

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA**



**Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia  
Aplicadas à Farmácia**

**MONALISA FREITAS DE PAULA**

**COMPORTAMENTO TEMPORAL DOS BIOMARCADORES DE LESÃO  
OXIDATIVA E DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RATOS DIABÉTICOS  
TRATADOS COM INSULINA OU CURCUMINA EM IOGURTE**

**Araraquara, SP  
Agosto 2017**

**MONALISA FREITAS DE PAULA**

**COMPORTAMENTO TEMPORAL DOS BIOMARCADORES DE LESÃO OXIDATIVA E  
DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM  
INSULINA OU CURCUMINA EM IOGURTE**

Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação  
em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de  
Araraquara Área de Concentração: Bioquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

**Araraquara, SP**

**Agosto 2017**

**Ficha Catalográfica**

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**P324c** Paula, Monalisa Freitas de  
Comportamento temporal dos biomarcadores de lesão oxidativa e de atividade antioxidante em ratos diabéticos tratados com insulina ou curcumina em iogurte / Monalisa Freitas de Paula. – Araraquara, 2018.  
157 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Concentração: Bioquímica.

Orientador: Iguatemy Lourenço Brunetti.

1. Diabetes mellitus. 2. Estresse oxidativo. 3. Insulina. 4. Curcumina em Iogurte. I. Brunetti, Iguatemy Lourenço, orient. II. Título.

**CAPES: 40300005**

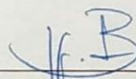
MONALISA FREITAS DE PAULA

COMPORTAMENTO TEMPORAL DOS BIOMARCADORES DE LESÃO OXIDATIVA E DE  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM INSULINA OU  
CURCUMINA

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de  
Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual  
Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como  
requisito para a obtenção do título de Mestra em  
Biotecnologia e Farmácia

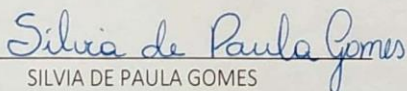
Araraquara, 14 de agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA



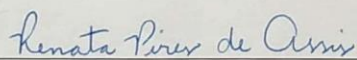
---

IGUATEMY LOURENÇO BRUNETTI



---

SILVIA DE PAULA GOMES



---

RENATA PIRES DE ASSIS

Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Araraquara como parte dos requisitos para o título de Mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Bioquímica.

Trabalho desenvolvido no laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/ Câmpus Araraquara.

***Fomento: Bolsa CAPES – Mestrado***

*Agradecimientos*

A Deus, pelo constante cuidado e amparo que me faz seguir em frente sempre.

Aos meus pais Elio e Neli, por acreditarem em mim, por não medirem esforços para que eu realizasse mais esse sonho, pelo amor, cuidado e força que me dão, por terem me educado e com isso eu me tornar a pessoa que sou hoje, pelos valores transmitidos, vocês é que são meus mestres, minhas melhores escolhas, Eu Amo Vocês!

Ao Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, você foi muito mais que um orientador, foi um grande amigo, obrigada pelos ensinamentos científicos e de vida, os quais levarei para sempre comigo, obrigada por ter sido sempre presente, sou sua fã.

A professora Dra. Amanda Martins Baviera, pela atenção e ajuda desde os primeiros e-mails trocados até minha última planilha do excel, obrigada pelos olhares que instigam querer aprender sempre mais.

A minha irmã Mara, pelo apoio, carinho, incentivo e preocupação.

Ao meu amigo Leandro, que mesmo longe fisicamente, sempre dispôs de tempo para me ouvir, obrigada pela paciência e pelas longas conversas.

As minhas amigas Patrícia Lopes e Juliana Assumpção, que tive o prazer em conhecer durante a pós-graduação, pelo apoio, conselhos e conversas, gratidão por permanecerem em minha vida.

Ao meu amigo Inácio, por me ouvir, me distrair e fazer sorrir quando eu mais precisei.

A minha amiga Izáira, pelas orações e mensagens de conforto.

A minha amiga e Psicóloga Wilma, pela mudança positiva que causou em minha vida, por me proporcionar o autoconhecimento e com ele melhorar minha visão diante a vida e situações.

A querida Psicóloga Paola, pelo alívio e conforto proporcionado em cada sessão.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Renata e Carlos, que me receberam e sempre estiveram ao meu lado quando eu mais precisava, por compartilharem com muito zelo a bagagem que já tinham, pelos bons momentos fora do laboratório também.

Aos amigos do laboratório Vânia, Thais, Mariana, Tayra, Maiara, e os alunos de Iniciação Científica, Daniela Roxo, Juliana Oriel, Vitor, Victor, Jonas, Victoria, pela ajuda e pelos bons momentos que passamos juntos.

