmicos e, conseqüentemente, diminuir o estresse glico-oxidativo, um dos responsáveis por promover a diminuição na atividade da PON 1 (PAN et al., 2020; SALVATORE et al., 2020). O tratamento com licopeno, por sua vez, não somente impediu a diminuição na atividade da PON 1 em animais alimentados com dieta HL, mas também foi capaz de aumentar sua atividade em relação àquela observada em animais P, demonstrando o alto poder antioxidante do carotenoide (ASSIS et al., 2017; FIGUEIREDO et al., 2020; ZHU et al., 2020).

Em estudo anterior de nosso laboratório, observou-se que a associação entre um fármaco antihiperlipêmico (metformina) e um bioativo natural de alto poder antioxidante (licopeno) favoreceu a diminuição de processos glicativos e oxidativos em lipídeos e proteínas (FIGUEIREDO et al., 2020). Neste presente estudo, também foi observado o efeito combinado do tratamento com licopeno + metformina, o qual promoveu um aumento significativo na atividade da enzima PON 1 nos animais alimentados com dieta HL, alcançando valores superiores aos apresentados pelos tratamentos com metformina ou licopeno isoladamente. Uma das funções da PON 1 é metabolizar lipídeos oxidados tanto em LDL quanto em HDL (COSTA et al., 2003). Assim, a PON 1 impede a formação de LDL-oxidada e protege a HDL contra oxidação (COSTA et al., 2003). Essas ações sugerem um papel importante da PON 1 em contribuir para a prevenção do risco de doenças cardiovasculares e aterosclerose (COSTA et al., 2005). Em conjunto, esses achados indicam a terapia combinada de metformina e licopeno como uma opção interessante para a atenuação de eventos cardiovasculares associados à obesidade.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo sugerem que animais submetidos ao sistema-modelo *in vivo* de obesidade/resistência à insulina e tratados com metformina e/ou licopeno apresentam melhorias significativas nas alterações fisiometabólicas promovidas pela oferta de dieta hiperlipídica.

Podem ser destacadas, dentre as melhorias associadas aos tratamentos com metformina, licopeno e licopeno + metformina, a diminuição no ganho de peso corporal, diminuição nas massas de tecidos adiposos brancos, melhorias na tolerância à glicose e na resistência à insulina, diminuição nos níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol-HDL e na glicemia de jejum, diminuição nos níveis plasmáticos, hepáticos e renais de AGEs fluorescentes e de TBARS, além de promover aumento significativo na atividade da enzima antioxidante PON 1.

A terapia combinada metformina + licopeno foi capaz de promover melhorias em animais sob sistema-modelo *in vivo* de obesidade, não somente em relação aos animais em dieta HL e não tratados, mas também em relação aos animais em dieta HL e tratados com metformina ou licopeno isoladamente, com destaque para as melhorias observadas na atividade da PON 1 em plasma.

## 8. REFERÊNCIAS

AHMED, N. Advanced glycation endproducts – role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 67, n. 1, p. 3-21, 2005.

AHUJA, K. D.; PITTAWAY, J. K.; BALL, M. J. Effects of olive oil and tomato lycopene combination on serum lycopene, lipid profile, and lipid oxidation. **Nutrition.** v. 22, p. 259-265, 2006.

ALSHATWI, A. A.; AL OBAID, M. A.; AL SEDAIRY, S. A.; AL-ASSAF, A. H.; ZHANG, J. J.; LEI, K., Y. Tomato powder is more protective than lycopene supplement against lipid peroxidation in rats. **Nutr Res.** v. 30, p. 66-73, 2010.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and diagnosis of diabetes. **Diabetes Care.** v. 41, n. 1, p. 13-27, 2017.

AGARWAL, S.; RAO, A. V. Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. **Lipids.** v. 33, p. 981-984, 1998.

