

**‘UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Efeitos benéficos da insulina associada a bioativos naturais no
combate ao estresse glico-oxidativo em ratos diabéticos**

Ingrid Delbone Figueiredo

Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Araraquara - SP

2023

**Efeitos benéficos da insulina associada a bioativos naturais no
combate ao estresse glico-oxidativo em ratos diabéticos**

Ingrid Delbone Figueiredo

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

Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Araraquara - SP

2023

F475e

Figueiredo, Ingrid Delbone.

Efeitos benéficos da insulina associada a bioativos naturais no combate ao estresse glico-oxidativo em ratos diabéticos / Ingrid Delbone Figueiredo. – Araraquara: [S.n.], 2023.
136 f. : il.

Tese (Doutorado) – 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.

Orientadora: Amanda Martins Baviera.

1. Diabetes mellitus. 2. Licopeno. 3. Ácido alfa lipoico. 4. Terapias combinadas. 5. Complicações diabéticas. 6. Memória metabólica. 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 TESE: Insulina em menor dose combinada com bioativos naturais e os impactos em marcadores fisiometabólicos e do estresse glico-oxidativo em ratos diabéticos

AUTORA: INGRID DELBONE FIGUEIREDO

ORIENTADORA: AMANDA MARTINS BAVIERA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. AMANDA MARTINS BAVIERA (Participação Presencial)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. DEBORA CRISTINA DAMASCENO MEIRELLES DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia / Faculdade de Medicina do Câmpus de Botucatu da Unesp

Prof. Dr. EDUARDO CARVALHO LIRA (Participação Virtual)
Departamento de Fisiologia e Farmacologia / Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Profa. Dra. INAR CASTRO ERGER (Participação Virtual)
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental / Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP)

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

Araraquara, 20 de outubro de 2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus, pela vida, saúde e disposição que me fizeram chegar até aqui. Aos meus pais, Humberto e Fabiana, meus pilares, minha base que me ajudaram e ajudam em qualquer situação. Tenho muita sorte em tê-los em minha vida. Amo vocês incondicionalmente.

Ao meu noivo, meu parceiro de vida, meu confidente, meu ajudante até mesmo em alguns experimentos. Obrigada por estar em minha vida e me motivar sempre a ser uma pessoa melhor.

Ao meu irmão, pelo incentivo, por sempre defender a ciência e ser meu exemplo.

Aos meus avós, tios, primos e toda família meus mais sinceros agradecimentos por todo apoio. Dedico esta Tese ao meu querido avô Braz, que foi descansar ao lado de Deus. Você foi um avô maravilhoso e eu sinto sua falta diariamente, te amarei eternamente vô!

À minha orientadora, Profa. Dra. Amanda M. Baviera, meus mais sinceros agradecimentos e gratidão. Foram tantos anos trabalhando juntas, muitos ensinamentos, muitas conversas, muitas risadas e até mesmo alguns “puxões de orelha”. Obrigada Profa, por toda ajuda, incentivo e por todo aprendizado que adiquiri ao longo de todos esses anos. Obrigada por confiar em meu trabalho, pelos elogios e pela dedicação comigo. Sei que muitas vezes não é fácil e não compreendemos algumas coisas, mas eu vejo essa fase da minha vida como uma verdadeira “escola” onde eu amadureci muito. Muita gratidão aos ensinamentos e saiba que sempre terá um espaço especial no meu coração.

Ao Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, por todos os ensinamentos ao longo destes anos, por toda ajuda, principalmente na fase experimental. Obrigada por tornar a pós-graduação mais leve, com suas piadas e risadas.

Aos colegas de laboratório, Paulo, André, Felipe, Camila, Tainá, meus mais sinceros agradecimentos pela amizade, companheirismo, conselhos e trabalhos juntos. Vocês tornaram meu curso de Doutorado muito mais leve, com mais alegria e levarei a amizade de vocês por toda vida.

Vocês são muito especiais para mim e podem sempre contar comigo.

Às amigas de laboratório “mais antigas”, Renata e Tayra, que mesmo não se envolvendo diariamente com a minha pesquisa, participaram e me ajudaram muito ao longo destes anos. Vocês me ensinaram muita coisa e se consegui escrever essa Tese é porque tive a ajuda de vocês em algum momento. Obrigada meninas, vocês moram em meu coração.

Ao laboratório de Bioquímica e Enzimologia, por ser minha segunda casa, por ser um ambiente que sempre lembrarei com muito carinho e muito orgulho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFar-UNESP) e a todos os funcionários que nela se encontram, meus mais sinceros agradecimentos, pela estrutura e todo apoio técnico que me forneceram condições para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“ASSIM, CAMINHAMOS PARA O FUTURO, COM PROPÓSITO, ESFORÇO E ALEGRIA,
SABENDO QUE CILADAS E SOBRESSALTOS EXIGEM DE NÓS PACIÊNCIA NA
TURBULÊNCIA E SABEDORIA NA TRAVESSIA ...”*

Mário Sergio Cortella

RESUMO

A hiperglicemia crônica é um dos principais fatores envolvidos no estabelecimento e manutenção do estresse glico-oxidativo, o qual participa no desenvolvimento das complicações do diabetes mellitus (DM) tipo 1. A insulina é o principal agente antidiabético utilizado para o tratamento do DM tipo 1; no entanto, a insulinização crônica pode aumentar os riscos de ocorrência de episódios de hipoglicemia. Com o objetivo de diminuir os efeitos indesejados da terapia insulínica, a utilização de bioativos naturais como opção terapêutica complementar torna-se interessante. O licopeno e o ácido alfa lipoico possuem elevada capacidade antioxidante. Tornam-se interessantes os estudos dos benefícios que podem ser alcançados com as terapias combinadas entre insulina em menor dose e o licopeno ou o ácido alfa lipoico, principalmente na atenuação do estresse glico-oxidativo e prevenção das complicações diabéticas. O trabalho foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa do trabalho, ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina (40 mg/kg; i.v) foram tratados com insulina (4U/dia ou 1U/dia, via subcutânea) ou licopeno em iogurte (45 mg/kg, via oral), sozinhos ou combinados, durante 30 dias. Níveis de glicose (pós-prandial e jejum), frutossamina, perfil lipídico e atividade de paraoxonase 1 (PON 1) foram avaliados no plasma, e hemoglobina glicada (HbA1c) no sangue. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e produtos finais de glicação avançada (AGEs fluorescentes) foram determinados no plasma e rins. As atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH-Px) foram determinadas nos rins. Massa corporal, massas de tecidos (adiposos, muscular e rins), ingestão alimentar, ingestão hídrica e volume urinário foram monitorados. A função e a integridade dos rins foram avaliadas pela determinação dos níveis de ácido úrico no plasma, proteinúria e excreção de albumina (urina de 24 horas). A sensibilidade à insulina foi monitorada em músculos *gastrocnemius* através da análise dos níveis de fosforilação da AKT após estímulo com insulina. Níveis proteicos dos componentes pertencentes aos sistemas de detoxificação dos AGEs, AGE receptor-1 (AGER-1) e glioxalase 1 (GLO 1), também foram avaliados nos rins. Na segunda etapa do trabalho, ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina (40 mg/kg; i.v) foram tratados com insulina (4U/dia ou 1U/dia, via subcutânea) ou ácido alfa lipoico em iogurte (50 mg/kg ou 25 mg/kg; via oral), sozinhos ou combinados, durante 30 dias. Tal como na primeira etapa do trabalho, os marcadores bioquímicos, fisiológicos e relacionados ao estresse glico-oxidativo no plasma, fígado e rins, bem como a função e a integridade dos rins foram monitorados. A terapia combinada “insulina (1U/dia) + licopeno” promoveu significativa diminuição da glicemia, atenuou a dislipidemia, diminuiu os níveis dos biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo (TBARS no plasma), aumentou a atividade de PON 1 no plasma. Maiores níveis de fosforilação de AKT estimulada por insulina foram observados, indicando uma melhoria na sensibilidade à insulina. Foi observada uma ação benéfica nos rins de ratos diabéticos, com aumento nas atividades de SOD e CAT, diminuição da peroxidação lipídica (TBARS), aumento nos níveis de AGER-1 e GLO 1. Houve diminuição da albuminúria e nos níveis de ácido úrico no plasma de ratos diabéticos tratados com “insulina (1U/dia) + licopeno”. Em relação às terapias combinadas entre “insulina (1U/dia) + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg)”, estas também promoveram significativa diminuição da glicemia, atenuaram a dislipidemia, diminuíram os níveis de HbA1c, frutossamina, TBARS, AGEs fluorescentes e aumentaram a atividade de PON 1 no plasma. O tratamento com “insulina (1U/dia) + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg)”, nos rins de ratos diabéticos, aumentou a atividade de SOD, reduziu a peroxidação lipídica (TBARS) e a glicação avançada (AGEs fluorescentes). Houve diminuição da albuminúria e nos níveis de ácido úrico no plasma de ratos diabéticos tratados com “insulina (1U/dia) + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25

mg/kg)". Adicionalmente, foi observado um aumento expressivo nos níveis de AGER-1 e GLO 1 em ratos diabéticos tratados com "insulina (1U/dia) + ácido alfa lipoico (25mg/kg)". O tratamento com "insulina (1U/dia) + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg)", no fígado de ratos diabéticos, aumentou as atividades de SOD e CAT, diminuiu os AGEs fluorescentes. O tratamento de ratos diabéticos com "insulina 1U/dia + ácido alfa lipoico (50 mg/kg)" promoveu diminuição significativa nos níveis de AGEs fluorescentes no fígado. Houve uma diminuição nos níveis de ALT no plasma dos ratos tratados com "insulina (1U/dia) + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg)". Os tratamentos de ratos diabéticos com "insulina (1U/dia) + licopeno" ou "insulina (1U/dia) + ácido alfa lipoico" promoveram diversos efeitos benéficos, os quais muitas vezes não foram observados com os tratamentos isolados. Os benefícios das terapias combinadas foram especialmente observados na diminuição dos níveis glicêmicos e na atenuação do estresse glico-oxidativo, com ênfase no potencial em acionar os sistemas endógenos de detoxificação das espécies reativas de oxigênio e dos produtos avançados da glicação. Levando-se em consideração que um fármaco antidiabético ideal deve ser aquele capaz de controlar efetivamente os níveis glicêmicos e atenuar o estresse glico-oxidativo, as terapias combinadas "insulina 1U/dia + licopeno" e "insulina 1U/dia + ácido alfa lipoico" surgem como estratégias terapêuticas promissoras para atenuar ou prevenir as complicações relacionadas ao DM tipo 1, principalmente àquelas que impactam o fígado e os rins.

Palavras-chave: diabetes mellitus, licopeno, ácido alfa lipoico, terapias combinadas, complicações diabéticas, memória metabólica.

ABSTRACT

Chronic hyperglycemia is one of the main factors involved in establishment and maintenance of glycooxidative stress, which contributes to the development of complications in type 1 diabetes mellitus (DM). Insulin is the primary antidiabetic agent used for the treatment of type 1 DM; however, chronic insulinization can increase the risk of hypoglycemic episodes. The use of natural bioactives as a complementary therapeutic option becomes interesting to mitigate undesirable effects of insulin therapy. Lycopene and alpha-lipoic acid have high antioxidant capacity. Studies have shown the benefits that can be achieved with combined therapies of lower-dose insulin and lycopene or alpha-lipoic acid, especially in attenuating glyco-oxidative stress and preventing diabetic complications. The work was divided into two stages. In the first stage of the study, streptozotocin-induced diabetic rats (40 mg/kg; i.v) were treated with insulin (4U/day or 1U/day, subcutaneously) or lycopene in yogurt (45 mg/kg, orally), alone or in combination, for 30 days. Glucose levels (postprandial and fasting), fructosamine, lipid profile, and paraoxonase 1 (PON 1) activity were evaluated in plasma, and glycated hemoglobin (HbA1c) in blood. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and advanced glycation end products (AGEs) were determined in plasma and kidneys. The activities of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px) were determined in kidneys. Body mass, tissue masses (adipose, muscle, and kidneys), food intake, water intake, and urinary volume were monitored. Kidney function and integrity were assessed by determining plasma uric acid levels, proteinuria, and albumin excretion (24-hour urine). Insulin sensitivity was monitored in gastrocnemius muscles by analyzing AKT phosphorylation levels after insulin stimulation. Protein levels of AGE detoxification components, AGE receptor-1 (AGER-1), and glyoxalase 1 (GLO 1) were also evaluated in the kidneys. In the second stage of the study, streptozotocin-induced diabetic rats (40 mg/kg; i.v) were treated with insulin (4U/day or 1U/day, subcutaneously) or alpha-lipoic acid in yogurt (50 mg/kg or 25 mg/kg; orally), alone or in combination, for 30 days. Likewise to the first stage of the study, biochemical, physiological, and glyco-oxidative stress-related markers in the plasma, liver, and kidneys, as well as kidney function and integrity, were monitored in the second stage of study. The combined therapy "insulin (1U/day) + lycopene" significantly reduced blood glucose levels, attenuated dyslipidemia, decreased oxidative stress-related biomarkers (plasma TBARS), and increased PON 1 activity in the plasma. Higher levels of insulin-stimulated AKT phosphorylation were observed, indicating improved insulin sensitivity. A beneficial effect on the kidneys of diabetic rats was observed, with increased SOD and CAT activities, reduced lipid peroxidation (TBARS), increased levels of AGER-1 and GLO 1. There was a decrease in albuminuria and plasma uric acid levels in diabetic rats treated with "insulin (1U/day) + lycopene." Regarding the combined therapies of "insulin (1U/day) + alpha-lipoic acid (50 mg/kg or 25 mg/kg)," these also significantly reduced blood glucose levels, attenuated dyslipidemia, reduced HbA1c, fructosamine, TBARS, fluorescent AGEs levels, and increased PON 1 activity in plasma. Treatment with "insulin (1U/day) + alpha-lipoic acid (50 mg/kg or 25 mg/kg)" in the kidneys of diabetic rats increased SOD activity, reduced lipid peroxidation (TBARS) and advanced glycation (fluorescent AGEs). There was a decrease in albuminuria and plasma uric acid levels in diabetic rats treated with "insulin (1U/day) + alpha-lipoic acid (50 mg/kg or 25 mg/kg)." Additionally, a significant increase in AGER-1 and GLO 1 levels was observed in diabetic rats treated with "insulin (1U/day) + alpha-lipoic acid (25mg/kg)." Treatment with "insulin (1U/day) + alpha-lipoic acid (50 mg/kg or 25 mg/kg)" in the livers of diabetic rats increased SOD and CAT activities and reduced fluorescent AGEs. Treatment of diabetic rats with "insulin 1U/day + alpha-lipoic acid (50 mg/kg)" significantly reduced fluorescent AGEs levels in the liver. There was a decrease in ALT levels in the plasma of rats treated with "insulin (1U/day) + alpha-lipoic acid (50 mg/kg or 25 mg/kg)." The treatments of diabetic rats with "insulin (1U/day) + lycopene" or "insulin (1U/day) + alpha-lipoic acid" resulted in various beneficial effects, which were often not observed with individual treatments. The benefits of combined therapies were particularly observed in the reduction of glycemic levels and the attenuation of glycooxidative stress, with an emphasis on the potential to activate endogenous systems for detoxifying reactive oxygen species and advanced glycation products. Considering that an ideal

antidiabetic drug should effectively control glycemic levels and attenuate glycooxidative stress, the combined therapies "insulin 1U/day + lycopene" and "insulin 1U/day + alpha-lipoic acid" emerge as promising therapeutic strategies to attenuate or prevent complications related to type 1 DM, especially those impacting the liver and kidneys.

Keywords: diabetes mellitus, lycopene, lipoic acid, combined therapies, diabetic complications, metabolic memory.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Via da sinalização da insulina.	25
FIGURA 2: Mecanismos pelos quais a via dos poliois aumenta estresse oxidativo.	28
FIGURA 3: Vias de produção dos AGEs endógenos	29
FIGURA 4: Mecanismos envolvidos na ativação da via da PKC.	31
FIGURA 5: Mecanismos envolvidos na via da hexosamina	32
FIGURA 6: Sistemas de defesas antioxidantes do organismo.	34
FIGURA 7: Principais ações atribuídas a PON	36
FIGURA 8: Estrutura do licopeno.	40
FIGURA 9: Estrutura do ácido alfa lipoico	43
FIGURA 10: Evolução da massa corporal e ganho de massa corporal de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno, sozinhos ou em combinação, após 30 dias de tratamento.....	63
FIGURA 11: Parâmetros fisiológicos (ingestão alimentar, ingestão hídrica e volume urinário) de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno, sozinhos ou em combinação, no início (dia 0) e final (dia 30) do experimento.....	64
FIGURA 12: Valores temporais de glicemia pós-prandial e glicemia de jejum após 30 dias de experimento de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno, sozinhos ou em combinação.	68
FIGURA 13: Níveis de fosforilação da AKT (basais e estimulados por insulina) em músculos esqueléticos de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno, sozinhos ou em combinação, durante 30 dias.	70
FIGURA 14: Biomarcadores de estresse glico-oxidativo no plasma de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno, sozinhos ou em combinação, durante 30 dias.	72
FIGURA 15: Perfil lipídico plasmático de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno, sozinhos ou em combinação, durante 30 dias.	73
FIGURA 16: Marcadores de função renal (ácido úrico no plasma) e injúria renal (albumina na urina) de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno, sozinhos ou em combinação, durante 30 dias.	75
FIGURA 17: Enzimas antioxidantes nos rins de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno, sozinhos ou em combinação, durante 30 dias.	76
FIGURA 18: Componentes pertencentes aos sistemas de detoxificação dos AGEs nos rins de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno, sozinhos ou em combinação, durante 30 dias.	77
FIGURA 19: Biomarcadores de estresse glico-oxidativo nos rins de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno, sozinhos ou em combinação, durante 30 dias.	78
FIGURA 20: Evolução da massa corporal e ganho de massa corporal de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, após 30 dias de tratamento.	82
FIGURA 21: Parâmetros fisiológicos (ingestão alimentar, ingestão hídrica e volume urinário) de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, no início (dia 0) e final (dia 30) do experimento.....	84
FIGURA 22: Valores temporais de glicemia pós-prandial e glicemia de jejum após 30 dias de experimento de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico	

(50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação.	87
FIGURA 23: Biomarcadores de estresse glico-oxidativo no plasma de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias.	89
FIGURA 24: Perfil lipídico plasmático de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias.	91
FIGURA 25: Marcadores de função renal (ácido úrico no plasma) e injúria renal (albumina na urina) de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias.....	92
FIGURA 26: Enzimas antioxidantes nos rins de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias.	94
FIGURA 27: Componentes pertencentes aos sistemas de detoxificação dos AGEs nos rins de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias.	95
FIGURA 28: Biomarcadores de estresse glico-oxidativo nos rins de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias.	96
FIGURA 29: Níveis de alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) em plasma de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias.	97
FIGURA 30: Enzimas antioxidantes nos rins de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias.	98
FIGURA 31: Biomarcadores de estresse glico-oxidativo no fígado de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias.	99

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Anticorpos primários e secundários, diluições e condições de armazenamento	60
TABELA 2: Massas de músculos esqueléticos (<i>gastrocnemius</i>), tecidos adiposos brancos (epididimal e retroperitoneal) e rins de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno, sozinhos ou em combinação, após 30 dias de tratamento.	66
TABELA 3: Massas de músculos esqueléticos (<i>soleos e EDL</i>), tecidos adiposos brancos (epididimal e retroperitoneal) e rins de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e/ou ácido alfa lipoico (50 ou 25 mg/kg), após 30 dias de tratamento.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

µL	Microlitros
4-HNE	4-Hidroxinonenal
ACC	Acetil-CoA carboxilase
AGER	AGEs receptors
AGER-1	AGEs receptors 1
AGER-2	AGEs receptors 2
AGER-3	AGEs receptors 3
AGEs	Advanced glycation end products
AGL	Ácidos graxos livres
Akt	<i>serine/threonine kinase</i>
AL	Ácido alfa lipoico
ALEs	<i>Advanced lipoxidation end products</i>
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
ALX	Aloxana
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	3'5'-adenosina-monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinase dependente de AMP
ANOVA	análise de variância One-Way
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob curva
CAr	Câmpus de Araraquara
CAT	Catalase
CEL	Nε(carboxietil) lisina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CML	Nε-(carboximetil) lisina
Colesterol-HDL	Lipoproteína de alta densidade
CoQ	Coenzima Q
CRTC2	CREB-regulated transcriptional coactivator-2
DAG	Diacilglicerol
DAL25	Ratos diabéticos tratados com 25 mg/kg de ácido alfa lipoico
DAL50	Ratos diabéticos tratados com 50mg/kg de ácido alfa lipoico
DHAL	Ácido dihidrolipoico
DHAP	Diidroxiacetona-P
DHBS	Ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno sulfonato
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcóolica
DI1U	Ratos diabéticos tratados com 1U/dia de insulina
DI1U+AL25	Ratos diabéticos tratados com 1U/dia de insulina + 25 mg/kg de ácido alfa lipoico
DI1U+AL50	Ratos diabéticos tratados com 1U/dia de insulina + 50 mg/kg de ácido alfa lipoico
DI1U+LIC	Ratos diabéticos tratados com 1U/dia de insulina + 45mg/kg de licopeno
DI4U	Ratos diabéticos tratados com 4U/dia de insulina
DIOG	Ratos diabéticos tratados com iogurte
DLIC	Ratos diabéticos tratados com 45mg/kg de licopeno
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRC	Doença renal diabética
DTT	1,4-dithiothreitol
EDL	<i>Extensor digitorum longus</i>

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
F1,6Pase	Frutose 1,6 bifosfatase
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
G6Pase	Glicose-6-fosfatase
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFAT	Glutamina frutose-6-fosfato aminotransferase
GLO 1	Glioxalase 1
GLUT 2	Transportador de glicose do tipo 2
GLUT 4	Transportador de glicose do tipo 4
GOLD	Dímero de lisina derivado de glioxal
GSH	Glutationa reduzida
GSH-Px	Glutationa peroxidase
GSH-Rd	Glutationa redutase
GSSG	Glutationa oxidada
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HbA1c	Hemoglobina glicada
HCl	Ácido clorídrico
HMG-CoA redutase	3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HOCl	Ácido hipocloroso
HRP	Enzima peroxidase de rábano
i.p.	Via intraperitoneal
IKK	Inibidor de fator nuclear kappa
IL-6	Interleucina 6
IR	Receptor de insulina
IRS	Substratos do receptor da insulina
IRS1	Substrato do receptor de insulina 1
LADA	Diabetes autoimune latente do adulto
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
LpL	Lipase lipoproteica
LPO	Lipoperoxidação ou peroxidação lipídica
LSH	Lipase hormônio sensível
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MDA	Malondialdeído
MG	Minas Gerais
mL	Mililitros
mg/kg	miligramas/kilogramas
mol/L	Micromoles/litro
MOLD	Dímero de lisina derivado de metilglioxal
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium</i>
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NIOG	Ratos não diabéticos tratados com iogurte

NO	Óxido nítrico
NRF2	Fator nuclear derivado do eritróide 2
O₂	Oxigênio
O₂^{•-}	Radical ânion superóxido
OH•	Radical hidroxila
OONO-	Peroxinitrito
p-AKT	AKT fosforilada
PDE 4B	Enzima fosfodiesterase do tipo 4B
PDK-1	Quinase 1 dependente de fosfoinosítídeo
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PIP₂	Fosfatidilinositol bifosfato
PIP₃	Fosfatidilinositol trifosfato
PKA	Proteína quinase A
PKB	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase C
PMSF	Fluoreto de fenilmetanossulfonil
PON 1	Paraoxonase 1
RAGE	Receptores de AGEs
R-AL	Enantiômero R-ácido alfa lipoico
S-AL	Enantiômero S-ácido alfa lipoico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
SOD	Superóxido dismutase
STZ	Estreptozotocina
TAG	triacilglicerol
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
UA	Unidades arbitrárias
U/dia	Unidades internacionais por dia
UDP-N-GlcNAc	Difosfato de uridina N-acetilglucosamina
UI/kg	Unidades internacionais por kilogramas
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
v/v	volume/volume
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
γ-GT	γ -glutamil transpeptidase

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELA

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 Diabetes mellitus.....	21
2.2 Insulina: sinalização e ações metabólicas	23
2.3 Estresse glico-oxidativo no DM.....	26
2.4 Mecanismos de defesas antioxidantes e componentes de maquinaria de detoxificação de AGEs.....	33
2.5 Utilização de bioativos com atividades antioxidante e antiglicação no manejo do DM.....	38
2.5.1 Licopeno	40
2.5.2 Ácido alfa lipoico.....	43
3. OBJETIVOS.....	46
3.1 Objetivo geral.....	46
3.2 Objetivos específicos	46
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Animais experimentais.....	48
4.2 Indução do diabetes mellitus experimental.....	48
4.3 Tratamento dos animais diabéticos com insulina e/ou licopeno.....	48
4.4 Tratamento dos animais diabéticos com insulina e/ou ácido alfa lipoico.....	49
4.5 Parâmetros fisiológicos, análise temporal da glicemia e finalização do experimento.....	50
4.6 Parâmetros bioquímicos.....	52
4.6.1 Determinação da concentração de glicose	52
4.6.2 Determinação da concentração de frutossamina.....	52
4.6.3 Determinação da concentração de colesterol total	53
4.6.4 Determinação da concentração de triacilglicerol	53
4.6.5 Determinação da concentração de HDL-colesterol	53
4.6.6 Determinação da concentração de creatinina.....	53
4.6.7 Determinação da concentração de ácido úrico.....	54
4.6.8 Determinação da concentração de alanina aminotransferase (ALT)	54
4.6.9 Determinação da concentração de fosfatase alcalina (ALP).....	54
4.7 Biomarcadores de estresse glico-oxidativo no plasma, fígado e rins	54
4.7.1 Biomarcadores de peroxidação lipídica	54
4.7.2 Biomarcadores de glicação avançada	55

4.8	Atividade antioxidante no plasma.....	56
4.9	Análise semi-quantitativa dos níveis de albuminúria	56
4.10	Defesas antioxidantes no fígado e rins.....	57
4.10.1	Preparação das amostras	57
4.10.2	Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	58
4.10.3	Atividade da catalase (CAT)	58
4.10.4	Atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px).....	59
4.10.5	Dosagem de proteínas totais.....	59
4.11	Níveis proteicos e de fosforilação da AKT nos músculos e níveis proteicos de AGER-1 e glicoxalase 1 nos rins (Western blotting)	59
4.12	Análises estatísticas	61
<i>Capítulo 1.....</i>		62
5.	RESULTADOS	63
5.1	A terapia combinada 1U/dia de insulina + licopeno (45 mg/kg) aumentou o ganho de massa corporal e diminuiu a polifagia, a polidipsia e a poliúria em ratos diabéticos.....	63
5.2	A terapia combinada 1U/dia de insulina + licopeno (45 mg/kg) diminuiu a glicemia eaumentou a sensibilidade à insulina nos músculos esqueléticos em ratos diabéticos	67
5.3	A terapia combinada 1U/dia de insulina + licopeno (45 mg/kg) diminuiu marcadores do estresse glico-oxidativo e aumentou as defesas antioxidantes no sangue de ratos diabéticos	70
5.4	A terapia combinada 1U/dia de insulina + licopeno (45 mg/kg) atenuou a dislipidemianos ratos diabéticos	72
5.5	A terapia combinada 1U/dia de insulina + licopeno (45 mg/kg) diminuiu biomarcadores de injúria renal e de função renal no plasma e na urina de ratos diabéticos.....	73
5.6	A terapia combinada 1U/dia de insulina + licopeno (45 mg/kg) aumentou as defesas antioxidantes e os componentes de maquinaria de detoxificação de AGEs nos rins deratos diabéticos	75
5.7	A terapia combinada 1U/dia de insulina + licopeno (45mg/kg) mitigou o estresse glico-oxidativo nos rins dos ratos diabéticos	78
<i>Capítulo 2.....</i>		80
5.8	A terapia combinada 1U/dia de insulina + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg) aumentou o ganho de massa corporal, mas não atenuou a polifagia, polidipsia e a poliúriaem ratos diabéticos	81
5.9	A terapia combinada 1U/dia de insulina + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg) diminuiu a glicemia pós-prandial de ratos diabéticos.....	86
5.10	A terapia combinada 1U/dia de insulina + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg) diminuiu marcadores do estresse glico-oxidativo e aumentou as defesas antioxidantes no sangue de ratos diabéticos	88
5.11	A terapia combinada 1U/dia de insulina + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg) atenuou a dislipidemia nos ratos diabéticos.....	90
5.12	A terapia combinada 1U/dia de insulina + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg) diminuiu biomarcadores de injúria renal e de função renal no plasma e na urina de ratos diabéticos	91
5.13	A terapia combinada 1U/dia de insulina + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg) aumentou as defesas antioxidantes e os componentes de maquinaria de detoxificação de AGEs nos rins de ratos diabéticos.....	93

5.14 A terapia combinada 1U/dia de insulina + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg) mitigou o estresse glico-oxidativo nos rins dos ratos diabéticos	95
5.15 A terapia combinada 1U/dia de insulina + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg) aumentou as defesas antioxidantes no fígado de ratos diabéticos e diminuiu marcadores relacionados a a lesão hepática.	96
5.16 A terapia combinada 1U/dia de insulina + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg)mitigou o estresse glico-oxidativo no fígado dos ratos diabéticos	99
6. DISCUSSÃO.....	100
7. CONCLUSÕES.....	121
8. REERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
9. ANEXOS.....	132

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O diabetes mellitus (DM) tipo 1 é definido por deficiência na produção insulínica em decorrência da destruição das células β -pâncreáticas, geralmente mediada por autoimunidade, resultando em deficiência absoluta de insulina. A principal característica do DM é a hiperglicemia crônica que, em longo prazo, está associada à ocorrências das complicações microvasculares (nefropatia, retinopatia, neuropatia diabéticas) e macrovasculares (doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral), sendo as causas principais de morbidade e mortalidade associadas ao DM (ELSAYED et al., 2023). Além da disfunção pancreática, outra característica do DM tipo 2 é a resistência tecidual à insulina, onde ocorre uma diminuição da sensibilidade às ações da insulina em tecidos-alvo, especialmente em músculos esqueléticos, tecidos adiposos, fígado e pâncreas (LAAKSO; KUUSISTO, 2014). Ainda não está totalmente esclarecida a magnitude da participação da resistência à insulina na fisiopatologia do DM tipo 1, porém a resistência à insulina está associada a um controle glicêmico ineficiente, culminando na necessidade de aumento gradativo na dose de insulina nos pacientes com DM tipo 1 para se obter o controle glicêmico, o que por sua vez, traz como principal consequência riscos de hipoglicemia (MILLER et al., 2021; OKAMOTO et al., 2011).

A hiperglicemia crônica típica do DM está envolvida no estabelecimento de um fenômeno denominado “memória metabólica”, o qual inclui um conjunto de consequências deletérias relacionadas ao inexistente ou insuficiente controle metabólico, ou até mesmo aos episódios transitórios de hiperglicemia, os quais têm associação com o estabelecimento das complicações da doença e da piora da capacidade de acionamento dos sistemas endógenos de reparo ou de defesa contra estas agressões (BEREZIN, 2016; CERIELLO et al., 2012). É um fenômeno promovido coletivamente por diversos mecanismos, os quais incluem geração de produtos avançados da glicação, estresse oxidativo, inflamação e alterações epigenéticas.

O aumento na geração de produtos finais de glicação avançada (AGEs) e de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) são favorecidos pela hiperglicemia crônica, estabelecendo-se o estresse glico-oxidativo, o qual participa de maneira direta no estabelecimento das complicações diabéticas (ROCHETTE et al., 2014; SATO et al., 2006). Os AGEs causam perda de funcionalidade de diversas biomoléculas, ademais também podem contribuir para a ocorrência das complicações diabéticas via ativação de receptores específicos presentes nas membranas plasmáticas, os receptores de AGEs (RAGE) (SINGH et al., 2014). A ligação dos AGEs aos receptores RAGE é responsável por exacerbar a produção de EROs, além de ativar o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), culminando em aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (SANAJOU et al., 2018; SINGH et al., 2014). Nos rins, a

interação AGEs-RAGE exerce efeitos prejudiciais, principalmente estimulando a migração de fagócitos mononucleares para o glomérulo, culminando na geração de diversos mediadores tóxicos, incluindo citocinas pró-inflamatórias e EROs, causando esclerose glomerular e favorecendo a lesão renal (BANBA et al., 2000; SONG; THAISS; GUO, 2019).

Por outro lado, existem sistemas de detoxificação de AGEs ou de seus precursores. Um deles é o complexo de AGEs receptores; AGER (AGER-1/OST-48, AGER-2/80K-H e AGER-3/galectin-3), envolvido na endocitose de proteínas modificadas por AGEs (KUMAR; CHITRA; REDDY, 2016). Há também o sistema dependente de glioxalase 1, responsável por detoxificar os produtos iniciais da glicação, incluindo os produtos de Amadori, bem como compostos dicarbonílicos reativos, tais como glioxal e metilglioxal (EMEL'YANOV, 2017; KUMAR; CHITRA; REDDY, 2016; OTT et al., 2014a).

A insulinoaterapia é a única opção para o tratamento do DM tipo 1. No entanto, a insulinização crônica pode causar episódios de hipoglicemia (CRYER, 2013), aumento do ganho de massa corporal (Heller et al., 2004), aumento do estresse oxidativo que resulta em disfunção endotelial e inflamação (AKOUMIANAKIS et al., 2020). Sabendo-se da importância da insulinização no DM tipo 1 e dos potenciais efeitos adversos que podem ser observados, a utilização de terapias combinadas entre insulina em menor dose e bioativos com potencial antidiabético pode ser uma opção interessante e efetiva para o alcance do controle glicêmico e atenuação das complicações diabéticas (PRABHAKAR; KUMAR; DOBLE, 2014; VENKATAKRISHNAN; CHIU; WANG, 2019). Terapias combinadas entre insulina e compostos bioativos de origem natural têm sido recentemente propostas como estratégias para alcançar um controle glicêmico eficaz e atenuar as complicações diabéticas em longo prazo relacionadas ao estresse glico-oxidativo, além de prevenir ou atenuar os efeitos adversos da insulinização em longo prazo (BASHIR, 2019; GUTIERRES et al., 2019; MALEKIYAN et al., 2019; SHARMA; CHOPRA; KULKARNI, 2007; SOLEYMANINEJAD et al., 2017).

Um dos principais benefícios da combinação de compostos bioativos naturais com agentes terapêuticos clássicos para o DM é o potencial de mitigar as consequências da memória metabólica. Um tratamento precoce e intensivo, na tentativa de manter os níveis glicêmicos próximos à normalidade e alcançar o controle metabólico em indivíduos diabéticos, é fundamental para minimizar os impactos negativos nos tecidos. Além disso, a introdução de agentes terapêuticos capazes de inibirem as cascatas bioquímicas desencadeadas pela glicação avançada, estresse oxidativo e inflamação pode ser útil para minimizar as complicações diabéticas (CERIELLO; IHNAT; THORPE, 2009; TESTA et al., 2017). Estudos têm demonstrado o potencial antidiabético, antioxidante e antiglicação de combinações de compostos bioativos presentes em plantas medicinais ou alimentos funcionais, sejam as combinações desses bioativos naturais entre si (ARCARO et al.,

2014; ASSIS et al., 2017; COSTA et al., 2020a) ou com fármacos antidiabéticos, com o intuito de verificar suas eficácias na prevenção das complicações do DM.

Estudo anterior de nosso laboratório mostrou os efeitos benéficos da associação de uma menor dose de insulina (1U/dia; i.p.) com o bioativo natural curcumina (90 mg/kg) em modelo experimental de DM tipo 1. Em relação ao tratamento com 1U/dia de insulina sozinha, a terapia combinada 1U/dia de insulina + curcumina causou maior diminuição dos níveis glicêmicos, atenuação da dislipidemia, diminuição dos marcadores de lesão hepática, redução do estresse glico-oxidativo e aumento das enzimas antioxidantes (GUTIERRES et al., 2019). Em outro estudo de nosso laboratório, foi evidenciado o potencial benéfico e aditivo alcançado com a associação entre o fármaco metformina (250 mg/kg) e o bioativo natural licopeno (45 mg/kg) em modelo experimental de DM tipo 1. Houve um efeito aditivo desta associação na diminuição da glicemia, níveis plasmáticos de colesterol total, marcador de injúria hepática e marcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo (FIGUEIREDO et al., 2020). Em conjunto, estes estudos fornecem evidências dos efeitos promissores alcançados pela associação de fármacos antidiabéticos com bioativos naturais em sistema-modelo *in vivo* de DM tipo 1.

Considerando ser a terapia insulínica prescrita para o DM tipo 1, torna-se extremamente interessante o estudo do tratamento de animais em sistema-modelo de DM tipo 1 com a associação de uma dose menor de insulina + fitoquímicos que possuem alto poder antioxidante, com vistas a diminuir a ocorrência dos eventos adversos da insulinização crônica sem perder a capacidade de proteção contra os eventos glico-oxidativos.

O licopeno é o principal carotenóide encontrado em tomates e outras frutas e vegetais vermelhos. Trata-se de um hidrocarboneto polieno linear que contém onze ligações duplas conjugadas e duas não conjugadas (GRABOWSKA et al., 2019). As propriedades antioxidantes do licopeno estão associadas principalmente à capacidade de captura de EROs (PRZYBYLSKA, 2020; ZHAO et al., 2020). Estratégias de suplementação com licopeno ou com alimentos ricos no carotenoide ganham destaque devido aos seus múltiplos benefícios à saúde, oferecendo proteção no combate a vários distúrbios metabólicos, incluindo doenças cardiovasculares e DM (BANIHANI, 2018; PRZYBYLSKA, 2020; XU et al., 2021).

O ácido alfa lipoico (AL) é um composto natural conhecido como ácido 1,2-ditiolano-3-pentanóico (BUSBY et al., 1999; GOLBIDI; BADRAN; LAHER, 2011). Trata-se de um composto dissulfeto que funciona como uma coenzima nas reações mitocondriais envolvendo as enzimas piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase. A presença de um carbono assimétrico em sua estrutura química confere à molécula dois enantiômeros: R-AL e S-AL, mas apenas o enantiômero R-AL é capaz de exercer função biológica nas reações mitocondriais (GOLBIDI; BADRAN; LAHER, 2011; REED, 1998). O AL promove diversos benefícios na prevenção das

complicações do diabetes, atuando principalmente como um potente antioxidante. Ademais, o AL aumenta o metabolismo oxidativo da glicose nos músculos esqueléticos ao atuar na sinalização da insulina, incluindo a estimulação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), melhorando a sensibilidade dos músculos esqueléticos às ações da insulina.

O AL proveniente da dieta é rapidamente absorvido, transportado para os compartimentos intracelulares e reduzido a ácido dihidrolipoico (DHAL)(ROCHETTE et al., 2015). Em virtude dos benefícios mencionados, o AL ganha destaque como antioxidante para uso no tratamento de complicações diabéticas, incluindo retinopatia, neuropatia e outras doenças vasculares.

Diante do exposto, este estudo pode fornecer evidências iniciais para novas estratégias terapêuticas eficazes no controle da glicemia e das complicações diabéticas, principalmente àquelas relacionadas ao estresse glico-oxidativo, com base em terapia combinada entre insulina em menor dose e os bioativos naturais, licopeno ou ácido alfa lipoico, em modelo experimental de DM tipo 1.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes mellitus

O DM é uma doença crônica complexa que exige estudos contínuos baseados em estratégias multifatoriais que se baseiam redução ou até mesmo da prevenção das complicações diabéticas (macrovasculares e microvasculares), além de alcance do controle glicêmico (COMMITTEE, 2022). O DM emergiu como uma das doenças mais graves dos tempos atuais, causando risco de vida, múltiplas complicações e reduzindo a expectativa de vida; sua prevalência global foi de 10,5% (536,6 milhões de adultos) em 2021. É estimado que entre os anos 2021 até 2045, cerca de 15,5 milhões de brasileiros estejam diabéticos. A crescente prevalência do DM tem sido atribuída ao envelhecimento das populações, no entanto a baixa mortalidade é relacionada com os crescentes estudos e melhoria nos protocolos médicos (SUN et al., 2022).

O DM é considerado uma doença metabólica definida por deficiência na produção de insulina pelas células beta do pâncreas e/ou por resistência tecidual às ações desse hormônio, acarretando diversos prejuízos no controle do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. A hiperglicemia crônica é a principal consequência dessa doença, no entanto outras alterações são observadas no DM, tais como: aumento nas concentrações circulantes de triglicerídeos e ácidos graxos, colesterol e da lipoproteína de baixa densidade (LDL), e diminuição nas concentrações circulantes de lipoproteína de alta densidade (HDL) (CAI; YANG; ZHANG, 2021; WIGGIN et al., 2009). As principais manifestações clínicas descritas, estão: glicosúria (aumento da excreção de glicose na urina), poliúria (aumento do volume urinário), perda de peso, polidipsia (aumento da sede), polifagia (aumento da fome) e visão turva (COMMITTEE, 2022).

A classificação do DM consiste em: (i) DM tipo 1 (incluindo diabetes autoimune latente do adulto - LADA), tendo como característica a destruição maciça das células β -pancreáticas, geralmente mediada por autoimunidade, sendo a principal consequência é a deficiência absoluta de insulina; (ii) DM tipo 2, onde observa-se predominância de resistência insulínica com disfunção pancreática e deficiência relativa de insulina; (iii) outros tipos específicos de DM, tais como defeitos genéticos das células beta do pâncreas, endocrinopatias, diabetes induzido por fármacos ou produtos químicos, entre outros; (iv) DM gestacional, quando a intolerância à glicose tem início na gravidez ou primeiramente detectada durante a gestação (COMMITTEE, 2022; DEUTSCH; AHLQVIST; UDLER, 2022). A hiperglicemia crônica é a principal consequência do DM, e no DM tipo 1 se desenvolve rapidamente e independe da presença de resistência à insulina; no entanto, após longos períodos de hiperglicemia crônica, a resistência à insulina pode surgir e aumentar gradualmente. Já no DM tipo 2, geralmente a resistência à insulina está presente por vários anos antes que a hiperglicemia crônica se desenvolva (LAAKSO; KUUSISTO, 2014).

Para induzir o DM experimental em animais, podem ser utilizadas estratégias farmacológicas, especialmente via administração dos fármacos diabetogênicos estreptozotocina (STZ) e aloxana (ALX). A STZ é uma molécula glicosilada e captada pelas células beta pancreáticas, via transportador de glicose GLUT 2, ocasionando a alquilação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e, culminando danos ao DNA que induzem a ativação de poli-ADP ribosilação, cuja consequência é a apoptose das células β -pancreáticas. Em adição, há liberação tóxica de óxido nítrico (NO) e a formação de EROs, incluindo radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH\cdot$) e peroxinitrito ($OONO^{\cdot}$), os quais também contribuem para a promoção dos danos ao DNA. Como resultado, as células β pancreáticas são destruídas também por necrose (SZKUDELSKI, 2001). Como ocorre uma destruição maciça das células beta pancreáticas, a administração de STZ leva ao desenvolvimento de modelo de DM que mimetiza as alterações do DM tipo 1, onde a hiperglicemia é muito elevada e consequentemente as complicações da doença aparecem rapidamente, tornando-se um modelo interessante para o estudo do potencial de compostos bioativos que previnam e/ou atenuem as complicações do DM relacionadas à hiperglicemia crônica.

A resistência à insulina é caracterizada como uma resposta biológica prejudicada às ações da insulina em tecidos-alvo, principalmente músculo esquelético, tecido adiposo e fígado, resultando em um aumento compensatório na secreção de insulina (BROWN; HARHAY; HARHAY, 2019; FREEMAN; PENNINGS, 2022; SEONG et al., 2019). No fígado, a resistência à insulina culmina em aumento na produção hepática de glicose, uma vez que não ocorre inibição nos processos de glicogenólise e gliconeogênese (SALTIEL, 2021). Tendo em vista que no metabolismo de carboidratos, a insulina é reponsável por aumentar a translocação de vesículas contendo os transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT4) do citoplasma para a membrana plasmática, promovendo a captação da glicose tissular para os miócitos e adipócitos para que a glicose siga para as vias oxidativas. Em um quadro de resistência tecidual à insulina, não ocorrerá a translocação das vesículas contendo GLUT4 e por consequência, não ocorrerá a captação da glicose tissular pelos músculos esqueléticos e tecidos adiposos.

Diversos mecanismos podem ocasionar a resistência à insulina, ao interferirem com a capacidade de ativação de componentes da cascata de sinalização deste hormônio, incluindo a exposição crônica aos elevados níveis de glicose, lipídeos, estresse oxidativo, inflamação, entre outros (KAUL; APOSTOLOPOULOU; RODEN, 2015). O desenvolvimento de resistência à insulina normalmente resulta em um aumento compensatório na produção e secreção de insulina. Concentrações elevadas de insulina endógena, estão associados à resistência à insulina e resultam em ganho de peso que, por sua vez, exacerba a resistência à insulina (HENSTRIDGE et al., 2019). Esse ciclo vicioso continua até que a função das células β -pancreáticas não seja mais suficiente para atender à demanda de insulina criada pela resistência à insulina, resultando em hiperglicemia crônica.

As consequências metabólicas da resistência à insulina podem resultar em hiperglicemia, hipertensão, dislipidemia, adiposidade visceral, hiperuricemia, marcadores inflamatórios elevados, disfunção endotelial, entre outros. A progressão da resistência à insulina pode levar à síndrome metabólica, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e DM tipo 2 (FREEMAN; PENNINGS, 2022).

2.2 Insulina: sinalização e ações metabólicas

A insulina é um hormônio cujas ações são essencialmente anabólicas, sendo o principal hormônio responsável pela manutenção da homeostase da glicose. A insulina participa do controle do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Essas funções são bem caracterizadas nas células-alvo dos órgãos que têm participação importante na regulação do metabolismo energético: fígado, músculos esqueléticos e tecidos adiposos (CRUZ-PINEDA et al., 2022).

Para exercer seus efeitos biológicos nos tecidos, a insulina liga-se na subunidade α do receptor de insulina (IR; figura 1). O IR é um receptor enzimático do tipo tirosina quinase, ou seja, é capaz fosforilar resíduos de tirosina em si próprio e em outros substratos. Quando a insulina se liga em seu receptor (IR) promove um processo de dimerização com consequente ativação da atividade tirosina quinase do receptor. Uma vez o IR ativado, ou seja, após a sua auto fosforilação em resíduos de tirosina, substratos do receptor da insulina (IRS) que se aproximam do IR também sofrem as ações da atividade tirosina quinase do receptor, após o ancoramento do IRS1 no IR (KIDO; NAKAE; ACCILI, 2001; SALTIEL, 2021).

As tirosinas fosforiladas presentes no IRS1 caracterizam um ponto inicial de uma cascata de sinalização e que culmina na ativação da Akt (PAULI et al., 2009). Assim, essas tirosinas fosforiladas presentes no IRS1 tornam-se um importante local de ancoramento de outros componentes, tal como a enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (KIDO; NAKAE; ACCILI, 2001). A PI3K e MAPK são importantes na regulação da mitogênese, diferenciação celular e transporte de glicose. Ainda, a PI3K é uma enzima que quando ativada, ou seja, após ancoramento com as tirosinas fosforiladas do IRS1, fosforila fosfolipídeos de membrana plasmática difosforilados (fosfatidilinositol bifosfato; PIP_2) gerando o fosfatidilinositol trifosfato; PIP_3 .

O aumento na geração de PIP_3 ocasiona o recrutamento de duas proteínas quinases importantes, tais como a proteína quinase B (PKB) e a quinase 1 dependente de fosfoinosítídeo (PDK-1) do citoplasma para a membrana plasmática. A proteína quinase B (PKB) é também conhecida como Akt quando ativada em células expostas a diversos estímulos como hormônios, fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). A perda da ativação da Akt acarreta diversos prejuízos fisiopatológicos para o organismo, e está relacionado com algumas

doenças como o DM e o câncer. Assim, a Akt relaciona-se com processos que incluem sobrevivência celular, crescimento, proliferação, angiogênese, metabolismo e migração (NOLAND et al., 2007). É notório destacar que PDK-1 quando não está ancorada no PIP₃ encontram-se em sua forma inativa, porém uma vez que acontece o ancoramento dessa quinase (PDK-1) no PIP₃, esta torna-se ativada. Além disto, sabe-se que a PDK-1 ativada, ou seja, ancorada no PIP₃ é capaz de fosforilar a Akt e por este motivo, normalmente essas quinases se encontram ancoradas em PIP₃ que estão localizadas próximas na membrana celular (MACKENZIE; ELLIOTT, 2014).

Uma vez que a Akt é ativada, ou seja, após ao ancoramento com PIP₃ e fosforilação por PDK-1, esta é capaz de fosforilar e controlar uma série de atividades de diversas proteínas exercendo um papel importante, principalmente relacionado ao metabolismo (NELSON et al., 2014; NOLAND et al., 2007). A Akt ativada (fosforilada) sofre um processo de dissociação e retorna para o citoplasma. Portanto, a ligação da insulina em seu receptor (IR) desencadeia sucessivas fosforilações e ancoramentos intracelulares que promovem a ativação de uma das proteínas efetoras, a Akt, responsável pelas ações metabólicas da insulina. Dentre elas, uma ação importante mediada pela fosforilação da Akt é a translocação dos transportadores de glicose (GLUT 4) localizados nas vesículas no citoplasma para a membrana citoplasmática, facilitando a captação de glicose pela célula (MACKENZIE; ELLIOTT, 2014).