Daniela Roxo, obrigada pela agradável companhia e auxílio durante os experimentos inclusive aos finais de semana e pelos bons momentos fora do laboratório.

A todos os colaboradores da instituição, especialmente a Dona Maria, Rosemira, Rose e Hermes, com os quais tive mais tempo de convivência, pela solicitude diária.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem a vitória, nem a derrota”

Theodore Roosevelt

“Tuas forças naturais, as que estão dentro de ti, serão as que curarão suas doenças”

Hipócrates

# *CAPÍTULO I*

## RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica crônica caracterizada por distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, como consequência da deficiência na produção de insulina pelas células beta do pâncreas e/ou ao aumento na resistência à insulina nos tecidos, resultando em hiperglicemia. A manutenção da hiperglicemia por longos períodos participa do estabelecimento de diversos distúrbios no equilíbrio pró-oxidante/antioxidante, os quais levam ao estresse oxidativo, o qual culmina em perda de funcionalidade de biomoléculas e assim participa do estabelecimento das complicações microvasculares e macrovasculares do DM. Para amenizar estas complicações, fármacos anti-hiperglicêmicos têm sido utilizados no tratamento do DM. Contudo, tem sido postulado que mesmo com o controle glicêmico, as complicações do DM ainda podem se desenvolverem em indivíduos diabéticos, via uma condição denominada “memória metabólica”, sendo que o estresse oxidativo participa deste processo. Intervenções terapêuticas complementares à terapia anti-hiperglicêmica para o auxílio na prevenção do progresso das complicações do DM incluem o combate ao estresse oxidativo com produtos naturais. Inúmeros estudos têm demonstrado os efeitos benéficos à saúde da curcumina (diferuloilmetano), pigmento amarelo extraído dos rizomas de *Curcuma longa* L., com ênfase em suas propriedades antioxidantes e anti-hiperglicêmicas. O presente estudo teve o objetivo investigar as mudanças temporais relacionadas ao estresse oxidativo em animais diabéticos e tratados com insulina ou curcumina incorporada ao iogurte. Ratos normais (N) e diabéticos (D, 3 dias após a indução do DM com estreptozotocina, STZ) foram tratados durante 7, 15, 30 e 74 dias. Os grupos: NIOG e DIOG, ratos tratados com iogurte (1 mL/dia); NCUR e DCUR, ratos tratados com curcumina incorporada ao iogurte 90 mg/kg/dia; DINS, ratos tratados com insulina (4U/dia); todos os animais foram tratados com metade das doses de insulina ou curcumina, duas vezes ao dia. Ao final de cada tempo de tratamento, os animais foram pesados, eutanasiados e foram obtidos o plasma e o fígado para as seguintes determinações: (i) glicemia, (ii) marcadores de estresse oxidativo: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS - plasma) e proteínas carboniladas (PCO - fígado); (iii) atividades de enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD - fígado), catalase (CAT - fígado) e glutathiona peroxidase (GSH-Px - fígado), paraoxonase (PON1 - plasma); e metabólitos antioxidantes endógenos: grupos sulfidrilas não-proteicos (GSNP - fígado); (iv) marcador de estresse glico-oxidativo:

produtos finais de glicação avançada (AGE - plasma). Aumentos nos níveis plasmáticos de TBARS foram observados precocemente no DM experimental (a partir de 3 dias pós-STZ); diminuição nas defesas antioxidantes também foram observadas em fígado e plasma de animais diabéticos: CAT (a partir de 15 dias de tratamento / 18 dias pós-STZ), SOD, GSH-Px e PON1 (a partir de 30 dias de tratamento / 33 dias pós-STZ) e níveis de GSNP (a partir 30 dias de tratamento / 33 dias pós-STZ). Aumentos nos níveis hepáticos de PCO foram observados a partir de 30 dias de tratamento (33 dias pós-STZ) em animais diabéticos. Em relação ao estresse glico-oxidativo, também foram observados aumentos nos níveis circulantes de AGE em animais diabéticos após 30 dias de tratamento. Ratos diabéticos tratados com curcumina em iogurte (DCUR) apresentaram melhora significativa em todos os parâmetros avaliados, prevenindo tanto a diminuição nas defesas antioxidantes quanto a elevação nos biomarcadores de lesão oxidativa e glico-oxidativa, em comparação aos animais DIOG. Os benefícios observados pelo tratamento com curcumina foram semelhantes aos benefícios promovidos pelo tratamento de ratos diabéticos com insulina (DINS). Os resultados obtidos corroboram os achados de estudos anteriores do nosso laboratório e reforçam a capacidade da curcumina em atenuar o estresse oxidativo em animais diabéticos. O presente estudo evidencia que a curcumina em iogurte é capaz de preservar os sistemas de defesas antioxidantes (plasma e fígado) de animais diabéticos, independente da cronicidade do DM, bem como previne a modificação oxidativa de proteínas hepáticas e reduz a lipoperoxidação. Evidências preliminares também sugerem ser a curcumina incorporada em iogurte benéfica na atenuação das modificações causadas pelo glico-oxidativo. Futuros estudos devem ser realizados com o objetivo de avançar no uso da curcumina como terapia complementar aos fármacos anti-hiperglicêmicos, com o objetivo de atenuar o desenvolvimento das complicações a longo prazo do DM.