AGHADAVOD, E.; KHODADADI, S.; BARADARAN, A.; NASRI, P.; BAHMANI, M.; RAFIEIAN KOPAEI, M. Role of oxidative stress and inflammatory factors in diabetic kidney disease. **Iran J Kidney Dis.** v. 10, n. 6, p. 337-343, 2016.

ASSIS, R. P.; AARCARO, C. A.; GUTIERRES, V. O.; OLIVEIRA, J. O.; COSTA, P. I.; BAVIERA, A. M.; BRUNETTI, I. L. Combined Effects of Curcumin and Lycopene or Bixin in Yoghurt on Inhibition of LDL Oxidation and Increases in HDL and Paraoxonase Levels in Streptozotocin-Diabetic Rats. **Int J Mol Sci.** v. 18, pii: E332, 2017.

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGE) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Art Bras Endocrinol Metab.** v. 52, n. 6, p. 940-950, 2008.

BARTHOLOMEW, R. J.; DELANEY, A. M. Bromocresol Green as a reagent for serum albumin. **Proceedings of the Association of Clinical Biochemists.** v. 1, p. 214, 1966.

BERNAL, C.; MARTÍN-POZUELO, G.; LOZANO, A. B.; SEVILLA, A.; GARCÍA-ALONSO, J.; CANOVAS, M.; PERIAGO, M. J. Lipid biomarkers and metabolic effects of lycopene from tomato juice on liver of rats with induced hepatic steatosis. **J Nutr Biochem.** v. 24, p. 1870-1881, 2013.

BEREZIN, A. Metabolic memory phenomenon in diabetes mellitus: achieving and perspectives. **Diabetes Metab Syndr.** v. 10, p. 176-183, 2016.

BIERHAUS, A.; NAWOROTH, P. P. Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. **Diabet.** v. 52, n. 11, p. 2251-2263, 2009.

BLACKER, T. S.; DUCHEN, M. R. Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. **Free Radic Biol Med.** v. 100, p. 53-65, 2016.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D. Glucose and reactive oxygen species. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** v. 5, n. 5, p. 561-568, 2002.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature.** v. 414, n. 6865, p. 813-820, 2001.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes.** v. 54, n. 6, p. 1615-1625, 2005.

BRUHN, M. A.; PEARSON, R. B.; HANNAN, R. D.; SHEPPARD, K. E. AKT-independent PI3-K signaling in cancer – emerging role for SGK3. **Cancer Manag Res.** v. 5, p. 281-292, 2013.

BUREN, P. V.; LEWINTER, M. M. Heart Failure: as a Consequence of Diabetic Cardiomyopathy. **Heart Failure: A Comp to Braun Heart Dis.** v. 1, p. 408–418, 2011.

CERIELLO, A. The emerging challenge in diabetes: the "metabolic memory". **Vascul Pharmacol.** v. 57, n. 5, p. 133-138, 2012.

CHIANG, J. L.; KIRKMAN, M. S.; LAFFEL, L. M.; PETERS, A. L. Type 1 Diabetes Sourcebook Authors. Type 1 diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care.** v. 37, n. 7, p. 2034-2054, 2014.

COOK, J. G. H. Creatinine assay in the presence of protein. **Clin Chim Acta.** v. 32, p. 485-486, 1971.

COSTA, L. G.; COLE, T. B.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Functional genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. **Annu Rev Med.** v. 54, p. 371–392, 2003.

COSTA, L. G.; MCDONALD, B. E.; MURPHY, S. D.; OMENN, G. S.; RICHTER, R. J.; MOTULSKY, A. G.; FURLONG, C. E. Serum paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 103, n. 1, p. 66-76, 1990.

COSTA, L. G.; VITALONE, A.; COLE, T. B.; FURLONG, C. E. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. **Biochem Pharmacol.** v. 69, p. 541-550, 2005.