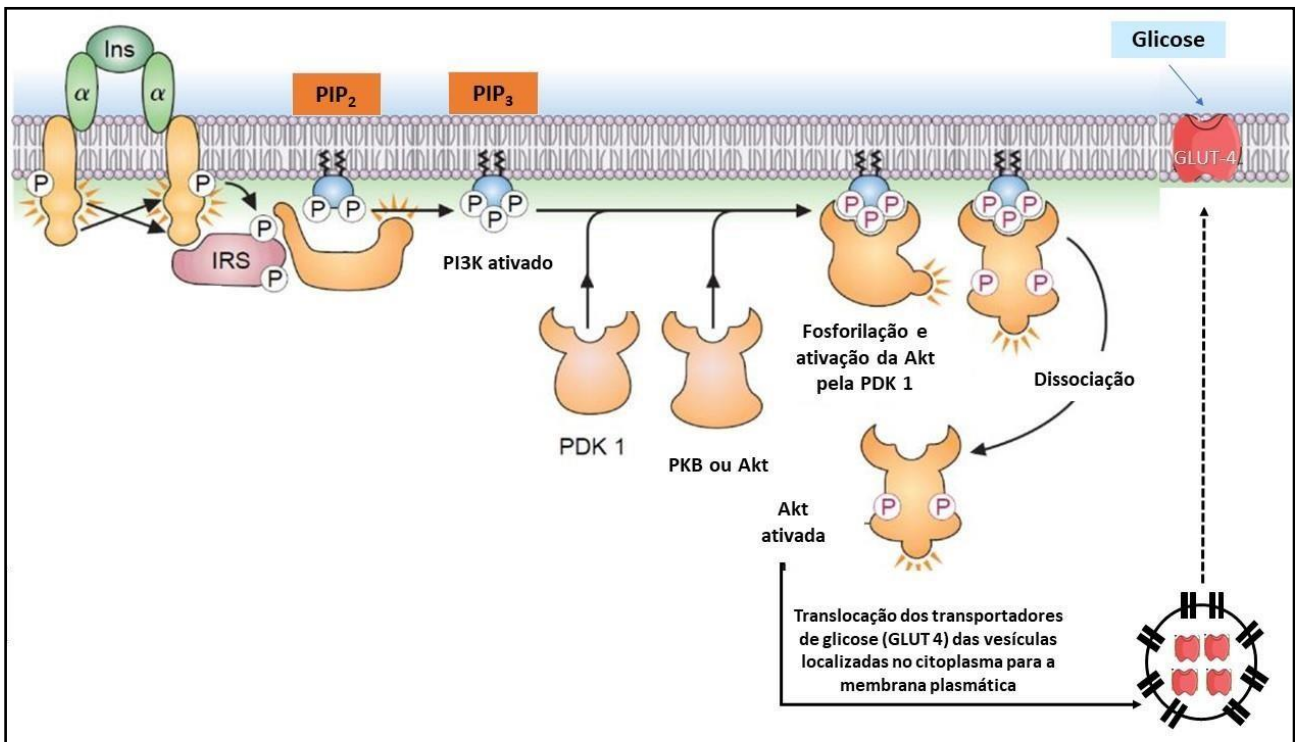


Figura 1. Via da sinalização da insulina. Para exercer seus efeitos biológicos nos tecidos, a insulina liga-se na subunidade α do receptor de insulina (IR). Quando a insulina se liga em seu receptor (IR) promove um processo de dimerização com consequente ativação da atividade tirosina quinase do receptor. Uma vez o IR ativado, substratos do receptor da insulina (IRS) também sofrem as ações da atividade tirosina quinase do receptor, após o ancoramento do IRS1 no IR. Assim, essas tirosinas fosforiladas presentes no IRS1 tornam-se um importante local de ancoramento de outros componentes, tal como a enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). A PI3K quando ativada (após ancoramento com as tirosinas fosforiladas do IRS1) fosforila fosfolipídeos de membrana plasmática difosforilados (fosfatidilinositol bifosfato; PIP₂) gerando o fosfatidilinositol trifosfato; PIP₃. O aumento na geração de PIP₃ ocasiona o recrutamento de duas proteínas quinases importantes: a proteína quinase B (PKB) e a quinase 1 dependente de fosfoinositídeo (PDK-1) do citoplasma para a membrana plasmática. A PDK-1 ativada (ancorada no PIP₃) é capaz de fosforilar a Akt. A Akt ativada (fosforilada) ocasiona uma importante ação no metabolismo: a translocação dos transportadores de glicose (GLUT4) localizados nas vesículas (citoplasma) para a membrana plasmática facilitando a captação da glicose. **Fonte:** Adaptado Alberts et al., 2008.

No metabolismo de carboidratos, a insulina é responsável por estimular a captação de glicose, especialmente em músculos esqueléticos e tecidos adiposos, uma vez que estimula a translocação de vesículas contendo os transportadores de glicose, GLUT 4, para a membrana plasmática das células; estimular a oxidação da glicose para geração de energia, estimular a glicogênese, ou seja, a síntese de glicogênio (SALTIEL; KAHN, 2001). A insulina promove a inibição da transcrição de genes de enzimas que participam da gliconeogênese, tais como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), frutose 1,6 bifosfatase (F1,6Pase) e glicose-6-fosfatase (G6Pase), que culmina na inibição da gliconeogênese. A glicogenólise (quebra do glicogênio) também é inibida pela insulina através da desfosforilação da glicogênio fosforilase, processo que a torna inativa, ou seja, impedindo que ocorra a quebra do glicogênio (SALTIEL, 2021). Estes mecanismos que promovem estimulação da captação e utilização da glicose, em combinação com a inibição na produção hepática de glicose, contribuem para a manutenção da glicemia em valores de normalidade.

Já no metabolismo lipídico, a insulina estimula a atividade da lipase lipoproteica (LpL), enzima presente nos capilares sanguíneos presentes nos tecidos adiposos e musculares, e assim promove a hidrólise dos triglicerídeos das lipoproteínas circulantes quilomicron e VLDL e estimula a captação de ácidos graxos; inibe a lipase hormônio sensível (LHS), presente nos tecidos adiposos, enzima responsável pela hidrólise de triglicerídeos, disponibilizando assim menos ácidos graxos livres (AGL) (SALTIEL, 2021; SALTIEL; KAHN, 2001).

Por fim, no metabolismo de proteínas, a insulina inibe a degradação de proteínas, liberando menos aminoácidos pelos tecidos; aumenta a captação de aminoácidos pelos tecidos e aumenta a velocidade da síntese proteica (SALTIEL, 2021).

2.3. Estresse glico-oxidativo no DM

O processo de respiração celular garante a produção de energia na forma trifosfato de adenosina (ATP) através de reações bioquímicas aeróbicas, ou seja, que utilizam o oxigênio molecular. Durante o processo de respiração celular, mais especificamente na cadeia transportadora de elétrons, o oxigênio molecular é uma das poucas moléculas capazes de atravessar a membrana mitocondrial interna, a qual é altamente impermeável (DUNN; GRIDER, 2023; RAUT; KHULLAR, 2023).

Assim, quando o oxigênio molecular atravessa a membrana mitocondrial interna, principalmente entre a Coenzima Q (CoQ) e Complexo III da cadeia transportadora de elétrons, ocorre a captura dos elétrons da CoQ pelo oxigênio molecular, processo que ocorre devido ao potencial de redução padrão do oxigênio molecular ser maior do que o do ferro presente no citocromo do Complexo III. O resultado é a formação do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que pode levar a formação do radical hidroxila ($\cdot HO$) e outras EROs (RAUT; KHULLAR, 2023; SHARMA; GUPTA; SHARMA, 2018).

Em condições fisiológicas, as EROs geradas durante o processo de respiração celular são, em sua maioria, eliminadas por inúmeros antioxidantes presentes na matriz mitocondrial (NISHIKAWA et al., 2000; RAUT; KHULLAR, 2023). No entanto, em condições patológicas, o cenário pode ser diferente. A hiperglicemia crônica do DM pode, em longo prazo, promover um aumento significativo na geração de EROs na cadeia transportadora de elétrons, através de cinco mecanismos: (i) aumento no fluxo de glicose e de outros açúcares pela via dos polióis; (ii) aumento na formação intracelular de AGEs; (iii) aumento na expressão dos receptores de AGE (RAGE) na superfície das células; (iv) ativação proteína quinase C (PKC); (v) aumento na via da hexosamina (BROWNLEE, 2005). O estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento na produção de EROs e ERNs e/ou pela redução nas defesas antioxidantes. O estresse oxidativo no DM participa do estabelecimento das complicações crônicas microvasculares (retinopatias, neuropatias, nefropatias) e macrovasculares (doenças cardiovasculares e cerebrovasculares) (INCALZA et al., 2018; MADONNA; DE CATERINA, 2011).

A via dos polióis é composta por enzimas que pertencem a família das aldo-ceto-redutases, e podem utilizar como substratos uma ampla variedade de compostos carbonílicos, e reduzi-los aos seus respectivos álcoois de açúcares (polióis), com a oferta de poder redutor da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). Na via dos poliois, a glicose é convertida em sorbitol por ação da enzima aldose redutase e para isso acontecer, há oxidação de NADPH (figura 2). Posteriormente, ocorre formação de frutose por ação da sorbitol desidrogenase que, por sua vez, utiliza o NAD^+ como cofator. Uma das principais consequências de aumento no fluxo desta via é a menor disponibilidade da NADPH, molécula necessária para a regeneração da glutatona em sua forma reduzida (GSH), culminando na diminuição drástica deste antioxidante endógeno e aumentando assim o estresse oxidativo induzido por hiperglicemia (GARG; GUPTA, 2022; NIIMI et al., 2021). Além disto, ocorre o acúmulo do sorbitol, devido a sua impermeabilidade na membrana plasmática; com isto, qualquer tecido independente de insulina é exposto ao estresse osmótico causado pelo excesso de sorbitol (SINGH; KAPOOR; BHATNAGAR, 2021). Outra consequência importante ocorre devido ao acúmulo de frutose, que promove um aumento na geração de dicarbonilas reativas como a 3-deoxiglicosona, aumentando a geração de AGEs, que podem aumentar ainda mais o estresse oxidativo. Também é válido ressaltar que, devido ao fato da enzima aldose redutase ser predominantemente encontrada em tecidos como a retina, cristalino, nervos e glomérulos renais, a via dos poliois também contribui na progressão das complicações microvasculares em retina e rins de pacientes diabéticos (GARG; GUPTA, 2022; RAMASAMY; GOLDBERG, 2010).

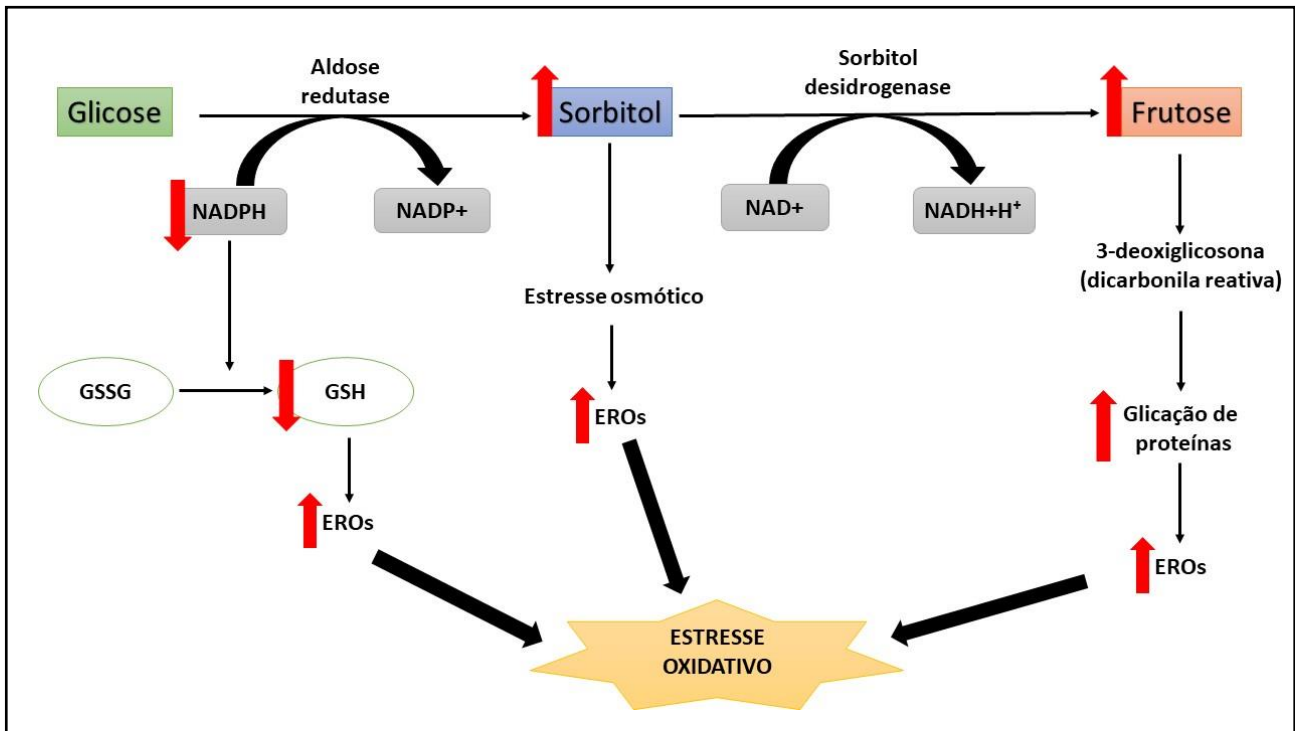


Figura 2. Mecanismos pelos quais a via dos poliois aumenta estresse oxidativo. A hiperglicemia é responsável por desviar a glicose em excesso para a via dos poliois. A glicose é convertida em sorbitol através da ação da enzima aldose redutase, na qual utiliza o NADPH como cofator. Com a diminuição no aporte de NADPH, não ocorre a redução da molécula de glutatona oxidada (GSSG) e consequentemente menores níveis da molécula de glutatona em sua forma reduzida serão cruciais para o aumento do estresse oxidativo via diminuição deste antioxidante endógeno. Além disto, o excesso de sorbitol no citoplasma das células promove o estresse osmótico que também aumenta a produção de EROs. Por fim, o excesso de frutose leva a produção de 3-deoxiglicosona, um dicarbonila altamente reativa que pode levar a produção de AGEs, aumentando assim o processo de glicação de proteínas e como consequência acontece o aumento da produção de EROs. **Fonte:** De autoria própria, 2023; Garg e Gupta, 2022.

O segundo mecanismo pelo qual a hiperglicemia crônica é responsável por aumentar o estresse glico-oxidativo dá-se pelo aumento na formação dos produtos finais de glicação avançada, os AGEs, demonstrado na Figura 3 (NOWOTNY et al., 2015). A diversidade estrutural dos AGEs sugere inúmeros mecanismos envolvidos na sua formação. De fato, AGEs endógenos podem ser gerados em diversas vias a partir de uma série de precursores (TWARDA-CLAPA et al., 2022). O principal mecanismo de produção de AGEs ocorre inicialmente com o processo de glicação de proteínas, via reação de Maillard, quando grupos carbonilas de monossacarídeos redutores (aldose ou cetose, por exemplo) reagem com grupos amino de proteínas (cadeias laterais de lisina ou arginina). A condensação do grupo carbonila e o grupo amina é uma reação reversível e produz as bases de Schiff (imina), que se rearranjam em produtos de Amadori (cetoamina) (BIERHAUS et al., 1998; KHALID; PETROIANU; ADEM, 2022; TWARDA-CLAPA et al., 2022).

Os produtos de Amadori são convertidos em dicarbonilas altamente reativas (glioxal, metilglioxal, 3-deoxiglicosona). Estas dicarbonilas, após desidratação e rearranjos, levam à formação de diversos AGEs, sendo os mais conhecidos N ϵ -(carboximetil) lisina (CML), N ϵ -(carboxietil) lisina (CEL), dímero de lisina derivado de glioxal (GOLD) e metilglioxal (MOLD), arg-pirimidina,

pirralina, pentosidina e vesperlisinas (AHMED, 2005; KHALID; PETROIANU; ADEM, 2022; NOWOTNY et al., 2015; TWARDA-CLAPA et al., 2022).

Vale destacar que processos como a glicólise, peroxidação lipídica, metabolismo das cetonas e via dos poliois também podem participar da geração de dicarbonilas altamente reativas e, consequentemente, dos ALEs e AGEs (OTT et al., 2014; TWARDA-CLAPA et al., 2022). Ainda, outras vias são responsáveis pela geração de AGEs: a via de Hodge (através da auto-oxidação dos produtos de Amadori); a via de Namiki (caracterizada pela clivagem de compostos dicarbonil das Bases de Schiff); e a via de Wolff (caraterizada pela formação de carbonilas após a auto-oxidação de monossacarídeos como a glicose, frutose, ribose e gliceraldeído) (TWARDA-CLAPA et al., 2022).

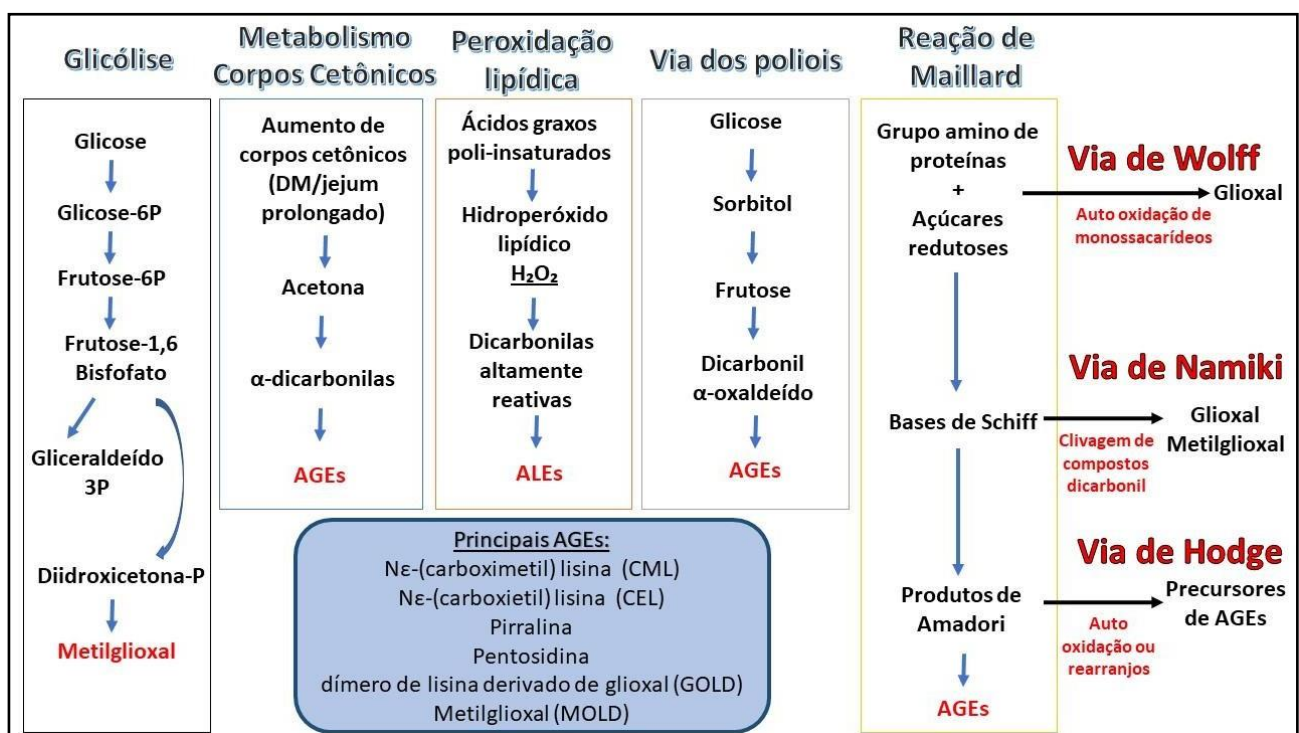


Figura 3. Vias de produção dos AGEs endógenos. Os AGEs são formados através de diferentes vias: a reação clássica de Maillard ocorre quando açúcares redutores se ligam em grupamentos amino de proteínas, formando as bases de Schiff através de uma reação reversível. Após sofrer rearranjos, as bases de Schiff dão origem aos produtos de Amadori que por fim, podem formar os AGEs. Outras vias também são responsáveis pela formação de AGEs: a via de Wolff, ocorre quando monossacarídeos sofrem auto oxidação originando o glioxal; a via de Namiki, acontece quando compostos dicarbonil presentes nas bases de Schiff são clivados originando o glioxal e metilglioxal; por fim, a via de Hodge ocorre quando os produtos de Amadori sofrem oxidação ou rearranjos, originando os precusores de AGEs. Além destas vias, alguns processos bioquímicos participam da geração de AGEs: a glicólise, durante o metabolismo de corpos cetônicos ou cetogênese, na peroxidação lipídica e na via dos poliois. Fonte: De autoria própria, 2023; Nowotny et al., 2015.

A produção exacerbada de AGEs no DM não controlado, ou seja, em uma situação de hiperglicemia crônica, há produção exacerbada de AGEs nas matrizes intra e extracelulares, inclusive nas células β-pancreáticas, o que contribui para a toxicidade. O aumento de AGEs na matriz intracelular pode ocasionar perda da função das proteínas que são modificadas pelos AGEs, afetando sua função biológica. Além disto, os AGEs podem se ligar aos receptores RAGE, presentes nas superfícies celulares de macrófagos, células do endotélio vascular, células musculares lisas, dentre

outras, resultando em um aumento na produção de EROs que, por sua vez, ativa o fator nuclear kappa B (NF- κ B), culminando em uma maior geração de citocinas inflamatórias, tais como IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF- α) (SANAJOU et al., 2018; SINGH et al., 2014). Ademais, a ligação AGEs-RAGE promove estresse do retículo endoplasmático, estresse mitocondrial e peroxidação lipídica das membranas celulares, o que compromete as funções celulares e viabilidade celular (KHALID; PETROIANU; ADEM, 2022).

O receptor RAGE é um receptor transmembrana encontrado em uma variedade de células, tais como células endoteliais, neuronais, fibroblastos, macrófagos, células epiteliais tubulares, glomerulares e mesangiais, hepatócitos, células perissinusoidais, entre outros (EGAÑA-GORROÑO et al., 2020; KUMAR; CHITRA; REDDY, 2016; OTT et al., 2014a; YAMAGISHI et al., 2015). Em condições fisiológicas normais, a expressão de receptores RAGE é baixa, mas pode ser regulada em resposta ao estresse e/ou inflamação (HYOGO; YAMAGISHI, 2008; YAMAGISHI et al., 2015). A interação AGE-RAGE culmina múltiplos efeitos biológicos, incluindo complicações microvasculares macrovasculares do DM (neuropatia, nefropatia, retinopatia, cardiomiopatia e aterosclerose) através da regulação de diversos eventos intracelulares via ativação de vários componentes sinalizatórios, resultando em disfunção celular (ASADIPOOYA; UY, 2019; EMEL'YANOV, 2017).

Em condições patológicas, receptores RAGE quando ativados estimulam a cascata sinalizatória PI3K-Akt-IKK com ativação de NF- κ B, culminando em sua translocação para o núcleo. Também promove um aumento na produção de EROs, apoptose e a autofagia. O NF- κ B, além de mediar a inflamação, também aumenta a expressão de RAGE e inibe a expressão de glioxalase 1 (EMEL'YANOV, 2017; KUMAR; CHITRA; REDDY, 2016; OTT et al., 2014a).

A ativação da PKC, demonstrado na figura 4, é o quarto mecanismo pelo qual a hiperglicemia crônica favorece o estresse glico-oxidativo. Trata-se de uma enzima que apresenta 11 isoformas, é amplamente distribuída em todos os tecidos e sua função é dependente de cálcio. É responsável pela fosforilação de resíduos de treonina/serina de diversos alvos proteicos. Mecanismos como o aumento da produção de EROs, aumento na disponibilidade de NADH devido a maior velocidade da via dos polióis e aumento da ligação AGE-RAGE são citados como ativadores desta via (GIACCO; BROWNLEE, 2010; NOR et al., 2022). Tanto o aumento na disponibilidade de NADH quanto a produção exacerbada de $O_2^{\cdot-}$ durante o estresse oxidativo ocasionam a inibição de uma enzima chamada gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), a qual é responsável por catalisar a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bisfosfoglicerato. Assim, uma vez que a enzima é inibida, ocorre o acúmulo de seu substrato, o gliceraldeído-3-fosfato, podendo assim favorecer a formação de metilglioxal (precursor de AGEs) e de diacilglicerol (DAG). A regulação da via DAG-PKC é importante na manutenção da permeabilidade vascular, contratilidade, proliferação celular, angiogênese, ação de citocinas e adesão leucocitária (NOR et al., 2022). Porém, quando o DAG é

gerado em excesso, esse aumento de DAG culmina na ativação da PKC que, uma vez ativada, é responsável pelo aumento da expressão de fatores pró-trombóticos e pró-inflamatórios (BROWNLEE, 2005; MADONNA; DE CATERINA, 2011; NOR et al., 2022; ROCHETTE et al., 2014). Embora o estresse oxidativo não seja responsável pela formação de DAG, Irie e colaboradores., 1998) demonstraram que o H_2O_2 induz uma modificação na PKC por fosforilação de tirosina, o que culmina na ativação desta enzima, porém isto se aplica apenas a alguns subtipos (PKC α e PKC δ).

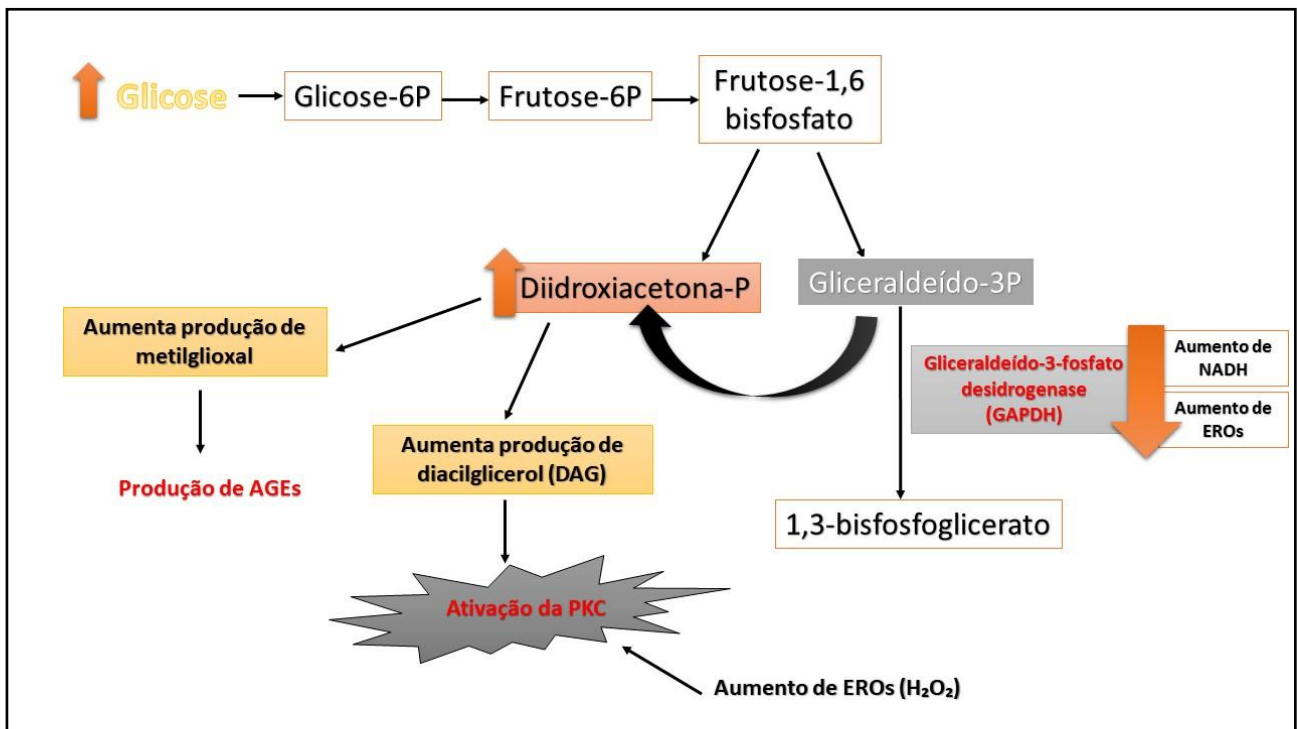


Figura 4. Mecanismos envolvidos na ativação da via da PKC. A hiperglicemia é responsável pela ativação da PKC e como consequência tem-se o aumento do estresse glico-oxidativo. A inibição da enzima GAPDH ocasionado pelo aumento da disponibilidade de NADH (devido ao maior desvio de glicose para a via dos poliois) e aumento da produção de EROs tem como principal consequência o acúmulo do seu substrato, gliceraldeído-3P. O excesso de gliceraldeído-3P é convertido a diidroxiacetona-P (DHAP) através da ação de uma enzima denominada triose fosfato isomerase. A DHAP aumenta a produção de metilglioxal, um precursor de AGEs e também aumenta a produção de diacilglicerol (DAG), um importante ativador da PKC. Além disto, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido em abundância durante o estresse oxidativo, também promove ativação da PKC através da fosforilação em resíduos de tirosina. **Fonte:** De autoria própria, 2023; Nor et al., 2022.

O aumento da via da hexosamina é o quinto mecanismo pelo qual a hiperglicemia crônica favorece o estresse glico-oxidativo e está representado na figura 5. Na hiperglicemia crônica, ocorre um excesso da oferta de glicose e ácidos graxos para as vias oxidativas, e isto contribui para a patogênese das complicações relacionadas ao DM via aumento do fluxo da frutose-6-fosfato pela via da hexosamina (DE GEEST; MISHRA, 2022; GIACCO; BROWNLEE, 2010b). Nesta via, a frutose-6-fosfato é deslocada da via glicolítica e se torna substrato de uma enzima chamada glutamina frutose-6-fosfato aminotransferase (GFAT), que converte a frutose-6-fosfato em glucosamina-6-fosfato, utilizando a glutamina como fonte de amina (COSTANTINO et al., 2017; GIACCO; BROWNLEE,

2010). O excesso de frutose-6-fosfato no DM pode ser explicado tanto pelo aumento na oferta de glicose para a via glicolítica, como também pela inibição da GAPDH (consequência do aumento da disponibilidade de NADH devido ao aumento da via dos poliois bem como do aumento na produção de EROs). Assim, as concentrações de frutose-6-fosfato aumentam dentro da célula e aumenta, conseqüentemente, a ação da enzima GFAT. O excesso de glicosamina-6-fosfato é convertido em difosfato de uridina N-acetilglucosamina (UDP-N-GlcNAc), causando orto-glico-n-acilação em resíduos de serina e treonina de proteínas citoplasmáticas e nucleares, alterando suas funções (GIACCO; BROWNLEE, 2010). Além disto, a glicosamina-6-fosfato pode interagir com diversas biomoléculas, alterando suas funções biológicas, incluindo o DNA (COSTANTINO et al., 2017; GIACCO; BROWNLEE, 2010b). A ativação desta via também pode aumentar o estresse oxidativo através da depleção da molécula de GSH (DE GEEST; MISHRA, 2022; KANETO et al., 2001).

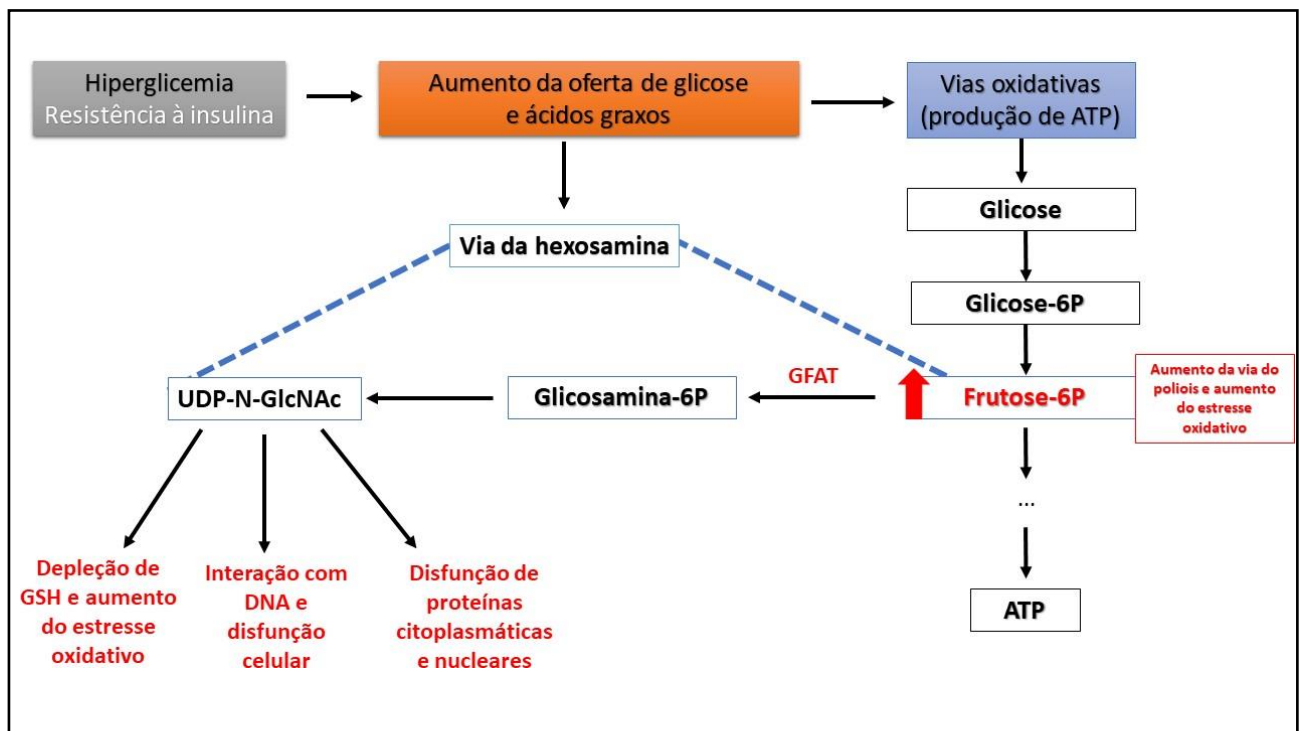


Figura 5. Mecanismos envolvidos na via da hexosamina. A hiperglicemia e a resistência à insulina são responsáveis por aumentar a oferta de glicose e ácidos graxos para as vias oxidativas e com isto, uma das consequências é o aumento da atividade da enzima GFAT. Fatores como o aumento da via dos poliois que culmina maior disponibilidade de NADH concomitante com o aumento da produção de EROs são cruciais na inibição da enzima GAPDH (citado anteriormente), assim, maiores níveis de frutose-6P serão desviados para a via da hexosamina. Nesta via, a frutose-6P é convertida em glicosamina-6P através da ação da enzima GFAT. O excesso de glicosamina-6-fosfato é convertido em UDP-N-GlcNAc, que por sua vez, promove disfunção celular, disfunção de proteínas citoplasmáticas e nucleares bem como aumenta estresse oxidativo via depleção de sistemas antioxidantes endógenos. **Fonte:** De autoria própria, 2023; Giacco; Brownlee, 2010.

O aumento na produção de EROs por vias citadas anteriormente em um quadro de DM também participa da oxidação de lipídeos circulantes e àqueles presentes em LDL, assim como os lipídeos encontrados em membranas plasmáticas. Este processo denomina-se peroxidação lipídica (LPO) e

um dos produtos formados é o malondialdeído (MDA), utilizado como um importante biomarcador da peroxidação lipídica (DHAM et al., 2021; GIANAZZA et al., 2019). A LPO é um processo no qual EROs atacam lipídeos, especialmente aqueles que possuem ligações duplas carbono-carbono, incluindo os ácidos graxos poli-insaturados, resultando em uma variedade de produtos. Os produtos primários da LPO são os hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e alguns dos produtos secundários são o malondialdeído (MDA), mais mutagênico, o 4-hidroxinonenal (4-HNE), mais tóxico e o glioxal (ARORA; VIG; ARORA, 2012; AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014; DHAM et al., 2021). No contexto atual estudos mostram a utilização do 4-HNE como um importante biomarcador de LPO em síndromes metabólicas, como o DM, por ter um aumento significativo tanto no plasma quanto em tecidos, e este aumento correlaciona-se com a prevalência das complicações diabéticas (DHAM et al., 2021).

A lipoxidação, por outro lado, descreve a formação de adutos covalentes entre produtos da peroxidação lipídica e macromoléculas como proteínas, fosfolipídeos e DNA, e os principais produtos formados são dienos conjugados, aduto lipídeo-DNA e aduto lipídico-proteico (AUGUSTINE et al., 2021; REQUENA et al., 1996). As células respondem à LPO de acordo com as condições metabólicas específicas e capacidade de reparo, podendo assim promover a sobrevivência ou induzir a morte celular. Sob condições fisiológicas ou baixas taxas de LPO, as células estimulam sua manutenção e sobrevivência por meio de defesas antioxidantes, porém sob altas taxas de LPO as células não conseguem reparar os danos, e assim ocorre a indução da apoptose ou necrose (AUGUSTINE et al., 2021; AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014).

2.4 Mecanismos de defesas antioxidantes e componentes de maquinaria de detoxificação de AGEs

A prevalência de vias aeróbicas para a obtenção de energia (metabolismo oxidativo) favorece a produção de EROs mesmo em condições fisiológicas, o que o levou ao desenvolvimento dos mecanismos de defesa na forma de agentes ou sistemas antioxidantes (Figura 6). Um agente ou sistema antioxidante é aquele capaz de diminuir a velocidade, impedir ou eliminar os danos oxidativos em moléculas alvo. No DM, além do aumento na produção de EROs por diferentes vias e processos, ocorre juntamente uma diminuição nas atividades de algumas enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT), tanto por alterações observadas nestas proteínas pela ação das EROs ou por eventos glicativos (KALUDERCIC; DI LISA, 2020; RAJENDRAN et al., 2014).

A principal função das enzimas antioxidantes é converter as EROs em moléculas de O_2 não reativas, e/ou formar H_2O . A interação antioxidante-EROs acontece muito mais rápido do que a

interação das EROs com pequenas moléculas no interior das células e, por isso, a presença dos antioxidantes é essencial para a eliminação das EROs (FORMAN; DAVIES; URSINI, 2014; FORMAN; ZHANG, 2021).

Durante o processo de geração de EROs, o $O_2^{\cdot-}$ é o principal intermediário reativo de O_2 , o qual é rapidamente dismutado a H_2O_2 espontaneamente e/ou por ação catalítica da SOD. O H_2O_2 sofre ação da CAT e/ou da GSH-Px, originando H_2O . O $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 podem originar outras ERO muito reativas, incluindo o ácido hipocloroso (HOCl) por ação da mieloperoxidase (MPO); $OH^{\cdot}$ pela reação de Fenton; peroxinitrito ($OONO^{\cdot}$) pela reação com o óxido nítrico (NO) (FORMAN; ZHANG, 2021; JHA et al., 2016). Portanto, o efeito antioxidante é de extrema importância para o controle do estresse glico-oxidativo.

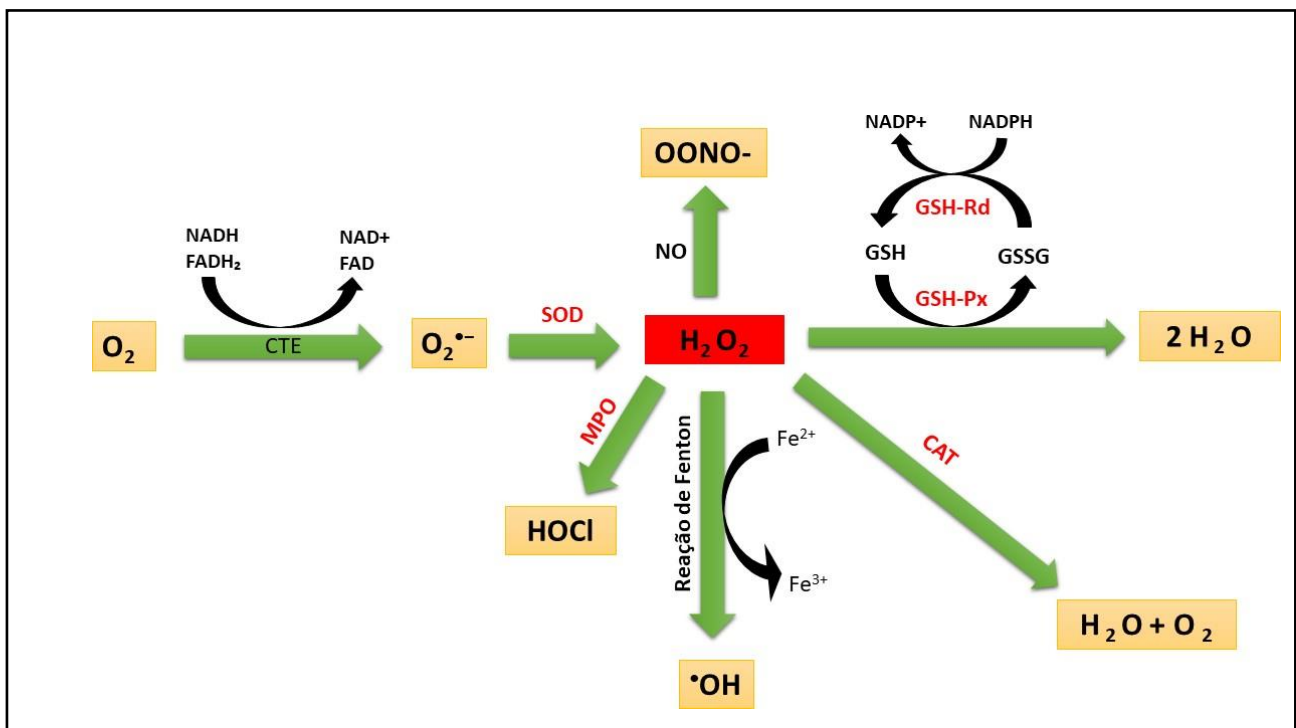


Figura 6. Sistemas de defesas antioxidantes do organismo. O oxigênio, através da cadeia transportadora de elétrons (CTE), promove o aumento da geração de radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que é dismutado pela ação da superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 pode ser eliminado sob a forma de água através da ação de duas enzimas antioxidantes: (i) catalase (CAT) e (ii) glutatona peroxidase (GSH-Px). Para GSH-Px exercer sua atividade é necessária a oxidação da molécula de GSH em GSSG. O ciclo é restaurado pela ação da glutatona redutase (GSH-Rd), no qual promove a redução da GSH com concomitante oxidação do NADPH à $NADP^+$. Por fim, o excesso de H_2O_2 pode reagir com o ferro, através da reação de Fenton, originando o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), pode gerar o ácido hipocloroso (HOCl) através da ação da mieloperoxidase (MPO) presente nos fagócitos e pode reagir com o óxido nítrico (NO), formando o peroxinitrito ($OONO^{\cdot}$). **Fonte:** De autoria própria, 2023; Kaludercic; Di Lisa, 2020.

Ainda, neste contexto, já são conhecidas as ações antioxidantes endógenas da molécula de glutatona. Assim, níveis diminuídos deste antioxidante estão relacionados com a exacerbação do estresse glico-oxidativo no DM. A molécula de glutatona reduzida (GSH) é oxidada (GSSG) pela ação da enzima glutatona peroxidase (GSH-Px), esta utiliza como substrato H_2O_2 bem como hidroperóxidos lipídicos. A regeneração da glutatona em sua forma reduzida ocorre via ação da

glutathione redutase (GSH-Rd), a qual utiliza como poder redutor o NADPH, para reduzir GSSG em GSH (BHABAK; MUGESH, 2010; FORMAN; ZHANG, 2021).

Uma outra enzima antioxidante, não menos importante, é a paraoxonase 1 (PON 1), uma enzima plasmática que circula associada à HDL (Figura 7). Sua função principal é a hidrólise de peróxidos lipídicos, tais como ésteres de colesterol e fosfolipídeos, protegendo as lipoproteínas (especialmente a LDL) contra o ataque das EROs (AVIRAM et al., 2000; MOHAMMED et al., 2022). Quando as EROs atacam componentes na LDL, ocorre a formação da LDL-oxidada, que é fagocitada pelos macrófagos, iniciando o processo de geração das células espumosas e formação da placa aterosclerótica. Sendo assim, atividade da PON 1 é de extrema importância e contribui para o potencial antiaterogênico da HDL (MOHAMMED et al., 2022; ROZENBERG et al., 2003).

Mazur (1946) e Aldridge (1953) desempenharam um papel fundamental na identificação e classificação da PON 1. Inicialmente ela foi identificada como A-esterase, mas depois se tornou conhecida como paraoxonase devido à sua capacidade de desintoxicar o composto organofosforado paraoxon, um metabólito tóxico do Paration (pesticida agrícola). A PON 1 pertence a uma família de três tipos de paraoxonase, PON 1, PON 2 e PON 3. PON 1 e PON 3 são sintetizadas principalmente no fígado e encontradas principalmente no plasma em associação à HDL. No contexto atual, sabe-se que além da atividade organofosfatase que a família de paraoxonase exerce, outras atividades já estão sendo atribuídas, tais como: a atividade arilesterase e lactonase, por exemplo (MOHAMMED et al., 2022). Todas as paraoxonases (PON 1, PON 2 e PON 3) possuem a capacidade de hidrolisar vários intermediários oxidados, bem como a homocisteína tiolactona, um aminoácido sulfurado que participa do metabolismo da metionina, e tem sido considerado um fator de risco para aterosclerose cerebral, coronariana e periférica. No entanto, a PON 1 é o subtipo que apresenta a maior capacidade antioxidante, sendo considerada a paraoxonase mais importante. Desta forma, a PON 1 tem papel protetor via atenuação do estresse oxidativo e proteção das membranas celulares contra a peroxidação lipídica, atenuando a aterosclerose (ADIGA; BANAWALIKAR; MENAMBATH, 2022; CHISTIakov et al., 2017; MOHAMMED et al., 2022; SHUNMOOGAM; NAIDOO; CHILTON, 2018).

Além disto, a PON 1 demonstrou ter um efeito protetor nas células β -pancreáticas contra as altas concentrações de glicose, desempenhando um papel benéfico na secreção de insulina. Neste contexto, Lee e colaboradores (2018), indicaram que peptídeos permeáveis às células conjugados com proteínas (PEP-1-PON1) protege as células β -pancreáticas de citotoxicidade induzida por citocinas, aliviando a toxicidade promovida pelo estresse oxidativo/nitrosativo e inflamação. Portanto, os autores concluíram que a transdução da PON 1 mediada por PEP-1 pode ser um método eficaz para reduzir a destruição e disfunção das células β -pancreáticas mediada por autoimunidade. Ademais, outros estudos já reportaram que animais deficientes no gene da PON 1 apresentaram um

aumento significativo do estresse oxidativo e, por outro lado, animais que superexpressavam os genes da PON 1 apresentaram uma diminuição na produção do hidroperóxido lipídico (KIM et al., 2015; MORRIS et al., 2001).

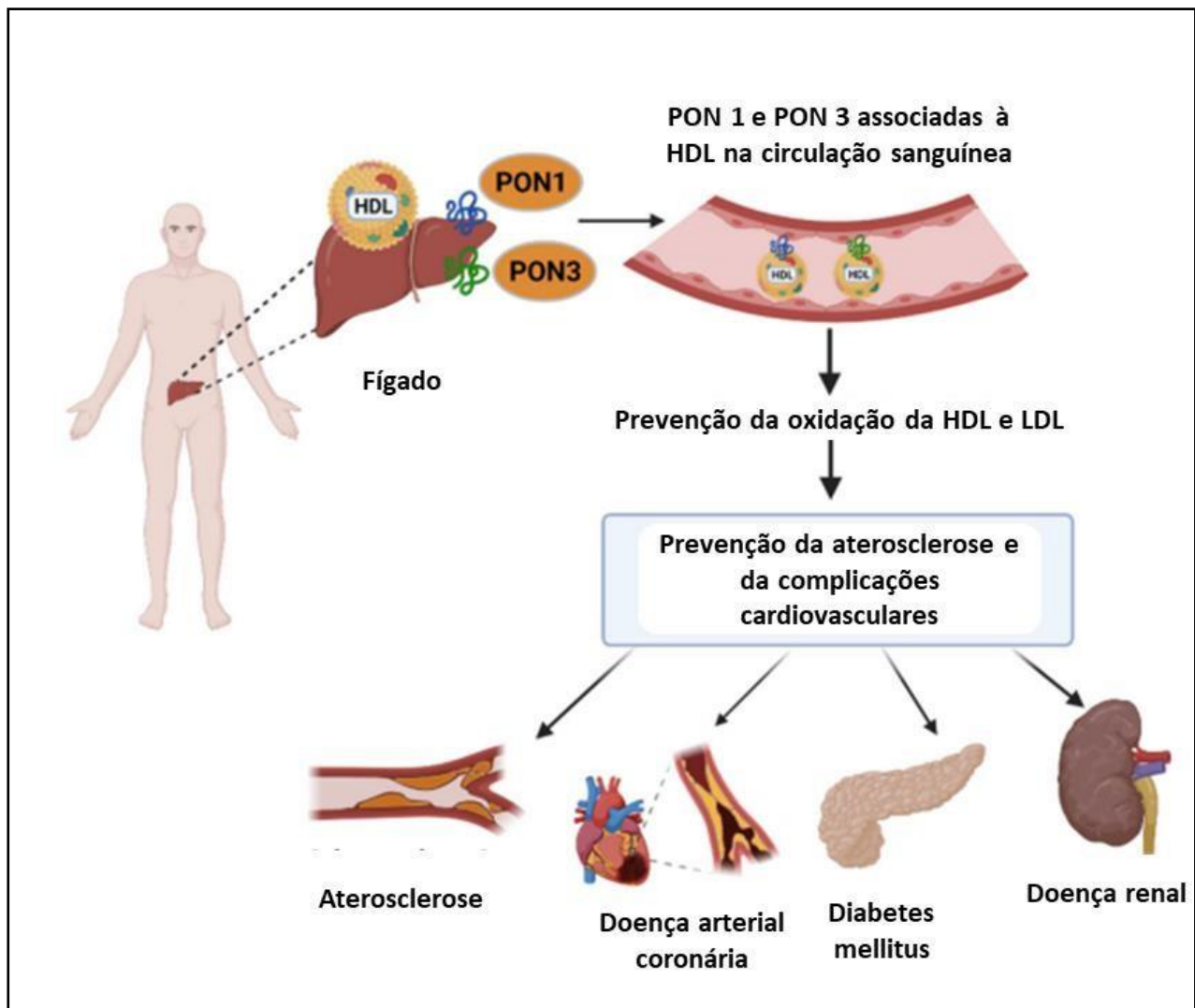


Figura 7: Principais ações atribuídas a PON. A PON 1 está associada à HDL, sintetizada no fígado e atua principalmente prevenindo a oxidação de HDL e LDL na corrente sanguínea. Em um quadro de DM, sabe-se que o estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento na geração das EROs que podem, por sua vez, oxidar componentes da LDL, levando a formação das células espumosas e a principal consequência é a formação da placa aterosclerótica. Assim, a PON 1 previne a aterosclerose e possíveis complicações cardiovasculares. Fonte: Adaptado Mohammed et al., 2022.

Os sistemas enzimáticos dependentes de glicoxalase e aldeído desidrogenase são responsáveis por detoxificar adutos de açúcares precoces (produtos de Amadori) e compostos carbonílicos reativos, tais como glicoxal e metilglicoxal (EMEL'YANOV, 2017; KUMAR; CHITRA; REDDY, 2016; OTT et al., 2014). O metilglicoxal é um composto aldeído altamente reativo formado principalmente durante a glicólise (KALAPOPOS, 2008). Em pacientes diabéticos, os níveis plasmáticos de metilglicoxal são elevados, o que mostra sua relação com a fisiopatologia do DM (WANG et al., 2007). A formação

excessiva do metilglioxal é causada pelo aumento de sua produção e/ou diminuição de componentes responsáveis pela sua detoxificação, como o sistema da glioxalase.

O sistema da glioxalase é um mecanismo muito importante de detoxificação de metilglioxal consistindo em duas enzimas: a glioxalase 1 (GLO 1) e glioxalase 2 (GLO 2). Ambas as enzimas catalisam reações sucessivas e dependentes da molécula de GSH e convertem compostos carbonílicos, tal como o metilglioxal, em ácido láctico. A GLO 1 catalisa a isomerização do hemitioacetil (formado não enzimaticamente a partir do metilglioxal e GSH) para S-D-lactoilglutathione, e a GLO 2 catalisa a hidrólise de S-D-lactoilglutathione em lactato, regenerando GSH utilizada na reação catalisada por GLO 1 (RABBANI; THORNALLEY, 2015). A diminuição da formação intracelular de AGEs está relacionada com o aumento na expressão da glioxalase, reduzindo o estresse oxidativo e apoptose celular. Contudo, quando o estresse oxidativo supera a capacidade do sistema da glioxalase, este pode não ser suficiente na diminuição dos níveis de metilglioxal (XUE et al., 2012).