**Palavras-chave:** Diabetes mellitus. Estresse oxidativo. Insulina. Curcumina em iogurte.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disorder characterized by disturbances in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins, as a consequence of the deficiency in the production of insulin by pancreatic beta cells and/or the increase in the insulin resistance in tissues, leading to hyperglycemia. The hyperglycemia maintenance for long periods has been involved in the onset of several disorders in the pro-oxidant / antioxidant balance, which lead to oxidative stress, culminating loss of biomolecule functionality and thus participates in the establishment of microvascular and macrovascular complications of DM. To alleviate these complications, oral antihyperglycemic drugs have been used in the treatment of DM. However, it has been postulated that, even with the effective glycemia control, the complications of DM can still be developed in diabetic individuals, via a condition called “metabolic memory”, having the oxidative stress as a participant. Therapeutic options complementary to the antihyperglycemic therapy to prevent the progression of DM complications include diminishing the oxidative stress with natural products. Numerous studies have demonstrated the beneficial health effects of curcumin (diferuloylmethane), a yellow pigment extracted from the rhizomes of *Curcuma longa* L., with an emphasis on its antioxidant and antihyperglycemic properties. The objective of the present study was to investigate the temporal changes in oxidative stress of diabetic animals and treated with insulin or yoghurt enriched with curcumin. Normal (N) and diabetic rats (D, 3 days after induction of DM with streptozotocin, STZ) were treated at the following periods: 0, 7, 15, 30 and 74 days, according to the following groups: NYOG and DYOG rats, treated with yoghurt (1 mL/day); NCUR and DCUR, rats treated with yoghurt enriched with curcumin, 90 mg/kg/day; DINS, rats treated with insulin (4U/day); all animals were treated with half-doses, twice a day. At the end of each treatment time, the animals were euthanized and plasma and liver were obtained for the following determinations: *(i) Glycemia* *(ii) oxidative stress biomarkers*, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS - plasma), carbonyl proteins (PCO - liver); *(iii) activities of antioxidant enzymes and endogenous antioxidant metabolites*, superoxide dismutase (SOD - liver), catalase (CAT - liver), glutathione peroxidase (GSH-Px - liver), non-protein sulfhydryl groups (NPSH - liver), paraoxonase (PON1 - plasma); *(iv) glycative stress biomarker*, fluorescence for advanced glycation end products (AGE - plasma). Increases in plasma levels of TBARS were observed early in the

experimental DM (from 3 days postSTZ). Fall in the antioxidant defenses was also observed in liver and plasma of diabetic rats: CAT (from 15 days of experiment / 18 days post-STZ), SOD, GSH-Px and PON1 (from 30 days of experiment / 33 days post-STZ) and GSNP levels (from 30 days of experiment / 33 days post-STZ). Increases in the hepatic levels of PCO were observed from 30 days of experiment (33 days post-STZ) in diabetic animals. Regarding the glycative stress, increases in the circulating levels of AGE in diabetic animals were also observed after 30 days of experiment. Diabetic rats treated with yoghurt-enriched curcumin (DCUR) showed a significant improvement in all evaluated parameters, preventing both the loss of antioxidant defenses and the elevation in biomarkers of oxidative and glycative lesions, compared with the results of DYOG animals. The benefits observed with the curcumin treatment were very similar to the benefits promoted by the treatment of diabetic rats with insulin (DINS). These data corroborate the findings of previous studies in our laboratory and reinforce the capacity of curcumin to attenuate the oxidative stress in diabetic animals. The present study shows that curcumin in yoghurt is able to preserve the antioxidant defense systems (plasma and liver) of diabetic animals, regardless of the chronicity of DM, as well as prevents the oxidative changes of liver proteins and reduces lipoperoxydation. Preliminary evidences also suggest that curcumin in yoghurt is beneficial in attenuating the changes caused by the glycative stress. Further studies should be carried out with the aim of advance in the use of curcumin as a complementary therapy to antihyperglycemic drugs, attempting to attenuate the onset of the long-term complications of DM.