COSTA, M. C.; LIMA, T. F. O.; ARCARO, C. A.; INACIO, M. D.; BATISTA-DUHARTE, A.; CARLOS, I. Z.; SPOLIDORIO, L. C.; ASSIS, R. P.; BRUNETTI, I. L.; BAVIERA, A. M. Trigonelline and curcumin alone, but not in combination, counteract oxidative stress and inflammation and increase glycation product detoxification in the liver and kidney of mice with high fat diet induced obesity. **J Nut Biochem.** v. 76, p. 1083-1103, 2020.

DE FREITAS, E. S.; DA SILVA, P. B.; CHORILLI, M.; BATISTA, A. A.; DE OLIVEIRA LOPES, E.; DA SILVA, M. M.; LEITE, C. Q.; PAVAN, F. R. Nanostructured Lipid Systems as a Strategy to Improve the in vitro Cytotoxicity of Ruthenium(II) Compounds. **Molecules.** v. 19, p. 5999-6008, 2014.

DE LA MAZA, M. P.; RODRIGUEZ, J. M.; HIRSCH, S.; LEIVA, L.; BARRERA, G.; BUNOUT, D. Skeletal muscle ceramide species in men with abdominal obesity. **J Nutr Health Aging.** v. 19, n. 4, p. 389-396, 2015.

DEFRONZO, R. A.; STONEHOUSE, A. H.; HAN, J.; WINTLE, M. E. Relationship of baseline HbA1c and efficacy of current glucose-lowering therapies: a meta-analysis of randomized clinical trials. **Diabet Med.** v. 27, n. 3, p. 309-317, 2010.

DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch Biochem Biophys.** v. 274, n. 2, p. 532-538, 1989.

FELBER, J. P.; GOLAY, A. Pathways from obesity to diabetes. **Int J Obes Relat Metab Disord.** v. 26, n. 2, p. 39-45, 2002.

FERREIRA, A. L. A.; RUSSELL, R. M.; ROCHA, N.; LADEIRA, M. S. P.; SALVADORI, D. M. F.; NASCIMENTO, M. C. M. O.; MMATSUI, M.; CARVALHO, F. A.; TANG, G.;

MATSUBARA, L. S.; MATSUBARA, B. B. Effect of lycopene on doxorubicin-induced cardiotoxicity: an echocardiographic, histological and morphometrical assessment. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** v. 101, n. 1, p. 16-24, 2007.

FIGUEIREDO, I. D.; LIMA, T. F. O.; INACIO, M. D.; COSTA, M. C.; ASSIS, R. P.; BRUNETTI, I. L.; BAVIERA, A. M. Lycopene improves the metformin effects on glycemic control and decreases biomarkers of glycoxidative stress in diabetic rats. **Diabetes Metab Syndr Obes.** v. 13, p. 3117-3135, 2020.

FOWLER, M. J. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. **Clinical Diabetes.** v. 26, n. 2, p. 77-82, 2008.

GALADARI, S.; RAHMAN, A.; PALLICHANKANDY, S.; GALADARI, A.; THAYYULLATHIL, F. Role of ceramide in diabetes mellitus: evidence and mechanisms. **Lipids Health Dis.** v. 12, n. 98, 2013.

GETZ, G.S. Overview of murine atherosclerosis series. **Curr Drug Targ.** v. 8, p. 1144–1149, 2007.

GIACCO, F.; BROWNLEE M. Oxidative stress and diabetic complications. **Food Funct.** v. 107, n. 9, p. 1058-1070, 2010.

GOH, S. Y.; COOPER, M. E. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. **J Clin Endoc Metab.** v. 93, n. 4, p. 1143-1152, 2008.

GOURANTON, E.; THABUIS, C.; RIOLLET, C.; MALEZET-DESMOULINS, C.; EL YAZIDI, C.; AMIOT, M. J.; BOREL, P.; LANDRIER, J. F. Lycopene inhibits proinflammatory cytokine and chemokine expression in adipose tissue. **J Nutr Biochem.** v. 22, n. 7, p. 642-648, 2010.