Além dos sistemas que eliminam os precursores de AGEs tal como o sistema da glioxalase, também existe o complexo AGE-R, que consiste em três receptores distintos: AGER-1/OST-48, AGER-2/80K-H e AGER-3/galectin-3, que está envolvido na sinalização de AGE e na endocitose de proteínas modificadas por AGEs. O receptor AGER-1/OST-48 é encontrado nas células mesangiais, endoteliais, neuronais, fibroblastos, macrófagos, entre outras. No rim, sua expressão está diminuída em patologias, incluindo o DM (KHALID; PETROIANU; ADEM, 2022; KUMAR; CHITRA; REDDY, 2016; OTT et al., 2014). No fígado também há expressão de AGER-1/OST-48, AGER-2/80K-H e AGER-3/galectin-3, sendo destacado o AGER-3, e estes encontram-se diminuídos em patologias como o DM e cirrose, por exemplo (BUTSCHEID et al., 2007). Este receptor, quando ativado, aumenta a velocidade de remoção dos AGEs, uma vez que promove a endocitose e degradação de proteínas modificadas, portanto também possui um papel protetor contra agressões mediadas pelo estresse oxidativo, e assim previne lesões celulares e teciduais (KUMAR; CHITRA; REDDY, 2016; OTT et al., 2014a).

O receptor AGER-1 se opõe ao receptor RAGE, ou seja, aos seus efeitos pró-inflamatórios. Sua atividade consiste na inibição da atividade da NADPH oxidase, diminuição do estresse oxidativo, bem como a sinalização mediada pelas ERO. O principal mecanismo envolvido é a inibição do NF- κ B por desacetilação, através da sirtuína 1 (SIRT 1), o que resulta na diminuição da inflamação e estresse oxidativo. Além disto, os efeitos benéficos do AGER-1 podem ser atribuídos a longa cauda extracelular com alta aderência a AGE, que interfere competitivamente com as interações AGE-RAGE (VLASSARA; STRIKER, 2011). Por fim, a indução de mecanismos de detoxificação de AGEs, tal como o sistema da glioxalase e o receptor AGER-1, conferem proteção contra eventos de glicação, impedindo o acúmulo de intermediários altamente reativos (HOLLENBACH, 2017).

2.5. Utilização de bioativos com atividades antioxidante e antiglicação no manejo do DM

Antioxidantes são agentes químicos ou biológicos capazes de neutralizar as ações das EROs através de diversos mecanismos, tais como: (i) sistemas catalíticos para neutralizar ou desviar EROs; (ii) ligação ou inativação de íons metálicos para prevenir a geração de EROs pela reação de Haber-Weiss; (iii) ação “*scavenger*”, em outras palavras, sequestrando diretamente as EROs; (iv) transferindo elétrons das EROs (KANWUGU et al., 2021; KHAN et al., 2015; RAJENDRAN et al., 2014). Diversos estudos avaliaram os efeitos de vários antioxidantes (incluindo vitaminas, polifenóis, carotenóides, entre outros) no DM e suas complicações (KANWUGU et al., 2021; KHAN et al., 2015). Embora os resultados provenientes de diversos estudos baseados na utilização de antioxidantes no manejo e/ou prevenção das complicações do DM demonstrem os mais diversos resultados, a grande maioria envolvendo modelos animais obtiveram resultados positivos e promissores, o que torna este assunto atual e alvo de inúmeros outros estudos (KHAN et al., 2015).

Aumentar a ingestão de antioxidantes pode prevenir várias doenças e reduzir problemas de saúde. Os aditivos alimentares na dieta estão ganhando popularidade com o passar dos anos. Diversos estudos demonstraram a capacidade antioxidante de vitaminas de origem natural na promoção da saúde e bem-estar. A suplementação dietética regular com frutas e vegetais tem sido associada com um aumento nos níveis de componentes antioxidantes no plasma (JOHN; ZIEBLAND, 2004; OZMEN et al., 2016).

Normalmente nutracêuticos clinicamente úteis na ativação de Nrf2, têm potencial como indutores de GLO 1 (CAPECE et al., 2022; TIBULLO et al., 2017). Alguns nutracêuticos interagem covalentemente com resíduos de Keap1, impedindo-o de se ligar a Nrf2 no citoplasma, e permitindo assim que o Nrf2 seja transportado para o núcleo, onde promove a transcrição não apenas de GLO 1, mas também de outras enzimas antioxidantes (CAPECE et al., 2022; PORASUPHATANA et al., 2012). Estudos já demonstram a capacidade do ácido alfa lipoico na interação com Keap, o que mobiliza o Nrf2 para o núcleo, aumentando a transcrição de enzimas antioxidantes, incluindo a GLO 1 (CAPECE et al., 2022; GOSSELIN; CHRAPOWITZKY; RIDEOUT, 2019; HEINISCH et al., 2010; MANDANI et al., 2021).

Sabendo da importância da contribuição do estresse glico-oxidativo para a instalação das complicações relacionadas ao DM, a utilização de nutracêuticos que podem contribuir para o aumento das defesas antioxidantes via Nrf2, podem ter um potencial benéfico para prevenção de complicações diabéticas. Por fim, o estudo envolvendo nutracêuticos e seus benefícios tornam-se adequados e importantes não só por diminuir a geração das espécies reativas, mas por aumentarem a expressão de componentes responsáveis pela detoxificação de AGEs. Neste contexto, Tabrez e colaboradores (2015) concluíram que o licopeno é capaz de reduzir processos de glicação e, conseqüentemente a

formação dos AGEs através da diminuição da expressão de RAGE, os receptores dos AGEs, e diminuição de proteínas inflamatórias, tais como NFκB, TNF-α, MMP-2.

São notórias as pesquisas envolvendo a utilização de nutracêuticos no combate e inibição de AGEs. Nutracêuticos, derivados de fontes alimentares e disponíveis como suplementos dietéticos, têm sido principalmente investigados em estudos pré-clínicos. Muitos estudos avaliaram estes compostos como potenciais agentes terapêuticos anti-AGE e mostraram efeitos positivos nas complicações diabéticas, incluindo a nefropatia e retinopatia. No entanto, a duração das intervenções necessárias para se obter um efeito benéfico na redução dos AGEs ainda é algo que exige maiores estudos (ROORDA, 2017).

Uma vez que a hiperglicemia crônica é um dos principais fatores envolvidos no estabelecimento das complicações do DM, o tratamento da doença tem como principal objetivo a manutenção dos níveis glicêmicos próximos à normalidade. Vale lembrar que a hiperglicemia crônica pode ocasionar alterações em longo prazo nas células, fenômeno este conhecido como “memória metabólica”, caracterizada pela persistência das complicações relacionadas ao DM mesmo após o alcance de um efetivo controle glicêmico (CERIELLO et al., 2012).

Insulina e agentes antidiabéticos orais têm sido as principais opções utilizadas no tratamento do DM. A prospecção de estratégias terapêuticas que contribuam para o alcance de um efetivo controle glicêmico no diabetes mellitus tipo 1 é extremamente importante, pois podem prevenir tanto a ocorrência de efeitos adversos da insulinização (incluindo episódios de hipoglicemia) quanto o desenvolvimento das complicações diabéticas relacionadas ao estresse glico-oxidativo. Algumas substâncias de origem natural podem atuar de forma sinérgica com fármacos já utilizados clinicamente, permitindo a redução das doses necessárias para produzir o efeito desejado e, consequentemente, minimizando os efeitos adversos (CASANOVA; COSTA, 2017).

A utilização de terapias combinadas entre antidiabéticos com o objetivo de alcançar um melhor controle glicêmico, preservando as células β-pancreáticas, e atenuado os impactos deletérios da memória metabólica já são conhecidas e sua principal ação é diminuir o risco de complicações diabéticas (CAHN; CEFALU, 2016; MOTTA et al., 2022). Contudo, estudos envolvendo os efeitos benéficos das associações entre bioativos naturais e drogas anti-hiperglicêmicas são necessários para o avanço do conhecimento. Neste contexto, Figueiredo e colaboradores (2020) observaram os efeitos benéficos e promissores que foram alcançados no tratamento de ratos diabéticos em modelo de DM experimental do tipo 1 (induzidos com estreptozotocina) com metformina, um fármaco já utilizado na clínica médica, associado com o licopeno, um antioxidante natural. Neste estudo foi concluído que a associação de metformina e licopeno pode atuar sinergicamente no controle da glicemia pós-prandial, dislipidemia e estresse glicoxidativo, bem como aumento das defesas antioxidantes, surgindo como uma estratégia terapêutica promissora para atenuar as complicações diabéticas.

Com os achados promissores obtidos por Figueiredo e colaboradores (2020) com a associação de metformina e licopeno em um modelo de DM experimental do tipo 1, tal como descrito anteriormente, surgiu a necessidade de investigar o potencial benéfico que esta associação poderia alcançar em um modelo de resistência à insulina / obesidade. Assim, Motta e colaboradores (2022) demonstraram que camundongos submetidos ao modelo experimental de resistência à insulina e obesidade (alimentados com dieta hiperlipídica) e tratados com a associação de metformina e licopeno apresentaram uma melhora significativa da resistência à insulina e tolerância à glicose bem como aumentou a atividade de enzimas antioxidantes, tal como a PON 1. Os autores concluíram que esta associação (metformina + licopeno) apresentou um potencial benéfico principalmente em mitigar o estresse glico-oxidativo envolvido nas complicações relacionadas ao DM.

2.5.1. Licopeno

O licopeno é um carotenoide isômero acíclico do β -caroteno com onze duplas ligações conjugadas e duas ligações não conjugadas (figura 8), portanto é altamente insaturado. É responsável pela coloração vermelha de tomates frescos e seus produtos processados (CEFALI et al., 2009). O processamento do tomate é o processo no qual é encontrado a maior concentração de licopeno (PELLICANÒ et al., 2019). É também encontrado em alguns microrganismos e outros vegetais, tais como melancia, mamão e goiaba. Após sua absorção, o licopeno é transportado via LDL, onde pode atuar como um potente antioxidante *in vivo* (YANG et al., 2012). Inúmeras propriedades são atribuídas ao licopeno, tais como: anticancerígenas (MEKURIA et al., 2020); antioxidantes (IMRAN et al., 2020); anti-inflamatórias (SHI et al., 2022); anti-ateroscleróticas (CHIVA-BLANCH et al., 2020); anti-hiperlipidêmica (WANG et al., 2018); antiobesogênica e antidiabética (ZHU et al., 2020); anti-lesão hepática aguda (WANG et al., 2018). O desenvolvimento e aplicação de licopeno em alimentos, medicamentos e cosméticos vêm ganhando destaque na área da pesquisa.

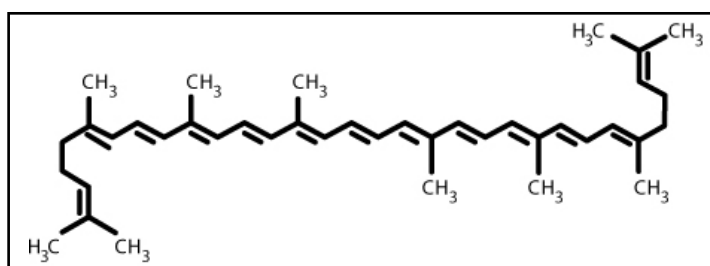


Figura 8. Estrutura do licopeno. Fonte: Adaptado Cefali et al., 2009.

É válido ressaltar que o licopeno exerce uma potente atividade antioxidante, especialmente contra radicais derivados de oxigênio e tem a maior capacidade de extinção de oxigênio singlete entre todos os carotenóides em sistemas biológicos e isto pode acontecer através de diversos mecanismos, tais como: (i) adição de radicais à cadeia do polieno; (ii) transferência de elétrons do licopeno para os radicais; (iii) eliminação de átomos de hidrogênio do licopeno (GOENAWAN et al., 2022). Alguns estudos atribuíram o consumo de suco de tomate na promoção de diversos benefícios à saúde, reduzindo os níveis de biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo, inflamação e dislipidemia (GHAVIPOUR; SOTOUDEH; GHORBANI, 2015; JACOB et al., 2008).

Outra ação importante atribuída ao licopeno é seu potencial em promover redução nos níveis de colesterol relacionado às seguintes ações: (i) capacidade de inibição de HMG-CoA redutase, enzima importante na síntese do colesterol; (ii) inibição da enzima colesterol aciltransferase (ACAT), que catalisa a formação de ésteres de colesterol no fígado; (iii) inibição da síntese de receptores da LDL, protegendo as células do acúmulo de colesterol (PALOZZA et al., 2012). Muitos dos benefícios relacionados à ingestão de tomate e seus derivados têm sido atribuídos à presença do licopeno. Bernal et al. (2013) observou que a administração de licopeno a ratos alimentados com dieta hiperlipídica/hipercolesterolêmica reduziu o desenvolvimento de esteatose hepática; tal benefício foi associado à redução nos níveis circulantes de triacilgliceróis e dos níveis urinários de isoprostanos (marcador de estresse oxidativo).

Em relação aos benefícios do licopeno no DM, tem sido demonstrado uma importante ação na atenuação da disfunção endotelial e o estresse oxidativo, reduzindo os níveis de LDL-ox, portanto contribui para a redução do risco cardiovascular (ZHU; WANG; XU, 2011). O licopeno também é capaz de proteger os rins contra a nefropatia diabética, via redução do estresse oxidativo, promovendo aumento nas enzimas antioxidantes SOD, CAT (ALI; AGHA, 2009) e GSH-Px, e redução nos níveis de malondialdeído (MDA), marcador de peroxidação lipídica (GUO; TU; HU, 2008). Ainda, foram descritas as ações protetoras do licopeno contra o dano oxidativo no DNA, proteínas e lipídeos e na modulação da comunicação intercelular, inibindo a proliferação de células tumorais no endométrio e pulmões (ALI; AGHA, 2009). Estudo realizado por Ozmen et al. (2016) demonstrou que o licopeno é capaz de atuar sobre as células β pancreáticas, prevenindo sua destruição e consequentemente atenuando os prejuízos na secreção de insulina. O licopeno também foi capaz de diminuir a vacuolização das ilhotas de Langerhans, ou seja, reduziu a degeneração celular pancreática. Já no contexto atual, foi demonstrado uma importante ação do licopeno na ativação de um ativador transcricional de genes antioxidantes, fator nuclear eritróide relacionado ao fator 2 (Nrf2), culminando aumento na expressão das enzimas antioxidantes (GOENAWAN et al., 2022).

A prospecção de estudos envolvendo fitoquímicos é realidade em nosso laboratório. Em um dos estudos realizado por Assis e colaboradores (2017) observaram os diversos benefícios alcançados

após os tratamentos de ratos diabéticos durante 50 dias com iogurte enriquecido com combinações de fitoquímicos: **curcumina** (extrato dos rizomas de *Curcuma longa*, contendo 65% de curcumina), **licopeno** (extrato de tomate, contendo 10,13% de licopeno) ou **bixina** (extrato das sementes de *Bixa orellana*, contendo 60% de bixina). Os tratamentos com as misturas **curcumina + bixina** ou **curcumina + licopeno** apresentaram efeitos combinados, que preservaram os benefícios alcançados com os tratamentos isolados: nos tratamentos combinados, houve redução em biomarcadores de distúrbios do metabolismo de carboidratos e lipídeos (efeitos da curcumina), aumento nos níveis de HDL (efeitos dos carotenoides, licopeno ou bixina) e redução no estresse oxidativo (efeitos da curcumina e dos carotenoides). Os efeitos combinados das misturas curcumina + licopeno ou curcumina + bixina também preveniram a oxidação de LDL, sugerindo que a suplementação com misturas de fitoquímicos tenha potencial para prevenir ou atenuar complicações cardiovasculares no DM.

Outro estudo elaborado por Figueiredo e colaboradores (2020) avaliaram o benefício do tratamento de ratos diabéticos em modelo estreptozotocínico com licopeno (extrato de tomate, contendo 10,13% de licopeno; 45 mg/kg) e/ou metformina (cloridrato de metformina 99,56%; 250 mg/kg) durante um período experimental de 30 dias. Diversos benefícios foram atribuídos ao licopeno, tais como: (i) **parâmetros fisiológicos**: redução da ingestão alimentar, urinária e volume urinário; (ii) **parâmetros bioquímicos**: redução da glicemia e atenuação da dislipidemia; (iii) **marcadores de estresse glico-oxidativo**: redução das concentrações de proteínas carboniladas (PCO), AGEs e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); (iv) **defesas antioxidantes**: aumento das atividades de PON1, SOD, CAT e GSH-Px. Estes resultados reiteram o potencial benéfico que de fato pode ser alcançado através da utilização do licopeno em um modelo experimental mimetizando o DM tipo 1.

Ainda, neste mesmo estudo, foi avaliado a ações promissoras a associação de metformina + licopeno. Como dito anteriormente, alguns fotoquímicos podem atuar de forma sinérgica ou aditiva aos fármacos já utilizados clinicamente, como é o caso da metformina, permitindo tanto a redução de doses como a diminuição dos efeitos adversos. Foi observado neste estudo uma maior redução da glicemia promovida pela associação de metformina + licopeno que impactou positivamente na promoção de redução nos níveis plasmáticos de AGEs fluorescentes e TBARS, cujas quedas foram mais significativas que aquelas de animais tratados com metformina ou licopeno isoladamente. Também houve uma redução maior das concentrações de colesterol total e diminuição dos níveis de ALT. Além dos efeitos promissores da associação metformina + licopeno em biomarcadores plasmáticos de animais diabéticos, foram também observados seus efeitos benéficos no fígado e rins. Com base nestes resultados obtidos através do tratamento de ratos diabéticos (modelo estreptozotocínico) com licopeno e/ou metformina, tornou-se extremamente importante e promissor

o estudo da associação de licopeno + insulina (em menor dose), um fármaco mais adequado e utilizado para este modelo experimental (mimetizando DM tipo 1).

2.5.2. Ácido alfa lipoico

O ácido alfa lipoico ($C_8H_{14}O_2S_2$; AL) é um composto natural também conhecido como ácido 1,2-ditiolano-3-pentanoico (BUSBY et al., 1999; GOLBIDI; BADRAN; LAHER, 2011). Trata-se de um composto do tipo dissulfeto que atua como coenzima em reações mitocondriais catalisadas pelas enzimas complexo da piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase, estas envolvidas em processos oxidativos de produção de energia. Conforme demonstrado na figura 9, a presença de um carbono assimétrico em sua estrutura química (representado na figura 9) confere a molécula a existência de duas formas enantiôméticas: R-ácido alfa lipoico e S-ácido alfa lipoico, sendo apenas o enantiômero R-ácido alfa lipoico capaz de exercer função biológica nas reações oxidativas mitocondriais (GOLBIDI; BADRAN; LAHER, 2011; REED, 1998).

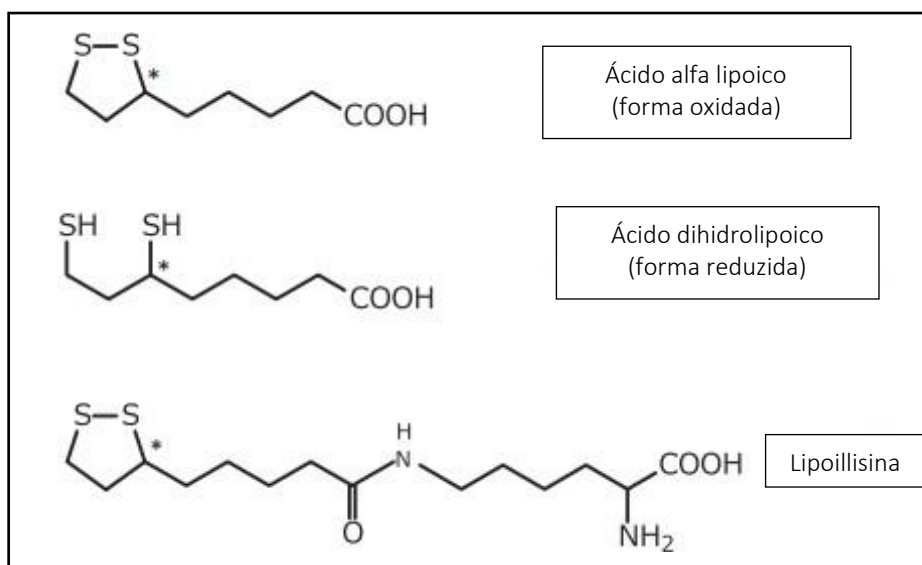


Figura 9. Estrutura do ácido alfa lipoico. Fonte: Adaptado de Rochette et al., 2015.

Os vegetais e tecidos animais contêm quantidades de R-ácido alfa lipoico detectadas na forma de lipoillisina (ligação de AL em resíduos de lisina específicos). As fontes vegetais mais abundantes são: espinafre, brócolis e tomate enquanto as os tecidos animais com maior abundância de AL são fígado, coração e rins (ROCHETTE et al., 2015).

O AL tem propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, sendo amplamente distribuído em plantas e animais tanto nas membranas celulares como no citosol, podendo exercer suas funções em ambos os locais (ROCHETTE et al., 2015). Nas células que possuem mitocôndrias, o ácido alfa lipoico é

reduzido à ácido dihidrolipoico, em reação dependente de NADH, enquanto em células desprovidas de mitocôndrias, a redução do ácido alfa lipoico à ácido dihidrolipoico ocorre via reação catalisada pela enzima tioredoxina redutase, dependente de GSH (GOLBIDI; BADRAN; LAHER, 2011; JONES et al., 2002). Tanto o ácido alfa lipoico quanto o ácido dihidrolipoico promovem benefícios no combate ao estresse oxidativo através de alguns mecanismos: (i) promovem a eliminação do excesso de ERO, prevenção da peroxidação lipídica de membranas e de danos às proteínas; (ii) participam da regeneração de antioxidantes, incluindo vitaminas C e E, além de promoverem aumento nos níveis de GSH; (iii) reparação de proteínas oxidadas; (iv) regulação de fatores de transcrição envolvidos na expressão gênica de componentes citoprotetores (NRF 2 e PPARs); (v) inibição da ativação do NF-kB (DUGBARTEY et al., 2022; EVANS; GOLDFINE, 2000; MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003). Em estudo realizado por Rochette e colaboradores (2015) demonstraram que o ALA participa no combate a resistência à insulina, melhora o metabolismo energético prevenindo a neuropatia diabética, uma complicação importante relacionada ao DM.

Como dito anteriormente, as mitocôndrias são uma importante fonte intracelular de pró-oxidantes que podem aumentar a produção de espécies reativas. Evidências indicam o papel fundamental de uma enzima do ciclo de Krebs (α -cetoglutarato desidrogenase) como um componente do sistema antioxidante mitocondrial e um “sensor” de estado redox, principalmente induzindo mudanças críticas no metabolismo mitocondrial celular afim de prevenir danos oxidativos (MCLAIN; SZWEDA; SZWEDA, 2011; ROCHETTE et al., 2015). Assim, a α -cetoglutarato é excepcionalmente sensível ao estresse oxidativo, sofrendo inibição totalmente reversível mediada via aumento da produção de espécies reativas. O AL também participa do sistema antioxidante mitocondrial, é um cofator essencial para o componente E2 de complexos de α -cetoácido desidrogenase, piruvato desidrogenase, α -cetoácido. Por fim, o R-ácido alfa lipoico é um cofator para 4 complexos enzimáticos na mitocôndria, e é essencial para a produção de energia e a regulação do metabolismo de carboidratos e proteínas (ROCHETTE et al., 2015; VALDECANTOS et al., 2012).

Khamaisi et al. (1997) demonstraram que ratos diabéticos (indução com estreptozotocina) tratados com 30 mg/kg de ácido alfa lipoico por 10 dias apresentaram diminuição nos níveis glicêmicos, aumento no conteúdo de GLUT 4 nos músculos esqueléticos. Devido ao fato de os animais diabéticos tratados com ácido alfa lipoico não apresentarem redução da glicemia de jejum, os autores sugeriram que o efeito de redução da glicemia não esteja relacionado com inibição na produção hepática de glicose, mas sim com uma maior utilização da glicose pelos tecidos periféricos, incluindo os músculos esqueléticos. Assim, os autores sugeriram que o aumento no conteúdo proteico de GLUT 4 nos músculos esqueléticos tem relação com a diminuição nos níveis glicêmicos em animais tratados com ácido alfa lipoico.

Budin et al. (2009) também demonstraram ações benéficas do ácido alfa lipoico em ratos diabéticos (induzidos com estreptozotocina) tratados durante oito semanas; os autores observaram redução na glicemia de jejum destes animais, bem como aumento na atividade de SOD no plasma e diminuição nos níveis de MDA e 4-HNE, tanto no plasma quanto na aorta. Estes achados reiteram a ação ácido alfa lipoico em atenuar o estresse oxidativo *in vivo*, diminuindo a peroxidação lipídica no tecido vascular. Estudo realizado por Ghelani e colaboradores (2018) demonstrou resultados interessantes quanto ao potencial antiglicação do ácido alfa lipoico, este verificado via utilização de sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica. Ao incubarem a proteína mioglobina (1 mg/mL) com frutose (1 M), na presença de ácido alfa lipoico (1, 2 e 4 mM), os autores observaram uma inibição significativa na formação de AGEs fluorescentes, durante o período de 30 dias. Além disto, o ácido alfa lipoico diminuiu *in vitro* os níveis da frutossamina (biomarcador de glicação inicial), o qual pode estar diretamente associada à diminuição observada nos níveis de AGEs (biomarcador de glicação avançada). A incubação com ácido alfa lipoico também diminuiu a liberação de ferro da mioglobina, resposta esta atribuída à proteção da mioglobina contra às agressões promovidas pela frutose. Neste trabalho também foi demonstrado o efeito protetor do ácido alfa lipoico contra eventos oxidativos na mioglobina, observado principalmente pela diminuição nos níveis de proteínas carboniladas a aumento dos grupos nos grupos tióis proteicos na mioglobina. Deste modo, os achados deste estudo enfatizam o potencial benéfico da suplementação com ácido alfa lipoico na prevenção de complicações diabéticas mediadas pelo acúmulo de AGEs.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos dos tratamentos de ratos diabéticos (modelo experimental de DM tipo 1), durante 30 dias, com dose reduzida de insulina, sozinha ou combinada com licopeno ou com ácido alfa lipoico, sobre alterações em parâmetros fisiometabólicos e biomarcadores do estresse glico-oxidativo.

3.2 Objetivos específicos

A execução do presente projeto foi dividida em duas etapas.

A primeira etapa do projeto foi dedicada à avaliação dos efeitos da terapia combinada entre insulina em uma menor dose (1U/dia) e o bioativo natural licopeno (45 mg/kg), em parâmetros fisiometabólicos e do estresse glico-oxidativo alterados em sistema-modelo *in vivo* de DM tipo 1, com enfoque na avaliação das alterações renais. Assim, nesta etapa foram avaliados:

- Parâmetros fisiológicos (massa corporal, ingestão alimentar, ingestão hídrica e volume urinário) bem como as massas dos tecidos corporais (músculos esqueléticos *soleus* e *extensor digitorum longus*, EDL, e tecidos adiposos brancos retroperitoneal e epididimal);
- Níveis de biomarcadores plasmáticos relacionados ao metabolismo de carboidratos e lipídeos (glicose, triglicerídeos, colesterol total e colesterol-HDL), marcadores de integridade hepática (ALT, ALP), marcadores de disfunção renal (creatinina e ácido úrico).
- Níveis proteicos e de fosforilação de AKT em músculos *gastrocnemius* (níveis basais e pós-estimulação com insulina);
- Níveis de frutossamina no plasma;
- Níveis de HbA1c no sangue total;
- Níveis de TBARS no plasma e sobrenadantes de rim;
- Níveis de AGEs fluorescentes no plasma e sobrenadantes de rim;
- Atividade da enzima antioxidante PON 1 no plasma;
- Atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px nos sobrenadantes de rim;
- Níveis de albumina na urina de 24 horas;
- Níveis de marcadores de citoproteção relacionados à detoxificação de AGEs (níveis proteicos de glioxalase 1 e AGER 1 nos rins).

A segunda etapa do projeto consistiu na avaliação dos efeitos da terapia combinada entre insulina em uma menor dose (1U/ dia) e o ácido alfa lipoico (doses de 50 mg/kg ou 25 mg/kg), em parâmetros fisiometabólicos e do estresse glico-oxidativo em sistema-modelo *in vivo* de DM tipo 1, com ênfase na avaliação das alterações renais e hepáticas. Assim, nesta etapa foram avaliados:

- Parâmetros fisiológicos (massa corporal, ingestão alimentar, ingestão hídrica e volume urinário) bem como as massas dos tecidos corporais (músculos esqueléticos *soleus* e *extensor digitorum longus*, EDL, e tecidos adiposos brancos retroperitoneal e epididimal);
- Níveis de biomarcadores plasmáticos relacionados ao metabolismo de carboidratos e lipídeos (glicose, triglicerídeos, colesterol total e colesterol-HDL), marcadores de integridade hepática (ALT, ALP), marcadores de disfunção renal (ácido úrico).
- Níveis de frutossamina no plasma;
- Níveis de HbA1c no sangue total;
- Níveis de TBARS no plasma e sobrenadantes de fígado e rim;
- Níveis de AGEs fluorescentes no plasma e sobrenadantes de fígado e rim;
- Atividade da enzima antioxidante PON 1 no plasma;
- Atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px nos sobrenadantes de fígado e rim;
- Níveis de albumina na urina de 24 horas;
- Níveis de marcadores de citoproteção relacionados à detoxificação de AGEs (níveis proteicos de glioxalase 1 e AGER 1 nos rins).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) pesando 140-160 g (6 semanas de idade) foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e ciclo claro/escuro (12 horas) no Biotério do Departamento de Análises Clínicas da FCF/UNESP, Araraquara. Durante todo o período experimental, os ratos receberam água e dieta comercial (Presença Nutrição Animal, Paulínia, SP, Brasil) *ad libitum*. Os animais permaneceram nestas condições durante 48 horas antes do início dos experimentos.

Todos os procedimentos experimentais realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FCF/UNESP, Araraquara (CEUA/FCF/CAr 13/2020).

4.2 Indução do diabetes mellitus experimental

Primeiramente, os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas. O modelo experimental de DM tipo 1 foi induzido através de uma injeção única de 40 mg/kg de estreptozotocina (STZ) dissolvida em citrato 0,01 M (pH 4,5) via intravenosa (veia jugular). Para este procedimento, a inalação de isoflurano foi utilizada como método anestésico. Ratos normais, não diabéticos, também foram jejuados e receberam apenas tampão citrato, pela mesma via.

Os experimentos foram iniciados três dias após a administração de STZ. Ratos com glicemia pós-prandial igual ou superior a 250 mg/dL foram utilizados na composição dos grupos diabéticos. Os animais foram distribuídos nos diferentes grupos experimentais de acordo com os valores médios de glicemia e massa corporal (pareamento). Este foi considerado o dia “0” do experimento, e assim deu-se início aos tratamentos.

4.3 Tratamento dos animais diabéticos com insulina e/ou licopeno

Na primeira etapa do projeto, ratos diabéticos foram tratados com insulina (4U/dia e 1U/dia), licopeno (45 mg/kg/dia) ou com a associação de insulina 1U/dia + licopeno.

Os ratos foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- Ratos normais, não diabéticos (NIOG; n=12)
- Ratos diabéticos, os quais foram divididos em 5 grupos (n=12/grupo):
- Ratos diabéticos tratados com veículo, iogurte (DIOG);
- Ratos diabéticos tratados com 4U/dia de insulina (DI4U) (tratamento padrão);
- Ratos diabéticos tratados com 1U/dia de insulina (DI1U) (insulina em menor dose);

- Ratos diabéticos tratados com 45 mg/kg de licopeno (DLIC);
- Ratos diabéticos tratados com 1U/dia de insulina + 45 mg/kg de licopeno (DI1U+LIC).

Devido a sua baixa solubilidade em água, o extrato de tomate em pó rico em licopeno (*Lycopersicon esculentum* Mill., 10.13% licopeno, Ningbo Vitax Biotechnology Company, Ltda., China) foi incorporado em iogurte (170 g de iogurte contém 9.1 g carboidratos, 6.8 g proteínas, 7.0 g gorduras totais, 126 kcal, Nestlé®, Brasil) através da utilização de um homogeneizador (27.000 rpm), por 90 segundos em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$).

As doses diárias de 45 mg/kg de licopeno foram divididas em duas doses de 22,5 mg/kg, e administradas duas vezes ao dia (8:00 e 17:00 horas), durante 30 dias. O licopeno incorporado em iogurte foi administrado por via orogástrica (gavagem) em 0,5 mL de iogurte (totalizando 1mL/dia), cuja dose foi escolhida de acordo com trabalho prévio realizado por Figueiredo et al. (2020).

Os ratos NIOG e DIOG receberam apenas iogurte (veículo). Insulina foi administrada por via subcutânea. Tal como o licopeno, as doses diárias de insulina também foram divididas em duas doses sendo a menor dose de insulina escolhida de acordo com trabalho prévio realizado por Gutierrez et al. (2019); 4U/dia insulina foram administradas na forma duas doses de 2U, às 8:00 e 17:00 horas, e 1U/dia insulina foi administrada na forma duas doses de 0,5U, às 8:00 e 17:00 horas. A insulina (Humulin® N, U-100, Eli Lilly do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) foi preparada em cloreto de sódio (0,85%).

A fim de submeter todos os ratos as mesmas condições de manipulação dos tratamentos, animais dos grupos NIOG, DIOG e DLIC receberam salina (0,85%) por via subcutânea, enquanto os animais dos DI4U e DI1U receberam 0,5mL de água via orogástrica.

4.4 Tratamento dos animais diabéticos com insulina e/ou ácido alfa lipoico

Na segunda etapa do projeto, ratos diabéticos foram tratados com insulina (4U/dia e 1U/dia), ácido alfa lipoico (50 mg/kg/dia e 25 mg/kg/dia) ou com a associação de insulina 1U/dia + ácido alfa lipoico (50 mg/kg/dia ou 25 mg/kg/dia).

Os ratos foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- Ratos normais, não diabéticos (NIOG; n=12)
- Ratos diabéticos, os quais foram divididos em 7 grupos (n=12/grupo):
- Ratos diabéticos tratados com veículo, iogurte (DIOG);
- Ratos diabéticos tratados com 4U/dia de insulina (DI4U) (tratamento padrão);
- Ratos diabéticos tratados com 1U/dia de insulina (DI1U) (insulina em menor dose);

- Ratos diabéticos tratados com 50 mg/kg de ácido alfa lipoico (DAL50);
- Ratos diabéticos tratados com 1U/dia de insulina + 50 mg/kg de ácido alfa lipoico (DI1U+DAL50);
- Ratos diabéticos tratados com 25 mg/kg de ácido alfa lipoico (DAL25);
- Ratos diabéticos tratados com 1U/dia de insulina + 25 mg/kg de ácido alfa lipoico (DI1U+DAL25).

O ácido alfa lipoico (Ibero Magistral, Ltd, Brasil) foi incorporado em iogurte (170 g de iogurte contém 9.1 g carboidratos, 6.8 g proteínas, 7.0 g gorduras totais, 126 kcal, Nestlé®, Brasil) através da utilização de um homogeneizador (27.000 rpm), por 90 segundos em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$).

As doses diárias de 50 mg/kg de ácido alfa lipoico foram divididas em duas doses de 25 mg/kg, e administradas duas vezes ao dia (8:00 e 17:00 horas), durante 30 dias. O mesmo foi realizado para as doses diárias de 25 mg/kg de ácido alfa lipoico, as quais foram divididas em duas doses de 12,5 mg/kg e administradas duas vezes ao dia (8:00 e 17:00 horas), durante 30 dias. O ácido alfa lipoico incorporado em iogurte foi administrado por via orogástrica (gavagem) em 0,5 mL de iogurte (totalizando 1mL/dia), cuja doses foram escolhidas de acordo com a literatura (MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003; SHARMA; CHOPRA; KULKARNI, 2007).

Os ratos NIOG e DIOG receberam apenas iogurte (veículo). Insulina foi administrada por via subcutânea. Tal como o ácido lipoico, as doses diárias de insulina também foram divididas em duas doses sendo a menor dose de insulina escolhida de acordo com trabalho prévio realizado por Gutierrez et al. (2019); A insulina (Humulin® N, U-100, Eli Lilly do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) foi preparada em cloreto de sódio (0,85%).

A fim de submeter todos os ratos as mesmas condições de manipulação dos tratamentos, animais dos grupos NIOG, DIOG e DLIC receberam salina (0,85%) por via subcutânea, enquanto os animais dos DI4U e DI1U receberam 0,5mL de água via orogástrica.

4.5 Parâmetros fisiológicos, análise temporal da glicemia e finalização do experimento

Todos os ratos foram mantidos em caixas de polipropileno (n=4/caixa) durante todo o período experimental, exceto nos dias 0 e 30 de tratamento, onde foram mantidos em gaiolas metabólicas, individualmente, para o monitoramento da ingestão alimentar, ingestão hídrica e volume urinário de cada animal. Para a obtenção dos parâmetros fisiológicos, os animais foram mantidos nas gaiolas metabólicas por um período prévio de três dias (adaptação). Em cada gaiola metabólica eram oferecidos 50 g de dieta comercial e 200 mL de água, bem como havia um frasco para a coleta de

urina, contendo 500 µL de tolueno para a preservação da amostra. Após a leitura dos parâmetros fisiológicos, ou seja, medição do consumo alimentar, ingestão hídrica e volume urinário, os animais retornaram para as caixas de polipropileno.

As amostras de urina de 24 horas foram aliquotadas e imediatamente armazenadas a -80°C para análise semi-quantitativa dos níveis de albumina na urina. Foram utilizadas amostras de urina coletadas dos animais mantidos em gaiolas metabólicas, após 30 dias de tratamento.

A massa corporal foi monitorada semanalmente, durante todo período experimental. O ganho de massa corporal foi determinado pela subtração da massa corporal do final do experimento (dia 30) pela massa corporal do início do experimento (dia 0).

A glicemia pós-prandial foi determinada nos dias 0, 10, 20 e 30 de tratamento, sendo o plasma obtido a partir de amostras de sangue coletadas da cauda de cada animal, 2 horas após os respectivos tratamentos. A glicemia de jejum foi monitorada após um período de 6 horas de jejum, no 28º dia de tratamento.

No 29º dia de tratamento, foi realizada uma coleta de sangue, via caudal, em *eppendorfs* contendo EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético; 80mg/mL) na seguinte proporção, 40 µL de EDTA para cada 200 µL de sangue, para a análise dos níveis de hemoglobina glicada (HbA1c).

Após 30 dias de tratamento, o experimento foi finalizado. Os ratos foram jejuados por 5 horas, anestesiados (5mg/kg de xilazina e 50 mg/kg de quetamina). Em 3 animais de cada grupo, foi administrada insulina (5 UI/kg), e em outros 3 animais foi administrada solução salina, por via intraperitoneal, para a investigação das alterações nos níveis de fosforilação da AKT (basal ou estimulada) em músculos *gastrocnemius*. Após 10 minutos da administração de insulina ou salina, músculos *gastrocnemius* foram coletados e armazenados imediatamente a -80°C para as análises posteriores.

Devido ao grande volume de sangue necessário para as análises, os animais foram eutanasiados por decapitação (com uso de guilhotina) e amostras de sangue total foram coletadas para a obtenção do plasma, o qual foi utilizado para as análises de marcadores bioquímicos, marcadores de estresse glico-oxidativo e atividade da enzima antioxidante paraoxonase 1 (PON 1).

Tecidos adiposos (retroperitoneal e epididimal) e musculares (músculos esqueléticos *soleus* e *extensor digitorum longus*) foram removidos e pesados. Os rins foram cuidadosamente retirados e armazenados a -80 °C para posterior análises dos biomarcadores de estresse glico-oxidativo (AGEs fluorescentes e TBARS), enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GSH-Px) e níveis proteicos de marcadores de detoxificação dos AGEs (GLO 1 e AGER-1). O fígado também foi retirado e armazenado a -80 °C para posterior análise dos biomarcadores de estresse glico-oxidativo e enzimas antioxidantes.

4.6 Parâmetros bioquímicos

Amostras de sangue total foram coletadas um dia antes da eutanásia (29º dia de tratamento) para determinação dos níveis de HbA1c, via cromatografia por afinidade; baseia-se na capacidade da glicose (ligada à HbA1c) de se ligar a derivados do ácido borônico imobilizados em resina. A hemoglobina não glicada é eluída e mensurada como o primeiro pico do cromatograma. Posteriormente, a HbA1c ligada à resina é eluída (com sorbitol), sendo possível, assim, mensurar a fração glicada da hemoglobina. Foi utilizado o equipamento Premier Hb9210™ (Trinity Biotech), o qual utiliza os princípios de cromatografia por afinidade da HbA1c ao boronato, seguido de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Trinity Biotech Premier Hb9210 Operator's Manual).

Níveis plasmáticos de glicose, frutossamina, triglicerídeos, colesterol total, HDL-colesterol, creatinina, ácido úrico, ALT e ALP foram determinados através de kits comerciais (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil), em amostras de plasma obtidas após coleta e centrifugação do sangue total.

4.6.1 Determinação da concentração de glicose

A glicemia foi monitorada através do método da glicose oxidase, na qual catalisa a oxidação da glicose à ácido glicônico e H_2O_2 . O H_2O_2 reage com 4-aminoantipirina, sob a ação de uma enzima do tipo peroxidase, formando uma antipirilquinonimina, monitorada em 505 nm, e cuja intensidade de absorção é proporcional à concentração da glicose na amostra (TRINDER, 1969). Os resultados foram expressos em mg/dL.

4.6.2 Determinação da concentração de frutossamina

A glicose se liga aos grupamentos amino das proteínas formando uma base de Schiff (aldimina), que após um rearranjo molecular, transforma-se em uma cetoamina, mais estável em relação à imina, denominada frutossamina. Em meio alcalino, a frutossamina é convertida à forma enólica, a qual reduz o azul de nitrotetrazólio a uma “formazana púrpura”. A medida da diferença de absorbância, após incubação aos 10 e aos 15 minutos, é proporcional à concentração de frutossamina na amostra. A calibração do sistema é realizada com calibrador de matriz bovina, calibrado com polilisina glicada (BAKER et al., 1985; JOHNSON; METCALF; BAKER, 1983). Os resultados foram expressos em micromoles/litro ($\mu\text{mol/L}$).

4.6.3 Determinação da concentração de colesterol total

A concentração de colesterol total foi determinada utilizando sistema de reações enzimáticas acopladas, com colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase. O produto formado é a antipirilquinonimina, monitorada em 505 nm, e cuja intensidade de absorção é proporcional à concentração de colesterol na amostra (MROZ, 2003). Os resultados foram expressos em mg/dL.

4.6.4 Determinação da concentração de triacilglicerol

A concentração de triacilgliceróis foi determinada via reações enzimáticas acopladas; os triacilgliceróis são hidrolisados pela lipase, produzindo glicerol e ácidos graxos. O glicerol é fosforilado pela gliceroquinase, produzindo glicerol-3-fosfato, o qual é oxidado à dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio sob ação da glicerol-3-fosfato oxidase. O H_2O_2 participa da oxidação de 4-aminoantipirina, pela ação catalizadora da peroxidase, gerando antipirilquinonimina, monitorada a 505 nm, sendo diretamente proporcional à concentração dos triacilgliceróis na amostra (RIFAI; WARNICK, 2006). Os resultados foram expressos em mg/dL.

4.6.5 Determinação da concentração de HDL-colesterol

O poliânion composto por fosfotungstato de sódio e íons de magnésio forma complexos estáveis com a superfície das lipoproteínas VLDL, LDL e quilomicrons. Os complexos formados com as partículas do colesterol-HDL presentes no soro não se estabilizam, ficando sujeitos à ação detergente do polioxietileno lauril éter, solubilizando-se. Em seguida, ocorre a ação de colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase sobre o colesterol em HDL, resultando na formação de um cromóforo o qual é diretamente proporcional à concentração de colesterol presente na lipoproteína HDL da amostra (RIFAI; WARNICK, 2006). Os resultados foram expressos em mg/dL.

4.6.6 Determinação da concentração de creatinina

A concentração de creatinina foi determinada pela ação da enzima creatinina amidohidrolase, a qual converte creatinina à creatina. A creatina produzida é hidrolisada a sarcosina e ureia pela ação da enzima creatina amidinohidrolase. Em seguida, a enzima sarcosina oxidase promove a desmetilação oxidativa da sarcosina, levando à produção de glicina, formaldeído e H_2O_2 . Na presença de peroxidase, o H_2O_2 formado reage com o N-etil-N-sulfopropil-m-toluidina (ESPMT) e 4-aminoantipirina, produzindo uma quinoneimina, monitorada a 546 nm (JUNGE et al., 2004). Os resultados foram expressos em mg/dL.

4.6.7 Determinação da concentração de ácido úrico

A concentração de ácido úrico foi monitorada via reações enzimáticas acopladas. O ácido úrico é oxidado a alantoína e H_2O_2 , através da ação da enzima uricase. O H_2O_2 , na presença de peroxidase, reage com o ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno sulfonato (DHBS) e a 4-aminoantipirina, resultando na formação de antipirilquinonimina, monitorada a 505 nm. A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração do ácido úrico na amostra (DUNCAN et al., 1982). Os resultados foram expressos em mg/dL.

4.6.8 Determinação da concentração de alanina aminotransferase (ALT)

A ALT catalisa a transferência do grupo amino da alanina para o α -cetoglutarato, na presença de piridoxal-5-fosfato, produzindo piruvato e glutamato; o piruvato é oxidado à acetilfosfato e é gerado peróxido de hidrogênio via uma oxidase de piruvato. A reação final consiste na oxidação de corante leuco pelo peróxido de hidrogênio, na presença de uma peroxidase, com a formação de cromóforo. A alteração da densidade da reflectância é proporcional à atividade de ALT na amostra (HENRY et al., 1960; KARMEN; WROBLEWSKI; LADUE, 1955). Os resultados foram expressos em U/L.

4.6.9 Determinação da concentração de fosfatase alcalina (ALP)

A ALP, em meio alcalino, hidrolisa o p-nitrofenilfosfato liberando p-nitrofenol e fosfato inorgânico. A quantidade produzida de p-nitrofenol, monitorada em 405 nm, é diretamente proporcional à atividade enzimática da ALP na amostra (BOWERS et al., 1981). Os resultados foram expressos em U/L.

4.7 Biomarcadores de estresse glico-oxidativo no plasma, fígado e rins

4.7.1 Biomarcadores de peroxidação lipídica

Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinados no plasma, fígado e rim através da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), de acordo com Kohn e Liversedge (1944). Amostras de fígado e rim (0,25 g) foram homogeneizadas em 1 mL de cloreto de potássio 1,15%. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g por 10 min a 4 °C e os sobrenadantes utilizados para as análises. Sobrenadantes de plasma, fígado e rim foram previamente desproteinizados de acordo com o método proposto por Pilz et al. (2000).

Os reagentes utilizados na quantificação dos níveis de TBARS foram preparados conforme descritos a seguir. As soluções de cloreto de potássio (1,15%), hidróxido de sódio (1,5 M) e ácido

perclórico (10%) foram preparadas previamente em água MiliQ. A solução de TBA (10 mM) foi preparada em tampão fosfato monobásico de potássio (75 mM, pH 2,5) no dia do experimento. O 1,1',3,3'-tetrametoxipropano (400 µM; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) utilizado para a construção da curva padrão foi preparado em água MiliQ no dia do experimento.

Em tubos *ependorfs* foram pipetados 200 µL de plasma, homogenato, padrões ou branco e adicionados 400 µL de hidróxido de sódio (1,5 M). Após homogeneização e incubação (30 minutos, 60°C), foram adicionados 400 µL de ácido perclórico (10%) e os tubos foram centrifugados (10.000 g por 10 minutos à 4 °C). Os sobrenadantes foram utilizados para a determinação dos níveis de TBARS.

Em tubos *ependorfs* de rosca foram pipetados 250 µL do sobrenadante, padrão ou água e adicionado 500 µL de TBA. O TBA reage principalmente com compostos dienos, incluindo o malondialdeído, gerando produtos (TBARS) cujos níveis são determinados fluorimetricamente no plasma (comprimentos de onda de excitação e emissão de 510 nm e 553 nm, respectivamente) e espectrofotometricamente no fígado e rim a 535 nm. Os resultados foram expressos em µmol/L.

4.7.2 Biomarcadores de glicação avançada

Os níveis dos AGEs fluorescentes foram determinados de acordo com o método proposto por Costa et al. (2020). Amostras de fígado e rim (0,1 g) foram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato de sódio (10 mM; pH 7,4). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g por 10 min a 4 °C e os sobrenadantes dos homogenatos foram utilizados para a estimativa dos AGEs fluorescentes.

Os reagentes utilizados na estimativa dos AGEs fluorescentes foram preparados conforme descritos a seguir. A solução de fosfato de sódio (10 mM; pH 7,4) foi preparada através da utilização de dois sais (fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio bibásico). O hidróxido de sódio (0,1 M) foi preparado previamente em água MiliQ. A solução de ácido tricloroacético (0,12 M) foi preparada em água MiliQ no dia do experimento. As soluções de clorofórmio (1,21 M ou 2,42 M) foram preparadas previamente em água MiliQ.

Em tubos de plástico contendo 21 µL de amostras de plasma ou sobrenadantes dos homogenatos de fígado foram adicionados: 480 µL de ácido tricloroacético (0,12 M), 59 µL de clorofórmio (1,21 M plasma; 2,42 M fígado) e 40 µL de hidróxido de sódio (0,1 M). Os tubos foram homogeneizados em vórtex e mantidos a 8-10 °C durante 30 minutos e posteriormente centrifugados (10.000 g por 10 minutos à 10 °C) para a obtenção dos sobrenadantes. Já nos tubos de plásticos contendo 80 µL dos sobrenadantes dos homogenatos de rim foram adicionados 520 µL de NaOH (0,1 M); os tubos foram homogeneizados em vórtex e centrifugados à 10.000 g durante 10 minutos a 10°C. Em seguida foram feitas leituras em espectrofluorímetro (comprimentos de onda de excitação 370 nm e de emissão 440 nm). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (UA) de fluorescência/mg de proteína.

Os níveis de proteínas totais no plasma foram determinados através do método de Lowry et al. (1951) e utilizados para correção dos resultados.

4.8 Atividade antioxidante no plasma

A atividade da enzima paraoxonase 1 (PON 1) foi determinada pelo monitoramento da liberação do p-nitrofenol (405 nm), de acordo com o método proposto por Costa et al. (1990) e modificado por Assis et al. (2017).

As soluções utilizadas na determinação da atividade de PON 1 foram preparadas conforme descritas a seguir. Em uma solução de Tris-HCl (30 mM, pH 8,5) foram adicionados cloreto de cálcio (0,3 mM) e cloreto de sódio (0,6 M). Uma solução “mãe” de paraoxon (120 mM) foi preparada no dia do experimento em acetona. A partir desta solução de paraoxon (120 mM) foi realizada uma diluição (1:40) em água MiliQ. Assim, a concentração da solução de paraoxon diluída (1:40) foi de 3 mM.

Nas amostras de plasma foram adicionados 150 µL de tampão Tris-HCl (30 mM; pH 8,5) contendo cloreto de cálcio (0,3 mM), cloreto de sódio (0,6 M) e paraoxon (1,2 mM). O p-nitrofenol é liberado através da hidrólise do paraoxon pela ação catalítica da PON 1. A atividade de PON 1 foi expressa em unidades/litro (unidade = µmoL paraoxon hidrolisado/min).