**Keywords:** Diabetes mellitus. Oxidative stress. Insulin. Curcumin in yoghurt.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Peso corporal (g) de ratos normais e diabéticos não tratados e tratados por 0, 7, 30 e 74 dias com iogurte, curcumina em iogurte ou insulina.....**41**
- Figura 2.** Glicemia (mg/dL) de ratos normais e diabéticos tratados por 7, 15, 30 e 74 dias com iogurte, curcumina em iogurte ou insulina .....**42**
- Figura 3.** TBARS plasmático ( $\mu\text{mol/L}$ ) de ratos normais e diabéticos tratados por 7, 15, 30 e 74 dias com iogurte, curcumina em iogurte ou insulina.....**44**
- Figura 4.** PCO hepático (nmol/mg de proteína) de ratos normais e diabéticos tratados por 7, 15, 30 e 74 dias com iogurte, curcumina em iogurte ou insulina.....**46**
- Figura 5.** Atividade da SOD (U/mg de proteína) em fígado de ratos normais e diabéticos tratados por 7, 15, 30 e 74 dias com iogurte, curcumina em iogurte ou insulina.....**47**
- Figura 6.** Atividade da CAT (mmol/min/mg de proteína) em fígado de ratos normais e diabéticos tratados por 7, 15, 30 e 74 dias com iogurte, curcumina em iogurte ou insulina.....**49**
- Figura 7.** Atividade da GSH-Px (mmol/min/mg de proteína) em fígado de ratos normais e diabéticos tratados por 7, 15, 30 e 74 dias com iogurte, curcumina em iogurte ou insulina.....**50**
- Figura 8.** Concentração de GSNP (mmol/g de tecido) em fígado de ratos normais e diabéticos tratados por 7, 15, 30 e 74 dias com iogurte, curcumina em iogurte ou insulina.....**52**
- Figura 9.** Atividade da PON1 no plasma (U/L) de ratos normais e diabéticos tratados por 7, 15, 30 e 74 dias com iogurte, curcumina em iogurte ou insulina.....**53**
- Figura 10.** Concentração de AGE (UA/ mg de proteína) no plasma de ratos normais e diabéticos tratados por 7, 15, 30 e 74 dias com iogurte, curcumina em iogurte ou insulina.....**54**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Peso corporal (g) no dia da administração de STZ ou citrato e peso corporal e glicemia (mg/dL) 3 dias após administração de STZ.....**40**
- Tabela 2.** TBARS plasmático ( $\mu\text{mol/L}$ ) de ratos normais e diabéticos 3 dias após a administração de citrato ou SZT.....**43**
- Tabela 3.** PCO hepático (nmol/mg de proteína) de ratos normais e diabéticos 3 dias após a administração de citrato ou STZ.....**44**
- Tabela 4:** Atividade da SOD (U/mg de proteína) em fígado de ratos normais e diabéticos 3 dias após a administração de citrato ou STZ .....**46**
- Tabela 5.** Atividade da CAT (mmol/min/mg de proteína) em fígado de ratos normais e diabéticos 3 dias após a administração de citrato ou STZ .....**48**
- Tabela 6.** Atividade da GSH-Px (mmol/min/mg de proteína) em fígado de ratos normais e diabéticos 3 dias após a administração de citrato ou STZ.....**49**
- Tabela 7.** Concentração de GSNP (mmol/g de tecido) no fígado de ratos normais e diabéticos 3 dias após a administração citrato ou STZ.....**51**
- Tabela 8.** Atividade da PON1 no plasma (U/L) em fígado de ratos normais e diabéticos 3 dias após a administração de citrato ou STZ.....**52**
- Tabela 9.** Níveis de AGE (UA/ mg de proteína) no plasma de ratos normais e diabéticos 3 dias após a administração de citrato ou STZ.....**54**

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	Associação Americana de Diabetes
AGE	<i>Advanced Glycation End Products (Produtos Finais de Glicação Avançada)</i>
AGL	Ácidos Graxos Livres
AKT	V- akt murine thymoma viral oncogene homolog (Proteína quinase B)
ALT	Alanina Aminotransferase
ALX	Aloxana
ARE	Elemento de Resposta Atioxidante
AST	Aspartato Aminotransferase
CAT	Catalase
DM	Diabetes Mellitus
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina
DTNB	5,5-Ditio-2-Nitrobenzoico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPM	Erro Padrão da Média
ERK1/2	Quinases ½ reguladoras de sinal extracelular
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FADH2	Flavina Adenina Dinucleotídeo na Forma Reduzida
G6Pase	Glicose-6-fosfatase
GLUT4	Transportador de Glicose do Tipo 4
GR	Glutathione Redutase
GSNP	Grupos sulfidrilas não protéicos
GSH-Px	Glutathione Peroxidase
GSSH	Glutathione Oxidada
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
IDF	<i>International Diabetes Federation</i> (Federação Internacional de Diabetes)
IRS1	Substrato de receptor de insulina
JKN	Quinase C-JUN N- terminal
Keap1	Kelchi-like EHC associated protein
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases (Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos)
MDA	Malondialdeído
MODY	Maturity onset diabetes of the Young