GUO, Y.; LIU, Y.; WANG, Y. Beneficial effect of lycopene on anti-diabetic nephropathy through diminishing inflammatory response and oxidative stress. **Food Funct.** v. 6; n. 4, p. 1150-1156, 2015.

GUPTA, R. C.; CHANG, D.; NAMMI, S.; BENSOUSSAN, A.; BILINSKI, K.; ROUFOGALIS, B. D. Interactions between antidiabetic drugs and herbs: an overview of mechanisms of action and clinical implications. **Diab Met Syndr.** v. 9, n. 59, 2017.

HENRY, S. L.; BENSLEY, J. G.; WOOD-BRADLEY, R. J.; CULLEN-MCEWEN, L. A.; BERTRAM, J. F.; ARMITAGE, J. A. White adipocytes: more than just fat depots. **Int Biochem Cell Biol.** v. 44, n. 3, p. 435-440, 2012.

HO, S. C.; WU, S. P.; LIN, S. M.; TANG, Y. L. Comparison of anti-glycation capacities of several herbal infusions with that of green tea. **Food Chem.** v. 122, n. 3, p. 768-774, 2010.

HOSSAIN, P.; KAWAR, B.; EL NAHAS, M. Obesity and diabetes in the developing world-a growing challenge. **N Engl J Med.** v. 356, n. 3, p. 213-215, 2007.

HOWLETT, H. C.; BAILEY, C. J. A risk-benefit assessment of metformin in type 2 diabetes mellitus. **Drug Saf.** v. 20, n. 6, p. 489-503, 1999.

HSU, Y. M.; LAI, C. H.; CHANG, C. Y.; FAN, C. T.; CHEN, C. T.; WU, C. H. Characterizing the lipid-lowering effects and antioxidant mechanisms of tomato paste. **Biosci Biotechnol Biochem.** v. 72, p. 677-685, 2008.

IBRAHIM, H. S.; AHMED, L. A.; EL-DIN, M. M. The functional role of some tomato products on lipid profile and liver function in adult rats. **J Med Food.** v. 11, p. 551-559, 2008.

INACIO, M. D.; COSTA, M. C.; LIMA, T. F. O.; FIGUEIREDO, I. D.; MOTTA, B. P.; SPOLIDORIO, L. C.; ASSIS, R. P.; BRUNETTI, I. L.; BAVIERA, A. M. Pentoxifylline mitigates renal glycoxidative stress in obese mice by inhibiting AGE/RAGE signaling and increasing glyoxalase levels. **Life Sci.** v. 258, p. 1181-1196, 2020.

INSEL, R. A.; DUNNE, J. L.; ATKINSON, M. A.; CHIANG, J. L.; DABELEA, D.; GOTTLIED, P. A. Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of IDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. **Diabetes Care.** v. 38, n. 10, p. 1967-1974, 2015.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes Atlas, 9th ed. Brussels, Belgium: **International Diabetes Federation.** 2019.

INZUCCHI, S. E.; LIPSKA, K. J.; MAYO, H.; BAILEY, C. J.; MCGUIRE, D. K. Metformin in patients with type 2 diabetes and kidney disease: a systematic review. **JAMA.** v. 312, p. 2668-2675, 2014.