4.9 Análise semi-quantitativa dos níveis de albuminúria

Os níveis de albumina na urina (análise semi-quantitativa) foram determinados de acordo com o método descrito por Kakani et al. (2012), com modificações feitas por Inácio et al. (2020) e adaptações realizadas no presente estudo.

Nas amostras de urina (coletadas por um período de 24 horas, após 30 dias de tratamento dos animais) foi realizada a determinação da concentração de proteínas totais pelo método do vermelho de pirogalol (WATANABE et al., 1986). Em seguida, com o objetivo de concentrar as amostras de urina e, assim, viabilizar a aplicação dessas amostras em gel de poliacrilamida contendo uma massa de proteína suficiente para a visualização das bandas de albumina, 500 µL de urina foram adicionados em tubo do tipo *eppendorf* e esse volume foi diminuído em equipamento do tipo SpeedVac® Concentrator, à temperatura ambiente, por um período de aproximadamente 12 horas.

Após o processo de concentração, as amostras de urina foram ressuspensas em diferentes volumes de tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), de forma a alcançar a seguinte condição: massa de 1,33 µg de proteína em 1 µL de amostra. Após ressuspensão das amostras, foi novamente realizada a determinação da concentração de proteínas totais, com o intuito de se obter a nova concentração de

proteínas de cada amostra, bem como para a conferência do alcance da concentração de proteínas desejada nas amostras.

A análise da presença de albumina na urina e a determinação semi-quantitativa de seus níveis foram realizadas via separação eletroforética de proteínas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), seguida de coloração do gel para visualização das bandas proteicas.

Na etapa de preparo da amostra para a eletroforese, as amostras de urina (previamente ressuspendidas em tampão Tris-HCl) foram preparadas em tampão Laemmli (125 mM Tris-HCl, 4 20% de glicerol, 140 mM dodecil sulfato de sódio (SDS), 200 mM 1,4-dithiothreitol (DTT) e 0,01% de azul de bromofenol; pH 6,8), na proporção 10 µL de amostra + 10 µL de tampão Laemmli. Amostras contendo 7,5 µg de proteína foram submetidas à eletroforese. Foram preparados géis de acrilamida/bisacrilamida 10%. Foi utilizado tempo de corrida de 30 minutos no gel de empilhamento a 60V, e tempo de 90 minutos no gel de separação a 120V, em temperatura ambiente.

Após a corrida e a separação eletroforética, as bandas das proteínas separadas no gel foram visualizadas pela coloração dos géis com solução de Azul de Coomassie (0,01% *Coomassie Brilliant Blue* R-250, 10% (v/v) metanol e 10% (v/v) de ácido acético glacial). Os géis ficaram na solução de coloração por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, houve o processo de descoloração dos géis com solução contendo 10% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético glacial, realizado em três etapas (20 minutos, 10 minutos e 5 minutos a temperatura ambiente).

Os géis foram fotografados e a análise da intensidade das bandas proteicas referentes à albumina foi realizada usando o Programa ImageJ 1.53a (Institutos Nacionais de Saúde, EUA). A análise semi-quantitativa dos níveis de albumina na urina foi realizada por meio de determinação da intensidade de bandas de albumina nas amostras de urina em comparação à intensidade das bandas de albumina pura, conduzidas como padrão do ensaio. Como padrão de albumina, foi utilizada solução contendo albumina de soro bovino na concentração de 50 mg/ml, sendo aplicadas massas de 1,00; 0,50; 0,25 µg/poço. A análise densitométrica da intensidade de bandas de albumina pura permitiu a elaboração de uma curva padrão, possibilitando o cálculo do fator. Os resultados foram expressos em termos de µg de albumina/7,5 µg de proteína total.

4.10 Defesas antioxidantes no fígado e rins

4.10.1 Preparação das amostras

Amostras de fígado e rim (0,1 g) foram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato de sódio (10 mM; pH 7,4). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g por 10 min a 4 °C e os sobrenadantes dos homogenatos foram utilizados para a determinação das atividades das enzimas antioxidantes

descritas a seguir. Os níveis de proteínas totais foram determinados através do método descrito por Lowry et al (1951) e utilizados para correção dos resultados.

4.10.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade de SOD foi determinada através do monitoramento da inibição da redução do *nitroblue tetrazolium chloride* (NBT), de acordo com método proposto por Beauchamp e Fridovich (1971).

As soluções utilizadas para a análise da atividade de SOD no fígado e nos rins foram preparadas conforme descrito a seguir. A solução de fosfato de sódio e potássio (53 mM; pH 7,8) foi preparada através da utilização de dois sais: fosfato dissódico e fosfato de potássio monobásico, os quais foram pesados e solubilizados em água MiliQ. A solução de NBT (10 mM) foi preparada em frasco *eppendorf* em água MiliQ no dia do experimento. As soluções de EDTA (10 mM) e de xantina (5 mM) foram preparadas em água MiliQ. Por fim, a solução de xantina oxidase foi preparada em tampão fosfato de sódio e potássio (53 mM; pH 7,8).

Para a realização do experimento, foi preparada uma “solução de trabalho” contendo: 500 µL de tampão fosfato de sódio e potássio (53 mM; pH 7,8), 100 µL de xantina (5 mM) e 10 µL de EDTA (10 mM). Para cada amostra (40 µL) foram pipetados 200 µL da solução de trabalho, 30 µL de NBT (10 mM) e 30 µL da solução de xantina oxidase.

A xantina oxidase promove a oxidação da xantina, gerando o radical ânion superóxido o qual, por sua vez, reduz o NBT a uma formazana. A SOD catalisa a dismutação do radical ânion superóxido, inibindo a redução do NBT, monitorado em 550 nm. Os resultados foram expressos em U/mg proteína.

4.10.3 Atividade da catalase (CAT)

A atividade de CAT foi monitorada pelo consumo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), de acordo com Beers e Sizer (1952).

Para a análise da atividade da CAT foram utilizadas as soluções descritas a seguir. A solução de fosfato de potássio (50 mM; pH 7,0) foi preparada através da utilização de dois sais: fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico, os quais foram pesados e solubilizados em água MiliQ. Para a realização do experimento, foi preparada uma “solução de trabalho” contendo: 50 mL da solução de fosfato de potássio (50 mM; pH 7,0) e 50 µL de peróxido de hidrogênio (10 mM).

Para cada amostra (10 µL) foram pipetados 290 µL da solução de trabalho e a atividade da CAT foi monitorada em 230 nm. Os resultados foram expressos em mmol de H₂O₂ consumido/min/mg proteína.

4.10.4 Atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px)

A atividade de GSH-Px foi determinada pelo monitoramento da oxidação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida (NADPH) em NADP⁺ (forma oxidada), de acordo com Rush e Scandiford (2003).

As soluções utilizadas para a análise da atividade de GSH-Px no fígado e rins foram preparadas conforme descrito a seguir. A solução de Tris-HCl (53 mM; pH 7,6) contendo EDTA (5,29 mM) foi preparada em água MiliQ. As soluções de NADPH (3 mM) e de glutathione redutase foram preparadas em tampão Tris-HCl (53 mM; pH 7,6) contendo EDTA (5,29 mM). As soluções de glutathione reduzida (1,5 mM) e de peróxido de hidrogênio foram preparadas em água MiliQ.

Para a realização do experimento, foi preparada uma “solução de trabalho” contendo volumes iguais das soluções de NADPH (3 mM), glutathione reduzida (1,5 mM) e glutathione redutase. Para cada amostra (50 µL) foram pipetados 170 µL da solução de Tris-HCl (53 mM; pH 7,6) contendo EDTA (5,29 mM), 60 µL da solução de trabalho e 20 µL da solução de peróxido de hidrogênio.

A GSH-Px catalisa a oxidação do metabólito glutathione (GSH) na presença de H₂O₂. A glutathione em sua forma oxidada (GSSG) é, então, reduzida em GSH pela ação da enzima glutathione redutase (GSH-Rd), com concomitante oxidação do NADPH em NADP⁺, monitorado em 340 nm. Os resultados foram expressos em mmol de NADPH oxidado/min/mg proteína.

4.10.5 Dosagem de proteínas totais

As proteínas foram quantificadas no plasma e nos sobrenadantes dos homogenatos dos tecidos (fígado e rim) de acordo com o método de Lowry et al. (1951). O princípio do método baseia-se na utilização de uma mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, denominada reagente *Folin-Ciocalteu*, que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença de cobre, monitorada a 660 nm. A albumina bovina foi utilizada como padrão. Os resultados foram expressos como mg de proteína / mL.

4.11 Níveis proteicos e de fosforilação da AKT nos músculos e níveis proteicos de AGER-1 e glioxalase 1 nos rins (Western blotting)

Músculos *gastrocnemius* e rins foram homogeneizados (Polytron Omni TH01, Kennesaw, GA, USA) em tampão contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM de cloreto de sódio (NaCl), 1 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 24 mM de deoxicolato de sódio, 0,01% de dodecil sulfato de sódio, 10 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de ortovanadato de sódio, 1,5 µM de aprotinina, 1 mM de fluoreto de fenilmetanossulfonil (PMSF) e 2,1 µM de leupeptina. Os

homogenatos foram centrifugados a 11.900 g a 4°C por um período de 30 minutos, e os sobrenadantes foram utilizados para determinação dos níveis de proteína (LOWRY et al., 1951). Tampão de amostra contendo 62,5 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 10% de glicerol, 2% de SDS, 33,3 mM de DTT e 0,01% de azul de bromofenol foi adicionado aos sobrenadantes no dia do experimento, na proporção 15 µL de amostra em 15 µL de tampão (*gastrocmenius*) e na proporção 10 µL de amostra em 25 µL de tampão (rins).

Amostras contendo de 30 µg de proteína foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida/bisacrilamida de 10% a 12% (tempo de corrida de 30 minutos no gel de empilhamento à 60 V, e 90 minutos no gel de separação à 120 V, em temperatura ambiente). Em seguida, as proteínas foram eletrotransferidas do gel para membranas de nitrocelulose (tempo de transferência de 3 horas, 0,35 mA a 4°C).

Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos primários específicos (Tabela 1). A ligação dos anticorpos primários foi detectada por anticorpos secundários conjugados com HRP peroxidase (Cell Signaling) (Tabela 1) e visualizada com substrato quimiluminescente (1,1 mM de sal sódico de luminol, 1,98 mM de ácido 4-iodofenilborônico e 5,3 mM de H₂O₂, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,6). As bandas quimiluminescentes foram capturadas pelo C-Digit Blot Scanner (LI-COR, Lincoln, NE) e as intensidades das bandas foram analisadas utilizando o LI-COR Image Studio 4.0.

Tabela 1: Anticorpos primários e secundários, diluições e condições de armazenamento.

Anticorpos Primários	Empresa	Código	Diluição	Condições de armazenamento
AGER-1 (DDOST)	Elabscience®	E-AB-63923	1:750	-20°C
GLO 1	Elabscience®	E-AB-15072	1:500	-20°C
Anti-β-actina (controle interno)	Cell Signaling	#5057	1:1000	-20°C
Anti-AKT (pan)	Cell Signaling	#4691	1:1000	-20°C
Anti-fosfo-[Ser 473]-AKT	Cell Signaling	#4060	1:1000	-20°C
Anticorpos Secundários	Empresa	Código	Diluição	Condições de armazenamento
Anti-rabbit conjugado-HRP	Cell Signaling	#7074	1:1000	-20°C
Anti-mouse conjugado-HRP	Sigma-Aldrich	A5441	1:5000	-20°C

Fonte: autoria própria, 2023.

4.12 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Diferenças entre os grupos experimentais foram analisadas por análise de variância One-Way (ANOVA) seguida por teste Student-Newman-Keuls. O teste de t-Student pareado foi utilizado para comparações intragrupos em relação ao dia 0. Diferenças estatísticas foram considerados quando $p < 0.05$. As análises foram determinadas através do programa GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

Capítulo 1

5. RESULTADOS

5.1 A terapia combinada 1U/dia de insulina + licopeno (45 mg/kg) aumentou o ganho de massacorporal e diminuiu a polifagia, a polidipsia e a poliúria em ratos diabéticos

Conforme esperado, 3 dias após a administração de STZ, os ratos diabéticos que receberam veículo, iogurte (DIOG), apresentaram uma diminuição nos valores de massa corporal e, conseqüentemente, o ganho total de massa corporal foi menor do que aquele observado nos animais normais, não diabéticos (NIOG; Figura 10). Ao final dos 30 dias de experimento, observou-se que ratos DIOG também apresentaram uma diminuição nas massas de músculos esqueléticos e de tecidos adiposos (Tabela 2), o que pode explicar, pelo menos em parte, os menores valores de massa corporal e de ganho de massa corporal. Em comparação aos ratos NIOG, os ratos DIOG também apresentaram polifagia, polidipsia e poliúria (Figura 11), manifestações clássicas deste modelo experimental de DM tipo 1.

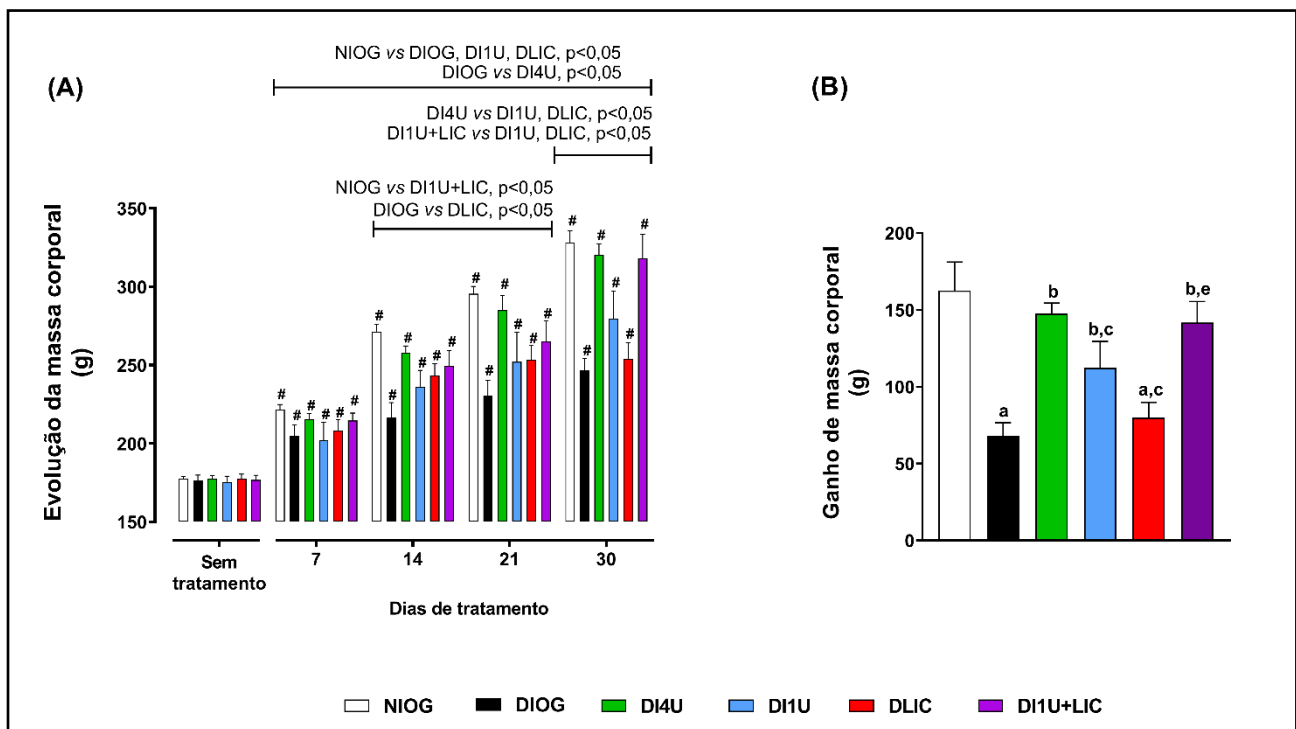


Figura 10. Evolução da massa corporal e ganho total de massa corporal de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno (45 mg/kg), sozinhos ou em combinação, após 30 dias de tratamento. Evolução da massa corporal (A) e ganho total de massa corporal (B). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DLIC; #, diferença com o dia 0.

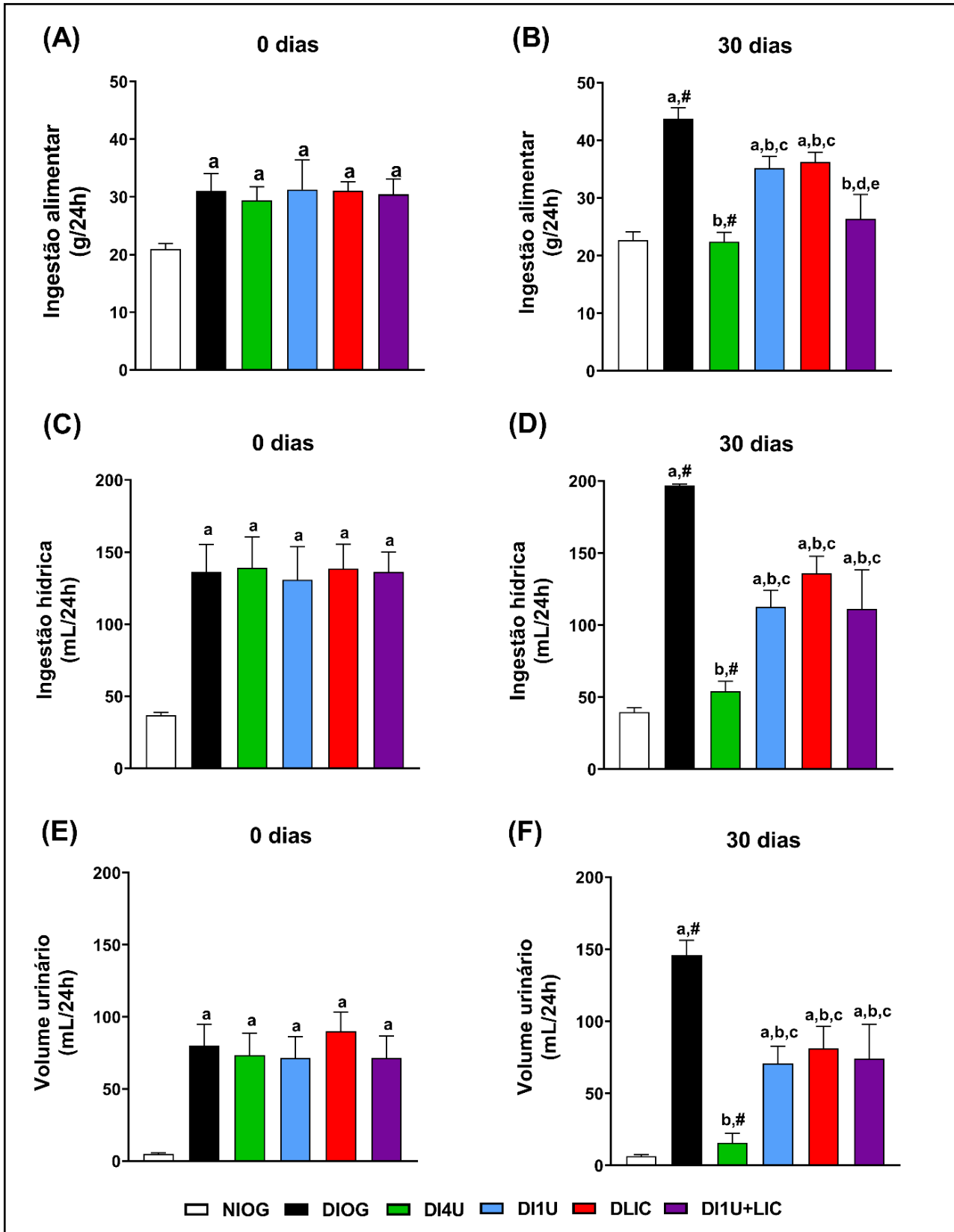


Figura 11. Ingestão alimentar, ingestão hídrica e volume urinário de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno (45 mg/kg), sozinhos ou em combinação, no início (dia 0) e final (dia 30) do experimento. Ingestão alimentar 0 dias (A); ingestão alimentar 30 dias (B); ingestão hídrica 0 dias (C); ingestão hídrica 30 dias (D); volume urinário 0 dias (E) e volume urinário 30 dias (F). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DLIC; #, diferença com o dia 0.

O tratamento de ratos diabéticos com 4U/dia de insulina preveniu todos os distúrbios em parâmetros fisiológicos observados no DM tipo 1, ou seja, os animais DI4U apresentaram uma diminuição nos valores relacionados à ingestão hídrica, alimentar e volume urinário (Figura 11). O tratamento com 4U/dia de insulina também preveniu a perda de massas de tecidos musculares esqueléticos e adiposos (Tabela 2), o que justifica, pelo menos em parte, o aumento da massa corporal observado nestes animais (Figura 10).

Ratos diabéticos tratados com uma menor dose de insulina, 1U/dia (DI1U), apresentaram um aumento nos valores de massa corporal após 30 dias de tratamento, alcançando valores maiores do que os observados nos ratos DIOG; contudo o ganho total de massa corporal nos animais DI1U foi menor do que aquele observado nos animais DI4U (Figura 10). Ratos DI1U também apresentaram um aumento nas massas de músculos esqueléticos e tecidos adiposos (Tabela 2), o que contribui para explicar a maior massa corporal nestes animais. Em relação à ingestão alimentar, ingestão hídrica e volume urinário (Figura 11), ratos DI1U apresentaram uma melhora nestes parâmetros, porém foi uma melhora menos efetiva do que aquela observada nos animais tratados com 4U/dia de insulina.

Após 30 dias de tratamento, nenhuma alteração significativa foi observada nos ratos diabéticos tratados somente com licopeno (DLIC) no que diz respeito aos parâmetros massa corporal, ingestão alimentar, ingestão hídrica e volume urinário. Em outras palavras, ratos DLIC apresentaram um menor ganho de massa corporal (Figura 10B), corroborado pelas menores massas de músculos esqueléticos e tecidos adiposos observadas nestes animais após 30 dias de tratamento (Tabela 2). Também foi observado que o tratamento com licopeno, sozinho, não melhorou os parâmetros fisiológicos alterados no DM experimental (ingestão alimentar, ingestão hídrica e volume urinário), após 30 dias de tratamento (Figura 11). Sendo assim, foi observado que o tratamento de ratos diabéticos somente com o licopeno não atenuou a perda de massa corporal típica desse modelo de diabetes, bem como não promoveu uma melhora nos parâmetros fisiológicos, uma vez que ratos DLIC apresentaram perfil de resposta semelhante aos ratos DIOG.

O tratamento de ratos diabéticos com a terapia combinada de 1U/dia de insulina + licopeno (DI1U+LIC) levou a um maior aumento nos valores de massa corporal em relação aos ratos DIOG, DI1U e DLIC, após 30 dias de tratamento (Figura 10). Justificando o aumento de massa corporal nos animais DI1U+LIC, maiores massas de músculos esqueléticos e tecidos adiposos foram observados, essas massas foram inclusive maiores do que aquelas observadas nos ratos DIOG e DLIC (Tabela 2). Em conjunto, um maior ganho de massa corporal foi observado nestes animais. Diversos benefícios foram observados com o tratamento de ratos diabéticos com a associação 1U/dia de insulina + licopeno nos parâmetros fisiológicos: houve diminuição da ingestão alimentar, hídrica e volume urinário, quando comparado aos ratos DIOG. É válido ressaltar que a diminuição da ingestão

alimentar promovida em ratos diabéticos pelo tratamento com a associação 1U/dia de insulina + licopeno foi maior do que aquela promovida pelos tratamentos isoladamente. (Figura 11B).

Tabela 2. Massas de músculos esqueléticos (*gastrocnemius*), tecidos adiposos brancos (epididimal e retroperitoneal) e rins de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno (45 mg/kg), sozinhos ou em combinação, após 30 dias de tratamento.

Tecidos	NIOG	DIOG	DI4U	DI1U	DLIC	DI1U+LIC
Músculo <i>gastrocnemius</i> (g/100 g massa corporal)	1.59 ± 0.05	0.98 ± 0.16 ^a	1.57 ± 0.05 ^b	1.36 ± 0.19 ^b	1.10 ± 0.12 ^{a,c}	1.46 ± 0.16 ^{b,e}
Tecido adiposo epididimal (g/100 g massa corporal)	4.67 ± 0,67	1.60 ± 0.32 ^a	4.22 ± 0.38 ^b	2.97 ± 0.46 ^{a,b,c}	1.88 ± 0.17 ^{a,c,d}	3.64 ± 0.62 ^{b,e}
Tecido adiposo retroperitoneal (g/100 g massa corporal)	5.92 ± 0.74	1.02 ± 0.26 ^a	4.79 ± 0.66 ^b	2.93 ± 0.60 ^{a,b}	1.22 ± 0.12 ^{a,c,d}	3.63 ± 0.87 ^{a,b,e}
Rins (g/100 g massa corporal)	1.37 ± 0.05	1.62 ± 0.14 ^a	1.42 ± 0.06 ^b	1.50 ± 0.14	1.49 ± 0.11	1.44 ± 0.08

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). n = 10. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls (p<0,05). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DLIC; #, diferença com o dia 0.

5.2 A terapia combinada 1U/dia de insulina + licopeno (45 mg/kg) diminuiu a glicemia e aumentou a sensibilidade à insulina nos músculos esqueléticos em ratos diabéticos

Ratos normais, não diabéticos, que receberam iogurte (NIOG), apresentaram níveis de glicemia pós-prandial em valores considerados normais ($\cong 99$ mg/dL), e estes valores se mantiveram ao longo dos 30 dias de tratamento (Figura 12A). A indução do DM tipo 1 experimental foi eficaz, uma vez que todos os grupos de ratos diabéticos (DIOG, DI4U, DI1U, DLIC, DI1U + LIC) apresentaram valores médios de glicemia em torno de 380 mg/dL, três dias após a administração de STZ, este considerado o dia 0 do experimento (Figura 12A). Ao longo dos 30 dias de experimento, ratos DIOG apresentaram um aumento progressivo nos níveis glicêmicos, alcançando valores médios de 565 mg/dL ao final dos 30 dias de experimento (Figura 12A). Além disto, ratos DIOG apresentaram maiores valores de AUC da glicemia pós-prandial (Figura 12B) e de glicemia de jejum (6 horas de jejum) (Figura 12C), quando comparados aos valores de ratos NIOG. Ratos DIOG também apresentaram uma diminuição significativa (57%) nos níveis de fosforilação da AKT estimulada por insulina nos músculos esqueléticos, quando comparados aos valores observados em ratos NIOG, indicando assim um comprometimento na sensibilidade à insulina (Figura 13).

O tratamento de ratos diabéticos com 4U/dia de insulina foi significativamente efetivo na promoção de diminuição nos valores de glicemia pós-prandial, em todos os tempos estudados (Figura 12A). Após 30 dias de tratamento, ratos DI4U apresentaram diminuições da glicemia pós-prandial (93%, figura 12A) e da glicemia de jejum (65%, figura 12C), bem como da AUC da glicemia pós-prandial (76%; figura 12B), quando comparados aos valores em ratos DIOG. Vale a pena aqui destacar que os níveis glicêmicos nos ratos DI4U foram significativamente menores do que os observados nos ratos NIOG (Figura 12A), o que pode tornar, em longo prazo, estes animais mais susceptíveis a um quadro de hipoglicemia, apesar deste fato não ter sido observado na AUC da glicemia pós-prandial (Figura 12B), e nem mesmo na glicemia de jejum (Figura 12C). Ratos DI4U apresentaram níveis basais de fosforilação da AKT, nos músculos esqueléticos, maiores do que os observados nos ratos NIOG (Figura 13), o que pode contribuir para explicar os menores valores de glicemia pós-prandial observados em animais DI4U em relação aos animais NIOG.

Ratos diabéticos tratados com 1U/dia de insulina também apresentaram uma diminuição da glicemia pós-prandial em todos os tempos estudados (dia 30), esta diminuição foi de 50% em relação aos valores de glicemia de ratos DIOG (Figura 12A). Também foi observada uma diminuição da AUC da glicemia pós-prandial (38%, figura 12B) e da glicemia de jejum (53%,

figura 12C) nos animais DI1U, em relação aos ratos DIOG. No entanto, é válido ressaltar que o tratamento com 1U/dia de insulina foi menos eficaz na conquista de um efetivo controle glicêmico de ratos diabéticos, uma vez que promoveu uma menor diminuição da glicemia em comparação ao tratamento com 4U/dia de insulina. No entanto, é interessante observar que os níveis de fosforilação basal de AKT em músculos de ratos DI1U foram maiores em relação aos valores encontrados nos grupos NIOG, DIOG e DI4U. No entanto, após o estímulo com insulina, os níveis de fosforilação de AKT em músculos de ratos DI1U foram semelhantes aos níveis observados nos ratos NIOG e DI4U, porém foram maiores do que os níveis observados nos ratos DIOG (Figura 13).

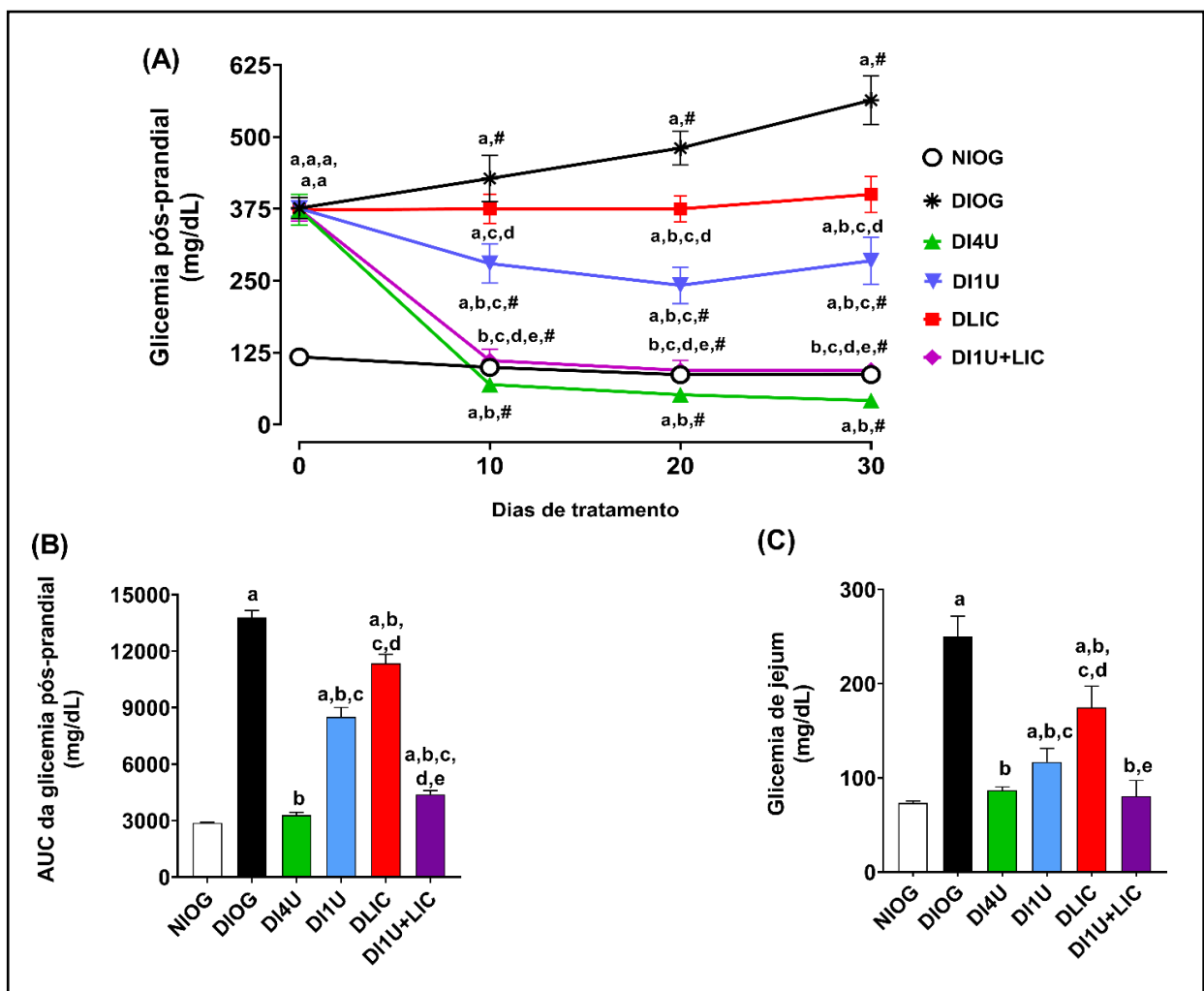


Figura 12. Valores temporais de glicemia pós-prandial e glicemia de jejum após 30 dias de experimento de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno (45 mg/kg), sozinhos ou em combinação. Respostas temporais da glicemia pós-prandial (A), área sob a curva da glicemia pós-prandial (B), glicemia de 6 horas de jejum (C). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DLIC; #, diferença com o dia 0.

O tratamento de ratos diabéticos com licopeno diminuiu discretamente os níveis de glicemia pós-prandial de ratos diabéticos, em comparação aos significativos efeitos dos tratamentos com 4U/dia ou 1U/dia de insulina neste parâmetro bioquímico; ademais, os níveis glicêmicos de animais DLIC foram mantidos em valores semelhantes ao longo de todo período de tratamento (Figura 12A). Em relação aos ratos DIOG, o tratamento com licopeno promoveu uma pequena diminuição nos níveis glicêmicos (29%; figura 12A), após 30 dias de tratamento e, analisando a AUC da glicemia pós-prandial, é possível observar que os efeitos do licopeno foram menores do que aqueles promovidos pelos tratamentos com insulina, nas doses de 4U/dia ou 1U/dia (Figura 12B e C). Os níveis de fosforilação da AKT estimulados por insulina nos músculos esqueléticos de animais DLIC foram menores do que os observados nos ratos NIOG, DI4U e DI1U (Figura 13), o que vai ao encontro do perfil de resposta observado na glicemia. Embora a fosforilação de AKT nos animais DLIC, após estímulo com insulina, tenha sido discretamente maior do que aquela observada nos ratos DIOG, nenhuma diferença estatística foi observada na comparação entre ratos DLIC e DIOG.

Os melhores resultados em relação ao controle glicêmico foram observados nos ratos tratados com a associação de insulina 1U/dia + licopeno: foi observada uma significativa diminuição da glicemia pós-prandial (70%, figura 12A) em relação aos valores encontrados em ratos DIOG, após 30 dias de tratamento, bem como em relação aos tratamentos com os bioativos sozinhos. O mesmo perfil foi observado na AUC da glicemia pós-prandial; os valores de AUC de animais DI1U + LIC foram semelhantes aos encontrados em animais NIOG, e significativamente menor do que os valores encontrados em animais submetidos aos tratamentos isolados. Reforçando a efetividade da associação insulina 1U/dia + licopeno na promoção de redução dos níveis glicêmicos, maiores níveis de fosforilação da AKT estimulada por insulina foram observados nos músculos esqueléticos de ratos DI1U + LIC, em relação aos ratos DIOG, DI4U e DLIC, reforçando as ações benéficas da terapia combinada no aumento da sensibilidade a insulina e, conseqüentemente, culminando em provável aumento da captação da glicose pelos tecidos musculares.

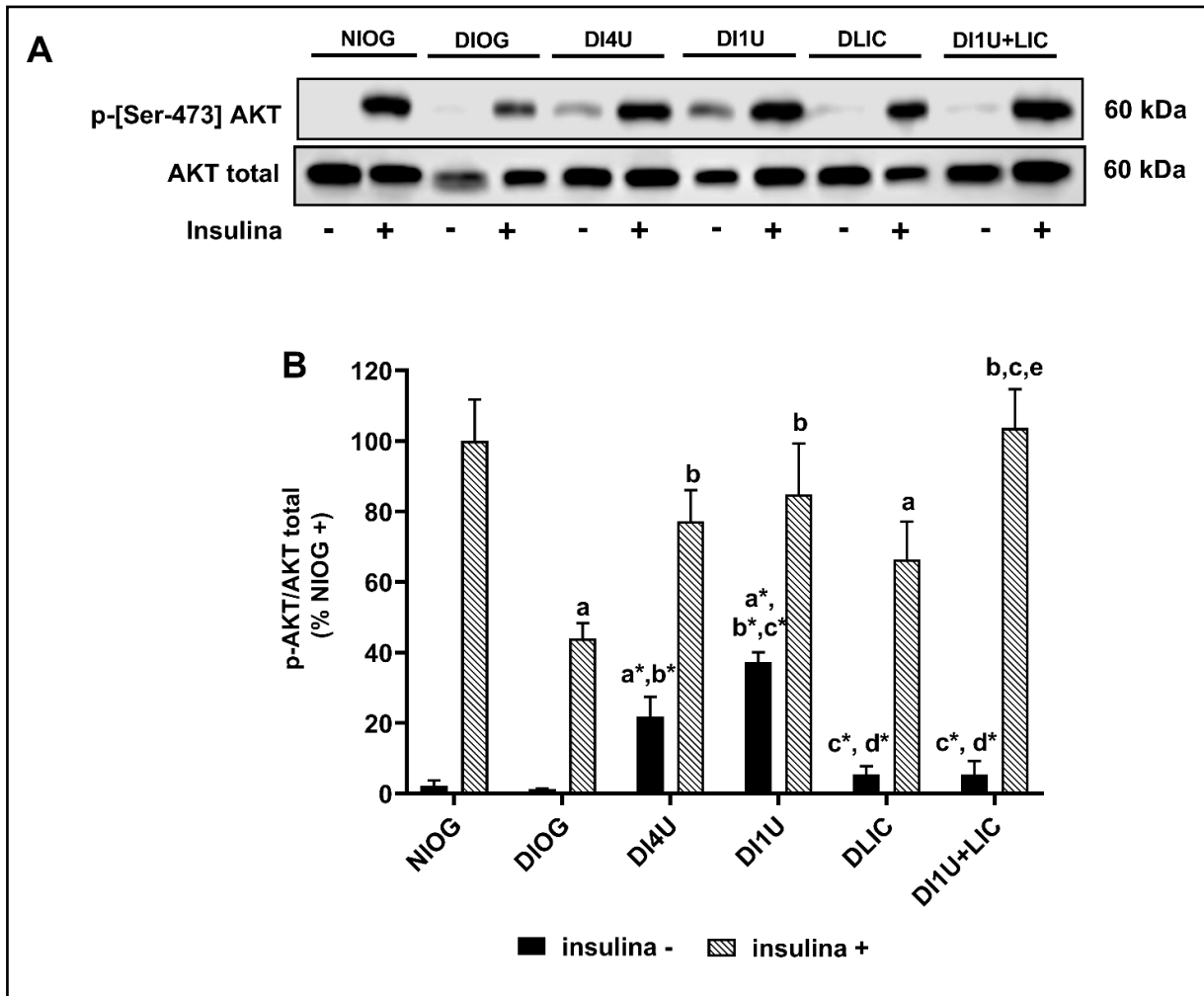


Figura 13. Níveis de fosforilação da AKT (basais e estimulados por insulina) em músculos esqueléticos de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno (45mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias. Bandas representativas (A) e análise densitométrica dos níveis de fosforilação de AKT, basal (-) e após estímulo com insulina (+), no músculo *gastrocnemius* (B). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $n = 4$. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). a*, diferenças com NIOG; a, diferenças com NIOG; b*, diferenças com DIOG; b, diferenças com DIOG; c*, diferenças com DI4U; c, diferenças com DI4U; d*, diferenças com DI1U; d, diferenças com DI1U; e*, diferenças com DLIC; e, diferença com DLIC.

5.3 A terapia combinada 1U/dia de insulina + licopeno (45 mg/kg) diminuiu marcadores do estresse glico-oxidativo e aumentou as defesas antioxidantes no sangue de ratos diabéticos

Em adição ao monitoramento de parâmetros fisiológicos e da eficácia no controle glicêmico, uma abordagem importante para a avaliação da efetividade do controle metabólico após os tratamentos de ratos diabéticos com bioativos e suas associações é a análise de biomarcadores relacionados aos processos de glicação em proteínas, através da determinação dos níveis de HbA1c e de frutossamina, uma vez que são marcadores de estágio inicial de processos glicativos. Em conjunto, a análise de marcadores precoces (HbA1c, frutossamina) e avançados da glicação

(via determinação dos AGEs fluorescentes) e a análise de processos de peroxidação lipídica (via determinação dos níveis de TBARS) evidenciam o potencial das estratégias terapêuticas em atenuar o estresse glico-oxidativo.

Após 30 dias de experimento, ratos DIOG apresentaram significativos aumentos nos níveis de HbA1c (50%, figura 14A) e de frutossamina (77%; figura 14B) em relação aos valores de ratos NIOG. Adicionalmente, maiores níveis plasmáticos de TBARS e de AGEs fluorescentes (75% e 82%, respectivamente) e menor atividade da enzima antioxidante PON 1 (24%) foram observados nos ratos DIOG, quando comparados aos animais NIOG (Figuras 14C, D e E). Estes achados reiteram a instalação do estresse glico-oxidativo nos animais diabéticos que receberam somente veículo. O tratamento de ratos diabéticos com insulina 4U/dia promoveu diminuição de todos os marcadores de estresse glico-oxidativo e aumentou a atividade de PON 1 no plasma.

Ratos diabéticos tratados com insulina 1U/dia apresentaram diminuição nos níveis plasmáticos de TBARS e AGEs fluorescentes (45% e 41%, respectivamente) e aumento na atividade de PON 1 (28%), porém não foram observadas diminuições nos marcadores de processos glicativos em estágio inicial (HbA1c e frutossamina), em relação aos valores encontrados em animais DIOG (Figura 14). O mesmo perfil foi observado no tratamento de ratos diabéticos com licopeno: houve diminuição nos níveis de TBARS e AGEs fluorescentes no plasma (45% e 37%, respectivamente) e aumento na atividade de PON 1 (25%), enquanto que os níveis de HbA1c e frutossamina permaneceram elevados, quando comparados aos ratos DIOG (Figura 14).

Ratos diabéticos tratados com a associação insulina 1U/dia + licopeno apresentaram diminuições nos níveis de HbA1c, frutossamina, TBARS e AGEs fluorescentes (30%, 29%, 42% e 43%, respectivamente) e aumento na atividade de PON 1 no plasma (28%), quando comparados aos valores de ratos DIOG (Figura 14). Vale a pena destacar a melhor ação da terapia combinada 1U/dia de insulina + licopeno na redução dos níveis de HbA1c, frutossamina e TBARS quando comparados aos efeitos do tratamento de ratos diabéticos com licopeno sozinho (Figuras 14A, B e C). Destaca-se também que os tratamentos com os bioativos sozinhos não haviam conquistado eficácia na diminuição dos níveis de proteínas glicadas, HbA1c e frutossamina. Em conjunto, estes achados demonstram as melhores ações da terapia combinada “1U/dia de insulina + licopeno”, seja melhorando ainda mais uma resposta já exercida pelos bioativos sozinhos, ou agregando uma melhor ação na diminuição dos marcadores de estresse glico-oxidativo.

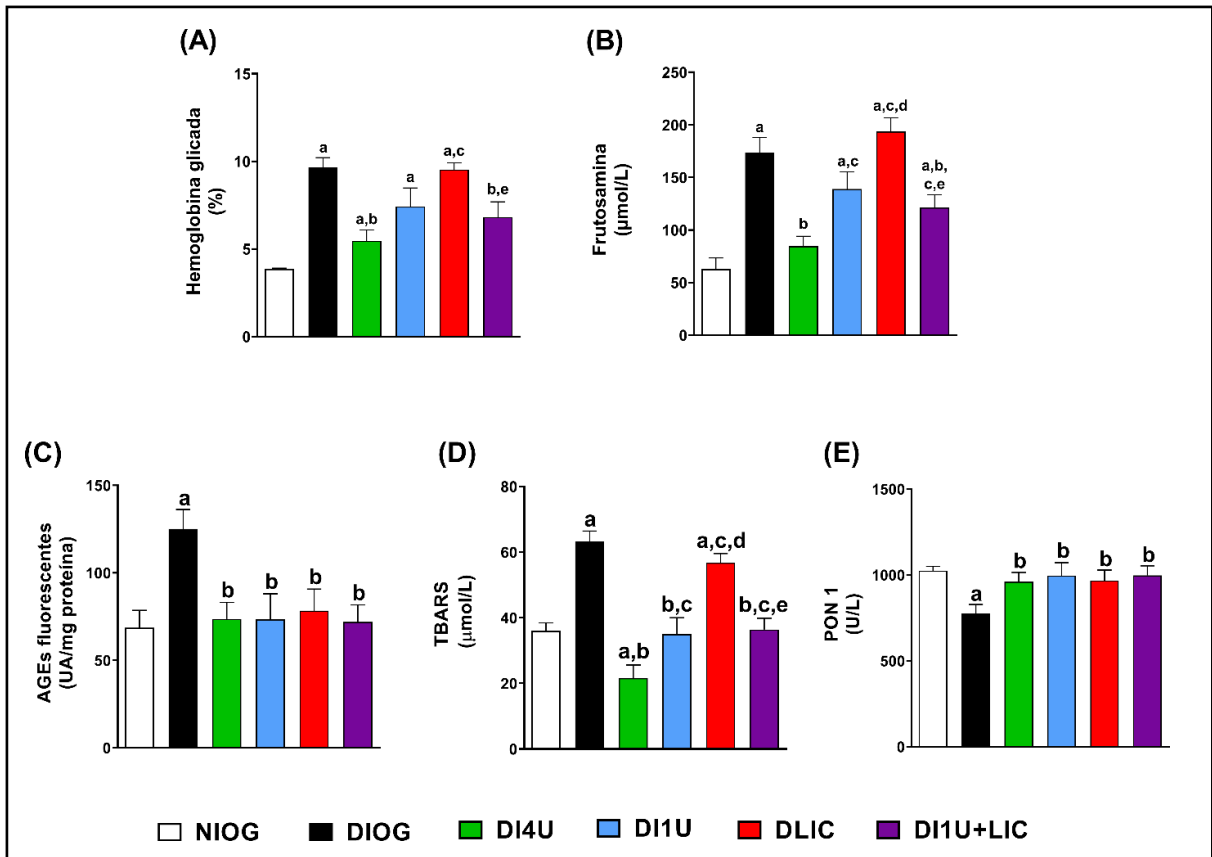


Figura 14. Biomarcadores de estresse glico-oxidativo no sangue de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno (45 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias. Níveis sanguíneos de HbA1c (A), níveis plasmáticos de frutamina (B), AGEs fluorescentes (C) e TBARS (D), e atividade de PON 1 (E) no plasma. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DLIC.

5.4 A terapia combinada 1U/dia de insulina + licopeno (45 mg/kg) atenuou a dislipidemia nos ratos diabéticos

Após 30 dias de experimento, ratos DIOG apresentaram um aumento dos níveis plasmáticos de triglicerídeos (157%; figura 15A) e colesterol total (22%; figura 15B) em relação aos ratos NIOG. Alterações bioquímicas são profundas em um quadro clínico de DM tipo 1, sendo a dislipidemia uma destas alterações, caracterizada pelo aumento significativo dos níveis de triglicerídeos e colesterol total. Ambos os tratamentos com insulina (4U/dia e 1U/dia) foram igualmente eficazes na promoção de redução nos níveis de triglicerídeos e de colesterol total. É interessante notar que, mesmo o tratamento de ratos diabéticos com insulina 1U/dia não sendo efetivo na redução dos marcadores sanguíneos e plasmáticos de processos glicativos (HbA1c e frutamina; figura 14A e B), foi possível observar as suas ações benéficas em atenuar a dislipidemia observada no DM.

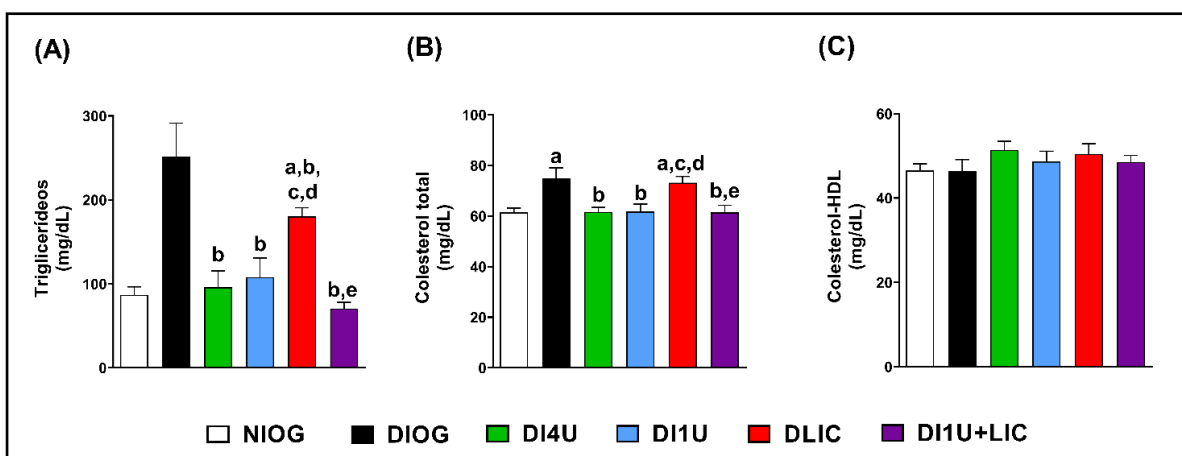


Figura 15. Perfil lipídico de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno (45 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias. Níveis plasmáticos de triglicerídeos (A), colesterol total (B) e colesterol-HDL (C). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DLIC.

Os ratos diabéticos tratados com licopeno apresentaram uma redução apenas dos níveis de triglicerídeos (figura 15A) em relação aos animais diabéticos DIOG. O tratamento de ratos diabéticos com a associação insulina 1U/dia + licopeno se mostrou efetivo na diminuição dos níveis plasmáticos de triglicerídeos (18%; figura 15A) e de colesterol total (68%; figura 15B).

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais constituídos por animais diabéticos em relação aos níveis de colesterol-HDL (figura 14C) quando comparados aos animais não diabéticos (NIOG).

5.5 A terapia combinada 1U/dia de insulina + licopeno (45 mg/kg) diminuiu biomarcadores de injúria renal e de função renal no plasma e na urina de ratos diabéticos

Com o objetivo de avaliar a função renal em ratos diabéticos, os níveis de creatinina e ácido úrico no plasma foram determinados. Já para a avaliação de injúria renal, estudos da excreção urinária de proteínas foram realizados. Ratos DIOG apresentaram aumentos nos níveis plasmáticos de creatinina (25%, figura 16C) e ácido úrico (44%, figura 16D) e na excreção de albumina na urina (142%, figura 16A e B), o que sugere disfunção e injúria renal nestes animais. Ambos os tratamentos com insulina (4U/dia e 1U/dia) foram capazes de diminuir os níveis plasmáticos de creatinina, ácido úrico e a excreção de albumina na urina quando comparados aos valores em ratos DIOG.