mRNA	RNA mensageiro
NADPH	Adenina Dinucleotídeo Fosfato na Forma Reduzida
NBT	<i>Nitroblue Tetrazolium</i>
NQO	Quinona Oxiredutases
Nrf2	Fator de transcrição nuclear
PCO	Proteínas Carboniladas
PEPCK	Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase
PKB	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase C
PON1	Paraoxonase 1
PPAR- $\gamma$	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-<math>\gamma</math></i>
RAGE	Receptor de produtos finais de glicação avançada
SOD	Superóxido Dismutase
STZ	Estreptozotocina
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$
TTGO	Teste de Tolerância à Glicose Oral
TZD	Tiazolidinedionas
VLDL	Lipoproteína de Densidade Muito Baixa

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

#### RESUMO

#### ABSTRACT

#### LISTA DE FIGURAS

#### LISTA DE TABELAS

#### LISTA DE ABREVIATURAS

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1 Diabetes Mellitus.....	218
1.2 DM e estresse oxidativo.....	21
1.3 Memória metabólica.....	28
1.4 Alimentos funcionais.....	30
1.5 Curcumina.....	31
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	34
2.1 Objetivo geral.....	34
2.2 Objetivos específicos.....	34
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
3.1 Animais .....	35
3.2 Indução do diabetes mellitus experimental .....	35
3.3 Tratamento de animais normais e diabéticos com iogurte enriquecido com curcumina .....	35
3.4 Metodologias das dosagens bioquímicas.....	36
3.5 Análise Estatística.....	38
<b>4. RESULTADOS</b> .....	39
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	55
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	64
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	65

#### ANEXOS

### CAPÍTULO II

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica crônica, caracterizada por distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas devido à deficiência na produção de insulina pelo pâncreas e/ou ao aumento na resistência à insulina em determinados tecidos, principalmente no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, causando prejuízos na captação de glicose e aumento na produção hepática do monossacarídeo, resultando em hiperglicemia (OLOFSSON; MARKLUND; BEHNDIG, 2009). Indivíduos diabéticos apresentam risco aumentado de doenças microvasculares, que podem levar à cegueira, amputação de membros inferiores e insuficiência renal, e de doenças macrovasculares, em especial as doenças cardiovasculares (FOWLER, 2008).

A doença afeta milhões de pessoas; dados da Federação Internacional de Diabetes (IDF, *International Diabetes Federation*) mostram que em 2015 a síndrome afetou mais de 415 milhões de indivíduos em todo o mundo, e estima-se que em 2040 este número alcance 642 milhões. O Brasil está entre os dez países com o maior número de pessoas com DM, e entre os países que mais têm despesas com essa patologia (IDF DIABETES ATLAS, 2015).

Nos últimos anos, o DM tem sido reconhecido como um problema de saúde pública mundial. Além dos prejuízos diretos observados em indivíduos devido ao DM, existem vários fatores sociais e econômicos que impactam negativamente na qualidade de vida do paciente com esta síndrome, tais como: incapacidade para desenvolver as atividades diárias, ausências do trabalho e aumento da taxa de mortalidade. Embora a doença seja reconhecida mundialmente, grande parte dos indivíduos com DM não realizam o tratamento adequado, fato este que culmina em diversos riscos e complicações crônicas (BATISTA; MONTEIRO, 2006).

A Associação Americana de Diabetes (ADA) classifica o DM em quatro classes principais: DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional e outros tipos de DM (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

O DM tipo 1 é caracterizado pela deficiência na produção e secreção de insulina, resultante da destruição autoimune das células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas. Geralmente o surgimento dos sintomas ocorre de forma abrupta, quando 80 a 90% das células beta pancreáticas já estão destruídas (EISENBARTH; BUSE, 2012). Indivíduos com DM tipo 1

usualmente possuem anticorpos anti-ilhota pancreática e tornam-se dependentes de aplicações exógenas de insulina (TANNUS et al., 2007).

O DM tipo 2 é caracterizado pela diminuição da sensibilidade tecidual à insulina (resistência à insulina), que ocorre quando uma concentração normal de insulina tem uma resposta reduzida nos tecidos alvo, como por exemplo em músculo esquelético, tecido adiposo e fígado. Uma deficiência parcial na produção pancreática de insulina também é observada em casos de DM tipo 2. A resistência periférica à insulina pode ser consequência de diferentes alterações: diminuição nos receptores da insulina (IR), redução da afinidade dos IR ao hormônio, redução na ativação de intermediários intracelulares da sinalização insulínica, entre eles o substrato do receptor da insulina (IRS-1) e proteína quinase B (PKB ou AKT) e diminuição na quantidade e/ou na translocação dos transportadores GLUT 4 (MCLELLAN et al., 2007; PRADA; SAAD, 2011).