- JAIN, M. Histopathological changes in diabetic kidney disease. **Clin Queries: Nephrol.** v. 1, n. 2, p. 127-133, 2012.
- JAY, D.; HITOMI, H.; GRIENGLING, K. K. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. **Free Radic Biol Medic.** v. 40, n.2, p. 183-192, 2006.
- KIM, E. K.; LEE, S. H.; JHUN, J. Y.; BYUN, J. K.; JEONG, J. H.; LEE, S.Y.; KIM, J. K.; CHOL, J. Y.; CHO, M. L. Metformin prevents fatty liver and improves balance of white/brown adipose in an obesity mouse model by inducing FGF21. **Mediators Inflamm.** v. 2016, p. 1-13; 2016.
- KOHN, H. I.; LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 82, n. 3, p. 292-300, 1944.
- LAPOLLA, A.; TRALDI, P.; FEDELE, D. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. **Clin Biochem.** v. 38, n. 2, p. 103-115, 2005.
- LI, R.; CHEN, L.; ZHAO, W.; ZHAO, S.; HUANG, X. Metformin ameliorates obesity-associated hypertriglyceridemia in mice partly through the apolipoprotein A5 pathway. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 478, p. 1173-1178, 2016.
- LIVINGSTONE, R.; BOYLE, J. G.; PETRIE, J. R.; REMOVAL STUDY TEAM. A new perspective on metformin therapy in type 1 diabetes. **Diabetologia.** v. 60, n. 9, p. 1594–1600, 2017.
- LOIS, K.; KUMAR, S. Obesity and diabetes. **Endocrinol Nutr.** v. 56, n. 4, p. 38-42, 2009.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.** v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUVIZOTTO, R. A. M.; NASCIMENTO, A. F.; IMAIZUMI, E.; PIERINE, D. T.; CONDE, S. J.; CORREA, C. R.; YEUM, K. J.; FERREIRA, A. L. Lycopene supplementation modulates plasma concentrations and epididymal adipose tissue mRNA of leptin, resistin and IL-6 in diet-induced obese rats. **Br J Nutr.** v. 110, n. 10, p. 1803-1809, 2013.
- LYONS, T. J.; JENKINS, A. J. Glycation, oxidation, and lipoxidation in the development of the complications of diabetes: a carbonyl stress hypothesis. **Diabetes Rev (Alex).** v. 5, n. 4, p. 365-391, 1997.

MACKNESS, M. I.; ARROL, S.; DURRINGTON, P. N. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. **FEBS Lett.** v. 286, p. 152–154, 1991.

MARCOTORCHINO, J.; ROMIER, B.; GOURANTON, E.; RIOLLET, C.; GLEIZE, B., MALEZET-DESMOULINS, C.; LANDRIER, J. F. Lycopene attenuates LPS-induced TNF- $\alpha$  secretion in macrophages and inflammatory markers in adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. **Mol Nutr Food Res.** v. 56, n. 5, p. 725-732, 2012.

MARSHALL, S. M. 60 years of metformin use: a glance at the past and a look to the future. **Diabetologia.** v. 60, n. 9, p. 1561–1565, 2017.

MATSUI, Y.; HIRASAWA, Y.; SUGIURA, T.; TOYOSHI, T.; KYUKI, K.; ITO, M. Metformin reduces body weight gain and improves glucose intolerance in high fat diet fed C57BL/6J mice. **Biol Pharm Bull.** v. 33, n. 6, p. 963-970, 2010.

MEEPROM, A.; SOMPONG, W.; CHAN, C. B.; ADISAKWATTANA, S. Isoferulic Acid, a New Anti-Glycation Agent, Inhibits Fructose and Glucose-Mediated Protein Glycation in Vitro. **Molecules.** v. 18, n. 6, p. 6439-6454, 2013.

MISRA, A.; BLOOMGARDEN, Z. Metabolic memory: Evolving concepts. **J Diabetes.** v. 10, n. 3, p. 186-187, 2018.

MONNIER, V. M.; SELL, D. R.; GENUTH, S. Glycation products as makers and predictors of the progression of diabetic complications. **Ann NY Acad Sci.** v. 1043, p. 567-581, 2005.

MONTEIRO, R.; AZEVEDO, I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. **Mediators Inflamm.** v. 1, n. 1, p. 1-10, 2010.

MROZ, J. R. Clinical Enzymology. In: Anderson SC, Cockayne S (eds). **Clinical Chemistry Concepts & Applications, chapter 11, Mc Graw-Hill.** p. 179-202, 2003.