O tratamento de ratos diabéticos com licopeno mitigou a injúria renal (Figuras 16A e B), uma vez que diminuiu a excreção de albumina na urina; também diminuiu as concentrações plasmáticas de creatinina e ácido úrico (Figuras 16C e D). No entanto, as melhores ações foram observadas no tratamento com insulina 1U/dia + licopeno. Ratos DI1U + LIC apresentaram uma redução de 70% (Figura 16A e B) na excreção de albumina na urina, quando comparados aos ratos DIOG. Esta ação promissora da associação de insulina 1U/dia + licopeno também foi evidenciada em relação aos tratamentos sozinhos com insulina 1U/dia (50%) ou licopeno (43%) (Figura 16A e B). Além disto, o tratamento com insulina 1U/dia + licopeno promoveu uma diminuição dos níveis plasmáticos de creatinina e ácido úrico (Figuras 16C e D). Em conjunto com os resultados obtidos no perfil glicêmico destes animais, é possível sugerir que o tratamento com a terapia combinada insulina 1U/dia + licopeno mitigou a lesão renal de maneira mais efetiva do que os bioativos isoladamente, evidenciando o potencial benéfico da terapia combinada.

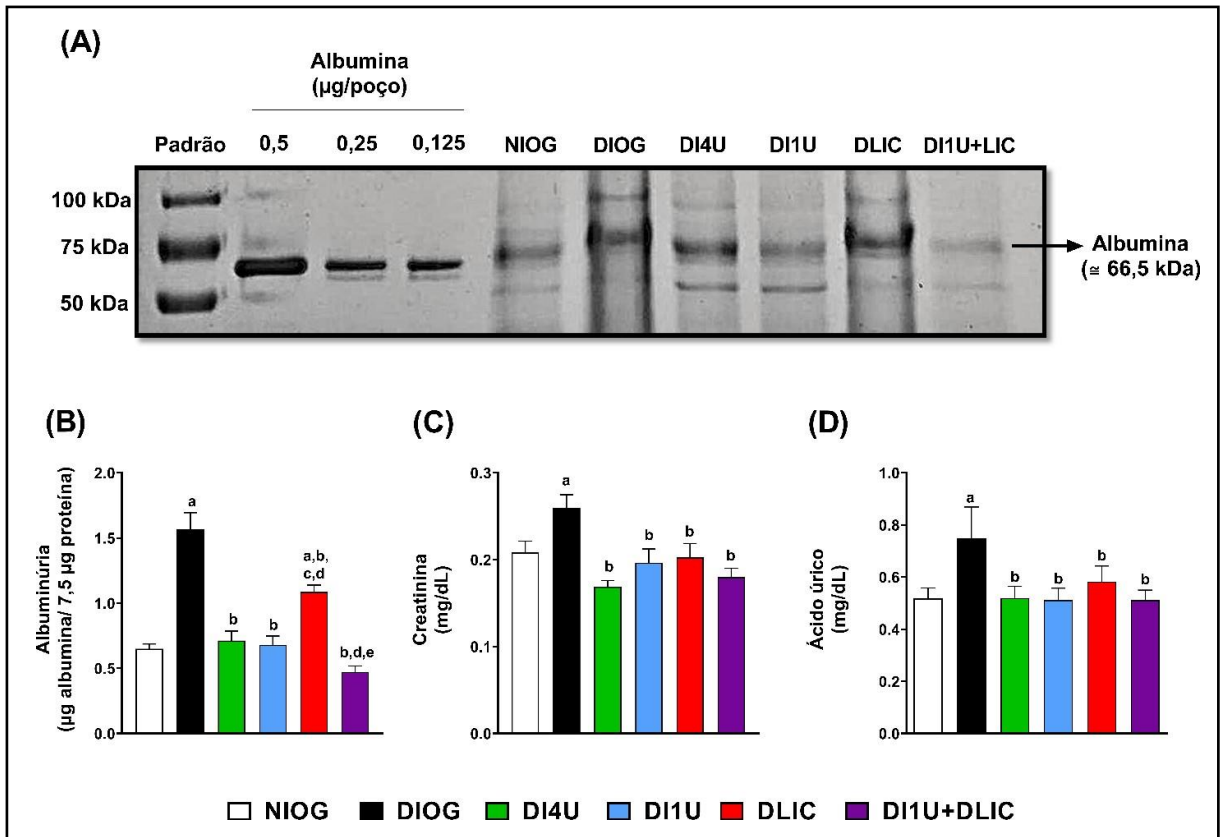


Figura 16. Marcadores de função renal (creatinina e ácido úrico no plasma) e injúria renal (albumina na urina) de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno (45 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias. Imagem representativa da separação eletroforética de proteínas de amostras de urina, evidenciando a albumina (A), albuminúria em µg por 7,5 µg de proteína (B), níveis de creatinina no plasma (C) e níveis de ácido úrico no plasma (D). Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). n = 10 (níveis de ácido úrico) e n = 4 (albuminúria SDS-PAGE). As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DLIC.

5.6 A terapia combinada 1U/dia de insulina + licopeno (45 mg/kg) aumentou as defesas antioxidantes e os componentes de maquinaria de detoxificação de AGEs nos rins de ratos diabéticos

Além dos prejuízos observados na atividade da enzima antioxidante PON 1 no plasma, ratos DIOG apresentaram prejuízos nos sistemas endógenos de detoxificação de EROs e AGEs nos rins, um cenário que pode contribuir para o estabelecimento do estresse glico-oxidativo nesse tecido.

Após 30 dias de experimento, ratos DIOG apresentaram, nos rins, diminuição nas atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT (32% e 50%, respectivamente), quando comparados aos valores encontrados em rins de ratos NIOG (Figura 17A e B). Além disto, ratos DIOG apresentaram diminuição significativa nos níveis renais dos componentes dos sistemas de detoxificação de AGEs, as proteínas AGER-1 (56%) e GLO 1 (58%), em relação aos ratos

NIOG (Figura 18). Por outro lado, ratos DIOG apresentaram um aumento na atividade de GSH-Px em relação aos ratos NIOG (Figura 17C).

O tratamento dos ratos diabéticos com 4U/dia de insulina reestabeleceu as atividades das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) e os níveis de biomarcadores de detoxificação dos AGEs nos rins (AGER-1 e GLO 1), cujos valores foram semelhantes aos encontrados em animais NIOG.

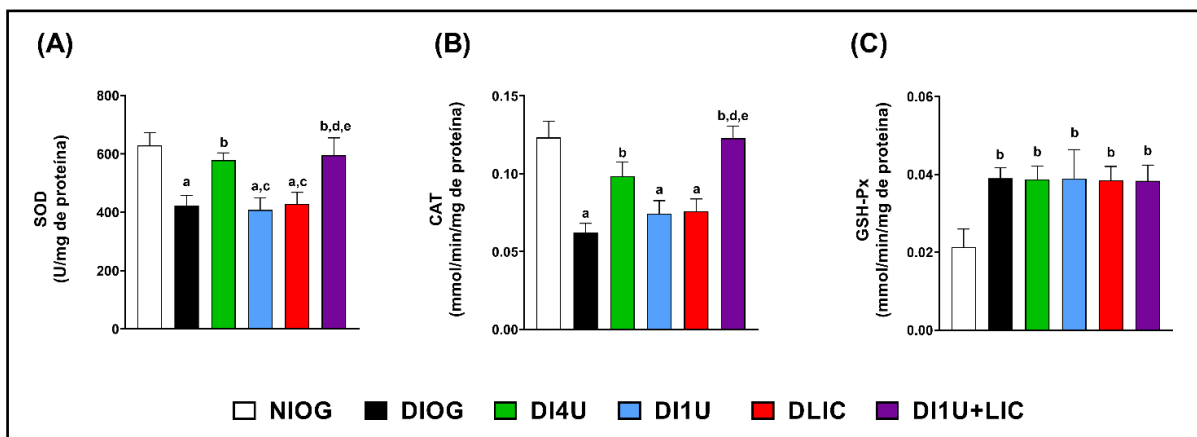


Figura 17. Enzimas antioxidantes nos rins de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno (45 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias. Atividades de SOD (A), CAT (B) e GSH-Px (C) no rim. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DLIC.

Os tratamentos com insulina 1U/dia ou com licopeno, isoladamente, não foram efetivos em aumentar as atividades das enzimas antioxidantes SOD (figura 17A) e CAT (figura 17B) nos rins de ratos diabéticos. Também foi observado que os níveis proteicos de AGER-1 em rins de ratos DI1U e DLIC foram menores do que aqueles encontrados em ratos NIOG, no entanto eles foram maiores que os níveis observados em ratos DIOG (figura 18 A e B). Os tratamentos com insulina 1U/dia ou com licopeno, isoladamente, promoveram um aumento nos níveis proteicos de GLO 1 de forma semelhante ao efeito do tratamento com insulina 4U/dia (Figura 18C).

Interessantemente, todos os grupos constituídos de ratos diabéticos (DI4U, DI1U, DLIC e DI1U+LIC) apresentaram um aumento na atividade de GSH-Px em relação aos valores encontrados em ratos não diabéticos (Figura 17C).

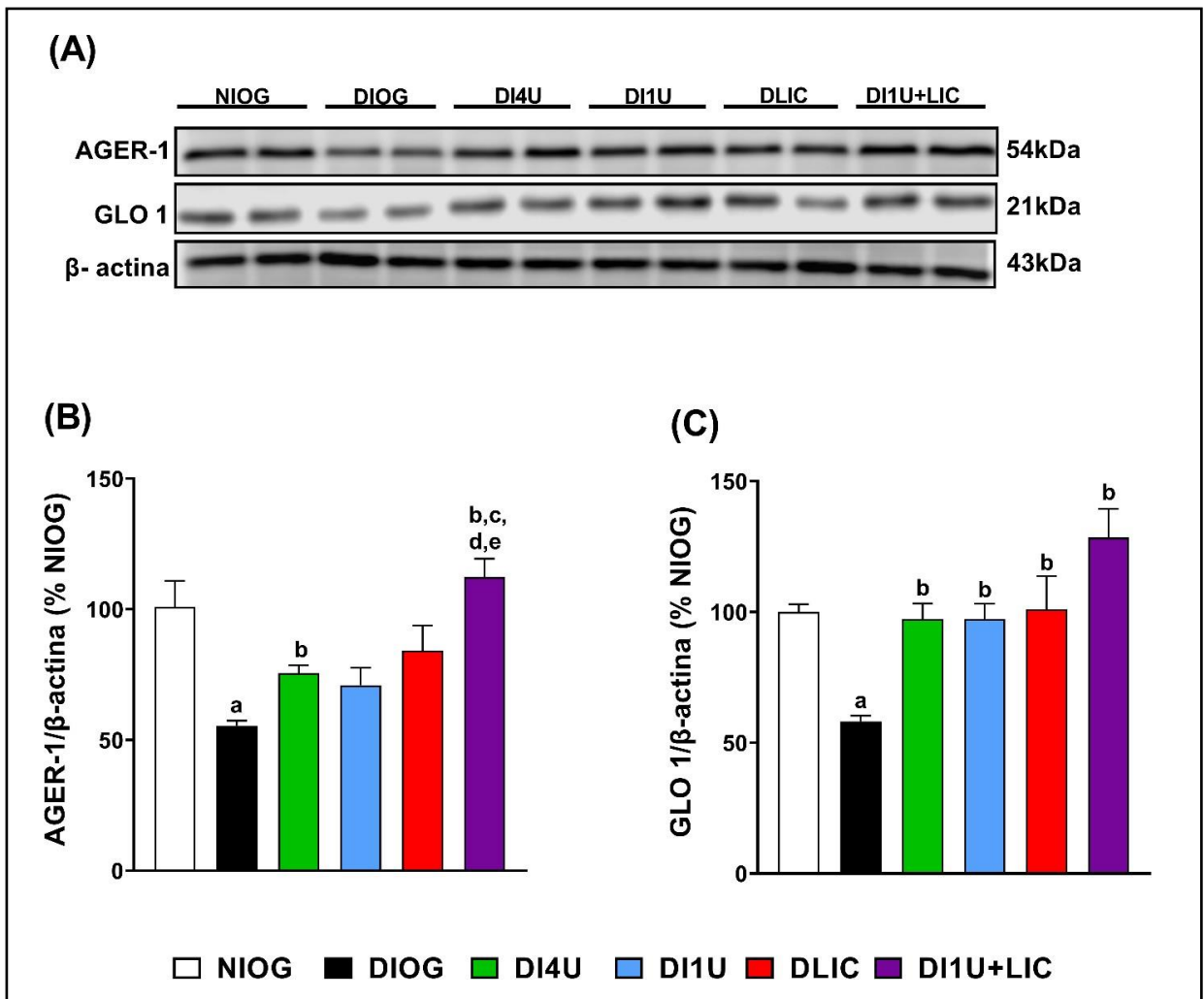


Figura 18. Componentes pertencentes aos sistemas de detoxificação dos AGEs nos rins de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno (45 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias. Linhas representativas dos níveis proteicos de AGER-1, GLO 1 e β-actina detectados via Western Blotting (A); análise densitométrica dos resultados provenientes da análise via Western Blotting de AGER-1 (B) e GLO 1 (C). Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). n = 4. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DLIC.

A terapia combinada “insulina 1U/dia + licopeno” se mostrou efetiva em relação à promoção de melhorias nas atividades das enzimas antioxidantes e nos níveis de componentes dos sistemas de detoxificação dos AGEs em rins de ratos diabéticos: (i) promoveu um aumento significativo nas atividades de SOD (41%, figura 17A) e CAT (97%, figura 17B) em relação aos ratos DIOG e em relação aos ratos tratados com insulina 1U/dia ou com licopeno, sozinhos; (ii) promoveu um maior aumento nos níveis proteicos de AGER-1 nos rins, em relação aos tratamentos com insulina 1U/dia ou com licopeno, sozinhos (figura 17B); (iii) promoveu um aumento dos níveis proteicos de GLO 1 nos rins, em relação aos ratos DIOG, porém este efeito se deu na mesma magnitude daquelas dos tratamentos isolados (figura 18C).

Em conjunto, as ações promovidas pelo tratamento de ratos diabéticos com “insulina 1U/dia + licopeno” evidenciam o potencial benéfico dessa terapia combinada, em relação ao acionamento dos sistemas endógenos de detoxificação de EROs e AGEs nos rins de ratos diabéticos, o que pode ser importante no combate ao estresse glico-oxidativo no DM.

5.7 A terapia combinada 1U/dia de insulina + licopeno (45mg/kg) mitigou o estresse glico-oxidativo nos rins dos ratos diabéticos

Em concordância com o aumento nos níveis de TBARS no plasma, ratos DIOG apresentaram um aumento significativo nos níveis de TBARS nos rins (48%, figura 19A), após 30 dias de experimento, quando comparados aos valores encontrados em rins de ratos NIOG. O desequilíbrio entre os aumentos na produção das EROs, ERNs e nos produtos oriundos de processos glicativos, em conjunto com uma diminuição nas defesas antioxidantes e nos componentes com atividade antiglicação, contribuem para a instalação do estresse glico-oxidativo no rim no DM.

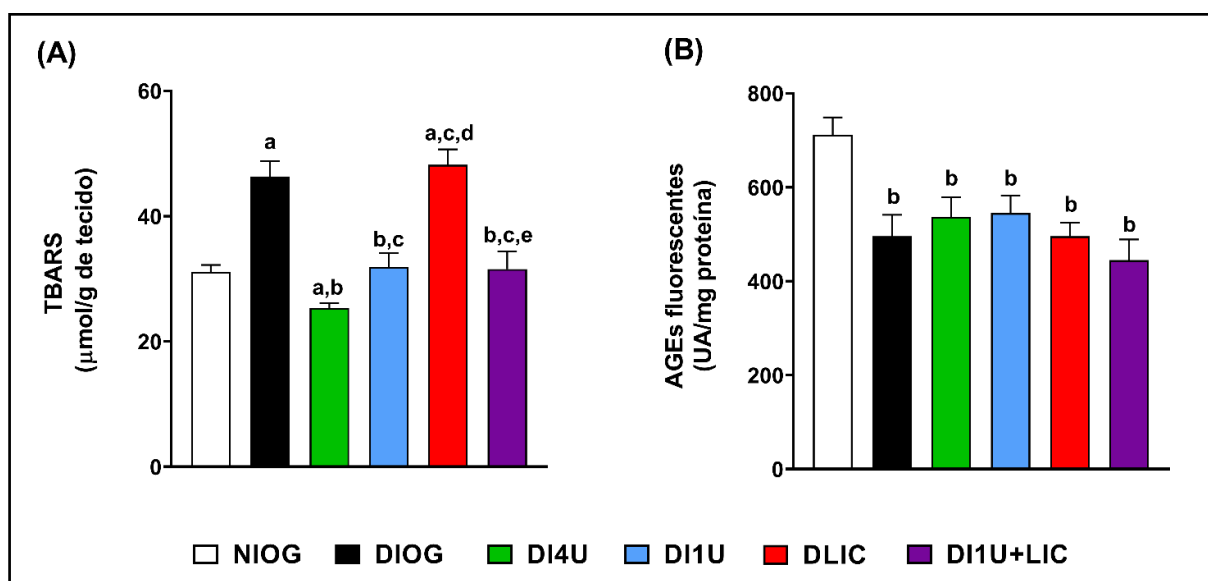


Figura 19. Biomarcadores de estresse glico-oxidativo nos rins de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e licopeno (45 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias. Níveis de TBARS (A) e AGEs fluorescentes (B) no rim. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DLIC.

Os tratamentos de ratos diabéticos com insulina nas duas doses estudadas (4U/dia e 1U/dia) reduziram os níveis de TBARS nos rins (46% e 31%, respectivamente) quando

comparados aos valores de ratos DIOG (Figura 19A). Não foi observada redução nos níveis de TBARS em rins de ratos diabéticos tratados com licopeno.

Ratos DI1U + LIC apresentaram uma redução de 32% nos níveis renais de TBARS (figura 19A), alcançando níveis semelhantes aos encontrados em animais DI1U, o que indica prevalência dos efeitos da insulina no combate à lipoperoxidação nos rins de ratos diabéticos.

Em relação aos níveis de AGEs fluorescentes nos rins, é interessante notar que todos os grupos constituídos por ratos diabéticos, tratados ou não tratados (DIOG, DI4U, DI1U e DI1U + LIC), apresentaram uma diminuição dos níveis de AGEs fluorescentes nos rins, em comparação aos ratos NIOG, após 30 dias de tratamento (Figura 19B).

Capítulo 2

5.8 A terapia combinada 1U/dia de insulina + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg) aumentou o ganho de massa corporal, mas não atenuou a polifagia, polidipsia e a poliúria em ratos diabéticos

Tal como observado em relação aos achados no Capítulo 1, após 3 dias da administração de STZ, ratos diabéticos que receberam iogurte (DIOG) apresentaram uma diminuição nos valores de massa corporal e, conseqüentemente, o ganho total de massa corporal foi menor em animais DIOG, do que aquele observado nos animais normais, não diabéticos (NIOG; Figura 20C e D). Corroborando estes achados, ratos DIOG também apresentaram uma diminuição nas massas de músculos esqueléticos e de tecidos adiposos (Tabela 3). Alterações fisiológicas clássicas do modelo experimental de DM tipo 1 (polifagia, polidipsia e poliúria) também foram observados nestes animais (Figura 21). Vale destacar que todos os grupos experimentais de ratos diabéticos apresentaram um aumento da ingestão alimentar, hídrica e volume urinário, após 3 dias da administração da STZ, quando comparados aos ratos não diabéticos (Figuras 21 A, C e E).

Em contrapartida, ratos diabéticos tratados com 4U/dia de insulina apresentaram melhorias significativas em todas as alterações fisiológicas relacionadas ao DM tipo 1, sendo observada uma diminuição nos valores relacionados à ingestão hídrica e alimentar e volume urinário (Figura 21) bem como a prevenção na perda de massas de tecidos musculares esqueléticos e adiposos (Tabela 3), o que justifica, pelo menos em parte, o aumento da massa corporal observado nestes animais (Figura 20C e D).

O tratamento de ratos diabéticos com uma menor dose de insulina (DI1U) promoveu um aumento nos valores de massa corporal, após 30 dias de tratamento, quando comparado aos ratos DIOG. No entanto, o ganho total de massa corporal nos animais DI1U foi menor do que aquele observado nos animais DI4U (Figura 20C e D). Os aumentos nas massas de músculos esqueléticos e de tecidos adiposos brancos (Tabela 3) observados nos ratos DI1U contribuíram para a maior massa corporal nestes animais. Ratos DI1U apresentaram reduções nos parâmetros de ingestão alimentar, hídrica e volume urinário em relação aos ratos DIOG, após 30 dias de tratamento (Figura 21). Vale a pena destacar que os efeitos promovidos pela insulina 1U/dia foram menos efetivos do que os observados com a insulina 4U/dia, nos parâmetros fisiológicos supracitados (Figura 21).

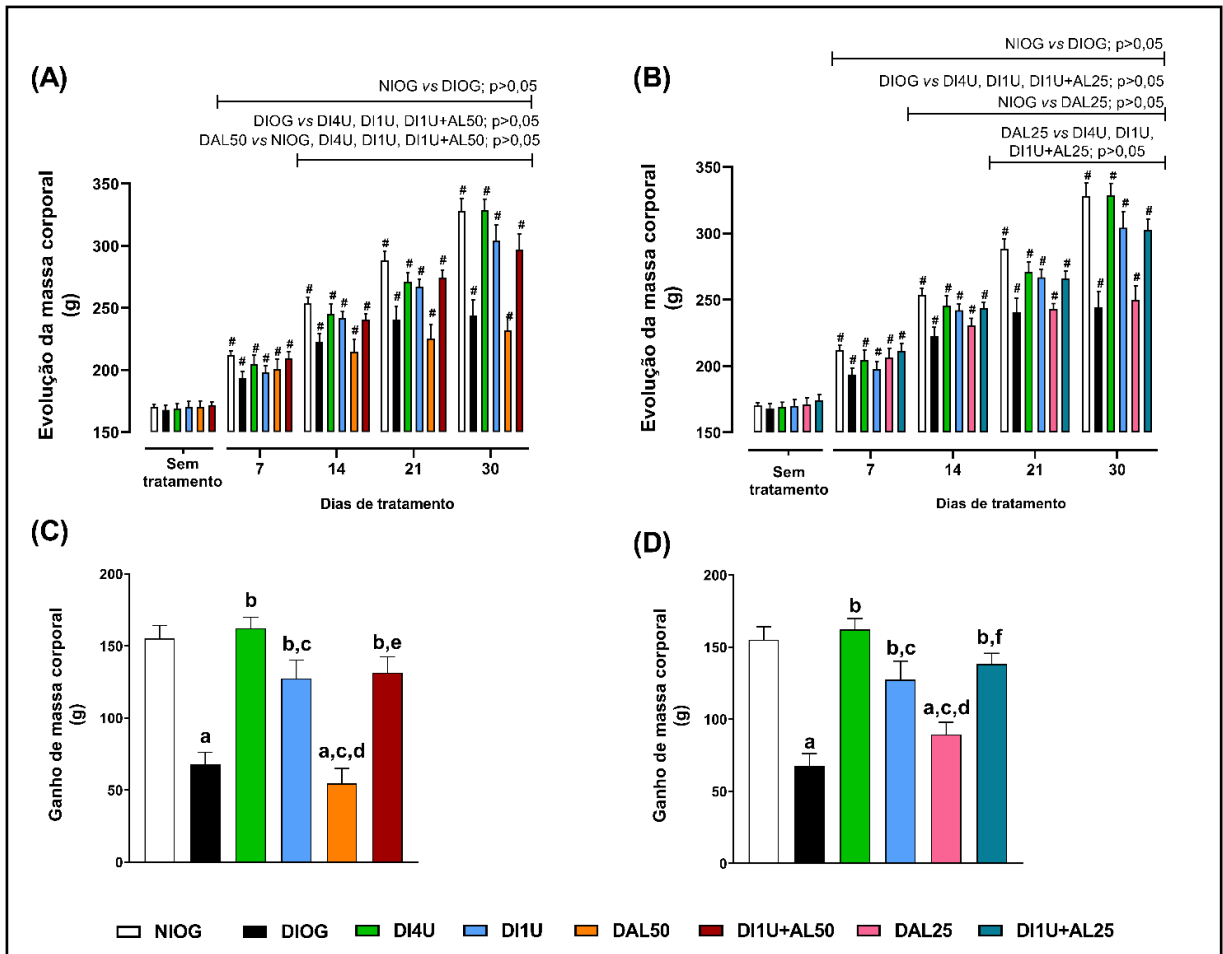


Figura 20. Evolução da massa corporal e ganho total de massa corporal de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, após 30 dias de tratamento. Evolução da massa corporal de ratos tratados com insulina 1U e/ou 50 mg/kg de ácido alfa lipoico (A); evolução da massa corporal de ratos tratados com insulina 1U e/ou 25 mg/kg de ácido alfa lipoico (B); ganho total de massa corporal de ratos tratados com insulina 1U e/ou 50 mg/kg de ácido alfa lipoico (C) e ganho total de massa corporal de ratos tratados com insulina 1U e/ou 25 mg/kg de ácido alfa lipoico (D). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DAL50; f, diferenças com DAL25 e #, diferença com o dia 0.

Ratos diabéticos tratados com ácido alfa lipoico em iogurte, isoladamente e nas duas doses estudadas (50 mg/kg ou 25 mg/kg), não tiveram melhorias significativas no ganho de massa corporal (Figura 20), o que foi corroborado pelas menores massas de músculos esqueléticos e de tecidos adiposos (Tabela 3). No entanto, foi observado que ratos DAL50 apresentaram reduções nos parâmetros de ingestão alimentar, hídrica e volume urinário quando comparado aos ratos diabéticos DIOG, após 30 dias de tratamento (Figura 21). Por outro lado, não foram observadas diferenças estatísticas nos parâmetros de ingestão alimentar, hídrica e volume urinário em ratos DAL25 e DIOG (Figura 21).

Os ratos diabéticos tratados com as terapias combinadas de 1U/dia de insulina + ácido alfa lipoico (DI1U+AL50 ou DI1U+AL25) apresentaram maiores massas de músculos esqueléticos e de tecidos adiposos (Tabela 3), o que certamente impactou na observação de maiores valores de massa corporal em relação aos ratos DIOG, DI1U, DAL50 e DAL25, após 30 dias de tratamento (Figura 20); assim, observamos que um maior ganho de massa corporal foi observado nestes animais. Em relação aos demais parâmetros fisiológicos, foi observado que ratos DI1U+AL50 apresentaram uma diminuição da ingestão alimentar, hídrica e volume urinário, após 30 dias de tratamento, quando comparados aos ratos DIOG (Figura 21B, D e F).

O tratamento de ratos diabéticos com a associação de insulina 1U/dia + ácido alfa lipoico (25 mg/kg) foi efetivo em prevenir ou atenuar os distúrbios fisiológicos característicos do modelo experimental de DM tipo 1, ou seja, foram observadas diferenças estatísticas entre os ratos DI1U+AL25 e DIOG nos parâmetros ingestão alimentar, ingestão hídrica e volume urinário (Figura 21).

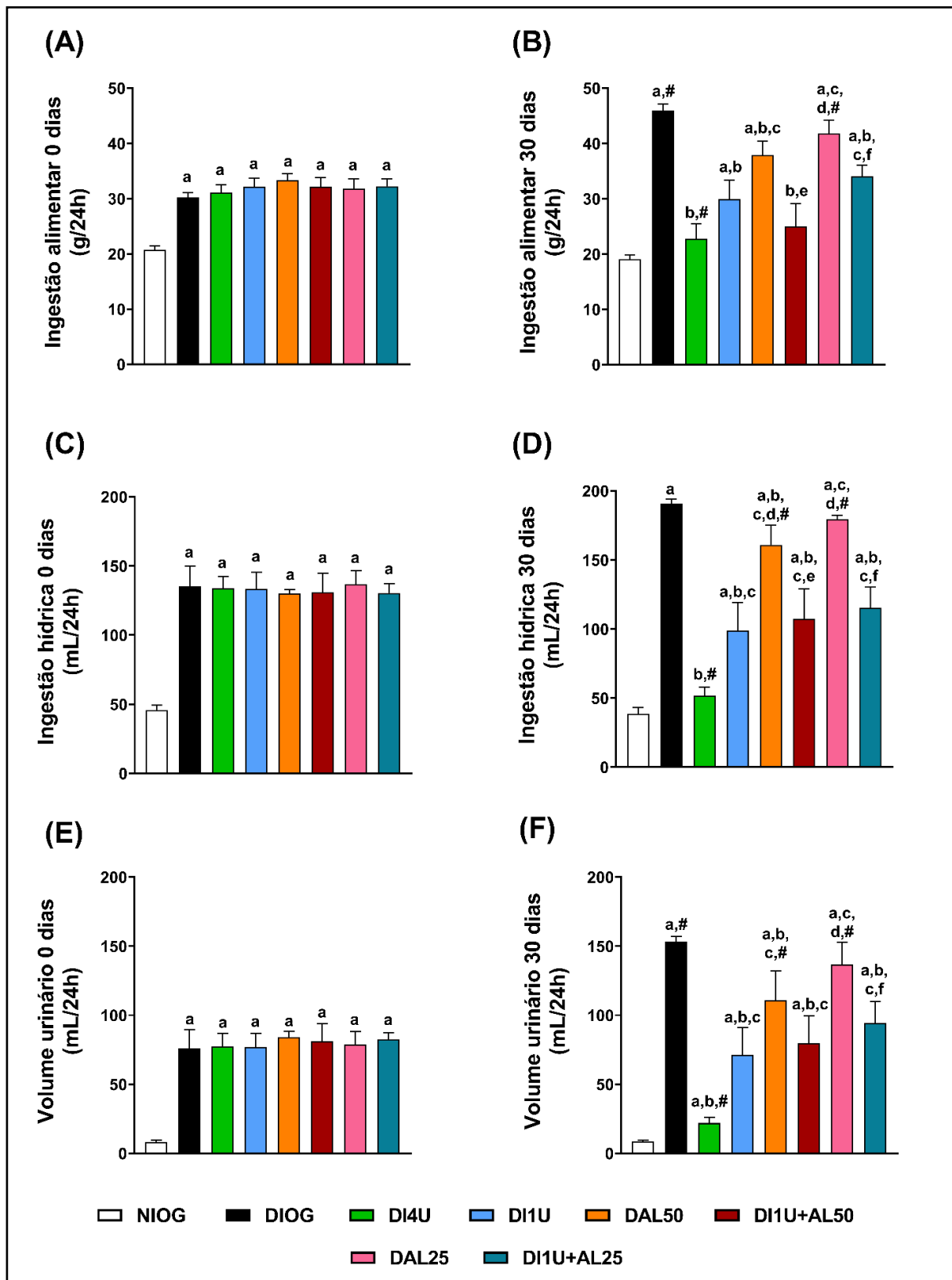


Figura 21. Ingestão alimentar, ingestão hídrica e volume urinário de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, no início (dia 0) e final (dia 30) do experimento. Ingestão alimentar 0 dias (A); ingestão alimentar 30 dias (B); ingestão hídrica 0 dias (C); ingestão hídrica 30 dias (D); volume urinário 0 dias (E) e volume urinário 30 dias (F). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DAL50; f, diferenças com DAL25; #, diferença com o dia 0.

Tabela 3. Massas de músculos esqueléticos (*soleus* e EDL), tecidos adiposos brancos (epididimal e retroperitoneal) e rins de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e/ou ácido alfa lipoico (50 ou 25 mg/kg), após 30 dias de tratamento.

Tecidos	NIOG	DIOG	DI4U	DI1U	DAL50	DI1U+AL50	DAL25	DI1U+AL25
Músculo <i>soleus</i> (g/100 g massa corporal)	0.29 ± 0.01	0.22 ± 0.01 ^a	0.29 ± 0.01 ^b	0.27 ± 0.08 ^b	0.21 ± 0.01 ^{a,c,d}	0.26 ± 0.01 ^{b,e}	0.21 ± 0.01 ^{a,c,d}	0.26 ± 0.01 ^{b,f}
Músculo EDL (g/100 g peso corporal)	0.28 ± 0.01	0.22 ± 0.02 ^a	0.27 ± 0.01 ^b	0.26 ± 0.08 ^b	0.18 ± 0.01 ^{a,c,d}	0.23 ± 0.01 ^{b,e}	0.18 ± 0.01 ^{a,c,d}	0.24 ± 0.01 ^{b,f}
Tecido adiposo epididimal (g/100 g massa corporal)	5.14 ± 0.40	1.39 ± 0.16 ^a	3.88 ± 0.27 ^{a,b}	3.25 ± 0.35 ^{a,b}	1.67 ± 0.23 ^{a,c,d}	2.75 ± 0.42 ^{a,b,e}	1.69 ± 0.18 ^{a,c,d}	3.09 ± 0.34 ^{a,b,f}
Tecido adiposo retroperitoneal (g/100 g massa corporal)	6.06 ± 0.76	0.31 ± 0.21 ^a	2.99 ± 0.33 ^{a,b}	2.70 ± 0.58 ^{a,b}	0.62 ± 0.14 ^{a,c,d}	2.33 ± 0.81 ^{a,b,e}	0.60 ± 0.18 ^{a,c,d}	2.26 ± 0.52 ^{a,b,f}
Rins (g/100 g massa corporal)	2.35 ± 0.08	3.03 ± 0.17 ^a	2.61 ± 0.13 ^b	2.75 ± 0.14 ^b	2.97 ± 0.13 ^a	2.73 ± 0.11 ^b	3.07 ± 0.21 ^a	3.10 ± 0.08 ^a

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). n = 10. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls (p<0,05). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DAL50; f, diferenças com DAL25.

5.9 A terapia combinada 1U/dia de insulina + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg) diminuiu a glicemia pós-prandial de ratos diabéticos

Ratos normais, não diabéticos, que receberam iogurte (NIOG), apresentaram níveis de glicemia pós-prandial em valores considerados normais ($\cong 100$ mg/dL), os quais assim se mantiveram ao longo dos 30 dias de experimento (Figura 22A e B). A efetividade da indução do DM tipo 1 experimental nos ratos foi comprovada, uma vez que todos os grupos experimentais constituídos por ratos diabéticos (DIOG, DI4U, DI1U, DAL50, DI1U + AL50, DAL25, DI1U + AL25) apresentaram valores médios de glicemia de $\cong 400$ mg/dL, três dias após a administração de STZ, este considerado o dia 0 do experimento (Figura 22A e B). Ao longo dos 30 dias de experimento, ratos DIOG apresentaram um aumento progressivo nos níveis glicêmicos (94%), alcançando valores médios de 605 mg/dL ao final dos 30 dias de experimento (Figura 22A e B). Além disto, ratos DIOG apresentaram maiores valores de AUC da glicemia pós-prandial (Figura 22C e D) quando comparados aos valores de ratos NIOG.

O tratamento de ratos diabéticos com 4U/dia de insulina foi efetivo na promoção de diminuição nos valores de glicemia pós-prandial, em todos os tempos estudados (Figura 22A e B). Após 30 dias de tratamento, ratos DI4U apresentaram diminuições na glicemia pós-prandial (93%, figura 22A e B) e na AUC da glicemia pós-prandial (78%; figura 22A e B), quando comparados aos valores de ratos DIOG. Vale a pena aqui destacar que os níveis glicêmicos nos ratos DI4U foram significativamente menores do que aqueles observados nos ratos NIOG (Figura 22A e B), o que pode deixar estes animais mais susceptíveis a um quadro de hipoglicemia em longo prazo, apesar de este fato não ter sido observado em termo de valores de AUC da glicemia pós-prandial (Figura 22B e C).

Ratos diabéticos tratados com 1U/dia de insulina também apresentaram uma diminuição da glicemia pós-prandial em todos os tempos estudados (dia 30), esta diminuição foi de 63% em relação aos valores de glicemia de ratos DIOG (Figura 22A e B). Também foi observada uma diminuição na AUC da glicemia pós-prandial (50%, figura 22B e C) nos animais DI1U, em relação aos ratos DIOG. No entanto, é válido ressaltar que o tratamento com 1U/dia de insulina foi menos eficaz no alcance do controle glicêmico de ratos diabéticos, uma vez que promoveu uma menor diminuição da glicemia em comparação ao tratamento com 4U/dia de insulina.

Ratos diabéticos tratados com ácido alfa lipoico na dose de 50 mg/kg apresentaram diminuição da glicemia pós-prandial, a partir do 10º dia de tratamento; houve redução de 31% em relação aos valores de glicemia observados em ratos DIOG (Figuras 22A e B) No entanto, é válido ressaltar que não foram observadas diferenças estatísticas entre os valores de glicemia pós-prandial no final e no início do experimento, nesse grupo (Figura 22A). O mesmo perfil foi observado na AUC da glicemia

pós-prandial, ou seja, a redução da glicemia em ratos DAL50 foi menor do que àquelas observadas em ratos DI4U e DI1U (Figura 22C).

Os melhores resultados foram observados com a terapia combinada de insulina 1U/dia + 50 mg/kg de ácido alfa lipoico; houve redução significativa da glicemia (a partir do 10º dia de tratamento), de aproximadamente 77%, em relação aos ratos DIOG (Figura 22A). É válido ressaltar que os valores de glicemia encontrados nos ratos DI1U+AL50 foram semelhantes aos valores obtidos nos ratos NIOG e inferiores aos obtidos nos grupos com os tratamentos isolados (insulina 1U/dia ou 50 mg/kg de ácido alfa lipoico). O mesmo perfil foi observado na AUC da glicemia pós-prandial de animais DI1U+AL50, ou seja, houve uma redução de 63% na glicemia, quando comparados aos ratos DIOG (Figura 22C).

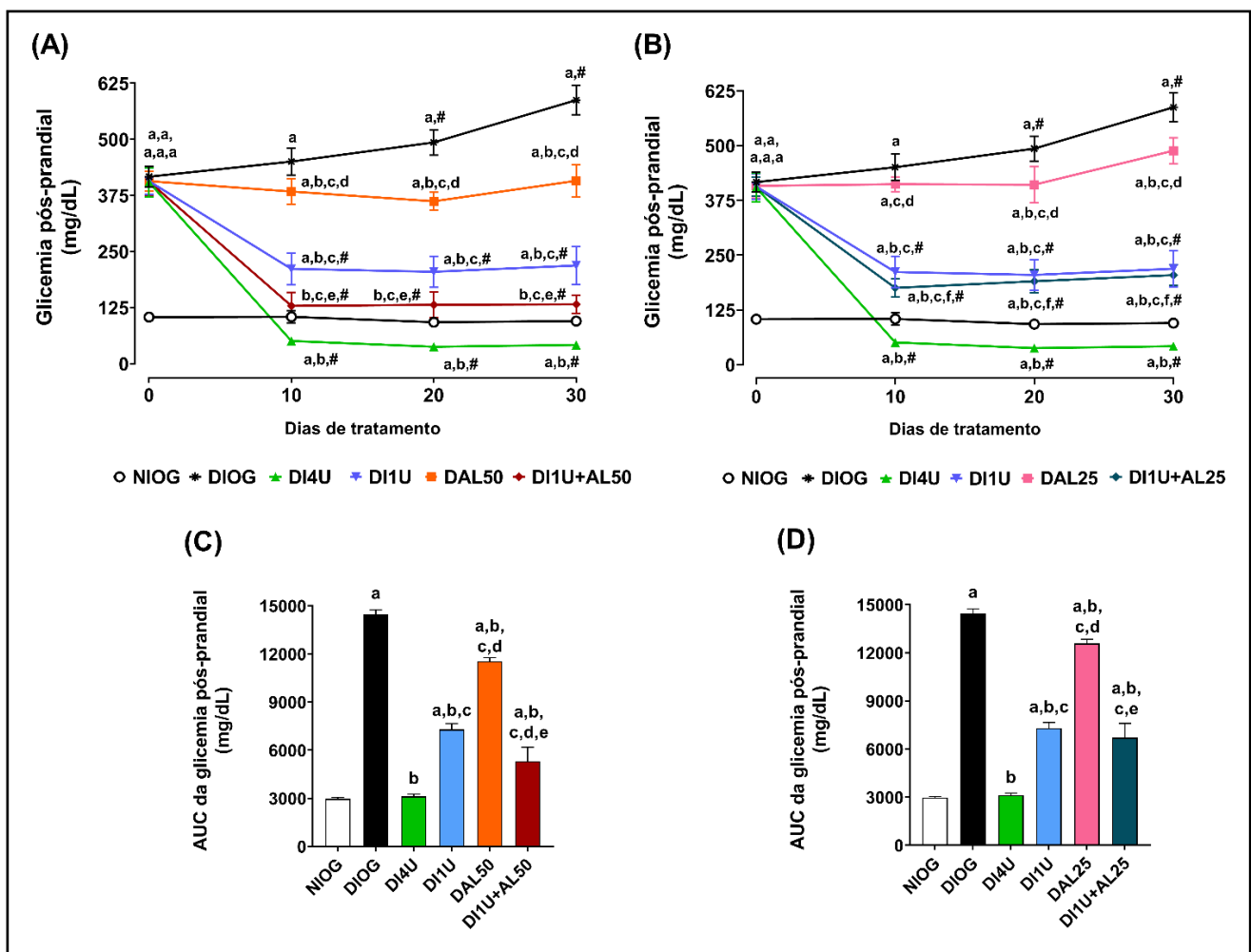


Figura 22. Valores temporais de glicemia pós-prandial e glicemia de jejum após 30 dias de experimento de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação. Respostas temporais da glicemia pós-prandial (A), área sob a curva da glicemia pós-prandial (B), glicemia de jejum (C). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DAL50; f, diferenças com DAL25.

O tratamento de ratos diabéticos com ácido alfa lipoico na dose de 25 mg/kg, sozinho, promoveu uma diminuição da glicemia pós-prandial, a partir do 20º dia de tratamento, de 17% em relação aos valores de glicemia observados em ratos DIOG (Figura 22B). No entanto, tal como observado no tratamento com ácido alfa lipoico na maior dose (50 mg/kg), os valores de glicemia de animais DAL25, no final do experimento, foram semelhantes aos observados no início do período experimental (Figura 22B). O mesmo perfil foi observado na AUC da glicemia pós-prandial, ou seja, a diminuição da glicemia em ratos DAL25 foi menor do que aquela observada em ratos DI4U e DI1U (Figura 22D).

Foram observadas maiores diminuições nos níveis da glicemia com a terapia combinada insulina 1U/dia + 25 mg/kg de ácido alfa lipoico, a partir do 10º dia de tratamento, a qual foi aproximadamente 65% menor em relação aos ratos DIOG (Figura 22B). É válido ressaltar que os valores de glicemia encontrados nos ratos DI1U+AL25 foram semelhantes aos valores obtidos nos ratos NIOG e DI1U e inferiores aos obtidos com o tratamento isolado com 25 mg/kg de ácido alfa lipoico. O mesmo perfil foi observado na AUC da glicemia pós-prandial destes animais, ou seja, houve uma redução de 54% na glicemia, quando comparados aos ratos DIOG (Figura 22D).

5.10 A terapia combinada 1U/dia de insulina + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg) diminuiu marcadores do estresse glico-oxidativo e aumentou as defesas antioxidantes no sangue de ratos diabéticos

Após 30 dias de experimento, ratos DIOG apresentaram um aumento nos níveis de HbA1c (56%, figura 23A) e de frutossamina (87%; figura 23B) em relação aos valores encontrados em ratos do grupo NIOG. Adicionalmente, maiores níveis plasmáticos de TBARS e de AGEs fluorescentes (65% e 56%, respectivamente) e menores atividades de PON 1 no plasma (28%) foram observados nos ratos DIOG quando comparados aos animais NIOG (Figura 23C, D e E).

O tratamento de ratos diabéticos com insulina 4U/dia promoveu diminuição de todos os marcadores de estresse glico-oxidativo e aumentou a atividade de PON 1 no plasma (Figura 23).

Ratos DI1U apresentaram diminuições nos níveis de HbA1c, frutossamina, TBARS e AGEs fluorescentes (27%, 34%, 33% e 55%, respectivamente) e aumento na atividade de PON 1 (26%) em relação aos valores encontrados em animais DIOG (Figura 23). No entanto, foi observado que a diminuição nos níveis de HbA1c, frutossamina e TBARS promovida pelo tratamento com insulina 1U/dia foi menor do que o efeito do tratamento com insulina 4U/dia, ou seja, o tratamento com 1U/dia de insulina foi menos efetivo no combate aos eventos glico-oxidativos associados ao DM.

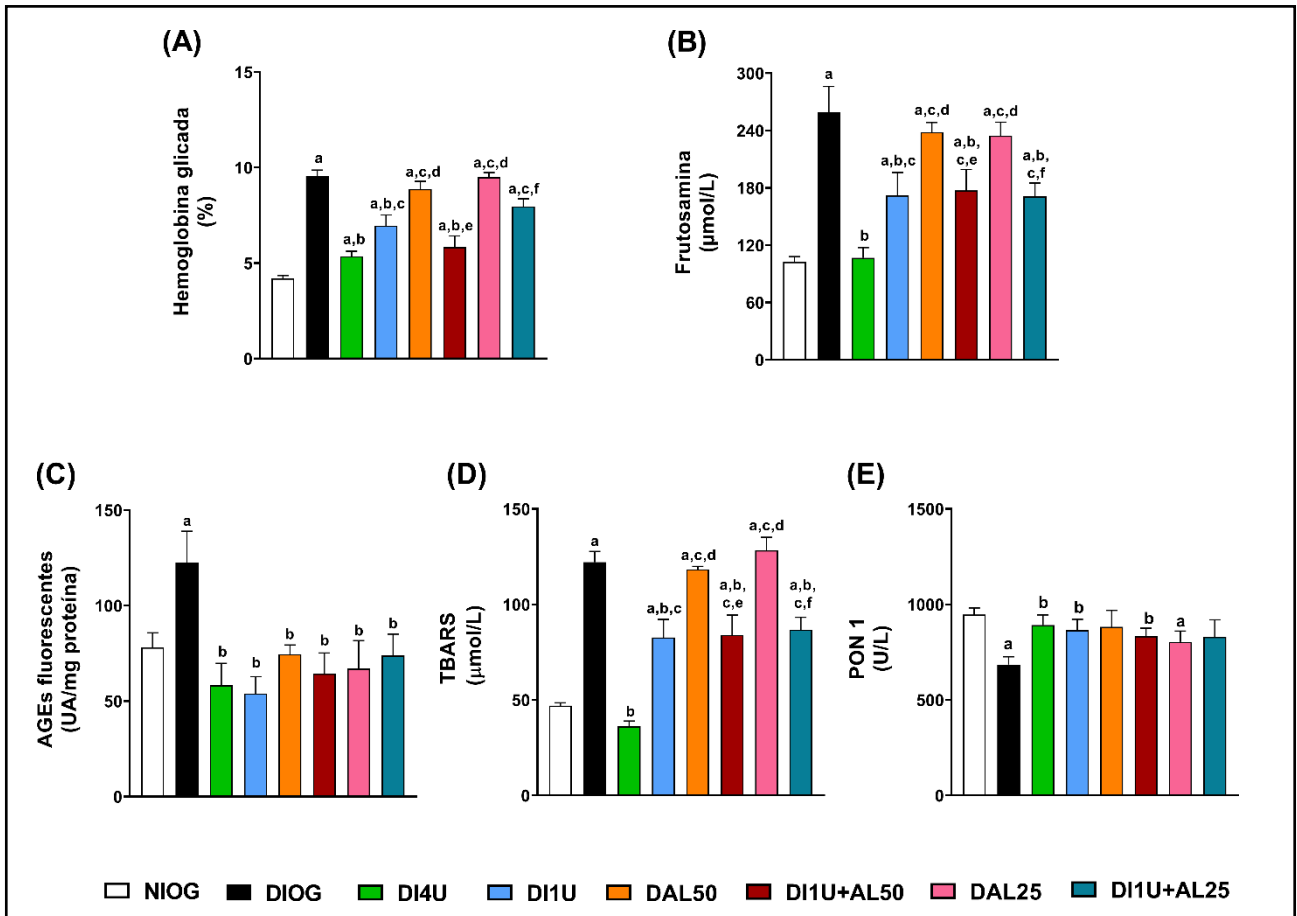


Figura 23. Biomarcadores de estresse glico-oxidativo no sangue de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias. Níveis sanguíneos de HbA1c (A), níveis plasmáticos de frutamina (B), AGEs fluorescentes (C) e TBARS (D), e atividade de PON 1 (E) no plasma. Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). n = 10. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls (p<0,05). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DAL50; f, diferenças com DAL25.

O tratamento de ratos diabéticos com ácido alfa lipoico (50 mg/kg), isoladamente, não foi efetivo na redução dos níveis de HbA1c, frutamina e TBARS, quando comparado aos ratos diabéticos que receberam apenas o iogurte, DIOG, porém o tratamento foi efetivo na redução dos níveis de AGEs fluorescentes no plasma (39%, figura 23).

O tratamento de ratos diabéticos com insulina 1U + ácido alfa lipoico (50 mg/kg) promoveu diminuições significativas nos níveis de HbA1c, frutamina, TBARS e AGEs fluorescentes (39%, 32%, 31%, 48%, respectivamente), bem como aumento na atividade de PON 1 (21%), em relação aos ratos DIOG (Figura 23). Contudo, as diminuições promovidas pelo tratamento com a terapia combinada insulina 1U/dia + ácido alfa lipoico (50 mg/kg) foram semelhantes àquelas promovidas pelo tratamento apenas com insulina 1U/dia, ou seja, representam a manutenção das ações da insulina 1U/dia.

Ratos diabéticos tratados somente com ácido alfa lipoico (25 mg/kg) apresentaram apenas diminuição nos níveis de AGEs fluorescentes (45%) em relação aos ratos DIOG, não apresentando efeitos sobre os outros marcadores analisados (Figura 23).

Ratos DI1U + AL25 apresentaram diminuições nos níveis de frutossamina, TBARS e AGEs fluorescentes (34%, 30% e 40%, respectivamente) quando comparados aos ratos DIOG (Figura 23B, C e D). Vale destacar que as melhorias observadas nos biomarcadores de lesão glico-oxidativa em ratos DI1U + AL25 foram semelhantes às aquelas conquistadas em ratos DI1U, isto é, tratados somente com 1U/dia de insulina (Figura 23), indicando que a terapia combinada preservou o efeito benéfico da insulina.

5.11 A terapia combinada 1U/dia de insulina + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg) atenuou a dislipidemia nos ratos diabéticos

Após 30 dias de experimento, ratos DIOG apresentaram aumentos nos níveis plasmáticos de triglicerídeos (210%; figura 24A) e de colesterol total (35%; figura 24B), em relação aos ratos do grupo NIOG, caracterizando um quadro de dislipidemia no DM. Ambos os tratamentos com insulina (4U/dia e 1U/dia) foram eficazes na redução dos níveis de triglicerídeos e de colesterol total. Porém, a redução nos níveis de triglicerídeos promovida pelo tratamento com insulina 1U/dia foi menor do que aquela observada com o tratamento com insulina 4U/dia (Figura 24A).

O tratamento de ratos diabéticos com ácido alfa lipoico na dose de 50 mg/kg, isoladamente, não foi efetivo na promoção de redução nos níveis de colesterol total e de triglicerídeos no plasma, quando comparados aos valores obtidos em ratos DIOG, ou seja, não foi efetivo no combate à dislipidemia no DM (Figura 24A e B). A terapia combinada de insulina 1U/dia + 50 mg/kg de ácido alfa lipoico promoveu uma diminuição apenas nos níveis de triglicerídeos (34%, figura 24A).