O DM gestacional é definido como qualquer grau de intolerância à glicose, com início ou primeiro reconhecimento durante a gestação, podendo permanecer ou não após o parto (MARUICHI; AMADEI; ABEL, 2012). Esta definição apresenta algumas limitações, uma vez que gestantes podem ter DM tipo 2 não diagnosticado, antes do início da gestação. Tal conceito foi modificado após o estudo “*Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome*” (HAPO), que avaliou mais de 25.000 gestantes e teve como propósito encontrar pontos de corte da glicemia materna associados a eventos perinatais adversos (METZGER et al., 2010).

Os critérios de diagnóstico de DM gestacional foram retificados e a recomendação, desde 2010, de acordo com a *International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups* (IADPSG) é de que gestantes que se enquadrem no diagnóstico padrão de DM tipo 2 na primeira consulta pré-natal sejam diagnosticadas como diabéticas e que sejam adotados novos valores de monitoramento para o diagnóstico de DMG, definidos para o teste oral de tolerância à glicose (TTGO) com o 75 g de glicose e com valores para o diagnóstico paliativo do DM2 de: glicemia de jejum  $\geq 92$  mg/dL, após 1 hora  $\geq 180$  mg/dL e/ou após 2 horas  $\geq 153$  mg/dL, sendo único valor anormal suficiente para o diagnóstico (IADPSG, 2010; METZGER et al., 2010). É aconselhável que mulheres com história de DM gestacional sejam avaliadas em relação à persistência ou não de anormalidades no metabolismo da glicose em 6 a 12 semanas após o parto, seguindo os mesmos critérios diagnósticos de TTGO utilizados fora do período gestacional ou através da glicemia de jejum, sendo que o TTGO considerado o mais sensível.

Se os níveis glicêmicos estiverem normais, a reavaliação pode ser feita a cada 3 anos, caso contrário, anualmente (METZGER et al., 2010).

Assim como o DM tipo 2, o DM gestacional está associado à resistência insulínica e à diminuição da função das células beta pancreáticas. Os principais fatores de risco para desenvolvimento de DM gestacional relacionam-se à idade materna avançada, sobrepeso, obesidade ou ganho de peso em excesso na gravidez, disposição excessiva de gordura corporal central, histórico familiar de DM, crescimento fetal excessivo, polidrâmnio, hipertensão, pré-eclâmpsia, antecedentes obstétricos de abortamentos, malformações e macrossomia, síndrome de ovários policísticos, além de mulheres com estaturas menores que 1,5 m (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016).

Formas menos frequentes do DM pertencem à classificação outros tipos de DM. A manifestação clínica desse grupo é bastante variada, e estão incluídos nessa categoria: defeitos genéticos da função da célula  $\beta$ , defeitos genéticos da ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, indução por drogas, fármacos ou produtos químicos, infecções, formas incomuns de diabetes mediado por imunidade, dentre outros (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016).

Recentemente, tem-se dado ênfase a 2 categorias de tipos específicos de diabetes: diabetes MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) e DM de origem mitocondrial. O tipo MODY inclui um grupo heterogêneo de diabetes sem propensão para a cetoadicose e obesidade, com hiperglicemia moderada, início antes dos 25 anos de idade, várias gerações de familiares com diabetes, caracterizando uma herança autossômica dominante. Normalmente, estes pacientes apresentam um defeito na secreção de insulina relacionado a mutações em genes específicos. Sugere-se que este tipo de diabetes seja responsável por cerca de 1 a 5% dos casos de diabetes (FAJANS; BELL; POLONSKY, 2001).

O DM de origem mitocondrial caracteriza-se por ocorrer em indivíduos jovens e sem obesidade. A princípio, a hiperglicemia é leve e pode progredir lentamente para graus mais avançados que necessitam da administração de insulina. Ocorre devido a uma mutação no DNA mitocondrial, interferindo com a produção de energia. Os pacientes usualmente apresentam surdez neurossensorial e distrofia macular e menos frequentemente pode haver miopatia, cardiomiopatia e doença renal (GUILLAUSSEAU et al., 2001).

## 1.2 DM e estresse oxidativo

No DM, a manutenção da hiperglicemia por longos períodos é responsável pelo estabelecimento de diversos distúrbios no equilíbrio pró-oxidante/antioxidante, culminando em diversos efeitos deletérios ao indivíduo, que levam ao estresse oxidativo (ABDOLLAHI et al., 2004; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; ACHESON, 2010; BANDEIRA et al., 2013). A geração de espécies reativas de oxigênio (e nitrogênio) de natureza radicalar e não radicalar, é um processo fisiológico e contínuo; tais espécies atuam como mediadores na transferência de elétrons em diversas reações bioquímicas (de forma permanente ou incidental). A instalação do quadro de estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio na homeostase entre compostos oxidantes e antioxidantes, podendo ser pela excessiva geração de espécies reativas e/ou por prejuízo na remoção destas espécies. Este evento leva à oxidação de biomoléculas e consequentemente perda da funcionalidade das mesmas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010).