NOWOTNY, K.; JUNG, T.; HÖHN, A.; WEBER, D.; GRUNE, T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. **Biomolecules.** v. 5, p. 194-222, 2015.

NI, Y.; ZHUGE, F.; NAGATA, N. Lycopene prevents the progression of lipotoxicity-induced nonalcoholic steatohepatitis by decreasing oxidative stress in mice. **Free Rad Biol Med.** v. 2019, p. 1-12, 2019.

OBROSOVA, I. G. Diabetes and the peripheral nerve. **Biochim Biophys Acta**. v. 1792, n. 10, p. 931-940, 2009.

OKAYASU, S.; KITAICHI, K.; HORI, A.; SUWA, T.; HORIKAWA, Y.; YAMAMOTO, M.; TAKEDA, J.; ITOH, Y. The evaluation of risk factors associated with adverse drug reactions by metformin in type 2 diabetes mellitus. **Biol Pharm Bull**. v. 35, p. 933-937, 2012.

OTT, C.; JACOBS, K.; HAUCKE, E.; SANTOS, A. N.; GRUNE, T.; SIMM, A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biology**. v. 2, p. 411-429, 2014.

OU, J.; HUANG, J.; WANG, M.; OU, S. Effect of rosmarinic acid and carnosic acid on AGE formation in vitro. **Food Chem**. v. 221, p. 1057-1061, 2017.

PACKER, L.; KRAEMER, K.; RIMBACH, G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. **Nutrition**. v. 17, n. 10, p. 888-895, 2001.

PAN, Q.; LU, X.; ZHAO, C.; LIAO, S.; CHEN, X.; GUO, F.; YANG, C.; LIU, H. Metformin: the updated protective property in kidney disease. **Ageing (Albany NY)**. v. 12, n. 9, p. 8742-8759, 2020.

PAZDRO, R.; BURGESS, J. R. The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications. **Mech Ageing Dev**. v. 131, n. 4, 276-286, 2010.

PRADA, P. O.; SAAD, M. J. A. Bases moleculares da sinalização da insulina. In: CINTRA, D. E.; ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R. Obesidade e diabetes – fisiopatologia e sinalização celular. São Paulo. **Sarvier**. 2011.

PILZ, J.; MEINEKE, I.; GLEITER, C. H. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**. v. 742, n. 2, 315-325, 2000.

POKUPEC, R.; KALAUZ, M.; TURK, N.; TURK, Z. Advanced glycation endproducts in human diabetic and non-diabetic cataractous lenses. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**. v. 241, p. 378-384, 2003.

PRABHAKAR, P. K.; KUMAR, A.; DOBLE, M. Combination therapy: a new strategy to manage diabetes and its complications. **Phytomed**. v. 21, n. 2, p. 123-130, 2014.

RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J. Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. **Amino Acids**. v. 42, n. 4, p. 1133-1142, 2012.

RAMKISSOON, J. S.; MAHOMOODALLY, M. F.; AHMED, N.; SUBRATTY, A. H. Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs. **Asian Pac J Trop Med**. v. 6, n. 7, p. 561-569, 2013.

RAO, P. V. Type 2 diabetes in children: clinical aspects and risk factors. **J Endocrinol Metab**. v. 19, p. 47-50, 2015.

REIS, J. S.; VELOSO, C. A.; MATTOS, R. T.; PURISH, S.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A. Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 52, n. 7, p.1096-1105, 2008.

RENA, G.; HARDIE, D. G.; PEARSON, E. R. The mechanisms of action of metformin. **Diabetologia**. v. 60, p. 1577-1585, 2017.

RICHTER, R. J.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. **Circ Cardiovasc Genet**. v. 1, n. 2, p. 147-152, 2008.

RIFAI, N.; WARNICK, G. R. Lipids, lipoproteins, Apolipoproteins, and other cardiovascular risk factors. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed, Elsevier Saunders**. p. 903-981, 2006.