Não foram observadas diferenças entre os grupos DAL25 e DIOG em relação aos níveis de triglicerídeos e de colesterol total (Figura 24A e B). O tratamento de ratos diabéticos com a terapia combinada de insulina 1U/dia + 25 mg/kg de ácido alfa lipoico promoveu uma redução nos níveis de triglicerídeos (39%) em relação aos ratos diabéticos DIOG (figura 24A), sendo esta redução semelhante à observada nos ratos DI1U. Em relação aos níveis de colesterol total, foi observado que ratos DI1U + AL25 apresentaram uma redução nos níveis plasmáticos de colesterol total (21%), quando comparados aos ratos DIOG (Figura 24B). Vale a pena destacar que a diminuição promovida pela terapia combinada de insulina 1U/dia + 25 mg/kg de ácido alfa lipoico nos níveis de colesterol foi maior do que aquela promovida pelo ácido alfa lipoico administrado isoladamente, e reproduziu os valores observados em ratos DI1U (Figura 24B).

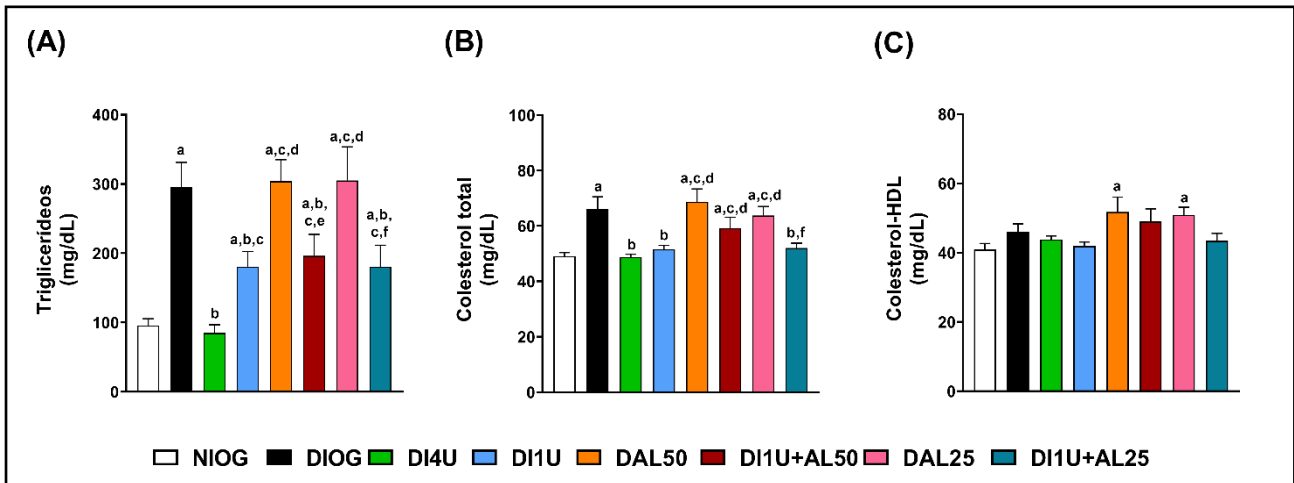


Figura 24. Perfil lipídico de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias. Níveis de triglicerídeos (A), colesterol total (B) e colesterol-HDL (C) no plasma. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DAL50; f, diferenças com DAL25.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos DIOG, DI4U, DI1U, DI1U + AL50, DI1U + AL25 em relação aos níveis plasmáticos de colesterol-HDL (figura 24C), quando comparados aos resultados encontrados em animais não diabéticos (NIOG). No entanto, interessante, foi observado que ratos diabéticos tratados somente com ácido alfa lipoico, em ambas as doses (grupos DAL50 ou DAL25) apresentaram um aumento significativo nos níveis de colesterol-HDL, quando comparados aos ratos NIOG (Figura 24C).

5.12 A terapia combinada 1U/dia de insulina + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg) diminuiu biomarcadores de injúria renal e de função renal no plasma e na urina de ratos diabéticos

Assim como no experimento 1, e com o objetivo de avaliar a função renal e a injúria renal em ratos diabéticos, os níveis de creatinina e ácido úrico no plasma, bem como a excreção urinária de proteínas foram analisados. Ratos DIOG apresentaram aumentos significativos nos níveis plasmáticos de creatinina (24%, figura 25C) e ácido úrico (58%, figura 25D) e na excreção de albumina na urina (170%, figura 25A e B), o que sugere disfunção renal e injúria renal nestes animais. Ambos os tratamentos com insulina (4U/dia e 1U/dia) foram capazes de diminuir os níveis plasmáticos de creatinina, ácido úrico e a excreção de albumina na urina.

O tratamento de ratos diabéticos com ácido lipoico na maior dose (50 mg/kg) mitigou a injúria renal (20%, figuras 25A e B), uma vez que diminuiu a excreção de albumina na urina. No entanto, foi observada uma melhor resposta com a associação de insulina 1U/dia + AL50 (50%, figura 25A e

B) na excreção de albumina na urina em relação aos ratos DIOG, uma vez que reduziu a excreção de albumina na urina de 24 horas.

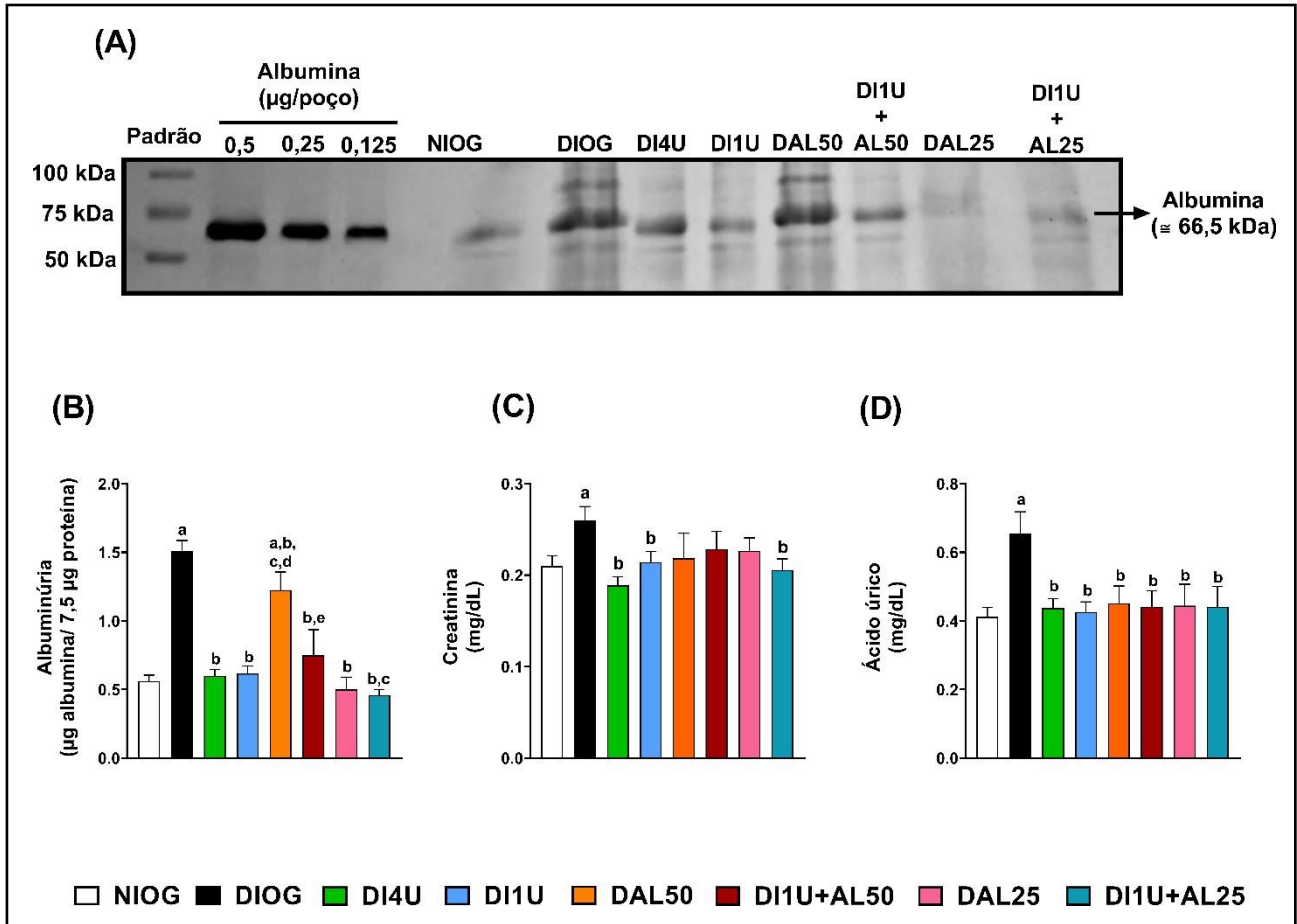


Figura 25. Marcadores de função renal (creatinina e ácido úrico no plasma) e injúria renal (albumina na urina) de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias. Imagem representativa da separação eletroforética de proteínas de amostras de urina, evidenciando a albumina (A), albuminúria em µg por 7,5 µg de proteína (B), níveis de creatinina no plasma (C), níveis de ácido úrico no plasma (D). Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). n = 10 (níveis de ácido úrico) e n = 4 (albuminúria SDS-PAGE). As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DAL50.

No entanto, ratos diabéticos tratados com ácido lipoico na menor dose (25 mg/kg) apresentaram uma redução na excreção de albumina na urina de 67% em relação aos ratos DIOG (Figura 25A e B). O mesmo perfil foi observado em ratos diabéticos tratados com insulina 1U/dia + AL25, ou seja, houve uma diminuição significativa na excreção de albumina na urina (70%, figura 25A e B) em comparação aos ratos DIOG. Vale destacar que a diminuição na excreção de albumina na urina observada nos ratos DI1U/dia + AL25 foi maior do que àquela promovida pelo tratamento com insulina 4U/dia, considerado o “padrão ouro” para este modelo experimental. Ratos DI1U/dia + AL25 também apresentaram reduções nos níveis de creatinina, um importante marcador de função renal, quando comparado com os ratos DIOG, após 30 dias de tratamento (Figura 25C).

Todas as intervenções realizadas em animais diabéticos no presente estudo (DI4U, DI1U, DAL50, DI1U/AL50, DAL25 e DI1U+AL25) promoveram diminuições dos níveis de ácido úrico no plasma, em relação aos ratos diabéticos DIOG (Figura 25C).

5.13 A terapia combinada 1U/dia de insulina + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg) aumentou as defesas antioxidantes e os componentes de maquinaria de detoxificação de AGEs nos rins de ratos diabéticos

Após 30 dias de experimento, ratos DIOG apresentaram, nos rins, uma diminuição nas atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT (29% e 50%, respectivamente) quando comparados aos valores encontrados em rins de ratos NIOG (Figura 26A e B). Ratos DIOG também apresentaram diminuição significativa nos níveis dos componentes que pertencem aos sistemas de detoxificação de AGEs, as proteínas AGER-1 (59%) e GLO 1 (71%), em relação aos ratos NIOG (Figura 27B e C).

O tratamento dos ratos diabéticos com 4U/dia de insulina reestabeleceu as atividades das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GSH-Px) e os níveis de biomarcadores de detoxificação dos AGEs nos rins (AGER-1 e GLO 1), cujos valores foram semelhantes aos encontrados em animais NIOG, exceto na atividade de CAT, a qual foi menor em ratos DI4U, em relação aos ratos NIOG (Figura 26B).

O tratamento com insulina 1U/dia, isoladamente, não foi efetivo em aumentar a atividade da enzima SOD (figura 26A), bem como os níveis proteicos de AGER-1 (Figura 27B) nos rins de ratos diabéticos. No entanto, ratos DI1U apresentaram um aumento da atividade de SOD (41%, figura 26A) e um discreto aumento nos níveis proteicos de GLO 1 (31%, figura 27C) em relação aos valores encontrados em rins de ratos DIOG.

Ratos tratados com 50 mg/kg de ácido alfa lipoico, isoladamente, apresentaram, nos rins, um aumento nas atividades das enzimas antioxidantes SOD (44%) e CAT (50%) em relação aos ratos DIOG (Figura 26A e B), sendo o aumento na atividade de SOD maior do que aquele promovido pelo tratamento com insulina 1U/dia.

Os benefícios promovidos pela terapia combinada “insulina 1U/dia + AL50” foram mais evidentes: houve, nos rins, aumentos nas atividades de SOD (45%, figura 26A) e de CAT (53%, figura 26B) bem como um aumento nos níveis proteicos de AGER 1 (34%, figura 27B) em relação aos valores encontrados em ratos DIOG. Destaca-se que o aumento na atividade de SOD promovido pelo tratamento com a associação entre insulina 1U/dia + 50 mg/kg de ácido alfa lipoico foi maior do que o efeito observado no tratamento com insulina 1U/dia (Figura 26A).

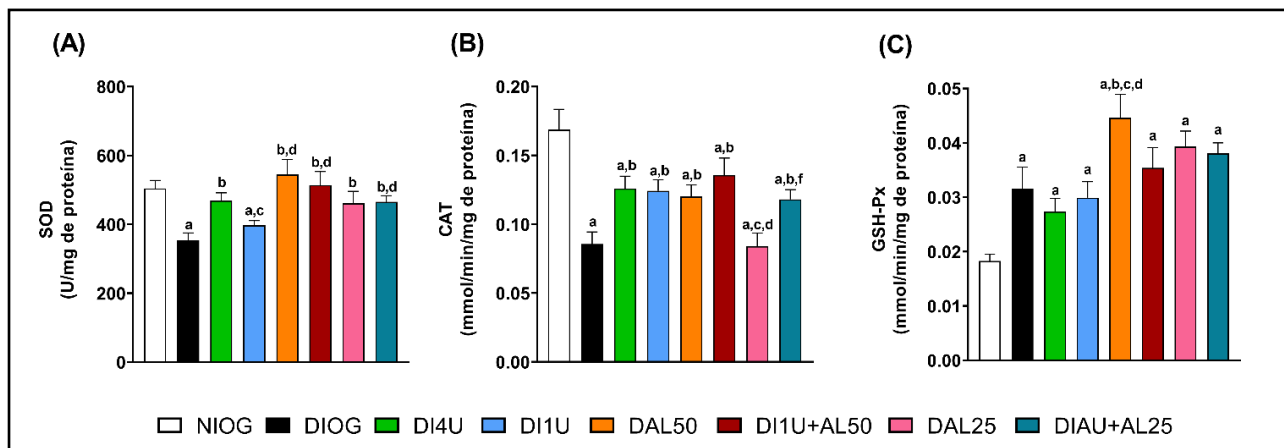


Figura 26. Enzimas antioxidantes nos rins de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias. Atividades de SOD (A), CAT (B) e GSH-Px (C) no rim. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DAL50; f, diferenças com DAL25.

Ratos diabéticos tratados com 25 mg/kg de ácido alfa lipoico, isoladamente, apresentaram um aumento na atividade de SOD nos rins (31%, figura 26A) em relação aos ratos diabéticos DIOG. O tratamento com a terapia combinada “insulina 1U/dia + AL25” promoveu, nos rins de ratos diabéticos, aumentos nas atividades das enzimas SOD (32%, figura 26A) e CAT (38%, figura 26B), e expressivos aumentos nos níveis proteicos de AGER 1 (66%, figura 27B) e de GLO 1 (70%, figura 27C) em relação aos valores encontrados em ratos DIOG. Vale a pena destacar que os aumentos nos níveis proteicos de AGER 1 e GLO 1 promovidos pela terapia combinada entre insulina 1U/dia + 25 mg/kg de ácido alfa lipoico foram maiores do que os efeitos promovidos pelos tratamentos isolados com insulina 1U/dia ou com 25 mg/kg de ácido alfa lipoico.

Em conjunto, as ações promovidas pelo tratamento de ratos diabéticos com “insulina 1U/dia + 25 mg/kg de ácido alfa lipoico” evidenciam o potencial benéfico dessa terapia combinada em relação ao acionamento dos sistemas endógenos de detoxificação de EROs e AGEs nos rins de ratos diabéticos, o que pode ser importante no combate ao estresse glico-oxidativo observado no DM.

Todos os grupos de animais diabéticos (DIOG, DI4U, DI1U, DAL50, DI1U + AL50, DAL25, DI1U + AL25) apresentaram aumentos na atividade da GSH-Px nos rins, quando comparados aos valores encontrados em ratos não diabéticos, NIOG (Figura 26C). Além disto, ratos DAL50 apresentaram um aumento na atividade de GSH-Px ainda maior do que aquele observado em ratos DIOG, DI4U e DI1U (Figura 26C).

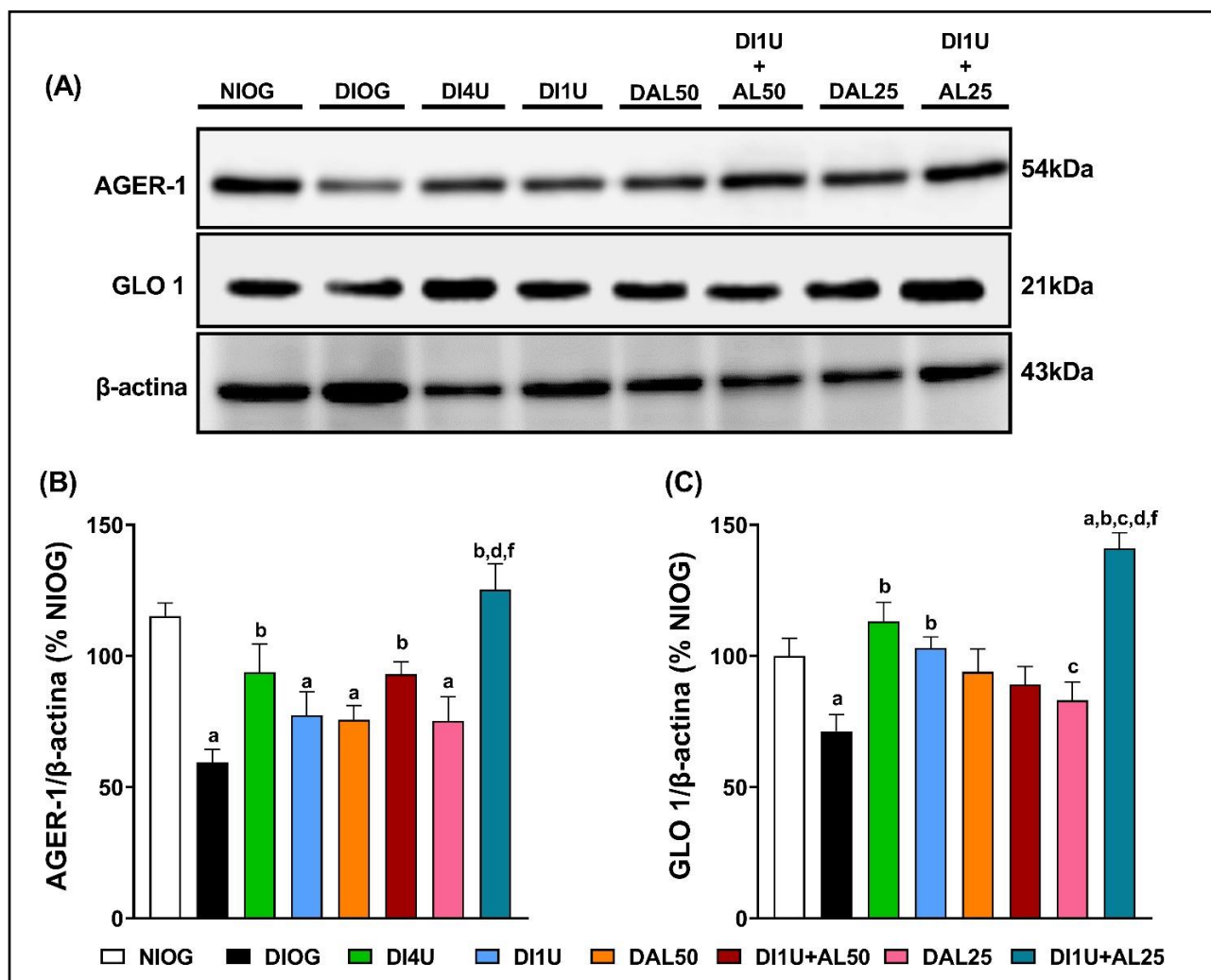


Figura 27. Componentes pertencentes aos sistemas de detoxificação dos AGEs nos rins de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias. Linhas representativas dos níveis proteicos de AGER-1, GLO 1 e β -actina detectados via Western Blotting (A); análise densitométrica dos resultados provenientes da análise via Western Blotting de AGER-1 (B) e GLO 1 (C). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $n = 4$. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DAL50; f, diferenças com DAL25.

5.14 A terapia combinada 1U/dia de insulina + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg) mitigou o estresse glico-oxidativo nos rins dos ratos diabéticos

Ratos DIOG apresentaram aumentos significativos nos níveis de TBARS (90%, figura 28A) e de AGEs fluorescentes (24%, figura 28B) nos rins, após 30 dias de experimento, quando comparados aos valores encontrados em rins de ratos NIOG. O tratamento de ratos diabéticos com 4U/dia de insulina reduziu os níveis de TBARS (38%) e AGEs fluorescentes (27%) nos rins, quando comparados aos valores encontrados em ratos DIOG (Figura 28). Por outro lado, o tratamento de ratos diabéticos com 1U/dia de insulina promoveu diminuição apenas nos níveis de AGEs fluorescentes nos rins (27%, figura 28B), quando comparados aos valores observados em ratos diabéticos DIOG, não exercendo efeitos benéficos sobre os níveis renais de TBARS.

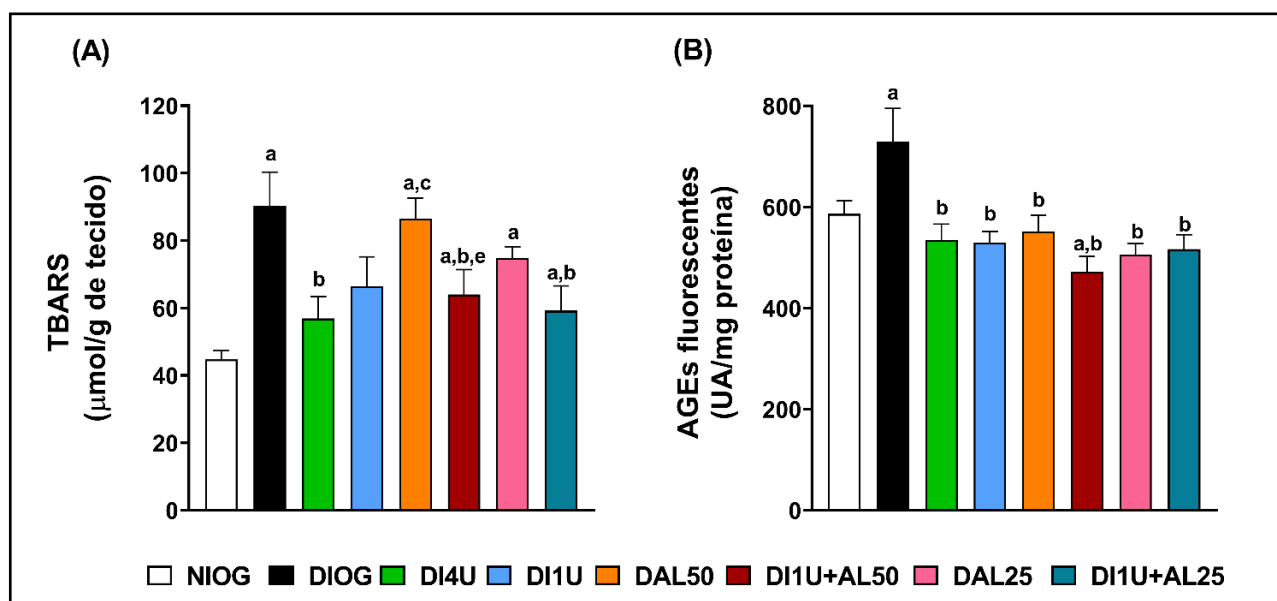


Figura 28. Biomarcadores de estresse glico-oxidativo nos rins de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias. Níveis de TBARS (A) e AGEs fluorescentes (B) no rim. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$ a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DAL50; f, diferenças com DAL25).

Ratos diabéticos tratados com ácido alfa lipoico na maior dose (50 mg/kg), isoladamente, não apresentaram reduções nos níveis de TBARS no rim, porém foi observada uma redução nos níveis de AGEs fluorescentes (24%, figura 28B), quando comparados aos ratos diabéticos DIOG. Por outro lado, ratos DI1U + AL50 apresentaram reduções nos níveis de TBARS (29%; figura 28A) e de AGEs fluorescentes (35%, figura 28B) no rim, quando comparados aos ratos diabéticos DIOG. Ratos DI1U + AL50 apresentaram níveis de AGEs fluorescentes menores do que aqueles observados em ratos não diabéticos NIOG (Figura 28B).

Ratos diabéticos tratados com ácido alfa lipoico na menor dose (25 mg/kg), isoladamente, não apresentaram reduções nos níveis de TBARS no rim, porém foi observada uma redução dos AGEs fluorescentes (20%, figura 28B) quando comparados aos ratos diabéticos DIOG. Por outro lado, ratos DI1U + AL25 apresentaram reduções nos níveis de TBARS (32%; figura 28A) e de AGEs fluorescentes (33%, figura 28B) no rim, quando comparados aos ratos diabéticos DIOG.

5.15 A terapia combinada 1U/dia de insulina + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg) aumentou as defesas antioxidantes no fígado de ratos diabéticos e diminuiu marcadores relacionados a a lesão hepática.

Ratos diabéticos DIOG apresentaram aumentos significativos nos níveis plasmáticos de ALT (200%) e de ALP (484%), em relação aos valores encontrados em animais NIOG (Figura 29), o que

sugere uma proteção contra a lesão hepática nestes animais. Os tratamentos com insulina (4U/dia e 1U/dia) foram capazes de reduzir (ou prevenir o aumento) os níveis plasmáticos de ALT de ratos diabéticos, em 54%, 49%, respectivamente, em relação aos valores observados em animais DIOG, alcançando valores próximos aos observados em animais NIOG (Figura 29A). O mesmo foi observado em relação aos níveis de ALP, ou seja, ratos DI4U e DI1U apresentaram diminuições de 154% e 48% nos níveis de ALP, respectivamente, em relação aos valores observados em animais DIOG (Figura 29B). Vale destacar que a diminuição nos níveis de ALP em ratos DI1U foi menor que aquela observada em animais DI4U.

Não foram observadas reduções nos níveis plasmáticos de ALT e ALP em ratos diabéticos tratados com ácido alfa lipoico em iogurte, em ambas as doses estudadas (50 ou 25 mg/kg), quando administrados sozinhos (Figura 29).

Em relação ao tratamento de ratos diabéticos com a terapia combinada de insulina (1U/dia) + ácido alfa lipoico (50 mg/kg), foi possível observar uma diminuição de 57% nos níveis plasmáticos de ALT, quando comparados aos animais DIOG (figura 29A). Já o tratamento com a terapia combinada de insulina (1U/dia) + ácido alfa lipoico (25 mg/kg) promoveu uma redução de 47% nos níveis de ALT, quando comparados aos animais DIOG (figura 29A). Não foram observadas reduções nos níveis de ALP no plasma de ratos diabéticos tratados com ácido alfa lipoico (50 ou 25 mg/kg) isoladamente ou em combinação com insulina (1U/dia), após 30 dias de tratamento.

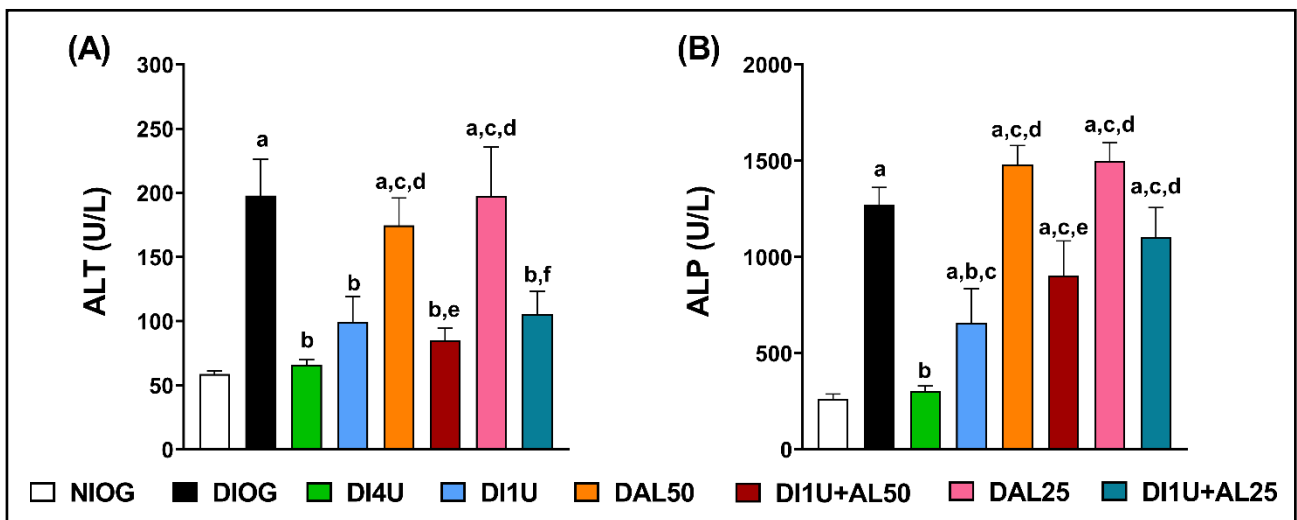


Figura 29. Níveis de alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) em plasma de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias. Níveis de alanina aminotransferase (A) e níveis de fosfatase alcalina (B). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DAL50; f, diferenças com DAL25.

Após 30 dias de experimento, ratos DIOG apresentaram, no fígado, uma diminuição nas atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT (48% e 36%, respectivamente) quando comparados aos valores encontrados em fígado de ratos NIOG (Figura 30A e B). Os tratamentos com insulina, nas doses de 4U/dia ou de 1U/dia, foram capazes de reestabelecer as atividades das enzimas antioxidantes no fígado de ratos diabéticos, cujos valores foram semelhantes aos encontrados em animais NIOG (Figura 30).

Não foram observados aumentos significativos nas atividades das enzimas antioxidantes no fígado (SOD e CAT) em ratos diabéticos tratados com ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg) isoladamente, quando comparados aos valores encontrados em ratos DIOG (Figura 30). Ou seja, as atividades das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) permaneceram diminuídas em fígado de animais DAL50 e DAL25, tal como observado em animais DIOG.

O tratamento de ratos diabéticos com a terapia combinada de insulina 1U/dia + 50 mg/kg de ácido alfa lipoico promoveu, no fígado, aumentos nas atividades de SOD (58%, figura 30A) e de CAT (28%, figura 30B) em relação aos ratos DIOG, sendo estes aumentos semelhantes aos promovidos pelo tratamento com insulina 1U/dia. O tratamento com insulina 1U/dia + 25 mg/kg de ácido alfa lipoico também promoveu aumentos nas atividades das enzimas antioxidantes SOD (62%, figura 30A) e CAT (31%, figura 30B) no fígado, em relação aos ratos diabéticos DIOG.

Todos os grupos experimentais (NIOG, DIOG, DI4U, DI1U, DAL50, DI1U + AL50, DAL25 e DI1U + AL25) apresentaram valores de atividade de GSH-Px no fígado semelhantes entre si (Figura 30C).

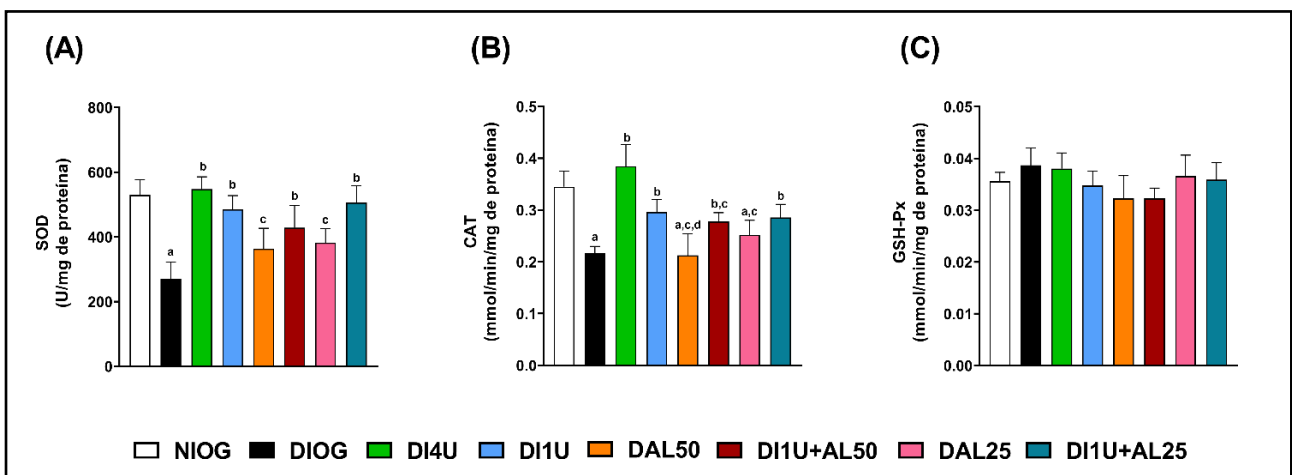


Figura 30. Enzimas antioxidantes no fígado de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias. Atividades de SOD (A), CAT (B) e GSH-Px (C) no fígado. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DAL50; f, diferenças com DAL25.

5.16 A terapia combinada 1U/dia de insulina + ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg) mitigou o estresse glico-oxidativo no fígado dos ratos diabéticos

Ratos diabéticos DIOG apresentaram uma diminuição dos níveis de TBARS no fígado e aumento dos AGEs fluorescentes (80%), quando comparados aos ratos NIOG (Figura 31). Os tratamentos de ratos diabéticos com insulina (4U/dia ou 1U/dia) promoveram reduções nos níveis de AGEs fluorescentes no fígado, em relação aos ratos DIOG (Figura 31B). Além disto, ratos DI4U apresentaram níveis de TBARS menores do que aqueles observados em ratos NIOG (Figura 31A).

Ratos diabéticos tratados com ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), isoladamente, apresentaram diminuições tanto nos níveis de TBARS quanto nos níveis de AGEs fluorescentes, no fígado. A associação entre insulina 1U/dia + ácido alfa lipoico (50 mg/kg) promoveu uma redução significativa nos níveis de AGEs fluorescentes (80%, figura 31B) em relação aos ratos DIOG e também em relação aos grupos tratados com os bioativos isolados (DI1U ou DAL50), ou seja, foi observado um efeito aditivo com a terapia combinada “insulina 1U/dia + 50 mg/kg de ácido alfa lipoico” no potencial em mitigar o estresse glicativo.

A terapia combinada de insulina 1U/dia + ácido alfa lipoico (25 mg/kg) também se mostrou efetiva na promoção de redução nos níveis de AGEs fluorescentes no fígado de ratos diabéticos (44%, figura 31B) quando comparados aos valores encontrados em ratos DIOG. No entanto, esta redução foi semelhante àquela promovida pelos tratamentos de ratos diabéticos com os bioativos isolados (insulina 1U/dia ou 25 mg/kg de ácido alfa lipoico).

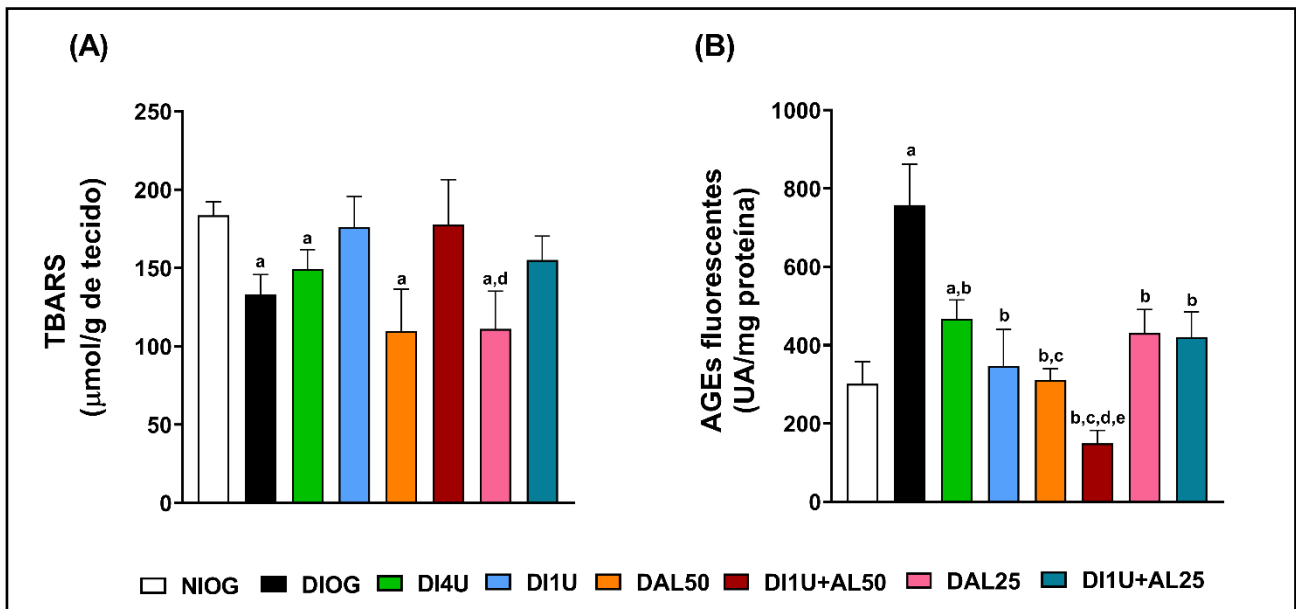


Figura 31. Biomarcadores de estresse glico-oxidativo no fígado de animais diabéticos tratados com insulina em menor dose (1U/dia) e ácido alfa lipoico (50 mg/kg ou 25 mg/kg), sozinhos ou em combinação, durante 30 dias. Níveis de TBARS (A) e AGEs fluorescentes (B) no rim. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando one-way ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$ a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DI4U; d, diferenças com DI1U; e, diferenças com DAL50; f, diferenças com DAL25).

6. DISCUSSÃO

No contexto do tratamento do DM tipo 1, a insulinoterapia é a única opção. A terapia com insulina é considerada o tratamento “padrão ouro” para o DM tipo 1, sendo altamente efetivo no controle glicêmico. Estudos realizados em nosso laboratório utilizando sistema-modelo in vivo de DM tipo 1 (ratos diabéticos e induzidos com estreptozotocina) (ARCARO et al., 2014; ASSIS et al., 2017; FIGUEIREDO et al., 2020; GUTIERRES et al., 2019; LIMA et al., 2020; ROXO et al., 2019) trataram estes animais com insulina na dose de 4U/dia, esta sendo a dose efetiva para a melhoria do controle glicêmico e demais alterações neste modelo experimental de DM. De fato, no presente estudo, ratos diabéticos tratados com 4U/dia de insulina apresentaram significativas melhorias nos parâmetros fisiológicos, bioquímicos, marcadores de estresse glico-oxidativo e defesas antioxidantes no plasma, fígado e rins. No entanto, ratos DI4U apresentaram uma redução significativa dos níveis glicêmicos, a partir do 10º dia de tratamento, os quais alcançaram níveis menores do que os observados nos animais NIOG, corroborando os achados de Gutierrez et al. (2019). Considerando o fato de que a hipoglicemia é uma consequência da terapia com insulina exógena (CRYER, 2013), o tratamento crônico com insulina sozinha e em uma dose elevada pode ser considerado um fator de risco para a ocorrência de episódios de hipoglicemia, especialmente levando em consideração a insulinização crônica.

Além disto, a insulinização em longo prazo pode estar relacionada com o estabelecimento de resistência à insulina, necessitando de maiores doses de insulina para o alcance de um controle glicêmico efetivo, o que, por sua vez, pode aumentar o risco de hipoglicemia (OKAMOTO et al., 2011). Akoumianakis e colaboradores (2020) demonstraram que o tratamento crônico de pacientes diabéticos com insulina provocou disfunção endotelial e inflamação, via aumento do estresse oxidativo no endotélio vascular. Outro fator importante e causa de mortalidade em pacientes com DM tipo 1 é a chamada hipoglicemia iatrogênica, a qual é um fator limitante para o bom controle glicêmico. A hipoglicemia iatrogênica causa prejuízos na manutenção dos níveis glicêmicos e a principal consequência é um “ciclo vicioso” de hipoglicemia. Uma insulinização efetiva, adequada e eficaz é imprescindível para a prevenção da hipoglicemia iatrogênica (CRYER, 2012, 2014). Além disso, em um grande estudo que envolveu mais de 11 mil pacientes com DM, observou-se que a ocorrência de episódios de hipoglicemia grave foi associada ao risco aumentado de complicações macrovasculares e morte dos pacientes em decorrência de doenças cardiovasculares. Observou-se também risco aumentado para diversos outros eventos não vasculares, incluindo condições que afetam os sistemas respiratório e digestivo. Os autores reportam que os prováveis mecanismos pelos quais a hipoglicemia pode causar doença cardiovascular incluem ativação simpatoadrenal,

repolarização cardíaca anormal, aumento da trombogênese, inflamação e vasoconstrição (ZOUNGAS et al., 2010).

Sabendo-se da importância da insulinização na prevenção das complicações do DM tipo 1 e dos potenciais efeitos adversos que podem ser observados, a utilização de terapias combinadas entre insulina em menor dose e outros fármacos antidiabéticos é uma opção interessante e efetiva para o alcance do controle glicêmico e atenuação das complicações diabéticas. Tem sido demonstrado que, quando a insulina é combinada com fármacos antidiabéticos, existe um significativo potencial para reduzir a dose de insulina, diminuindo assim o risco de ocorrência de ganho de peso e especialmente de hipoglicemia, contribuindo para a manutenção do controle glicêmico (BARNETT et al., 2013). Ademais, terapias combinadas entre insulina e compostos bioativos de origem natural também têm sido propostas como estratégias para alcançar um controle glicêmico eficaz e para atenuar as complicações diabéticas em longo prazo relacionadas ao estresse glico-oxidativo, além de prevenir os efeitos adversos da insulinização em longo prazo (BASHIR, 2019; MALEKIYAN et al., 2019).

Terapias combinadas entre insulina e compostos bioativos naturais com potencial antidiabético têm sido recentemente propostas como estratégias para alcançar um controle glicêmico eficaz, sendo capaz de atenuar as complicações diabéticas em longo prazo relacionadas ao estresse glico-oxidativo, além de prevenir ou atenuar os efeitos adversos da insulinização em longo prazo (BASHIR, 2019; GUTIERRES et al., 2019; MALEKIYAN et al., 2019; SHARMA; GUPTA; SHARMA, 2018). A combinação de compostos bioativos naturais e fármacos antidiabéticos vem ganhando destaque, uma vez que essas estratégias de terapias combinadas têm se mostrado efetivas no alcance do controle glicêmico no DM, bem como apresenta-se útil na atenuação das complicações diabéticas (PRABHAKAR; KUMAR; DOBLE, 2014; VENKATAKRISHNAN; CHIU; WANG, 2019). Um dos principais benefícios da combinação de compostos bioativos naturais com agentes terapêuticos clássicos para o DM é o potencial em mitigar as consequências da memória metabólica.

A primeira etapa do presente estudo consistiu na avaliação dos benefícios que podem ser alcançados com a terapia combinada entre ***insulina em uma dose reduzida (1U/dia)*** e um antioxidante de origem natural, no caso, o ***licopeno***, em ratos diabéticos. Primeiramente, um controle glicêmico mais efetivo foi observado nos animais DI1U + LIC, em relação aos animais DI1U ou DLIC. O mesmo benefício foi observado em relação à capacidade de ativar a sinalização insulínica em tecido periférico (no caso, músculo esquelético), uma vez que maiores níveis de fosforilação de AKT foram observados em músculos *gastrocnemius* de ratos diabéticos tratados com 1U/dia de insulina + licopeno. Essa melhoria observada na sensibilidade insulínica pode ter contribuído para uma maior translocação de GLUT4 para a membrana plasmática em músculos, favorecendo uma maior captação de glicose, impactando diretamente nos níveis de glicose sanguínea. Em conjunto,

estes achados reitaram a ação promissora da terapia combinada 1U/dia de insulina + licopeno na redução dos níveis glicêmicos em animais diabéticos.

Outro ponto importante a ser destacado é o efeito benéfico da terapia combinada 1U/dia de insulina + licopeno na redução do estresse glico-oxidativo e no aumento das defesas antioxidantes, tanto no plasma quanto nos rins, o que significa elevado potencial desta combinação de bioativos em atenuar as complicações diabéticas relacionadas ao estresse glico-oxidativo. Além disto, foi observada uma maior proteção da integridade e função dos rins de ratos DI1U + LIC, principalmente na redução urinária de albumina. Ainda, maiores níveis proteicos dos componentes de detoxificação dos AGEs (AGER-1 e GLO 1) foram observados em ratos DI1U + LIC. Portanto, a combinação 1U/dia de insulina + licopeno se mostrou uma estratégia interessante para o tratamento do DM e prevenção das complicações a longo prazo desta síndrome.

No geral, ratos DI1U + LIC apresentaram uma melhoria nos parâmetros fisiológicos quando comparados aos ratos DIOG, D1IU e DLIC. Foram observadas maiores massas de tecidos adiposos e musculares, culminando em um maior ganho de massa corporal, além de ser observada uma redução na polifagia, polidipsia e volume urinário. Também foi observado um efeito benéfico da terapia combinada 1U/dia de insulina + licopeno no perfil lipídico de animais diabéticos, incluindo a diminuição dos níveis de triglicerídeos e colesterol total. Além disto, foi observado um aumento na atividade de PON 1 no plasma dos ratos DI1U + LIC. A atividade de PON 1 está diretamente relacionada com a atenuação da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), diminuindo o risco de doenças cardiovasculares (GETZ; REARDON, 2004). Em conjunto, a diminuição nos níveis de colesterol total e o aumento na atividade de PON 1 nos ratos DI1U + LIC demonstram um potencial efeito protetor desta terapia combinada frente as complicações cardiovasculares observadas no DM.

O sucesso dos resultados obtidos com o tratamento com 1U/dia de insulina + licopeno pode ser explicado através da combinação dos efeitos dos bioativos isoladamente: (i) o licopeno, um antioxidante, atuando principalmente na captura das EROs, além de aumentar as defesas antioxidantes endógenas, (ii) e a insulina, aumentando a captação da glicose plasmática via transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT 4). Diversos estudos demonstram o significativo potencial antioxidante do licopeno, Eze e colaboradores (2018) observaram um aumento nas atividades das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GSH-Px) nos rins de ratos diabéticos (induzidos com STZ) após 30 dias de tratamento com 10, 20 e 40 mg/kg de licopeno veiculado em óleo de oliva.

Em concordância, estudo realizado por Soleymaninejad e colaboradores (2017), demonstrou que ratos diabéticos (induzidos com 60 mg/kg de STZ) tratados com insulina (2U/dia) e/ou licopeno (4 mg/kg/dia) apresentaram prevenção da morte celular no hipocampo, bem como tiveram redução na expressão de genes pró-apoptóticos (*Bax*) e aumento na expressão de genes antiapoptóticos (*Bcl-2*)

no hipocampo, reiterando o potencial benéfico que pode ser alcançado com a associação entre insulina e licopeno em um modelo experimental de DM tipo 1.

A segunda etapa do presente estudo consistiu na avaliação dos benefícios que podem ser alcançados com a terapia combinada de **insulina em uma dose reduzida (1U/dia)** e um outro antioxidante, o **ácido alfa lipoico**, em ratos diabéticos. Além disto, duas doses do ácido alfa lipoico (50 mg/kg e 25 mg/kg) foram avaliadas no presente estudo. Primeiramente um maior controle glicêmico foi observado nos animais DI1U + AL50 e DI1U + AL25 em relação aos animais tratados apenas com ácido alfa lipoico (DAL50 ou DAL25). Alguns trabalhos envolvendo o estudo de ratos diabéticos (modelo de diabetes induzido com estreptozotocina) e tratados com ácido alfa lipoico (10 ou 50 mg/kg via i.p) não observaram reduções das glicemias em ratos tratados com ácido alfa lipoico (MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003; OBROSOVA et al., 1998)

Ao analisar a AUC da glicemia pós-prandial ao longo de 30 dias de tratamento, foi possível observar que os ratos DI1U + AL50 apresentaram uma significativa redução da glicemia, a qual foi maior que aquela observada em ratos DI1U ou DAL50, o que pode ser explicado por uma ação conjunta entre a insulina, mesmo em dose reduzida promovendo uma redução parcial da glicemia, e o ácido alfa lipoico (50 mg/kg) um antioxidante, que pode participar na preservação das células β -pancreáticas e também no aumento da sinalização da insulina nos tecidos alvos. Estudo realizado por Mendoza-Núñez e colaboradores (2019) evidenciaram que o provável efeito antihiperlipglicemiante do ácido alfa lipoico é consequência do aumento da captação da glicose pelos músculos esqueléticos e tecidos adiposos.

As ações antihiperlipglicemiantes do ácido alfa lipoico já foram descritas por Yi et al (2011), as quais incluem uma proteção e melhoria da função das ilhotas pancreáticas. Além disto, o ácido alfa lipoico apresenta um importante efeito benéfico no aumento da atividade do receptor de insulina e, consequentemente, melhorando a captação de glicose (DIESEL et al., 2007; DUGBARTEY et al., 2022). Também aumenta a sensibilidade à insulina nos músculos esqueléticos e consequentemente pode aumentar a translocação dos transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT 4), e exerce um efeito estimulatório sobre a proteína quinase dependente de AMP (AMPK) (DUGBARTEY et al., 2022; WOO et al., 2005) e PI3K. O efeito estimulatório sobre PI3K promovido pelo ácido alfa lipoico acarreta a fosforilação da tirosina no receptor de insulina e melhora a captação de glicose dependente de PI3K (DUGBARTEY et al., 2022; YAWORSKY et al., 2000).

Uma meta-análise realizada por Mahmoudi-Nezhad e colaboradores (2021) concluiu que as ações antihiperlipglicêmicas atribuídas ao ácido alfa lipoico relacionam-se à dose administrada e ao período de administração e, por isso, existem muitos estudos que se contradizem neste sentido. Além disto, um problema envolvido na utilização do ácido alfa lipoico é decorrente do seu perfil farmacocinético: o ácido alfa lipoico apresenta baixa disponibilidade e tempo de meia-vida curto, o

que pode ter impactado na promoção dos efeitos benéficos. Outro ponto importante e que vale ser ressaltado é que diferentes ações são observadas em relação aos enantiômeros deste bioativo, R-ácido alfa lipoico e S-ácido alfa lipoico, em diferentes tecidos (EVANS; GOLDFINE, 2000). No presente estudo, a formulação de ácido alfa lipoico administrada contém os dois enantiômeros e por isso, as ações foram observadas em todos os tecidos analisados, algumas mais visíveis e outras mais discretas.

De modo geral, ratos DI1U + AL25 não apresentaram uma melhoria nos parâmetros fisiológicos quando comparados aos ratos DIOG ou D1IU. No entanto, ratos DI1U + AL50 apresentaram uma redução da ingestão alimentar quando comparados aos ratos DIOG e DI1U. Já são conhecidas e descritas as ações antiobesogênicas do ácido alfa lipoico. Tem sido descrito que o ácido alfa lipoico suprime a atividade da AMPK hipotalâmica para exercer tais efeitos (KIM et al., 2004). A AMPK também é expressa no hipotálamo e participa da regulação do apetite (ANDERSSON et al., 2004; MINOKOSHI et al., 2004). A ativação da AMPK hipotalâmica aumenta a ingestão alimentar e a massa corporal, ao passo que sua inibição desta quinase é necessária para que a leptina promova a saciedade e reduza o consumo de alimentos (ANDERSSON et al., 2004). No presente estudo, provavelmente o ácido alfa lipoico exerceu tal atividade, uma vez que ratos DAL50 apresentaram uma diminuição da ingestão alimentar.