A cronicidade do processo oxidativo é relevante em diversas condições crônicas, tais como aterosclerose, DM, obesidade, câncer e transtornos neurodegenerativos (GREEN; BRAND; MURPHY, 2004). A geração de espécies reativas de oxigênio pode ocorrer nas membranas celulares, especialmente nas membranas plasmáticas e mitocondriais; onde íons cobre e de ferro podem favorecer este mecanismo. No entanto, a mitocôndria é a principal fonte geradora de espécies reativas de oxigênio, por meio da cadeia transportadora de elétrons (GREEN; BRAND; MURPHY, 2004). Fisiologicamente, os organismos aeróbios utilizam de 85 a 90% do  $O_2$  na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, que atua como o aceptor final de elétrons. O restante (10-15%) é utilizado principalmente por diferentes enzimas, tais como oxidases e oxigenases, ou por reações químicas de oxidação direta (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Na cadeia transportadora de elétrons, o  $O_2$  sofre redução tetravalente, aceitando quatro elétrons para a formação de água, um processo mediado pela enzima citocromo oxidase. Contudo, cerca de 2-5% do oxigênio presente na mitocôndria pode ser reduzido de forma univalente, ao entrar em contato com a forma reduzida e radicalares da coenzima Q contendo um elétron desemparelhado ( $CoQH^{\bullet}$ ), formando o ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; KOURY; DONAGELO, 2003; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Com a redução univalente do  $O_2$  e a participação de íons de ferro ou de cobre, também pode ocorrer a geração de radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ) e de peróxido de hidrogênio

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Mesmo sem elétron desemparelhado na última camada eletrônica para caracterizá-lo como um radical livre, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresenta alto potencial reativo, tal fato se deve por sua participação na geração de HO<sup>•</sup> proporcionando assim ação deletéria ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pois desta forma pode alterar biomoléculas nas proximidades, além de ter capacidade de atravessar as membranas celulares, o que faz do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uma molécula altamente tóxica, especialmente na presença de ferro (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; KOURY; DONANGELO, 2003; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Os íons de ferro e de cobre assumem papel de catalisadores para a geração de espécies reativas, via reações de Fenton e Haber-Weiss, devido à capacidade destes compostos metálicos de sofrerem oxidação-redução. Na reação de Fenton, ocorre a geração do radical OH<sup>•</sup> por meio da reação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com os íons ferro ou cobre. Na reação de Haber-Weiss, estes íons catalisam a reação entre o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e geram OH<sup>•</sup> (KOURY; DONANGELO, 2003; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Quando ferro ou cobre se ligam às suas proteínas transportadoras, tais como transferrina ou ceruloplasmina, respectivamente, ou proteínas de estoque como a ferritina, previne-se ou reduz-se a geração destas espécies reativas.

O ferro não ligado à ferritina dissocia-se na forma de íon, tornando-se apto para as reações de oxidação-redução e sucessiva geração de espécies reativas (KOURY; DONANGELO, 2003; WELCH; VAN EDEN; AUST, 2002). As espécies reativas reagem com diversos componentes celulares, especialmente lipídeos, tais como ácidos graxos poli-insaturados, fosfolipídeos e colesterol presentes nas membranas celulares. Os ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares, quando oxidados, levam à geração de radicais, tais como o alcóxila (LO<sup>•</sup>) e o peróxila (LOO<sup>•</sup>), por meio do processo de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação, LPO (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A LPO leva a danos estruturais das membranas celulares, culminando prejuízos nos mecanismos de troca de metabólitos e, em condições mais extremas, à morte celular (BENZIE, 1996). É possível que a LPO constitua um dos eventos citotóxicos primários que desencadeia diversas lesões celulares. Modificações nas membranas biológicas levam a alterações da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e de outros compostos. Estes eventos podem comprometer a seletividade tanto para a entrada quanto para a saída de nutrientes e substâncias tóxicas da célula, favorecer modificações no material genético, promover a oxidação da lipoproteína de densidade baixa (LDL) e levar ao comprometimento de proteoglicanos,

colágeno e elastina, componentes da matriz extracelular (VACA; WILHEM; HARMS-RINGDAHL, 1988; BARBER; HARRIS, 1994).