ROCHETTE, L.; ZELLER, M.; COTTIN, Y.; VERGELY, C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. **Biochim Biophys Acta**. v. 1840, p. 2709-2729, 2014.

ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicol Appl Pharmacol**. v. 212, n. 2, p.167-178, 2006.

ROXO, D. F.; ARCARO, C. A.; GUTIERRES, V. O.; COSTA, M. C.; OLIVEIRA, J. O.; LIMA, T. F. O.; ASSIS, R. P.; BRUNETTI, I. L.; BAVIERA, A. M. Curcumin combined with metformin decreases glycemia and dislipidemia, and increases paraoxonase activity in diabetic rats. **Diabetol Metab Syndr**. v. 11, n. 1, p. 1-8, 2019.

RUSSELL, N. D.; COOPER, M. E. 50 years forward: mechanisms of hyperglycaemia-driven diabetic complications. **Diabetologia**. v. 58, n. 8, p. 1708-1714, 2015.

SALE, E. M.; SALE, G. J. Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. **Cell Mol Life Sci.** v. 64, n. 113, 7274-7279, 2008.

SALVATORE, T.; PAFUNDI, P. C.; GALIERO, R.; RINALDI, L.; CATURANO, A.; VETRANO, E.; APREA, C.; ALBANESE, G.; DI MARTINO, A.; RICOZZI, C.; IMBRIANI, S.; SASSO, F. C. Can metformin exert as na active drug on endotelial dysfunction in diabetic subjects? **Biomedicines.** v. 9, n. 1, p. 1-26, 2020.

SANCHEZ-RANGEL, E.; INZUCCHI, S. E. Metformin: clinical use in type 2 diabetes. **Diabetologia.** v. 60, p. 1586-1593, 2017.

SANTOMAURO-JUNIOR, A. C.; UGOLINI, M. R.; SANTOMAURO, A. T.; SOUTO, R. P. Metformin and AMPK: an old drug and a new enzyme in the context of metabolic syndrome. **Arq Bras Endocrinol Metabol.** v. 52, n. 1, p. 120-125, 2008.

SANTOS, J. M.; MOHAMMAD, G.; ZHONG, Q.; KOWLURU, R. A. Diabetic retinopathy, superoxide damage and antioxidants. **Curr Pharm Biotechnol.** v. 12, n. 3, p. 352-361, 2011.

SARHAT, E. R.; SAEED, H. S. M. Effects of lycopene on paraoxonase and adipokines parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. **J Nat Med Sci.** v. 18, n. 1, p. 1-8, 2017.

SCANDINAVIAN SOCIETY FOR CLINICAL CHEMISTRY. The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology: Four Enzymes in Blood. **Scand J Clin Lab Invest.** v. 33, p. 291-306, 1974.

SCHAFFER, J. E. Lipotoxicity: When tissues overeat. **Curr Opin Lipidol.** v. 2003, n. 14, p. 281-287, 2003.

SCHEEN, A. J. Clinical pharmacokinetics of metformin. **Clin Pharmacokinet.** v. 30, p. 359-371, 1996.

SCHUTZ, Y. Concept of fat balance in human obesity revisited with particular reference to de novo lipogenesis. **Int J Obes Relat Metab Disord.** v. 28, p. 3-11, 2004.

SINGH, V. P.; BALI, A.; SINGH, N.; JAGGI, A. S. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. **Korean J Physion Pharmacol.** v. 18, n. 1, p. 1-14, 2014.

SKYLER, J. S.; BAKRIS, G. L.; BONIFÁCIO, E.; DARSOW, T.; ECKEL, R. H.; GROOP, L. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. **Diabetes**. v. 66, n. 2, p. 241-255, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 2020.

SOUZA-MELLO, V.; GREGÓRIO, B. M.; CARDOSO-DE-LEMOS, F. S.; CARVALHO, L.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance and liver and pancreas remodeling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet. **Clin Sci (Lond)**. v. 119, n. 6, p. 239-250, 2010.