Além disto, foram observadas maiores massas de tecidos adiposos e musculares, culminando em um maior ganho de massa corporal em animais tratados com insulina (1U/dia) + ácido alfa lipoico (nas doses de 50 ou 25 mg/kg). Tal fato também pode ser atribuído ao conjunto de efeitos destes bioativos: a insulina, diminuindo processos de proteólise e lipólise, e o ácido alfa lipoico, atuando na supressão da AMPK. Também foi observado um efeito benéfico das terapias combinadas (insulina 1U/dia + ácido alfa lipoico nas doses de 50 ou 25 mg/kg) no perfil lipídico de animais diabéticos, incluindo a diminuição dos níveis de triglicerídeos e de colesterol total. Além disto, foi observado em ratos DI1U + AL50 um aumento na atividade de PON 1 no plasma.

Outro fator importante a ser destacado foi o efeito benéfico das associações de insulina 1U/dia + ácido alfa lipoico (50 ou 25 mg/kg) na atenuação do estresse glico-oxidativo no plasma, fígado e rins bem como na promoção de aumento das defesas antioxidantes no plasma (PON 1), fígado e rins (SOD e CAT). Adicionalmente, foi observado um aumento expressivo nos níveis proteicos de AGER 1 e GLO 1, nos rins, em ratos DI1U + AL25. Portanto, de modo geral, a combinação de insulina em uma menor dose (1U/dia) + ácido alfa lipoico (50 ou 25 mg/kg) se mostraram estratégias interessantes para o manejo do DM, principalmente na prevenção das complicações a longo prazo desta síndrome.

Um estudo importante conduzido em nosso laboratório por Gutierres e colaboradores (2019) avaliou os impactos do tratamento de ratos diabéticos (indução com estreptozotocina; 35 dias de tratamento) com uma menor dose de insulina (1U/dia; i.p.) em combinação com 90 mg/kg de curcumina administrada por via oral via suspensão em iogurte. Foi observado um efeito benéfico

aditivo desta terapia combinada na diminuição da glicemia, níveis de triglicerídeos, marcadores de injúria hepática (ALT, AST, ALP) e níveis de TBARS, bem como aumento das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px no fígado. Mais recentemente, outro estudo de nosso laboratório realizado por Figueiredo e colaboradores (2020) avaliou os impactos do tratamento de ratos diabéticos (indução com estreptozotocina; 30 dias de tratamento) com metformina (250 mg/kg) em combinação com licopeno (45 mg/kg). Neste estudo, observou-se que houve um benefício aditivo desta terapia combinada na diminuição da glicemia, níveis de colesterol total, marcador de injúria hepática (ALT), marcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo (TBARS e AGEs no plasma; TBARS no rim). Em conjunto, estes estudos anteriores de nosso laboratório fornecem evidências dos efeitos promissores alcançados pela associação de fármacos antidiabéticos com antioxidantes de origem natural, em sistema-modelo *in vivo* de DM tipo 1.

Ratos diabéticos tratados com insulina em dose reduzida, 1U/dia de insulina, apresentaram redução da glicemia pós-prandial após 30 dias de tratamento. No entanto, a média da glicemia pós-prandial foi de aproximadamente 302 mg/dL, ou seja, muito superior àquela observada nos ratos normais, não diabéticos (86 mg/dL) e ratos diabéticos tratados com a dose padrão de insulina, 4U/dia (46 mg/dL). Devido a este fato, o tratamento com 1U/dia de insulina não foi eficaz na redução de processos glicativos (observados pelos níveis elevados de HbA1c e frutossamina). Com a cronicidade da hiperglicemia, a ocorrência de glicação da hemoglobina (HbA1c) e de proteínas séricas (frutossamina) é mais frequente e diretamente relacionada com a concentração de glicose sanguínea (DORCELY et al., 2017; WELSH; KIRKMAN; SACKS, 2016). Ratos DI1U também apresentaram um aumento no ganho de peso (com aumento nas massas de tecidos adiposos e muscular), atenuação da dislipidemia, diminuição dos marcadores de lesão hepatocelular, biomarcadores de estresse glico-oxidativo no plasma (TBARS e AGEs fluorescentes) e rins (TBARS), assim como aumento da atividade antioxidante no plasma (PON 1). Em conjunto, estes achados fornecem evidências de que o tratamento com insulina em uma dose reduzida (1U/dia) foi efetivo na prevenção de hipoglicemia e na promoção de melhorias em parâmetros fisiometabólicos, no entanto não alcançou o efetivo controle glicêmico de ratos diabéticos, o que contribuiu para a ocorrência dos eventos glicativos, os quais estão relacionados com as complicações diabéticas, o que certamente justifica o uso da insulina em dose reduzida em uma estratégia de terapia combinada com um bioativo natural com atividade antidiabética.

Portanto, comparando as respostas alcançadas com os tratamentos de ratos diabéticos com insulina 4U/dia e 1U/dia, é possível observar que os ratos DI1U parecem estar mais suscetíveis às complicações do DM relacionadas à hiperglicemia, uma vez que o controle glicêmico nestes animais foi menos efetivo. Além disto, ratos DI1U apresentaram uma diminuição nas atividades das enzimas antioxidantes no rim (SOD e CAT), o que pode contribuir ainda mais para o aumento do estresse

glico-oxidativo neste tecido. Estudo conduzido por Gutierrez et al. (2019), o qual foi utilizado como uma importante referência do presente estudo, demonstrou um controle glicêmico menos efetivo com a insulina 1U/dia em relação a 4U/dia em ratos diabéticos (modelo experimental de DM tipo 1), corroborando os achados do presente estudo.

Assim, sabendo-se da necessidade de melhorar a eficácia terapêutica do tratamento com insulina em menor dose (1U/dia), principalmente no que diz respeito ao aumento das defesas endógenas que participam da detoxificação de EROs e AGEs e assim diminuição do estresse glico-oxidativo, mas também propondo evitar episódios de hipoglicemia, a prospecção sobre a utilização de compostos bioativos com atividades antidiabética, antioxidante e/ou antiglicação torna-se interessante. Antioxidantes são substâncias capazes de inibir ou prevenir a oxidação de moléculas ocasionada pela produção exacerbada de EROs e ERNs durante o estresse glico-oxidativo. Já os agentes com atividade antiglicação são capazes de prevenir processos de glicação nos estágios iniciais (HbA1c e frutossamina) e/ou avançados (AGEs), que podem contribuir para o aumento da produção das EROs e para as complicações do DM tipo 1.

Diversos estudos vêm demonstrando o potencial benéfico que pode ser alcançado com a utilização de antioxidantes no combate as complicações relacionadas ao DM, incluindo evidências anteriores de estudos de nosso laboratório (ARCARO et al., 2014; ASSIS et al., 2017; FIGUEIREDO et al., 2020; KELLY, 1998; LIMA et al., 2020; RAJENDIRAN; PACKIRISAMY; GUNASEKARAN, 2018). Alguns estudos pré-clínicos apresentam novas estratégias terapêuticas com foco na utilização de antioxidantes associados aos fármacos antidiabéticos já utilizados e disponíveis para a população, com o objetivo de obter um efeito aditivo ou sinérgico em relação às terapias administradas isoladamente (CIRANO et al., 2021; FIGUEIREDO et al., 2020; GUTIERRES et al., 2019; LIMA et al., 2020; MOTTA et al., 2022; OBAFEMI et al., 2021; ROXO et al., 2019).

O licopeno é um antioxidante com função *scavenger* do oxigênio singlete, uma espécie reativa de oxigênio, e por isso pode ter um papel fundamental na atenuação do estresse glico-oxidativo (FORNI et al., 2019) além de apresentar uma ação antihiper glicêmica (KUHAD; SETHI; CHOPRA, 2008). Já são descritas as ações benéficas do licopeno na redução dos níveis de AGEs e RAGE nos rins de animais diabéticos (TABREZ; AL-SHALI; AHMAD, 2015); levando-se em consideração que o aumento da interação AGEs-RAGE aumenta a produção de citocinas inflamatórias, o licopeno surge com um potente antioxidante com ação anti-inflamatória ao agir inibindo o receptor RAGE (CHEN et al., 2014). No presente estudo, as ações benéficas do licopeno em termos de combate ao estresse glico-oxidativo foram evidenciadas por um conjunto de fatores: (i) atenuação do estresse glico-oxidativo no plasma e rim e (ii) aumento da sensibilidade à insulina via aumento dos níveis de fosforilação da AKT em músculos esqueléticos, o que pode ter sido importante para a significativa diminuição da glicemia na terapia combinada com 1U/dia de insulina.

O ácido alfa lipoico, o segundo antioxidante estudado no presente trabalho, é um antioxidante de origem natural que contém enxofre em sua estrutura; atua como cofator para vários complexos enzimáticos mitocondriais envolvidos na produção de energia pelas células (BUSTAMANTE, 1998; DUGBARTEY et al., 2022). Alguns estudos já demonstram que níveis endógenos de ácido alfa lipoico diminuídos, sendo a suplementação benéfica como terapia complementar no tratamento do DM tipo 1 e 2, principalmente no combate as complicações diabéticas (SHAY et al., 2009). Além disto, em modelo de diabetes em roedores com inibição genética da ácido alfa lipoico sintase, enzima responsável pela produção endógena de ácido alfa lipoico, foi demonstrado que esses roedores apresentaram uma piora no quadro de nefropatia diabética, e que a suplementação com ácido alfa lipoico atenuou a progressão da nefropatia diabética (VERMA, 2018). No entanto, os efeitos do ácido alfa lipoico com terapias convencionais utilizadas para o manejo do DM tipo 1 e tipo 2 ainda não estão totalmente elucidados, sendo assim necessários maiores estudos para entender os efeitos promissores que podem ser alcançados com este antioxidante.

A AKT ou proteína quinase B tem um papel crucial na via de sinalização de insulina; participa da regulação de diversas funções celulares, incluindo o controle do metabolismo energético proliferação, hipertrofia e apoptose celulares (BRAZIL; YANG; HEMMING, 2004). Após uma cascata de sinalização intracelular, uma vez que a AKT é fosforilada e ativada, ocorre sua participação na estimulação à translocação das vesículas contendo os transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT 4; principalmente nos músculos esqueléticos) do citoplasma para a membrana plasmática, favorecendo o processo de captação de glicose estimulada por insulina. Com isso, prejuízos na sensibilidade à insulina que impactam negativamente a fosforilação da AKT podem estar relacionados com intolerância à glicose e hiperglicemia crônica (LIU et al., 2009).

Conforme o esperado, ratos DIOG apresentaram uma redução significativa nos níveis de fosforilação da AKT (56%) em músculos *gastrocnemius*, quando comparados aos ratos NIOG. Sabe-se que a STZ é responsável pela destruição de grande parte das células β pancreáticas. No modelo de DM experimental (indução com STZ) utilizado neste estudo, ocorre a destruição de grande parte das células β pancreáticas, caracterizando então um modelo insulinopênico, no qual a produção de insulina é drasticamente reduzida. Ademais, as células β que eventualmente não foram destruídas pela STZ e que continuam a secretar insulina, estas podem sofrer as consequências do estresse glicoxidativo, justificando assim o aumento progressivo da glicemia nos animais DIOG. Além disso, animais DIOG, além de produzirem progressivamente menos insulina, também podem ter desenvolvido resistência à insulina nos tecidos periféricos, condição esta que também pode contribuir com a piora da glicemia em animais DIOG. Estudos têm demonstrado que resistência à insulina também pode ser observada em animais diabéticos induzidos com STZ, e isto ocorre, principalmente, por uma redução na atividade tirosina quinase do receptor de insulina, e diminuição na ativação da

AKT (fosforilação no resíduo serina-473) (GIORGINO; CHEN; SMITH, 1992; GUTIERRES et al., 2015). De fato, no presente estudo, observamos uma menor fosforilação de AKT estimulada por insulina em músculos de ratos DIOG.

Os tratamentos de ratos diabéticos com insulina (4U/dia e 1U/dia) promoveram um aumento na fosforilação de AKT (basal e após estímulo com insulina), fato este esperado, uma vez que o tratamento com insulina reestabelece, total ou parcialmente, a deficiência insulínica característica desse sistema-modelo *in vivo* de DM tipo 1.

Além dos benefícios relacionados ao potencial antioxidante do licopeno já demonstrados em diversos estudos (ASSIS et al., 2017; FIGUEIREDO et al., 2020; MOTTA et al., 2022; XU et al., 2021) uma ação importante desse bioativo natural no combate à hiperglicemia, observado no presente trabalho, é a sua capacidade de promover aumento nos níveis de fosforilação de AKT (basal e após estímulo com insulina). Em conjunto, uma provável ação antioxidante *per se* do licopeno atuando na proteção das células β -pancreáticas, que pode estar protegendo-as contra o estresse glico-oxidativo, resultando em uma melhor produção/secreção de insulina principalmente nas células que não foram afetadas pela administração de STZ e; uma possível regulação positiva do receptor de insulina, PI3K e níveis de fosforilação da AKT nos músculos esqueléticos podem explicar o efeito benéfico do licopeno na melhoria da sensibilidade à insulina, principalmente na translocação das vesículas contendo GLUT 4 para a membrana plasmática, aumentando a captação da glicose tissular.

A terapia combinada insulina 1U/dia + licopeno se mostrou muito eficiente na promoção de aumento na fosforilação de AKT (basal e após estímulo com insulina) nos músculos esqueléticos de ratos diabéticos, de forma ainda maior que os efeitos dos tratamentos somente com insulina 1U/dia ou somente com licopeno, o que justifica sua melhor eficácia na redução da glicemia pós-prandial.

O estresse glico-oxidativo é um fator muito importante no estabelecimento das complicações relacionadas ao DM. Em um quadro de DM não controlado, ou seja, longos períodos de hiperglicemia, ocorre uma produção exacerbada de AGEs, e estes podem ocasionar perda das funções de proteínas, aumento na ativação de receptores RAGE culminando em aumento do estresse oxidativo e na produção de citocinas inflamatórias (SANAJOU et al., 2018). O aumento na produção de EROs e ERNs, por sua vez, pode favorecer a oxidação de lipídeos encontrados em membranas plasmáticas, culminando na formação de diversos produtos da lipoperoxidação, incluindo o malondialdeído (MDA), o qual reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando as chamadas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014).

Ratos DIOG apresentaram um aumento significativo nos níveis de AGEs e TBARS no plasma, o que era esperado, uma vez que estes animais apresentaram altos níveis glicêmicos ao longo do período experimental, o que favorece processos glicativos e oxidativos. O tratamento com insulina (4U/dia ou 1U/dia) preveniu a ocorrência de processos glico-oxidativos.

Estudos já vêm demonstrando os benefícios que podem ser alcançados no tratamento de síndromes metabólicas (incluindo o DM tipo 2) com licopeno e melhorias na capacidade de regulação do metabolismo de carboidratos e lipídeos, o que caracteriza, pelo menos em parte, a atividade antidiabética exercida pelo licopeno (YIN; ZHENG; JIANG, 2019). Embora no presente estudo não foi evidenciada a diminuição nos níveis de TBARS nos ratos DLIC no plasma e no rim, o tratamento com a terapia combinada insulina 1U/dia e licopeno promoveu uma redução nos níveis de AGEs plasmáticos que, em conjunto com os menores níveis de TBARS e maior atividade de PON 1, reforça o conjunto de benefícios que podem ser alcançados com a terapia combinada no combate ao estresse glico-oxidativo no plasma de ratos diabéticos.

Ainda, Figueiredo et al (2020) demonstraram os efeitos benéficos promovido pelo tratamento de ratos diabéticos (induzidos com 40 mg/kg de STZ) com licopeno (45 mg/kg) após 30 dias de tratamento: houve uma redução dos níveis de AGEs bem como um aumento da atividade de PON 1 no plasma; diminuição dos níveis de AGEs no fígado; e uma diminuição dos níveis de TBARS e AGEs nos rins. Motta e colaboradores (2022) também demonstraram os efeitos promissores do licopeno (45 mg/kg) em modelo de obesidade e resistência à insulina. No estudo realizado por Motta et al (2022) também foi observado uma redução dos níveis de TBARS, AGEs e aumento da atividade de PON 1 no plasma; e diminuições dos níveis de TBARS e AGEs no fígado e rins. Portanto, não são novidades as ações benéficas promovidas pelo licopeno e os achados observados no presente estudo reiteram estas ações promissoras.

No presente estudo foi evidenciada a ação do ácido alfa lipoico (50 e 25 mg/kg) na redução da glicemia dos ratos diabéticos, após 30 dias de tratamento, mesmo sendo menos efetiva do que os efeitos promovidos pelos tratamentos com as associações entre insulina 1U/dia + ácido alfa lipoico (50 ou 25 mg/kg). A ação combinada promovida pela insulina 1U/dia + ácido alfa lipoico (50 ou 25 mg/kg), aumentando a captação da glicose pelas células dos tecidos adiposos e musculares e consequentemente reduzindo a glicose plasmática, pode ser um potencial mecanismo de ação que contribua para a diminuição de eventos glicativos (HbA1c, frutamina e AGEs) e oxidativos (TBARS) no plasma dos ratos diabéticos. Vale destacar que a associação entre insulina 1U/dia + ácido alfa lipoico na maior dose (50 mg/kg) foi mais efetiva na redução dos níveis glicêmicos: ratos DI1U + AL50 apresentaram níveis glicêmicos de aproximadamente 140 mg/dL, após 30 dias de tratamento. Consequentemente, menores níveis de HbA1c foram observados nestes animais. Sabe-se que altos níveis de glicose promove glicotoxicidade, não só pelo aumento na formação de EROs e diminuição da capacidade das enzimas antioxidantes, mas também pelo aumento nas taxas de processos de glicação não enzimática de biomoléculas (MIRJANA et al., 2012).

Após 30 dias de experimento, houve um aumento significativo nos níveis plasmáticos de triglicerídeos em ratos DIOG, quando comparados aos valores em ratos NIOG. No DM, é comum um

aumento nos níveis séricos de triglicerídeos, que pode ser uma consequência da diminuição na atividade da lipase lipoproteica (LpL), responsável pela retirada dos triglicerídeos circulantes das lipoproteínas quilomícron e VLDL (RIFAI; WARNICK, 2006) visando seu armazenamento nos tecidos adiposos, ou sua oxidação (no caso os ácidos graxos) em músculos estriados. A hipertrigliceridemia no DM também pode ser exacerbada pelo aumento observado na ingestão alimentar (hiperfagia), culminando em aumento na produção de quilomícrons. Adicionalmente, ratos DIOG apresentaram um aumento nos níveis plasmáticos de colesterol em relação aos animais NIOG. Alguns fatores afetam negativamente o metabolismo das lipoproteínas, no diabetes, incluindo (i) aumento na produção da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), culminando em subsequente aumento nos níveis da lipoproteína de baixa densidade (LDL), rica em colesterol; (ii) diminuição na atividade dos receptores de LDL (RIFAI; WARNICK, 2006). A dislipidemia em geral está associada ao estresse oxidativo e ao aumento de um cenário inflamatório, os quais representam alto risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares (PARMAR; KAR, 2008).

Todos os tratamentos envolvendo os antioxidantes naturais isoladamente (licopeno, ácido alfa lipoico 50 mg/kg ou ácido alfa lipoico 25 mg/kg) não foram efetivos na promoção de redução dos níveis de colesterol total e triglicerídeos de ratos diabéticos, após 30 dias de tratamento. Muito embora já serem descritas as ações do licopeno na inibição da HMG-CoA redutase, enzima chave no processo de síntese do colesterol, o que culminaria em uma diminuição nos níveis de colesterol total (PALOZZA et al., 2012), não foram evidenciadas estas ações no presente trabalho. No entanto, ao associar o licopeno (45 mg/kg) e a insulina 1U/dia, foi observada uma redução significativa nos níveis de triglicerídeos e colesterol total, efeito este que pode ser explicado pelas ações da insulina, uma vez que ratos DI1U + LIC apresentaram um perfil semelhante ao observado em ratos DI1U. A insulina, no metabolismo lipídico, é responsável por estimular a lipase lipoproteica (LpL), promovendo a hidrólise dos triglicerídeos das lipoproteínas circulantes e assim aumenta a captação de ácidos graxos pelos tecidos adiposos (armazenamento) ou musculares (oxidação). A insulina também inibe a lipase hormônio sensível (LHS), presente nos tecidos adiposos, enzima responsável pela hidrólise de triglicerídeos, disponibilizando assim menos ácidos graxos livres (AGL) (KAHN; SALTIEL, 2005; SALTIEL, 2021).

As ações do ácido alfa lipoico na atenuação da dislipidemia decorrente do DM ainda são incertas. Foi relatado que o ácido alfa lipoico pode reduzir a dislipidemia associada à obesidade em ratos (WOO et al., 2005) e ao diabetes em camundongos deficientes em apolipoproteína E tratados com estreptozotocina (YI; MAEDA, 2006). Uma das ações importantes e descritas do ácido alfa lipoico é sua capacidade em ativar a AMPK (KIM et al., 2016; MEHANNA et al., 2018). A AMPK, uma vez ativada, fosforila a enzima ACC (acetil-CoA carboxilase), inibindo assim a lipogênese,

reduzindo os estoques de lipídeos no fígado, e em última instância tais eventos culminam em aumento na sensibilidade hepática à insulina.

No entanto, no presente estudo, não foram evidenciadas as ações benéficas antihiperlipidêmicas promovidas pelo ácido alfa lipoico, em ambas as doses estudadas, o que pode ser explicado pelas doses utilizadas em nosso estudo (25 e 50 mg/kg), muito inferiores àquela utilizada em estudo que observou ações antihiperlipidêmicas atribuídas ao ácido alfa lipoico (300 mg/kg) (FORD et al., 2001; MEHANNA et al., 2018). Outro fator importante a ser analisado é o modelo experimental de DM tipo 1 utilizado em nosso estudo; este modelo mimetiza um quadro muito severo de doença metabólica, no qual os níveis de colesterol total e triglicerídeos estão significativamente aumentados em relação aos ratos não diabéticos. Assim, mesmo sendo demonstradas as ações benéficas do ácido alfa lipoico na atenuação da dislipidemia em outros estudos, talvez neste modelo experimental, tais ações não tenham sido suficientes para reduzir os níveis plasmáticos de triglicerídeos.

Interessantemente, não foram observadas diferenças nos níveis de HDL-colesterol entre ratos diabéticos não tratados (DIOG) e não diabéticos (NIOG) após 30 dias de experimento. Redução nos níveis séricos de HDL-colesterol pode ser observada no DM, devido a uma menor velocidade de síntese desta lipoproteína e aumento na atividade da lipase hepática, assim ocorre um aumento na degradação de HDL (LUDKE; LÓPEZ, 1999). Estudos prévios do nosso laboratório que conduziram experimentos com ratos diabéticos (modelo de diabetes induzido com estreptozotocina) observaram reduções dos níveis de HDL-colesterol em ratos diabéticos não tratados em relação aos ratos normais, não diabéticos (ASSIS et al., 2017; GUTIERRES et al., 2019). No entanto, alguns fatores podem ter influenciado para que os resultados obtidos no presente trabalho não corroborassem os achados obtidos nos estudos prévios, são eles: (i) o período experimental conduzido por Assis et al. (2017) foi de 50 dias, ou seja, um período muito superior ao conduzido neste estudo (30 dias), e (ii) a condição na qual foi obtido o plasma, no estudo realizado por Assis et al. (2017), foi após um jejum prévio de 12 horas, ou seja, uma condição diferente da conduzida neste estudo (sem jejum prévio antes da coleta de sangue). Não foram evidenciadas neste estudo as ações do licopeno na promoção de aumento nos níveis de HDL-colesterol em ratos diabéticos, após 30 dias de tratamento, resultado este diferente do observado em estudo prévio realizado em nosso laboratório, o que também pode ser consequência dos fatores supracitados. Em estudo realizado por Assis et al. (2017), observou-se que animais diabéticos tratados com licopeno, após 50 dias, apresentaram um aumento significativo nos níveis de HDL-colesterol, quando comparados aos animais diabéticos DIOG.

Alguns estudos já demonstraram a atividade benéfica que pode ser alcançada na suplementação com ácido alfa lipoico na regulação do metabolismo de lipídeos e lipoproteínas (SEO; HA; KIM, 2012). O ácido alfa lipóico participa da regulação positiva dos receptores hepáticos de

LDL (AMOM et al., 2008) e aumenta a síntese de apolipoproteína A (apolipoproteína presente na HDL), importante no transporte reverso do colesterol (AMOM et al., 2008; MARANGON et al., 1999). Em uma meta-análise realizada por Akbari e colaboradores (2018), foi concluído que a administração de ácido alfa lipoico pode, de fato, levar a uma melhoria nos parâmetros relacionados a homeostase da glicose e no metabolismo dos lipídeos, exceto nos níveis de HDL-colesterol. No entanto, neste estudo, ao final dos 30 dias de experimento, apenas os grupos experimentais tratados com ácido alfa lipoico (25 ou 50 mg/kg) apresentaram um aumento nos níveis plasmáticos de HDL-colesterol em relação aos ratos NIOG. Levando-se em consideração que o tratamento de ratos diabéticos com ácido alfa lipoico (25 mg/kg) foi efetivo na promoção de aumento na atividade de PON 1, uma potente enzima antioxidante, e no aumento dos níveis de HDL-colesterol, pode-se dizer que o ácido alfa lipoico pode ser útil na prevenção das complicações cardiovasculares relacionadas ao DM. Porém, maiores análises serão necessárias para avaliar o potencial que pode ser alcançado com a suplementação com ácido alfa lipoico, neste cenário de uma disfunção metabólica.

A doença renal diabética (DRC) é uma complicação importante no DM tipo 1, sendo a principal causa de insuficiência renal crônica e doença renal terminal (KOYE et al., 2017). A cronicidade da hiperglicemia provoca a ativação de inúmeros processos patológicos que podem afetar as células do rim (FORBES; COOPER, 2013). Consequentemente, proteinúria com excreção exacerbada de albumina é um sintoma inicial de dano renal no DM (BABU; SRINIVASAN, 1999; KARALLIEDDE; GNUDI, 2008). O termo proteinúria engloba a excreção urinária de albumina e qualquer outro tipo de proteína na urina; já a albuminúria refere-se única e exclusivamente à eliminação urinária de albumina, um importante marcador de lesão glomerular. Mesmo com a filtração glomerular normal, ou seja, em seu perfeito funcionamento, a presença de albuminúria é um indicativo de risco aumentado para a evolução da DRC (ABENSUR, 2004; BASTOS; BREGMAN; KIRSZTAJN, 2010).

O manejo atual da DRC inclui a utilização de abordagens não-farmacológicas e farmacológicas. A abordagem não-farmacológica é baseada no estilo de vida, a qual inclui: modificações na dieta (redução da ingestão de açúcar e sódio), aumento da atividade física, intervenções psicológicas e sociais (DUGBARTEY et al., 2022; LEITE et al., 2020). As intervenções farmacológicas baseiam-se na redução da hiperglicemia com o uso de fármacos antidiabéticos (tal como a insulina, por exemplo), bloqueadores do sistema renina-angiotensina-aldosterona (inibidores da enzima conversora de angiotensina e bloqueadores do receptor de angiotensina II) e bloqueadores dos canais de cálcio (DUGBARTEY et al., 2022; VIVIAN; RUBINSTEIN, 2002). Considerando que esses agentes farmacológicos delongam o desenvolvimento e a progressão da DRC, mas não a reverte ou a impede, há a necessidade de identificar novos agentes farmacológicos, dentre eles os nutracêuticos, e os avanços nos estudos das estratégias de terapias associadas eficazes na atenuação

principalmente do estresse glico-oxidativo, o qual promove efeitos deletérios neste tecido em associação às doenças metabólicas.

No presente estudo, foi observado que ratos DIOG apresentaram um aumento significativo na excreção urinária de albumina e elevação nos níveis plasmáticos de ácido úrico após 30 dias de experimento. Ainda, nestes animais, foram observados valores maiores de massas de rins quando comparados aos animais NIOG, o que pode ser um indicativo de hipertrofia glomerular. O aumento progressivo da hiperglicemia, bem como o aumento do estresse glico-oxidativo nos animais DIOG, em conjunto podem ter sido cruciais para o desenvolvimento de um dano renal. Abtahi-Evari et al. (2017) observaram um aumento no peso dos rins, diâmetro dos glomérulos e quantidade de glomérulos de animais diabéticos (induzidos com 50 mg/kg de STZ) após 20 dias de experimento, corroborando os achados deste estudo, pelo menos no parâmetro tamanho do rim.

Todos os tratamentos realizados neste experimento (insulina 4U/dia ou 1U/dia, licopeno, associação de insulina 1U/dia + licopeno, ácido alfa lipoico, associação de insulina 1U/dia + ácido alfa lipoico nas doses de 25 ou 50 mg/kg) foram efetivos na promoção de redução na excreção urinária de albumina, bem como na diminuição dos níveis de ácido úrico no plasma. No entanto, foi evidenciado neste estudo que ratos diabéticos tratados com as associações de insulina 1U/dia + licopeno (45 mg/kg) ou com insulina 1U/dia + ácido alfa lipoico (25 ou 50 mg/kg) apresentaram uma redução da albuminúria mais efetiva do que aquela promovida pelos tratamentos isolados. Portanto, foi evidenciado o poder benéfico das terapias combinadas na proteção da integridade glomerular renal e consequentemente, proteção contra a doença renal diabética.

Os mecanismos pelos quais o ácido alfa lipoico exerce seus efeitos benéficos no tecido renal ainda não são totalmente elucidados, mas provavelmente envolve o estímulo de vias como PI3K/Akt/Nrf2 e PI3K/AKT (SKIBSKA et al., 2023; ZHANG; MCCULLOUGH, 2016). PI3K são uma família de enzimas envolvidas na sobrevivência celular. Nrf2 é um fator de transcrição que atua como um “sensor” de estresse oxidativo e um importante regulador dos mecanismos de defesas antioxidantes via modulação da transcrição de mais de 200 genes citoprotetores (LAKSHMI et al., 2023). É válido ressaltar que o ácido alfa lipoico exerce seus efeitos tanto na membrana plasmática quanto no citosol das células, devido ao seu perfil anfifílico (ZIEGLER et al., 2022). Assim, devido às suas características antioxidantes e antiinflamatórias, o ácido alfa lipoico é um bioativo interessante para as estratégias terapêuticas que visem a prevenção de danos renais associados às complicações do DM.

O aumento das EROs, juntamente com as deficiências nos sistemas antioxidantes, pode causar danos significativos nos rins em cenários de estresse oxidativo, contribuindo para o estabelecimento de inflamação e fibrose renal (JHA et al., 2016). No presente trabalho, foi observado um aumento significativo nos níveis de TBARS, juntamente com uma diminuição nas atividades das enzimas

antioxidantes (SOD e CAT) nos rins dos ratos DIOG, indicando que este órgão foi, de fato, acometido e prejudicado pela instalação do estresse oxidativo devido ao diabetes.

Normalmente, intervenções benéficas no combate do estresse oxidativo, em modelos experimentais de patologias, tendem a aumentar as atividades das enzimas antioxidantes, especialmente quando esta intervenção é baseada em um bioativo antioxidante de origem natural (FIGUEIREDO et al., 2020; MOTTA et al., 2022; TABREZ; AL-SHALI; AHMAD, 2015). Estudos anteriores já demonstraram que o licopeno tem efeito benéfico ao atenuar a nefropatia via aumento na expressão de fator nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2) em modelo experimental de nefrotoxicidade induzido por arsênio (RAMADAN et al., 2022). O Nrf2 é um importante fator de transcrição que controla a expressão gênica de diversas enzimas antioxidantes (AL OLAYAN et al., 2020). Além disto, a ativação de Nrf2 nos túbulos renais atenua o dano tubular e a fibrose intersticial ao induzir a expressão de genes relacionados à citoproteção contra o estresse oxidativo e, conseqüentemente, relaciona-se com a melhoria de nefropatia diabética e doenças renais crônicas (CUI et al., 2017; NEZU; SUZUKI, 2020). A ação benéfica do licopeno em aumentar o potencial antioxidante renal, incluindo as enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GSH-Px) através do aumento da expressão de Nrf2 já foi demonstrada por Yu e colaboradores (2018). Ainda, um efeito antioxidante mais potente exercido pelo licopeno em comparação ao efeito da cafeína foi demonstrado em um modelo experimental de isquemia renal (ŞAYLAN et al., 2021), onde observou-se que o licopeno promoveu uma maior redução nos níveis de TBARS e um maior aumento das enzimas antioxidantes, incluindo SOD e GSH-Px, em relação à cafeína. Figueiredo e colaboradores (2020) observaram um aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px nos rins de ratos diabéticos (induzidos com 40 mg/kg de STZ) e tratados com licopeno (45 mg/kg). Ainda, neste mesmo contexto, Motta e colaboradores (2022) também observaram aumentos das atividades de SOD, CAT e GSH-Px em camundongos submetidos ao modelo experimental de obesidade e resistência à insulina e tratados com licopeno (45 mg/kg). No entanto, no presente estudo, não foram observados aumentos nas atividades das enzimas antioxidantes e nem diminuição nos níveis de TBARS nos rins de ratos diabéticos tratados com licopeno. Tal ausência de efeito do licopeno pode ser explicada pelos altos níveis glicêmicos apresentados pelos ratos diabéticos tratados somente com licopeno, durante todo o período experimental ($\cong 375$ mg/dL), o que pode favorecer processos de glicação em enzimas antioxidantes nos rins de ratos diabéticos. Por outro lado, ao associar insulina 1U/dia + licopeno, foi observado um melhor efeito da terapia combinada na promoção de aumento nas atividades de SOD e CAT nos rins quando comparados aos ratos DIOG, DI1U e DLIC, bem como uma maior redução dos níveis de TBARS quando comparados aos ratos DIOG e DLIC.

O aumento na produção de EROs ocasionado pelo estresse oxidativo impacta de maneira importante na patogênese e progressão das complicações relacionadas ao DM, incluindo a doença

renal diabética (MORCOS et al., 2001). Como dito anteriormente, a superprodução de EROs em um cenário de hiperglicemia ocorre via alguns mecanismos, tais como: aumento da produção de AGEs, ativação da proteína quinase C, aumento do fluxo de vias do poliol e da hexosamina, ativação do fator nuclear kappa B (NFkB) (DUGBARTEY et al., 2022); todas essas vias culminam em exacerbação do estresse oxidativo. Assim, o estresse oxidativo causa lesão glomerular, disfunção microvascular, lesão tubular e, conseqüentemente, leva a lesão renal aguda (ALOBAIDI et al., 2015; RIMMELÉ et al., 2016; SKIBSKA et al., 2023). Estudos realizados por Peerapornratana et al. (2019) e Ow et al. (2021) demonstraram que o estresse oxidativo estimula a apoptose em células epiteliais renais, o que ocasiona a insuficiência renal. Portanto, estratégias terapêuticas que combatam o estresse glicoxidativo nos rins podem ser importantes para a prevenção e até mesmo desaceleração da progressão da DRC, uma complicação grave e importante relacionada ao DM.

No presente estudo, foram demonstradas as ações benéficas do ácido alfa lipoico na promoção de aumento das atividades das enzimas antioxidantes, tais como SOD, CAT e GSH-Px, nos rins dos ratos diabéticos. Após 30 dias de tratamento, foi possível observar que ratos DAL50 apresentaram um aumento na atividade de SOD nos rins, em magnitude maior do que o efeito promovido pelo tratamento com insulina 1U/dia. Adicionalmente, em animais DAL50, também foram observados aumentos nas atividades de CAT e GSH-Px nos rins de ratos diabéticos. Vale destacar que o aumento da atividade de GSH-Px promovida pelo tratamento com ácido alfa lipoico (50 mg/kg) foi maior do que os promovidos pelos tratamentos com insulina (4U/dia ou 1U/dia). Em estudo realizado por Wang e colaboradores (2013), sugeriu-se que o ácido alfa lipoico, ao atuar como um cofator para os complexos multienzimáticos mitocondriais, este pode influenciar no status antioxidante, ou seja, diminuindo a produção de EROs e aumentando as defesas celulares através da ativação de outros antioxidantes bem como de cofatores importantes no funcionamento de enzimas antioxidantes, como a GSH. Assim, todos esses mecanismos podem contribuir para atenuar o estresse oxidativo, protegendo as células renais contra os efeitos deletérios das EROs.

Tanto a geração de AGEs *per se* (danificando biomoléculas) quanto a sua interação com os receptores RAGE desencadeiam mecanismos celulares e moleculares que participam dos eventos patológicos relacionados à nefropatia diabética, tais como: alteração da função renal, espessamento da membrana basal e mesangial, indução da inflamação e fibrose, podocitopatia e mesangiopatia, entre outros (KUMAR; CHITRA; REDDY, 2016). Por outro lado, além dos sistemas endógenos que eliminam os precursores de AGEs, existe também o complexo AGER 1, envolvido na endocitose de proteínas modificadas por AGEs. No rim, sua expressão está diminuída em certas patologias, incluindo o DM (KUMAR; CHITRA; REDDY, 2016; OTT et al., 2014). Assim que este receptor é ativado, ocorre um aumento na velocidade de remoção dos AGEs, uma vez que ele promove a endocitose e a degradação de proteínas modificadas por AGEs. Portanto, AGER 1 possui um papel

protetor contra as agressões mediadas pelo estresse glico-oxidativo, e assim pode prevenir lesões celulares e teciduais no diabetes. Outro sistema importante na detoxificação dos AGEs é o sistema da glioxalase, o qual consiste nas atividades de duas enzimas, glioxalase 1 e glioxalase 2; este sistema é responsável por eliminar α -oxaldeídos, principalmente o metilglioxal, um dos compostos dicarbonílicos gerados de maneira exacerbada em condições de hiperglicemia (especialmente a partir de trioses fosfato) e que atuam como precursores na geração de AGEs (KUMAR; CHITRA; REDDY, 2016; OTT et al., 2014).

O rim é o maior local de detoxificação dos AGEs, porém os mecanismos pelos quais ocorre a eliminação dos AGEs ainda são incertos. Estudos demonstram que proteínas modificadas por AGEs são inicialmente endocitadas, para posteriormente serem filtradas e excretadas (ZHUANG et al., 2019). Surpreendentemente, ratos DIOG apresentaram uma diminuição nos níveis de AGEs nos rins, quando comparados aos ratos NIOG. No entanto, mesmo com menores níveis renais de AGEs, a função renal dos ratos DIOG foi comprometida, uma vez que foram nitidamente maiores os níveis de albuminúria (sugerindo injúria renal) e de ácido úrico no plasma (sugerindo disfunção renal), em relação aos valores observados nos ratos NIOG.

O receptor AGER-1 é expresso em podócitos e células mesangiais nos rins e participa da endocitose e degradação de AGEs, facilitando a eliminação de AGEs na urina (ZHUANG et al., 2019). Ratos DIOG apresentaram uma redução significativa na expressão de componentes que participam das maquinarias de detoxificação de AGEs e seus precursores, incluindo AGER 1 e GLO 1 nos rins, indicando que a eliminação dos AGEs e seus precursores neste tecido possa estar comprometida.

Um interessante achado deste estudo é o potencial benéfico da terapia combinada entre insulina 1U/dia + licopeno em mitigar o estresse glicativo no rim de ratos diabéticos, através do aumento na expressão de componentes envolvidos na maquinaria de detoxificação dos AGEs. Em ratos DI1U+LIC, foi observado um significativo aumento nos níveis proteicos de AGER-1 e de GLO 1 nos rins, reiterando o potencial benéfico da terapia combinada entre insulina 1U/dia + licopeno no combate às complicações diabéticas, principalmente aquelas que impactam os rins morfolologicamente e funcionalmente. Carotenoides são conhecidos por mitigar o estresse glico-oxidativo (TOPRAK; DEDEOĞLU, 2022), mais especificamente em aumentar a expressão de proteínas envolvidas na detoxificação dos AGEs, tanto em modelo de DM tipo 1 (LIN et al., 2014), modelo de DM tipo 2 (YIN; ZHENG; JIANG, 2019) em modelo de obesidade e resistência à insulina (NI et al., 2015).

Outro achado interessante do presente estudo foi o potencial benéfico da terapia combinada entre insulina 1U/dia + ácido alfa lipoico em mitigar o estresse glicativo no rim de ratos diabéticos, através do aumento na expressão de componentes envolvidos na maquinaria de detoxificação dos AGEs, assim como observado na terapia DI1U + licopeno. Em ratos DI1U + AL25, foi observado

um aumento significativo e expressivo nos níveis proteicos de AGER-1 e GLO 1 nos rins de ratos diabéticos. Estes achados, conjuntamente com os aumentos das atividades das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GSH-Px) e diminuição nos níveis de TBARS e AGEs fluorescentes no rim, reiteram o potencial benéfico da terapia combinada de insulina 1U/dia + ácido alfa lipoico (especialmente na dose de 25 mg/kg) no combate aos efeitos deletérios observados nos rins em um quadro de DM tipo 1.

Mastrocola e colaboradores (2016) observaram que a elevada ingestão de frutose provoca um acúmulo de AGEs em neurônios do hipocampo relacionado à atividade prejudicada de GLO 1, e isso foi associado à disfunção mitocondrial e estresse oxidativo devido à inibição do fator Nrf2. As ações benéficas na ativação do Nrf2 promovidas pelo ácido alfa lipoico já são descritas por Sena e colaboradores (2018). Assim, o ácido alfa lipoico, ao ativar o Nrf2, promove um aumento na expressão de genes relacionados às enzimas antioxidantes, tais como SOD, CAT, e aumenta a capacidade de restauração da molécula de GSH, cofator da enzima GSH-Px.

Interessantemente, foi observado que o tratamento de ratos diabéticos com a menor dose de ácido alfa lipoico (25 mg/kg) + 1U/dia de insulina foi muito mais efetivo do que o tratamento com a combinação 1U/dia de insulina + ácido alfa lipoico em maior dose (50 mg/kg), no que diz respeito aos marcadores envolvidos na maquinaria de detoxificação dos AGEs (AGER-1 e GLO 1). Estudos realizados em roedores sugerem que 20% a 40% do ácido alfa lipoico administrado por via oral é absorvido no plasma (SHAY et al., 2009). Os níveis plasmáticos de ácido alfa lipoico normalmente atingem os níveis máximos entre 0,5 e 2 horas após a ingestão, em uma variedade de espécies animais estudadas (SMITH et al., 2004).

O rápido transporte gastrointestinal do ácido alfa lipoico para o plasma sanguíneo é seguido por uma eliminação igualmente rápida, refletindo tanto a captação pelos tecidos (fígado, cérebro, coração e músculo esquelético) quanto a filtração glomerular e a excreção renal (SHAY et al., 2009). Além disso, já foi descrito que o efeito exercido pelo ácido alfa lipoico depende da dose administrada. Em um estudo foi demonstrado que o lipoato, metabólito do ácido alfa lipoico, em baixas concentrações (1 mol/L), apresentou um efeito proliferativo (aumentando a taxa de proliferação celular), ao passo que em elevadas concentrações (100 mol/L), exibiu um efeito antiproliferativo (BILSKA; WŁODEK, 2005; DOVINOVÁ et al., 1999). Tal fato foi observado no presente estudo em relação aos efeitos promovidos pela menor dose de ácido alfa lipoico: ratos diabéticos tratados com a associação de insulina + ácido alfa lipoico na menor dose (25 mg/kg) apresentaram maiores níveis proteicos de AGER-1 e GLO 1, em comparação aos efeitos da associação de insulina + ácido alfa lipoico em maior dose (50 mg/kg).

Foi demonstrado, no presente estudo, que os ratos diabéticos tratados com ambas as doses de ácido alfa lipoico (50 ou 25 mg/kg) apresentaram reduções nos níveis de AGEs fluorescentes no rim,

após 30 dias de tratamento. De acordo com o estudo desenvolvido por Ghelani e colaboradores (2018), foi demonstrado que o ácido alfa lipoico protege a mioglobina contra a glicação mediada pela glicose *in vitro*, através da inibição das reações de glicação iniciais e intermediárias que antecedem a formação de AGEs. Esta ação promissora do ácido alfa lipoico no combate à formação dos AGEs fluorescentes ocorre por via de alguns mecanismos, os quais incluem: (i) bloqueio dos grupos amino das proteínas (principais sítios de glicação nas proteínas), evitando assim sua glicação com monossacarídeos ou compostos dicarbonílicos; (ii) bloqueio dos grupos carbonila de monossacarídeos redutores; (iii) prevenção na formação dos produtos de Amadori; (iv) prevenção nos processos de autooxidação da glicose e de glicoxidação dos produtos de Amadori (GHELANI et al., 2018). Vale destacar que as ações “*anti-AGEs*” associadas ao ácido alfa lipoico (50 ou 25 mg/kg) foram observadas no plasma, rins e fígado, após 30 dias de tratamento.

Um importante benefício observado no tratamento com a terapia combinada entre ácido alfa lipoico (50 ou 25 mg/kg) + insulina 1U/dia foi seu potencial em mitigar processos de peroxidação lipídica, os quais podem induzir danos celulares, tais como a apoptose ou necrose (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014). Estudo realizado por Dalazen e colaboradores (2014), foram investigados os efeitos deletérios *in vitro* do ácido pipecólico sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo (níveis de TBARS e atividades de enzimas antioxidantes SOD, CAT, GSH, Px, GST) e avaliada a eficácia do ácido alfa lipoico contra possíveis efeitos pró-oxidantes do ácido pipecólico no córtex cerebral de ratos com 14 dias de vida. Neste estudo, o agente pró-oxidante, ácido pipecólico, foi utilizado como um agente promotor de estresse oxidativo. Neste contexto, um aumento na produção de H_2O_2 é capaz de induzir a peroxidação lipídica e produzir o radical hidroxila, extremamente reativo, e que pode atacar lipídeos das membranas celulares (NECHIFOR; NEAGU; MANDA, 2009). Os resultados obtidos por Dalazen e colaboradores (2014) demonstraram o efeito benéfico e promissor do ácido alfa lipoico na prevenção da peroxidação lipídica, e os autores relacionaram este efeito ao fato de o ácido alfa lipoico e seu metabólito, ácido dihidrolipoico, serem capazes de (i) eliminar radicais livres que são responsáveis por desencadear o processo de peroxidação lipídica, e (ii) quelar íons metálicos que participam nas reações de geração de espécies reativas. Por fim, os resultados obtidos neste presente trabalho corroboram, pelo menos em parte, os achados de Dalazen et al. (2014), uma vez que encontramos que os processos de peroxidação lipídica (monitorados via níveis de TBARS) foram diminuídos com a utilização do ácido alfa lipoico em ratos diabéticos, após 30 dias de tratamento.

O fígado exerce papel crucial em uma série de processos vitais, incluindo regulação do metabolismo energético, armazenamento de glicose na forma de glicogênio, síntese de lipídeos, síntese de proteínas séricas, além de desempenhar papel fundamental na regulação dos níveis glicêmicos. Danos hepatocelulares causam a liberação, para a circulação, das enzimas alanina e

aspartato aminotransferases (ALT e AST, respectivamente); por isso, as atividades destas enzimas no plasma são utilizadas como indicadores de dano nos hepatócitos. Em muitas doenças, incluindo o DM, biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo estão aumentados no fígado já em estágios iniciais da doença, e tais alterações podem contribuir para o início e a progressão de lesões hepáticas, as quais são caracterizadas pelo aumento nas taxas de liberação das enzimas hepáticas, incluindo ALT, AST, ALP e γ -GT (γ -glutamyl transferase). Outras consequências danosas podem ser observadas no fígado durante processos patológicos, especialmente aquelas relacionadas às disfunções metabólicas, e que incluem acúmulo de TBARS e AGEs, e diminuição nas atividades de enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px (LI et al., 2015; MOHAMED et al., 2016).

Neste presente estudo, ratos DIOG apresentaram níveis plasmáticos de ALT e ALP expressivamente aumentados em relação aos valores observados em ratos não diabéticos. Contudo, o tratamento de ratos diabéticos com as associações: ácido alfa lipoico (50 mg/kg) + insulina (1U/dia) e ácido alfa lipoico (25 mg/kg) + insulina (1U/dia) promoveram reduções nos níveis de ALT, em magnitude maior do que os efeitos promovidos pelos tratamentos com o ácido alfa lipoico sozinho (50 ou 25 mg/kg). Ademais, ratos DI1U+AL50 apresentaram uma redução significativa nos níveis de AGEs hepáticos, em comparação aos ratos diabéticos tratados somente com 1U/dia de insulina ou somente com 50 mg/kg de ácido alfa lipoico. Tais efeitos benéficos das terapias combinadas no combate ao estresse oxidativo no fígado podem ter contribuído para a diminuição nos níveis circulantes de ALT, demonstrando que a terapia combinada foi efetiva na prevenção da injúria hepática associada ao DM.

Diferente dos resultados encontrados no plasma e nos rins, ratos diabéticos DIOG apresentaram, no fígado, níveis de TBARS inferiores aos encontrados em fígado de animais NIOG. Em um trabalho realizado por Bukan e colaboradores (2003), ressaltou-se a importância da cronicidade de uma doença no encontro de aumento nos níveis de TBARS no fígado. Neste estudo, foi demonstrado que ratos diabéticos, após 24 semanas, apresentavam níveis maiores de TBARS no fígado, em relação aos ratos diabéticos com 8 semanas. Os autores explicam que tal fato pode estar associado ao período maior de diabetes experimental, pois os ratos diabéticos com 24 semanas de apresentam níveis maiores de TBARS no fígado. O período experimental no presente estudo consistiu em 4 semanas, ou seja, período inferior (8 e 24 semanas) ao analisado em trabalho realizado por Bukan et al., (2003) o que pode não ter sido suficiente para impactar em alterações nos níveis de TBARS no fígado de ratos diabéticos. Talvez um estudo experimental com um tempo de DM mais longo deva ser realizado, para analisar as alterações nos níveis de TBARS hepáticos.

O estabelecimento do DM é acompanhado, principalmente, pelo desenvolvimento de anormalidades bioquímicas e funcionais no fígado, incluindo prejuízos associados ao estresse oxidativo (SEIFALIAN et al., 2001; ZUWAŁA-JAGIEŁŁO et al., 2011). Além disto, a formação

exacerbada e o acúmulo de AGEs em diversos tecidos ocorre de forma extremamente acelerada no DM (HYOGO; YAMAGISHI, 2008). O aumento na geração de AGEs contribui para o estímulo de vias inflamatórias, prejuízos na sinalização da insulina e disfunção do metabolismo hepático (KAUL; APOSTOLOPOULOU; RODEN, 2015). O fígado, bem como os rins, exerce um papel importante na eliminação dos AGEs, portanto em condições em que ocorram danos hepáticos, pode haver o acúmulo de AGEs, favorecendo as consequências deletérias destes produtos avançados da glicação (ŠEBEKOVÁ et al., 2001; ZUWAŁA-JAGIEŁŁO et al., 2011). Além das agressões ao fígado promovidas pelo estresse glico-oxidativo, a resistência insulínica, característica do DM tipo 2, pode contribuir para o desenvolvimento de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA); pode haver progressão para esteatohepatite não alcoólica, cirrose e carcinoma hepatocelular (MOHAMED et al., 2016).