TANIGUCHI, C.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 7, p. 85-96, 2006.

TESTA, R.; BONFIGLI, A. R.; PRATTICHIZZO, F.; LA SALA, L.; DE NIGRIS, V.; CERIELLO, A. The “Metabolic Memory” theory and the early treatment of hyperglycemia in prevention of diabetic complication. **Nutrients**. v. 28, n. 9, p. 1-9, 2017.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. **J Clin Pathol**. v. 22, p. 158-161, 1969.

VALENCIA, W. M.; PALACIO, A.; TAMARIZ, L.; FLOREZ, H. Metformin and ageing: improving ageing outcomes beyond glycaemic control. **Diabetologia**. v. 60, n. 9, p. 1630-1638, 2017.

VANHAESEBROECK, B.; STEPHENS, L.; HAWKINS, P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 13, p. 195-203, 2012.

VELLOSO, L. A.; CARVALHO, C. R. O.; ROJAS, F. A.; FOLLI, F.; SAAD, M. J. A. Insulin signalling in heart involves insulin receptor substrates-1 and -2, activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the JAK 2-growth related pathway. **Cardiovascular Res**. v. 40, n. 1, p. 96-102, 1998.

WARNICK, G. R.; WOOD, P. D. National cholesterol education program recommendations for measurement of high-density lipoprotein-cholesterol: executive summary. The national cholesterol education program working group on lipoprotein measurement. **Clin chem.** v. 41, p. 1427-1433, 1995.

WROBLEWSKI, F.; LADUE, J. S. Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac with hepatic disease. **Proc Soc Exp Biol Med.** v. 91, p. 569-571, 1956.

ZHANG, H.; ZHANG, C. Adipose “talks” to distant organs to regulate insulin sensitivity and vascular function. **Obesity (Silver Spring).** v. 18, n. 11, p. 2071-2076, 2010.

ZHOU, K.; YEE, S. W.; SEISER, E. L.; VAN LEEUWEN, N.; TAVENDALE, R. Variation in the glucose transporter gene SLC2A2 is associated with glycemic response to metformin. **Nat Genet.** v. 48, n. 9, p. 1055-1059, 2016.

ZHU, J.; WANG, C. G.; XU, Y. G. Lycopene attenuates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats by reducing oxidative stress. **Pharm Biol.** v. 49, n. 11, p. 1144-1149, 2011.

ZIDANI, S.; BENAKMOUM, A.; AMMOUCHE, A.; BENALI, Y.; BOUHADEF, A.; ABBEDDOU, S. Effect of dry tomato peel supplementation on glucose tolerance, insulin resistance, and hepatic markers in mice fed high-saturated-fat/high-cholesterol diets. **J Nutr Biochem.** v. 40, p. 164-171, 2017.

ZILIN, S.; NAIFENG, L.; BICHENG, L.; JIPING, W. The determination of AGE-peptides by flow injection assay, a practical marker of diabetic nephropathy. **Clin Chim Acta.** v. 313, p. 69-75, 2001.

## 9. ANEXO

ANEXO 1: Parecer nº 43/2018 – Comissão de Ética no Uso de Animais.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada " Avaliação de biomarcadores fisiometabólicos e do estresse glico-oxidativo em camundongos em modelo de obesidade/resistência insulínica e tratados com metformina e/ou licopeno incorporados em lipossomas", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAr: 43/2018, sob a responsabilidade da Pesquisadora Amanda Martins Baviera, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em reunião de 22 de abril de 2019.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Julho de 2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Isogênico C57BL6/J
Nº de animais	96
Idade/Peso	3-4 semanas/ 20g
Sexo	Macho
Origem	ANILAB - Animais de Laboratório, Criação e Comércio LTDA.- Paulínia-SP

Araraquara, 23 de abril de 2019.

Prof. Dr. MARCELO TADEU MARIN  
Coordenador da CEUA