A neutralização das ações deletérias de EROs pode ocorrer via atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT. Além disso, no DM, pode-se observar que, além de uma exacerbada produção de EROs, ocorre um aumento nos processos glicativos das enzimas SOD e CAT, consequentemente ocorre diminuição de suas atividades e assim menor eficácia no combate às EROs (VINCENT; FELDMAN, 2004). Os efeitos antioxidantes do ácido alfa lipoico já são descritos (STANKOVIĆ et al., 2014) e essas ações benéficas também foram observadas no fígado, neste estudo. Morakinyo e colaboradores (2013) relataram que o tratamento com ácido alfa lipoico exerceu uma potente proteção antioxidativa no fígado e nos rins contra danos celulares induzidos por EROs, em ratos em modelo de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade.

Os efeitos antioxidantes do ácido alfa lipoico podem ocorrer potencialmente devido à sua inibição direta das espécies reativas (tal como o peroxinitrito), ao invés de promoção de aumento nas atividades das enzimas antioxidantes, tais como SOD e CAT (STANKOVIĆ et al., 2014). Não foram observados aumentos nas atividades de SOD e CAT em ratos diabéticos tratados apenas com ácido alfa lipoico (50 ou 25 mg/kg), neste estudo. Contudo, Moini e colaboradores (2002) relataram uma potente ação benéfica do ácido alfa lipoico em ativar o Nrf2, um fator de transcrição envolvido no aumento da expressão de enzimas antioxidantes. As ações da terapia combinada entre ácido alfa lipoico (50 ou 25 mg/kg) + insulina (1U/dia) foram mais expressivas: houve aumento nas atividades de SOD e CAT no fígado de ratos diabéticos, demonstrando que o ácido alfa lipoico ao aumentar a atividade das enzimas antioxidantes (SOD e CAT), pode diminuir indiretamente a produção de EROs, ao passo que a insulina, ao reduzir os níveis glicêmicos, pode estar diminuindo os processos glicativos que podem afetar as atividades destas enzimas e, consequentemente, a capacidade antioxidante endógena.

7. CONCLUSÕES

Estratégias terapêuticas baseadas na combinação de bioativos naturais com fármacos já utilizados na prática clínica estão em evidência. Este presente estudo fornece evidências acerca do potencial benéfico de terapias combinadas entre insulina em uma menor dose e compostos bioativos de origem natural, os antioxidantes licopeno e ácido alfa lipoico, em um sistema-modelo *in vivo* de DM tipo 1. Sabendo-se da dificuldade da escolha e da adequação da dose de insulina no tratamento do DM tipo 1 com vistas a evitar os efeitos indesejados da insulinização crônica (episódios de hipoglicemia, ganho de massa corporal, aumento do estresse oxidativo) e principalmente evitar a “memória metabólica”, este estudo permite reunir evidências iniciais dos benefícios de estratégias terapêuticas eficazes no controle da glicemia e no combate ao estresse glico-oxidativo, o qual tem papel importante no estabelecimento das complicações do DM.

Na primeira etapa do trabalho, foram demonstradas as ações benéficas da terapia combinada **insulina 1U/dia + licopeno**, principalmente na redução da glicemia pós-prandial de ratos diabéticos. Levando-se em consideração que a hiperglicemia em longo prazo promove o estresse glico-oxidativo, observou-se redução nos biomarcadores de estresse glico-oxidativo (TBARS e AGEs fluorescentes) e aumento nas atividades das enzimas antioxidantes (PON 1, plasma).

Na segunda etapa do trabalho, foram demonstradas as ações benéficas da terapia combinada **insulina 1U/dia + ácido alfa lipoico**. Foi observada redução na glicemia pós-prandial (principalmente no tratamento com insulina 1U/dia + 50 mg/kg ácido alfa lipoico, o que diminuiu todos os marcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo no plasma, fígado e rins.

Atenuação ou prevenção da nefropatia diabética também foi observada no tratamento com insulina 1U/dia + licopeno, uma vez que houve uma diminuição nos níveis de TBARS, aumento das enzimas antioxidantes (SOD e CAT), aumento nos componentes que atuam na detoxificação dos AGEs (AGER-1 e GLO 1), além da preservação da integridade renal (diminuição da excreção urinária de albumina). Destaca-se que terapia combinada insulina 1U/dia + 25 mg/kg ácido alfa lipoico tem grande potencial em aumentar os sistemas de detoxificação de AGEs nos rins.

Desta forma, podemos considerar que ambas as terapias combinadas “insulina 1U/dia + licopeno” e “insulina 1U/dia + ácido alfa lipoico” promovem uma diversidade de efeitos benéficos em biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo em animais diabéticos, surgindo como opções promissoras não somente no controle da glicemia, mas também na atenuação das complicações do DM, especialmente aquelas que impactam fígado e rins.

8. REERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABENSUR, H. DIRETRIZES BRASILEIRAS DE DOENÇA RENAL CRÔNICA. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 26, n. 1, p. S1–S49, 2004.
- ABTAHI-EVARI, S. et al. Protective effect of Galega officinalis extract on streptozotocin-induced kidney damage and biochemical factor in diabetic rats. **Journal of Medical and Biological Sciences**, v. 4, p. 108–114, 2017.
- ADIGA, U.; BANAWALIKAR, N.; MENAMBATH, D. T. Association of paraoxonase 1 activity and insulin resistance models in type 2 diabetes mellitus: Cross-sectional study. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 85, n. 1, p. 77–80, 2022.
- AHMED, N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 67, n. 1, p. 3–21, 2005.
- AKBARI, M. et al. The effects of alpha-lipoic acid supplementation on inflammatory markers among patients with metabolic syndrome and related disorders: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutrition & Metabolism**, v. 15, n. 1, p. 39, 2018.
- AKOUMIANAKIS, I. et al. Insulin-induced vascular redox dysregulation in human atherosclerosis is ameliorated by dipeptidyl peptidase 4 inhibition. **Science Translational Medicine**, v. 12, n. 541, 2020.
- AL OLAYAN, E. M. et al. Protocatechuic acid mitigates cadmium-induced neurotoxicity in rats: Role of oxidative stress, inflammation and apoptosis. **Science of The Total Environment**, v. 723, p. 137969, 2020.
- ALI, M. M.; AGHA, F. G. Amelioration of streptozotocin-induced diabetes mellitus, oxidative stress and dyslipidemia in rats by tomato extract lycopene. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 69, n. 3, p. 371–379, 2009.
- ALBAIDI, R. et al. Sepsis-Associated Acute Kidney Injury. **Seminars in Nephrology**, v. 35, n. 1, p. 2–11, 2015.
- AMOM, Z. et al. Lipid Lowering Effect of Antioxidant Alpha-Lipoic Acid in Experimental Atherosclerosis. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 43, n. 2, p. 88–94, 2008.
- ANDERSSON, U. et al. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 12005–12008, 2004.
- ARCARO, C. A. et al. Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic rats. **PloS One**, v. 9, n. 12, 2014.
- ARORA, R.; VIG, A.; ARORA, S. Lipid Peroxidation: A Possible Marker for Diabetes. **Journal of Diabetes & Metabolism**, 2012.
- ASADIPOOYA, K.; UY, E. M. Advanced Glycation End Products (AGEs), Receptor for AGEs, Diabetes, and Bone: Review of the Literature. **Journal of the Endocrine Society**, v. 3, n. 10, p. 1799–1818, 2019.
- ASSIS, R. P. et al. 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. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, 2017.
- AUGUSTINE, J. et al. The Role of Lipoxidation in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 621938, 2021.
- AVIRAM, M. et al. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. **Circulation**, v. 101, n. 21, p. 2510–2517, 2000.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.
- BABU, P.; SRINIVASAN, K. Renal lesions in streptozotocin-induced diabetic rats maintained on onion and capsaicin containing diets. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, n. 8, p. 477–483, 1999.
- BAKER, J. R. et al. Use of protein-based standards in automated colorimetric determinations of fructosamine in serum. **Clinical Chemistry**, v. 31, n. 9, p. 1550–1554, 1985.
- BANBA, N. et al. Possible relationship of monocyte chemoattractant protein-1 with diabetic nephropathy. **Kidney International**, v. 58, n. 2, p. 684–690, 2000.
- BANIHANI, S. A. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and type 2 diabetes. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1439959>, v. 21, n. 1, p. 114–120, 2018.
- BARNETT, A. H. et al. Saxagliptin Add-on Therapy to Insulin With or Without Metformin for Type 2 Diabetes Mellitus: 52-Week Safety and Efficacy. **Clinical Drug Investigation**, v. 33, n. 10, p. 707–717, 2013.
- BASHIR, S. O. Concomitant administration of resveratrol and insulin protects against diabetes mellitus type-1-induced renal damage and impaired function via an antioxidant-mediated mechanism and up-regulation of Na⁺/K⁺-ATPase. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 125, n. 2, p. 104–113, 2019.
- BASTOS, M. G.; BREGMAN, R.; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 2, p. 248–253, 2010.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276–287, 1971.
- BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 195, n. 1, p. 133–40, 1952.

- BEREZIN, A. Metabolic memory phenomenon in diabetes mellitus: Achieving and perspectives. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 10, n. 2, p. S176–S183, 2016.
- BHABAK, K. P.; MUGESH, G. Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants. **Accounts of Chemical Research**, v. 43, n. 11, p. 1408–1419, 2010.
- BIERHAUS, A. et al. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. **Cardiovascular Research**, v. 37, n. 3, p. 586–600, 1998.
- BILSKA, A.; WŁODEK, L. Lipoic acid - the drug of the future? **Pharmacological Reports : PR**, v. 57, n. 5, p. 570–7, 2005.
- BOWERS, G. N. et al. High-purity 4-nitrophenol: purification, characterization, and specifications for use as a spectrophotometric reference material. **Clinical Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 135–143, 1981.
- BRAZIL, D. P.; YANG, Z.-Z.; HEMMINGS, B. A. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 29, n. 5, p. 233–242, 2004.
- BROWN, J. C.; HARHAY, M. O.; HARHAY, M. N. The Value of Anthropometric Measures in Nutrition and Metabolism: Comment on Anthropometrically Predicted Visceral Adipose Tissue and Blood-Based Biomarkers: A Cross-Sectional Analysis. **Nutrition and Metabolic Insights**, v. 12, 2019.
- BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615–1625, 2005.
- BUDIN, S. B. et al. Effect of alpha lipoic acid on oxidative stress and vascular wall of diabetic rats. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 50, n. 1, p. 23–30, 2009.
- BUKAN, N. et al. Lipid peroxidation and scavenging enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 40, n. 6, p. 447–50, 2003.
- BUSBY, R. W. et al. Lipoic acid biosynthesis: LipA is an iron-sulfur protein. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 19, p. 4706–4707, 1999.
- BUSTAMANTE, J. α -Lipoic Acid in Liver Metabolism and Disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 6, p. 1023–1039, 1998.
- BUTSCHEID, M. et al. Hepatic expression of galectin-3 and receptor for advanced glycation end products in patients with liver disease. **Journal of Clinical Pathology**, v. 60, n. 4, p. 415–418, 2007.
- CAHN, A.; CEFALU, W. T. Clinical Considerations for Use of Initial Combination Therapy in Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 39 Suppl 2, n. Suppl 2, p. S137–S145, 2016.
- CAI, Z.; YANG, Y.; ZHANG, J. A systematic review and meta-analysis of the serum lipid profile in prediction of diabetic neuropathy. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–20, 2021.
- CAPECE, U. et al. Alpha-Lipoic Acid and Glucose Metabolism: A Comprehensive Update on Biochemical and Therapeutic Features. **Nutrients**, v. 15, n. 1, 2022.
- CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Interações Sinérgicas em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 575–595, 2017.
- CEFALI, L. C. et al. Tomate Salada: Uma Alternativa como Fonte de Antioxidante para Uso Tópico. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 4, p. 589–593, 2009.
- CERIELLO, A. et al. Evidence That Hyperglycemia After Recovery From Hypoglycemia Worsens Endothelial Function and Increases Oxidative Stress and Inflammation in Healthy Control Subjects and Subjects With Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 61, n. 11, p. 2993–2997, 2012.
- CERIELLO, A.; IHNAT, M. A.; THORPE, J. E. Clinical review 2: The “metabolic memory”: is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 2, p. 410–415, 2009.
- CHEN, H. et al. Advanced glycation end products increase carbohydrate responsive element binding protein expression and promote cancer cell proliferation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 395, n. 1–2, p. 69–78, 2014.
- CHISTIYAKOV, D. A. et al. Paraonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. **Biochimie**, v. 132, p. 19–27, 2017.
- CHIVA-BLANCH, G. et al. The Mediterranean diet decreases prothrombotic microvesicle release in asymptomatic individuals at high cardiovascular risk. **Clinical nutrition**, v. 39, n. 11, p. 3377–3384, 2020.
- CIRANO, F. R. et al. Resveratrol and insulin association reduced alveolar bone loss and produced an antioxidant effect in diabetic rats. **Journal of Periodontology**, v. 92, n. 5, p. 748–759, 2021.
- COMMITTEE, A. D. A. P. P. 7. Diabetes Technology: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. **Diabetes Care**, v. 45, n. Supplement_1, p. S97–S112, 2022.
- COSTA, L. G. et al. Serum paraonase and its influence on paraon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 103, n. 1, p. 66–76, 1990.
- COSTA, M. C. et al. 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. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 76, 2020.
- COSTANTINO, S. et al. Impact of Glycemic Variability on Chromatin Remodeling, Oxidative Stress, and Endothelial Dysfunction in Patients With Type 2 Diabetes and With Target HbA1c Levels. **Diabetes**, v. 66, n. 9, p. 2472–2482, 2017.
- CRUZ-PINEDA, W. D. et al. The regulatory role of insulin in energy metabolism and leukocyte functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 111, n. 1, p. 197–208, 2022.

- CRYER, P. E. Severe hypoglycemia predicts mortality in diabetes. **Diabetes care**, v. 35, n. 9, p. 1814–1816, set. 2012.
- CRYER, P. E. Mechanisms of hypoglycemia-associated autonomic failure and its component syndromes in diabetes. **Diabetes**, v. 54, n. 12, p. 3592–3601, 2013.
- CRYER, P. E. Glycemic goals in diabetes: trade-off between glycemic control and iatrogenic hypoglycemia. **Diabetes**, v. 63, n. 7, p. 2188–2195, 2014.
- CUI, W. et al. Role of Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 in Diabetic Nephropathy. **Journal of Diabetes Research**, v. 2017, p. 1–14, 2017.
- DALAZEN, G. R. et al. Pipelicolic acid induces oxidative stress in vitro in cerebral cortex of young rats and the protective role of lipoic acid. **Metabolic Brain Disease**, v. 29, n. 1, p. 175–183, 2014.
- DE GEEST, B.; MISHRA, M. Role of Oxidative Stress in Diabetic Cardiomyopathy. **Antioxidants**, v. 11, n. 4, 2022.
- DEUTSCH, A. J.; AHLQVIST, E.; UDLER, M. S. Phenotypic and genetic classification of diabetes. **Diabetologia**, v. 65, n. 11, p. 1758–1769, 2022.
- DHAM, D. et al. 4-Hydroxy-2-nonenal, a lipid peroxidation product, as a biomarker in diabetes and its complications: challenges and opportunities. **Free Radical Research**, v. 55, n. 5, p. 547–561, 2021.
- DIESEL, B. et al. Alpha-lipoic acid as a directly binding activator of the insulin receptor: protection from hepatocyte apoptosis. **Biochemistry**, v. 46, n. 8, p. 2146–2155, 2007.
- DORCELY, B. et al. Novel biomarkers for prediabetes, diabetes, and associated complications. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 10, p. 345–361, 2017.
- DOVINOVA, I. et al. Combined effect of lipoic acid and doxorubicin in murine leukemia. **Neoplasma**, v. 46, n. 4, p. 237–41, 1999.
- DUGBARTEY, G. J. et al. Supplementation of conventional anti-diabetic therapy with alpha-lipoic acid prevents early development and progression of diabetic nephropathy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 149, 2022.
- DUNCAN, P. et al. A candidate reference method for uric acid in serum. II. Interlaboratory testing. **Clinical Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 291–293, 1982.
- DUNN, J.; GRIDER, M. H. Physiology, Adenosine Triphosphate. **StatPearls**, 2023.
- EGAÑA-GORROÑO, L. et al. Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Mechanisms and Therapeutic Opportunities in Diabetes and Cardiovascular Disease: Insights From Human Subjects and Animal Models. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 7, 2020.
- ELSAIED, N. A. et al. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2023. **Diabetes Care**, v. 46, n. Supplement_1, p. S19–S40, 2023.
- EMEL'YANOV, V. V. Glycation, antiglycation, and deglycation: Their role in aging mechanisms and geroprotective effects (literature review). **Advances in Gerontology**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.
- EVANS, J. L.; GOLDFINE, I. D. Alpha-lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Technology & Therapeutics**, v. 2, n. 3, p. 401–413, 2000.
- EZE, E. D. et al. Lycopene attenuates diabetes-induced oxidative stress in Wistar rats. **Journal of Diabetes and Endocrinology**, v. 9, n. 2, p. 11–19, 2018.
- FIGUEIREDO, I. D. et al. Lycopene Improves the Metformin Effects on Glycemic Control and Decreases Biomarkers of Glycooxidative Stress in Diabetic Rats. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity : Targets and Therapy**, v. 13, p. 3117–3135, 2020.
- FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of Diabetic Complications. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 137–188, 2013.
- FORD, I. et al. The effects of treatment with alpha-lipoic acid or evening primrose oil on vascular hemostatic and lipid risk factors, blood flow, and peripheral nerve conduction in the streptozotocin-diabetic rat. **Metabolism**, v. 50, n. 8, p. 868–875, 2001.
- FORMAN, H. J.; DAVIES, K. J. A.; URSINI, F. How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. **Free radical Biology & Medicine**, v. 66, p. 24–35, 2014.
- FORMAN, H. J.; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 9, p. 689–709, 2021.
- FORNI, C. et al. Beneficial Role of Phytochemicals on Oxidative Stress and Age-Related Diseases. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 8748253, 2019.
- FREEMAN, A. M.; PENNINGS, N. **Insulin Resistance - StatPearls - NCBI Bookshelf**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507839/>>. Acesso em: 27 jul. 2023.
- GARG, S. S.; GUPTA, J. Polyol pathway and redox balance in diabetes. **Pharmacological Research**, v. 182, 2022.
- GETZ, G. S.; REARDON, C. A. Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. **Current Opinion in Lipidology**, v. 15, n. 3, p. 261–267, 2004.
- GHAVERPOUR, M.; SOTOUDEH, G.; GHORBANI, M. Tomato juice consumption improves blood antioxidative biomarkers in overweight and obese females. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 5, p. 805–809, 2015.
- GHELANI, H. et al. (R)- α -Lipoic acid inhibits fructose-induced myoglobin fructation and the formation of advanced glycation end products (AGEs) in vitro. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, 2018.
- GIACCO, F.; BROWNEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, v. 107, n. 9, p. 1058–1070, 2010.
- GIANAZZA, E. et al. Lipoxidation in cardiovascular diseases. **Redox Biology**, v. 23, 2019.

- GIORGINO, F.; CHEN, J. H.; SMITH, R. J. Changes in tyrosine phosphorylation of insulin receptors and a 170,000 molecular weight nonreceptor protein in vivo in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats: effects of insulin and glucose. **Endocrinology**, v. 130, n. 3, p. 1433–1444, 1992.
- GOENAWAN, Y. A. et al. LYCOPENE CONTENT IN SEVERAL AGES OF TOMATO CALLUS (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Rampai). **Agric**, v. 34, n. 1, p. 89–104, 2022.
- GOLBIDI, S.; BADRAN, M.; LAHER, I. Diabetes and alpha lipoic acid. **Frontiers in Pharmacology**, v. 2, p. 15229, 2011.
- GOSSELIN, L. E.; CHRAPOWITZKY, L.; RIDEOUT, T. C. Metabolic effects of α -lipoic acid supplementation in pre-diabetics: a randomized, placebo-controlled pilot study. **Food & Function**, v. 10, n. 9, p. 5732–5738, 2019.
- GRABOWSKA, M. et al. Let food be your medicine: nutraceutical properties of lycopene. **Food & Function**, v. 10, n. 6, p. 3090–3102, 2019.
- GUO, W. H.; TU, C. Y.; HU, C. H. Cis-trans isomerizations of beta-carotene and lycopene: a theoretical study. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 112, n. 38, p. 12158–12167, 2008.
- GUTIERRES, V. O. et al. Curcumin Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evidences in Streptozotocin-Diabetic Rats Support the Antidiabetic Activity to Be via Metabolite(s). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–13, 2015.
- GUTIERRES, V. O. et al. Curcumin improves the effect of a reduced insulin dose on glycemic control and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 4, p. 976–988, 2019.
- HEINISCH, B. B. et al. Alpha-lipoic acid improves vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes: a placebo-controlled randomized trial. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 40, n. 2, p. 148–154, 2010.
- HENRY, R. J. et al. Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase, and lactic acid dehydrogenase. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 34, p. 381–398, 1960.
- HENSTRIDGE, D. C. et al. Metabolic control and sex: A focus on inflammatory-linked mediators. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 21, p. 4193–4207, 2019.
- HOLLENBACH, M. The Role of Glyoxalase-I (Glo-I), Advanced Glycation Endproducts (AGEs), and Their Receptor (RAGE) in Chronic Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma (HCC). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, 2017.
- HYOGO, H.; YAMAGISHI, S. Advanced glycation end products (AGEs) and their involvement in liver disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 10, p. 969–972, 2008.
- IMRAN, M. et al. Lycopene as a Natural Antioxidant Used to Prevent Human Health Disorders. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 1–27, 2020.
- INACIO, M. D. et al. Pentoxifylline mitigates renal glycoxidative stress in obese mice by inhibiting AGE/RAGE signaling and increasing glyoxalase levels. **Life Sciences**, v. 258, 2020.
- INCALZA, M. A. et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular Pharmacology**, v. 100, p. 1–19, 2018.
- IRIE, K. et al. Molecular basis for protein kinase C isozyme-selective binding: The synthesis, folding, and phorbol ester binding of the cysteine-rich domains of all protein kinase C isozymes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 36, p. 9159–9167, 1998.
- JACOB, K. et al. Influence of lycopene and vitamin C from tomato juice on biomarkers of oxidative stress and inflammation. **The British Journal of Nutrition**, v. 99, n. 1, p. 137–146, 2008.
- JHA, J. C. et al. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 25, n. 12, p. 657–684, 2016.
- JOHN, J. H.; ZIEBLAND, S. Reported barriers to eating more fruit and vegetables before and after participation in a randomized controlled trial: a qualitative study. **Health Education Research**, v. 19, n. 2, p. 165–174, 2004.
- JOHNSON, R. N.; METCALF, P. A.; BAKER, J. R. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 87–95, 1983.
- JONES, W. et al. Uptake, recycling, and antioxidant actions of α -lipoic acid in endothelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 1, p. 83–93, 2002.
- JUNGE, W. et al. Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffé method. **Clinica Chimica Acta**, v. 344, n. 1–2, p. 137–148, 2004.
- KAHN, C. R. ;; SALTIEL, A. R. The molecular mechanism of insulin action and the regulation of glucose and lipid metabolism. Em: **Joslin's Diabetes Mellitus**. 14. ed. [s.l.] Philadelphia, 2005. p. 145–168.
- KAKANI, S. et al. The Gne M712T mouse as a model for human glomerulopathy. **The American Journal of Pathology**, v. 180, n. 4, p. 1431–1440, 2012.
- KALAPOPOS, M. P. The tandem of free radicals and methylglyoxal. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, n. 3, p. 251–271, 2008.
- KALUDERCIC, N.; DI LISA, F. Mitochondrial ROS Formation in the Pathogenesis of Diabetic Cardiomyopathy. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 7, 2020.
- KANETO, H. et al. Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic beta-cell function through the induction of oxidative stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 33, p. 31099–31104, 2001.

- KANWUGU, O. N. et al. Astaxanthin from bacteria as a feed supplement for animals. **Global Perspectives on Astaxanthin: From Industrial Production to Food, Health, and Pharmaceutical Applications**, p. 647–667, 2021.
- KARALLIEDDE, J.; GNUDI, L. Future strategies to prevent renal microvascular disease complications in diabetes. **Future Cardiology**, v. 4, n. 1, p. 77–83, 2008.
- KARMEN, A.; WROBLEWSKI, F.; LADUE, J. S. Transaminase activity in human blood. **The Journal of clinical investigation**, v. 34, n. 1, p. 126–131, 1955.
- KAUL, K.; APOSTOLOPOULOU, M.; RODEN, M. Insulin resistance in type 1 diabetes mellitus. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 64, n. 12, p. 1629–1639, 2015.
- KELLY, F. J. Use of antioxidants in the prevention and treatment of disease. **Journal of the International Federation of Clinical Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 21–3, 1998.
- KHALID, M.; PETROIANU, G.; ADEM, A. Advanced Glycation End Products and Diabetes Mellitus: Mechanisms and Perspectives. **Biomolecules**, v. 12, n. 4, 2022.
- KHAMAI, M. et al. Lipoic acid reduces glycemia and increases muscle GLUT4 content in streptozotocin-diabetic rats. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 46, n. 7, p. 763–768, 1997.
- KHAN, A. et al. The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: a review. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 22, n. 18, p. 13772–13799, 2015.
- KIDO, Y.; NAKAE, J.; ACCILI, D. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 3, p. 972–979, 2001.
- KIM, J. et al. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 48, n. 4, p. e224–e224, 2016.
- KIM, M. J. et al. Transduced PEP-1-PON1 proteins regulate microglial activation and dopaminergic neuronal death in a Parkinson's disease model. **Biomaterials**, v. 64, p. 45–56, 2015.
- KIM, M. S. et al. Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. **Nature Medicine**, v. 10, n. 7, p. 727–733, 2004.
- KOHN, H. I.; LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, p. 92–300, 1944.
- KOYE, D. N. et al. Incidence of chronic kidney disease among people with diabetes: a systematic review of observational studies. **Diabetic Medicine**, v. 34, n. 7, p. 887–901, 2017.
- KUHAD, A.; SETHI, R.; CHOPRA, K. Lycopene attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. **Life Sciences**, v. 83, n. 3–4, p. 128–134, 2008.
- KUMAR, A. P.; CHITRA, P. S.; REDDY, G. B. Advanced glycation end products mediated cellular and molecular events in the pathology of diabetic nephropathy. **Biomolecular Concepts**, v. 7, n. 5–6, p. 293–299, 2016.
- LAAKSO, M.; KUUSISTO, J. Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development. **Nature Reviews Endocrinology** 2014 10:5, v. 10, n. 5, p. 293–302, 2014.
- LAKSHMI, K. et al. A Short Review on Animal Models in Psychopharmacology. **Scholars Journal of Medical Case Reports**, v. 11, n. 2, p. 79–108, 2023.
- LEE, S. J. et al. PEP-1-paraoxonase 1 fusion protein prevents cytokine-induced cell destruction and impaired insulin secretion in rat insulinoma cells. **BMB Reports**, v. 51, n. 10, p. 538–543, 2018.
- LEITE, L. P. et al. HIPERTENSÃO NA DOENÇA RENAL CRÔNICA EM TRATAMENTO CONSERVADOR HYPERTENSION IN CHRONIC KIDNEY DISEASE UNDER CONSERVATIVE TREATMENT. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 27, n. 4, p. 115–121, 2020.
- LI, S. et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 11, p. 26087–26124, 2015.
- LIMA, T. F. O. et al. Curcumin, Alone or in Combination with Aminoguanidine, Increases Antioxidant Defenses and Glycation Product Detoxification in Streptozotocin-Diabetic Rats: A Therapeutic Strategy to Mitigate Glycoxidative Stress. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, 2020.
- LIN, X. et al. Association Between Endogenous Secretory Receptor for Advanced Glycation-end Products (esRAGE) and Carotid Intima-media Thickness in Type 2 Diabetes. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 122, n. 05, p. 277–280, 2014.
- LIU, Y. et al. Functional significance of skeletal muscle adiponectin production, changes in animal models of obesity and diabetes, and regulation by rosiglitazone treatment. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 297, n. 3, p. E657–E664, 2009.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, 1951.
- LUDKE, M. DO C. M. M.; LÓPEZ, J. Colesterol e composição dos ácidos graxos nas dietas para humanos e na carcaça suína. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 181–187, 1999.
- MACKENZIE, R. W. A.; ELLIOTT, B. T. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 7, p. 55–64, 2014.
- MADONNA, R.; DE CATERINA, R. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes--part II: cellular mechanisms and therapeutic targets. **Vascular Pharmacology**, v. 54, n. 3–6, p. 75–79, 2011.

- MAHMOUDI-NEZHAD, M.; VAJDI, M.; FARHANGI, M. A. An updated systematic review and dose-response meta-analysis of the effects of α -lipoic acid supplementation on glycemic markers in adults. **Nutrition**, v. 82, 2021.
- MALEKIYAN, R. et al. Antioxidant and neuroprotective effects of lycopene and insulin in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biomedical Reports**, v. 10, n. 1, p. 47–54, 2019.
- MANDANI, M. et al. Alpha-lipoic acid supplementation effects on serum values of some oxidative stress biomarkers in women with gestational diabetes. **Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology**, v. 37, n. 12, p. 1111–1115, 2021.
- MARANGON, K. et al. Comparison of the effect of α -lipoic acid and α -tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9–10, p. 1114–1121, 1999.
- MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. B. Effects of α -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, n. 5, p. 288–294, 2003.
- MASTROCOLA, R. et al. High-fructose intake as risk factor for neurodegeneration: Key role for carboxy methyllysine accumulation in mice hippocampal neurons. **Neurobiology of Disease**, v. 89, p. 65–75, 2016.
- MCLAIN, A. L.; SZWEDA, P. A.; SZWEDA, L. I. α -Ketoglutarate dehydrogenase: a mitochondrial redox sensor. **Free Radical Research**, v. 45, n. 1, p. 29–36, 2011.
- MEHANNA, E. T. et al. An optimized dose of raspberry ketones controls hyperlipidemia and insulin resistance in male obese rats: Effect on adipose tissue expression of adipocytokines and Aquaporin 7. **European Journal of Pharmacology**, v. 832, p. 81–89, 2018.
- MEKURIA, A. N. et al. Anti-Cancer Effects of Lycopene in Animal Models of Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 560625, 2020.
- MENDOZA-NÚÑEZ, V. M. et al. The Effect of 600 mg Alpha-lipoic Acid Supplementation on Oxidative Stress, Inflammation, and RAGE in Older Adults with Type 2 Diabetes Mellitus. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.
- MILLER, R. G. et al. Insulin resistance-associated genetic variants in type 1 diabetes. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 35, n. 4, p. 107842, 2021.
- MINOKOSHI, Y. et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. **Nature**, v. 428, n. 6982, p. 569–574, 2004.
- MIRJANA, M. et al. Alpha-lipoic acid preserves the structural and functional integrity of red blood cells by adjusting the redox disturbance and decreasing O-GlcNAc modifications of antioxidant enzymes and heat shock proteins in diabetic rats. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 8, p. 975–986, 2012.
- MOHAMED, J. et al. Mechanisms of Diabetes-Induced Liver Damage: The role of oxidative stress and inflammation. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, v. 16, n. 2, p. e132-141, 2016.
- MOHAMMED, C. J. et al. A PON for All Seasons: Comparing Paraoxonase Enzyme Substrates, Activity and Action including the Role of PON3 in Health and Disease. **Antioxidants**, v. 11, n. 3, 1 mar. 2022.
- MOINI, H.; PACKER, L.; SARIS, N.-E. L. Antioxidant and Prooxidant Activities of α -Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 182, n. 1, p. 84–90, 2002.
- MORAKINYO, A. O.; AWOBAJO, F. O.; ADEGOKE, O. A. Effects of alpha lipoic acid on blood lipids, renal indices, antioxidant enzymes, insulin and glucose level in streptozotocin-diabetic rats Biology and Medicine Effects of alpha lipoic acid on blood lipids, renal indices, antioxidant enzymes, insulin and glucose level in streptozotocin-diabetic rats. **Research Article Biology and Medicine**, v. 5, p. 26–33, 2013.
- MORCOS, M. et al. Effect of α -lipoic acid on the progression of endothelial cell damage and albuminuria in patients with diabetes mellitus: an exploratory study. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 52, n. 3, p. 175–183, 2001.
- MORRIS, M. C. et al. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 12, p. 1173–1176, 2001.
- MOTTA, B. P. et al. Combined Effects of Lycopene and Metformin on Decreasing Oxidative Stress by Triggering Endogenous Antioxidant Defenses in Diet-Induced Obese Mice. **Molecules**, v. 27, n. 23, 2022.
- MROZ, J. R. Clinical Enzymology. In: Anderson SC, Cockayne S. **Clinical Chemistry Concepts & Applications**, v. 11, p. 179–202, 2003.
- NECHIFOR, M.; NEAGU, T.-M.; MANDA, G. Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies. **Current Chemical Biology**, v. 3, n. 1, p. 22–46, 2009.
- NELSON, V. L. B. et al. Adipose tissue insulin resistance due to loss of PI3K p110 α leads to decreased energy expenditure and obesity. **American journal of physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 306, n. 10, 2014.
- NEZU, M.; SUZUKI, N. Roles of Nrf2 in Protecting the Kidney from Oxidative Damage. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2951, 2020.
- NI, Y. et al. Prevention and Reversal of Lipotoxicity-Induced Hepatic Insulin Resistance and Steatohepatitis in Mice by an Antioxidant Carotenoid, β -Cryptoxanthin. **Endocrinology**, v. 156, n. 3, p. 987–999, 2015.
- NICHOLSON, K. M.; ANDERSON, N. G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. **Cellular Signalling**, v. 14, n. 5, p. 381–395, 2002.
- NIIMI, N. et al. Aldose Reductase and the Polyol Pathway in Schwann Cells: Old and New Problems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 1–14, 2021.
- NISHIKAWA, T. et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v. 404, n. 6779, p. 787–790, 13 abr. 2000.

- NOLAND, R. C. et al. Peroxisomal-mitochondrial oxidation in a rodent model of obesity-associated insulin resistance. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 4, 2007.
- NOR, N. A. M. et al. The Role of Polyphenol in Modulating Associated Genes in Diabetes-Induced Vascular Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, 2022.
- NOWOTNY, K. et al. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. **Biomolecules**, v. 5, n. 1, p. 194–222, 2015.
- OBAFEMI, T. O. et al. Combined effect of metformin and gallic acid on inflammation, antioxidant status, endoplasmic reticulum (ER) stress and glucose metabolism in fructose-fed streptozotocin-induced diabetic rats. **Toxicology Reports**, v. 8, p. 1419–1427, 2021.
- OBROSOVA, I. et al. Diabetes-induced changes in lens antioxidant status, glucose utilization and energy metabolism: effect of DL- α -lipoic acid. **Diabetologia**, v. 41, n. 12, p. 1442–1450, 1998.
- OKAMOTO, M. M. et al. Intensive insulin treatment induces insulin resistance in diabetic rats by impairing glucose metabolism-related mechanisms in muscle and liver Title: High doses of insulin induce insulin resistance. **Journal of Endocrinology**, v. 211, n. 1, p. 55, 2011.
- OTT, C. et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox biology**, v. 2, n. 1, p. 411–429, 2014.
- OW, C. P. C. et al. Targeting Oxidative Stress in Septic Acute Kidney Injury: From Theory to Practice. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 17, p. 3798, 2021.
- OZMEN, O. et al. Effects of Caffeine and Lycopene in Experimentally Induced Diabetes Mellitus. **Pancreas**, v. 45, n. 4, p. 579–583, 2016.
- PALOZZA, P. et al. Lycopene as a guardian of redox signalling. **Acta Biochimica Polonica**, v. 59, n. 1, p. 21–25, 2012.
- PARMAR, H. S.; KAR, A. Possible amelioration of atherogenic diet induced dyslipidemia, hypothyroidism and hyperglycemia by the peel extracts of *Mangifera indica*, *Cucumis melo* and *Citrullus vulgaris* fruits in rats. **BioFactors**, v. 33, n. 1, p. 13–24, 2008.
- PAULI, J. R. et al. New mechanisms by which physical exercise improves insulin resistance in the skeletal muscle. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 4, p. 399–408, 2009.
- PEERAPORNATANA, S. et al. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment. **Kidney International**, v. 96, n. 5, p. 1083–1099, 2019.
- PELLICANÒ, T. M. et al. Optimizing the supercritical fluid extraction process of bioactive compounds from processed tomato skin by-products. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 692–697, 2019.
- 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. **Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications**, v. 742, n. 2, p. 315–325, 2000.
- PORASUPHATANA, S. et al. Glycemic and oxidative status of patients with type 2 diabetes mellitus following oral administration of α -lipoic acid: a randomized double-blinded placebo-controlled study. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22374556/>>. Acesso em: 31 jul. 2023.
- PRABHAKAR, P. K.; KUMAR, A.; DOBLE, M. Combination therapy: a new strategy to manage diabetes and its complications. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 123–130, 2014.
- PRZYBYLSKA, S. Lycopene – a bioactive carotenoid offering multiple health benefits: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n. 1, p. 11–32, 2020.
- RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J. Dicarbonyl stress in cell and tissue dysfunction contributing to ageing and disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 458, n. 2, p. 221–226, 2015.
- RAJENDIRAN, D.; PACKIRISAMY, S.; GUNASEKARAN, K. A REVIEW ON ROLE OF ANTIOXIDANTS IN DIABETES. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 11, n. 2, p. 48, 2018.
- RAJENDRAN, P. et al. Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta: International Journal of Clinical Chemistry**, v. 436, p. 332–347, 2014.
- RAMADAN, S. S. et al. Lycopene mitigates arsenic-induced nephrotoxicity with activation of the Nrf2 pathway in mice. **Toxin Reviews**, v. 41, n. 2, p. 446–456, 2022.
- RAMASAMY, R.; GOLDBERG, I. J. Aldose reductase and cardiovascular diseases, creating human-like diabetic complications in an experimental model. **Circulation Research**, v. 106, n. 9, p. 1449–1458, 2010.
- RAUT, S. K.; KHULLAR, M. Oxidative stress in metabolic diseases: current scenario and therapeutic relevance. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 478, n. 1, p. 185–196, 2023.
- REED, L. J. From lipoic acid to multi-enzyme complexes. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, v. 7, n. 1, p. 220, 1998.
- REQUENA, J. R. et al. Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. **Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 11 Suppl 5, n. SUPPL. 5, p. 48–53, 1996.
- RIFAI, N.; WARNICK, G. R. Lipids, lipoproteins, Apolipoproteins, and other cardiovascular risk factors. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**, v. 4, p. 903–981, 2006.
- RIMMELÉ, T. et al. Immune Cell Phenotype and Function in Sepsis. **Shock**, v. 45, n. 3, p. 282–291, 2016.

- ROCHETTE, L. et al. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n. 9, p. 2709–2729, 2014.
- ROCHETTE, L. et al. Alpha-lipoic acid: molecular mechanisms and therapeutic potential in diabetes. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 93, n. 12, p. 1021–1027, 2015.
- ROORDA, M. Therapeutic interventions against accumulation of Advanced Glycation End products (AGEs). 2017.
- ROXO, D. F. et al. Curcumin combined with metformin decreases glycemia and dyslipidemia, and increases paraoxonase activity in diabetic rats. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 11, n. 1, 2019.
- ROZENBERG, O. et al. Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: Studies in PON1-knockout mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 6, p. 774–784, 2003.
- RUSH, J. W. E.; SANDIFORD, S. D. Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: Influence of gender and physical activity. **Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 5, p. 345–351, 2003.
- SALTIEL, A. R. Insulin signalling in health and disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 1, 2021.
- SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799–806, 2001.
- SANAJOU, D. et al. AGE-RAGE axis blockade in diabetic nephropathy: Current status and future directions. **European Journal of Pharmacology**, v. 833, p. 158–164, 2018.
- SATO, T. et al. TAGE (Toxic AGEs) Theory in Diabetic Complications. **Current Molecular Medicine**, v. 6, n. 3, p. 351–358, 2006.
- ŞAYLAN, A. et al. Analysis of Antioxidant Effects of Lycopene and Caffeine in Experimentally Induced Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. **Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi**, v. 18, n. 3, p. 510–516, 2021.
- ŠEBEKOVÁ, K. et al. Plasma levels of advanced glycation end products in healthy, long-term vegetarians and subjects on a western mixed diet. **European Journal of Nutrition**, v. 40, n. 6, p. 275–281, 2001.
- SEIFALIAN, A. M. et al. Effect of graded hypoxia on the rat hepatic tissue oxygenation and energy metabolism monitored by near-infrared and ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 14, p. 2642–2648, 2001.
- SENA, C. et al. Lipoic Acid Prevents High-Fat Diet-Induced Hepatic Steatosis in Goto Kakizaki Rats by Reducing Oxidative Stress Through Nrf2 Activation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 2706, 2018.
- SEO, E. Y.; HA, A. W.; KIM, W. K. α -Lipoic acid reduced weight gain and improved the lipid profile in rats fed with high fat diet. **Nutrition Research and Practice**, v. 6, n. 3, p. 195, 2012.
- SEONG, J. et al. Hypothalamic inflammation and obesity: a mechanistic review. **Archives of Pharmacal Research**, v. 42, n. 5, p. 383–392, 2019.
- SHARMA, G. N.; GUPTA, G.; SHARMA, P. A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 28, n. 2, p. 139–154, 2018.
- SHARMA, S.; CHOPRA, K.; KULKARNI, S. K. Effect of insulin and its combination with resveratrol or curcumin in attenuation of diabetic neuropathic pain: participation of nitric oxide and TNF- α . **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 3, p. 278–283, 2007.
- SHAY, K. P. et al. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1790, n. 10, p. 1149–1160, 2009.
- SHI, K. et al. Thermal conditions and active substance stability affect the isomerization and degradation of lycopene. **Food research international**, v. 162, n. Pt A, 2022.
- SHUNMOOGAM, N.; NAIDOO, P.; CHILTON, R. Paraoxonase (PON)-1: a brief overview on genetics, structure, polymorphisms and clinical relevance. **Vascular Health and Risk Management**, v. 14, p. 137–143, 2018.
- SINGH, M.; KAPOOR, A.; BHATNAGAR, A. Physiological and Pathological Roles of Aldose Reductase. **Metabolites**, v. 11, n. 10, 2021.
- SINGH, V. P. et al. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2014.
- SKIBSKA, B. et al. Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of α -Lipoic Acid on Lipopolysaccharide-induced Oxidative Stress in Rat Kidney. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 71, n. 1, p. 1–13, 2023.
- SMITH, A. R. et al. Lipoic Acid as a Potential Therapy for Chronic Diseases Associated with Oxidative Stress. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 9, p. 1135–1146, 2004.
- SOLEYMANINEJAD, M. et al. The Effects of Lycopene and Insulin on Histological Changes and the Expression Level of Bcl-2 Family Genes in the Hippocampus of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Journal of Diabetes Research**, v. 2017, 2017.
- SONG, N.; THAISS, F.; GUO, L. NF κ B and Kidney Injury. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 815, 2019.
- STANKOVIĆ, M. N. et al. The Effects of α -Lipoic Acid on Liver Oxidative Stress and Free Fatty Acid Composition in Methionine–Choline Deficient Diet-Induced NAFLD. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 2, p. 254–261, 2014.
- SUN, H. et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 183, 2022.
- SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, v. 50, n. 6, p. 537–546, 2001.
- TABREZ, S.; AL-SHALI, K. Z.; AHMAD, S. Lycopene powers the inhibition of glycation-induced diabetic nephropathy: a novel approach to halt the AGE-RAGE axis menace. **BioFactors**, v. 41, n. 5, p. 372–381, 2015.

- TESTA, R. et al. The “Metabolic Memory” Theory and the Early Treatment of Hyperglycemia in Prevention of Diabetic Complications. **Nutrients**, v. 9, n. 5, 2017.
- TIBULLO, D. et al. Biochemical and clinical relevance of alpha lipoic acid: antioxidant and anti-inflammatory activity, molecular pathways and therapeutic potential. **Inflammation Research**, v. 66, n. 11, p. 947–959, 2017.
- TOPRAK, S. F.; DEDEOĞLU, S. Astaxanthin protects against hearing impairment in diabetic rats. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 88, p. S73–S80, 2022.
- TRINDER, P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. **Journal of Clinical Pathology**, v. 22, n. 2, p. 246, 1969.
- TWARDA-CLAPA, A. et al. Advanced Glycation End-Products (AGEs): Formation, Chemistry, Classification, Receptors, and Diseases Related to AGEs. **Cells**, v. 11, n. 8, 2022.
- VALDECANTOS, M. P. et al. Lipoic acid improves mitochondrial function in nonalcoholic steatosis through the stimulation of sirtuin 1 and sirtuin 3. **Obesity**, v. 20, n. 10, p. 1974–1983, 2012.
- VENKATAKRISHNAN, K.; CHIU, H.-F.; WANG, C.-K. Popular functional foods and herbs for the management of type-2-diabetes mellitus: A comprehensive review with special reference to clinical trials and its proposed mechanism. **Journal of Functional Foods**, v. 57, p. 425–438, 2019.
- VERMA, P. R. Effect of alpha-lipoic acid and its Nano-formulation on streptozotocin induced diabetic neuropathy in Rats. **The Pharma Innovation Journal**, v. 7, n. 1, p. 482–485, 2018.
- VINCENT, A. M.; FELDMAN, E. L. New Insights into the Mechanisms of Diabetic Neuropathy. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 5, n. 3, p. 227–236, 2004.
- VIVIAN, E. M.; RUBINSTEIN, G. B. Pharmacologic management of diabetic nephropathy. **Clinical Therapeutics**, v. 24, n. 11, p. 1741–1756, 2002.
- VLISSARA, H.; STRIKER, G. E. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 7, n. 9, p. 526–539, 2011.
- WANG, A. L. et al. AGEs mediated expression and secretion of TNF alpha in rat retinal microglia. **Experimental Eye Research**, v. 84, n. 5, p. 905–913, 2007.
- WANG, J. et al. Lycopene attenuates western-diet-induced cognitive deficits via improving glycolipid metabolism dysfunction and inflammatory responses in gut–liver–brain axis. **International Journal of Obesity**, v. 43, n. 9, p. 1735–1746, 2018.
- WANG, L. et al. The protective effect of α -Lipoic acid on mitochondria in the kidney of diabetic rats. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 6, n. 2, p. 90–97, 2013.
- WATANABE, N. et al. Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. **Clinical Chemistry**, v. 32, n. 8, p. 1551–1554, 1986.
- WELSH, K. J.; KIRKMAN, M. S.; SACKS, D. B. Role of Glycated Proteins in the Diagnosis and Management of Diabetes: Research Gaps and Future Directions. **Diabetes Care**, v. 39, n. 8, p. 1299–1306, 2016.
- WIGGIN, T. D. et al. Elevated triglycerides correlate with progression of diabetic neuropathy. **Diabetes**, v. 58, n. 7, p. 1634–1640, 2009.
- WOO, J. L. et al. Alpha-lipoic acid increases insulin sensitivity by activating AMPK in skeletal muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 332, n. 3, p. 885–891, 2005.
- XU, Z. et al. A combination of lycopene and human amniotic epithelial cells can ameliorate cognitive deficits and suppress neuroinflammatory signaling by choroid plexus in Alzheimer’s disease rat. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 88, 2021.
- XUE, M. et al. Transcriptional control of glyoxalase 1 by Nrf2 provides a stress-responsive defence against dicarbonyl glycation. **The Biochemical Journal**, v. 443, n. 1, p. 213–222, 2012.
- YAMAGISHI, S. I. et al. Advanced Glycation End Products: A Molecular Target for Vascular Complications in Diabetes. **Molecular medicine**, v. 21 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S32–S40, 2015.
- YANG, C. M. et al. Lycopene inhibits the proliferation of androgen-dependent human prostate tumor cells through activation of PPAR γ -LXR α -ABCA1 pathway. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 1, p. 8–17, 2012.
- YAWORSKY, K. et al. Engagement of the insulin-sensitive pathway in the stimulation of glucose transport by alpha-lipoic acid in 3T3-L1 adipocytes. **Diabetologia**, v. 43, n. 3, p. 294–303, 2000.
- YI, X. et al. α -Lipoic acid protects diabetic apolipoprotein E-deficient mice from nephropathy. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 25, n. 3, p. 193–201, 2011.
- YI, X.; MAEDA, N. α -Lipoic Acid Prevents the Increase in Atherosclerosis Induced by Diabetes in Apolipoprotein E-Deficient Mice Fed High-Fat/Low-Cholesterol Diet. **Diabetes**, v. 55, n. 8, p. 2238–2244, 2006.
- YIN, Y.; ZHENG, Z.; JIANG, Z. Effects of lycopene on metabolism of glycolipid in type 2 diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 2070–2077, 2019.
- YU, K. et al. Lycopene attenuates AFB1-induced renal injury with the activation of the Nrf2 antioxidant signaling pathway in mice. **Food & Function**, v. 9, n. 12, p. 6427–6434, 2018.
- ZHANG, J.; MCCULLOUGH, P. A. Lipoic Acid in the Prevention of Acute Kidney Injury. **Nephron**, v. 134, n. 3, p. 133–140, 2016.
- ZHAO, Q. et al. Lycopene attenuates chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome by inhibiting oxidative stress and inflammation via the interaction of NF- κ B, MAPKs, and Nrf2 signaling pathways in rats. **Andrology**, v. 8, n. 3, p. 747–755, 2020.

- ZHU, J.; WANG, C. G.; XU, Y. G. Lycopene attenuates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats by reducing oxidative stress. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 11, p. 1144–1149, 2011.
- ZHU, R. et al. Lycopene in protection against obesity and diabetes: A mechanistic review. **Pharmacological Research**, v. 159, 2020.
- ZHUANG, A. et al. Globally elevating the AGE clearance receptor, OST48, does not protect against the development of diabetic kidney disease, despite improving insulin secretion. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13664, 2019.
- ZIEGLER, D. et al. The Role of Biofactors in Diabetic Microvascular Complications. **Current Diabetes Reviews**, v. 18, n. 4, 2022.
- ZOUNGAS, S. et al. Severe Hypoglycemia and Risks of Vascular Events and Death. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 15, p. 1410–1418, 2010.
- ZUWAŁA-JAGIEŁŁO, J. et al. Advanced oxidation protein products and inflammatory markers in liver cirrhosis: a comparison between alcohol-related and HCV-related cirrhosis. **Acta Biochimica Polonica**, v. 58, n. 1, p. 59–65, 2011.

9. ANEXOS

9.1 Carta de aprovação pelo CEUA / FCF / CAr nº 13 / 2020



CEUA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP



CERTIFICADO

* torna sem efeito o parecer CEUA 14/2020

Certificamos que a proposta intitulada "Parâmetros fisiometabólicos e biomarcadores do estresse glico-oxidativo em ratos diabéticos tratados com dose diminuída de insulina, sozinha ou co-administrada com licopeno ou com ácido lipoico.", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAr. 13/2020, sob a responsabilidade da pesquisadora Ingrid Delbone Figueiredo, 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 6.890, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) teve suas alterações aprovadas "ad referendum" pela Coordenadora da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em 08 de fevereiro de 2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Setembro de 2023
Espécie/linhagem/raça	Rato Heterogênico Wistar
Nº de animais	192
Peso/idade	150 g / 3-4 semanas
Sexo	Machos
Origem	1- Biotério Central – UNESP Botucatu
Registro CIAEP	02.00082.2019

Araraquara, 08 de fevereiro de 2021.


Prof. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros
Coordenadora da CEUA