A LPO pode ocorrer por duas formas distintas nos sistemas biológicos: (i) via enzimática, que envolve as ciclo-oxigenases e lipoxigenases na oxigenação dos ácidos graxos, e (ii) peroxidação não enzimática, com a participação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, metais de transição (ferro e cobre) e outros radicais livres (AL-MEHDI et al., 1993; PORTER; CALDWELL; MILLS, 1995).

Tem sido postulado que, para ocorrer a oxidação inicial dos ácidos graxos poliinsaturados, faz-se necessário um oxigênio na forma ativada, como por exemplo o oxigênio no estado eletronicamente excitado, o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ); o estado fundamental do oxigênio é um estado triplete com dois elétrons não pareados de mesmo spin, mas em diferentes orbitais (DI MASCIIO, 1995).

O radical  $OH^\bullet$  apresenta um elevado potencial reativo, sendo postulado como o principal iniciador do processo de LPO. Este radical também tem a capacidade de agir sobre várias biomoléculas e alterar sua estrutura funcional. Por exemplo, a interação do radical  $OH^\bullet$  com o DNA aumenta a possibilidade de aparecimento de mutações (WELCH; VAN EDEN; AUST, 2002).

As espécies reativas de oxigênio também reagem com outros componentes celulares, tais como proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos (ORRENIUS; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY, 2007). Em relação aos danos provocados pelas espécies reativas em proteínas, merecem destaque as alterações oxidativas em resíduos de aminoácidos específicos (arginina, tirosina e triptofano), levando a alterações conformacionais na proteína, bem como fragmentação e desnaturação, com aumento da susceptibilidade à hidrólise. Proteínas com muitos grupos sulfidrilas são mais susceptíveis ao ataque de espécies reativas. A reação de espécies reativas de oxigênio e proteínas pode resultar em alterações estruturais, com consequente diminuição ou perda de sua funcionalidade (CECARINI et al., 2006).

Os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos. Dentre os componentes enzimáticos, destacam-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GSH-Px) e o sistema que utiliza nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (NADPH) como coenzima importante da enzima glutatona redutase (GSH-Rd) para promover a regeneração de glutatona reduzida (GSNP) a

partir de glutathiona oxidada (GSSG) (VASCONCELOS et. al., 2007; EBERHARDT, 2001; MACNEE, 2000).

A SOD, uma das principais enzimas de defesa antioxidante, apresenta atividade em vários tecidos, tais como sangue, fígado, cérebro, entre outros. São capazes de catalisar a dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$  no estado fundamental, protegendo as células dos efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010).

Em humanos, foram identificadas três isoformas da SOD, que dependem de metal no sítio ativo: (i) Cu, Zn-SOD citosólica (SOD1): apresenta massa molecular de 32 KDa, composta por duas subunidades idênticas, sua atividade independe de pH na faixa de 5 a 9,5; (ii) Mn-SOD mitocondrial (SOD2): é um homotetrâmero de 96 kDa, contém um átomo de  $Mn^{2+}$  por subunidade; é uma das mais efetivas enzimas antioxidantes; (iii) SOD extracelular (EC-SOD/SOD3): é uma glicoproteína tetramérica que contém  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ , no sítio ativo, tem alta afinidade por certos glicosaminoglicanos, como a heparina (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

As enzimas CAT e GSH-Px atuam impedindo o acúmulo de  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos bem como evitam a ocorrência das reações de Fenton e Haber-Weiss (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Considerando a reatividade das espécies reativas de oxigênio, é de extrema importância manter os níveis das enzimas antioxidantes com o propósito de promover a manutenção da integridade celular. A GSH-Px existe sob duas formas: dependente e independente de selênio, e podem apresentar-se no citoplasma ou na mitocôndria (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; GREEN et al., 2004). A GSH-Px merece atenção especial, pois sua atuação depende do ciclo redox da glutathiona por meio do controle entre a relação da glutathiona nas formas reduzida e oxidada (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; KOURY; DONAGELO, 2003; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). No DM, a hiperglicemia crônica participa no estabelecimento do estresse oxidativo, que ocorre em diversos tecidos, especialmente aqueles que captam a glicose de maneira independente de insulina, com destaque para as células renais, da retina, fígado, células beta do pâncreas, células endoteliais, dentre outras. Desta forma, estes tecidos apresentam altas concentrações intracelulares de glicose e paralelas à hiperglicemia (GIACCO; BROWNLEE, 2010; MADONNA; DE CATERINA, 2011).

Este aumento nos níveis intracelulares de glicose contribui para o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente na dependência dos seguintes mecanismos

(GIACCO; BROWNLEE, 2010; MADONNA; DE CATERINA, 2011): (i) aumento na oferta de substratos para a via glicolítica e ciclo de Krebs, e assim aumento na geração de nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo na forma reduzida (FADH<sub>2</sub>), estas em seguida são coenzimas reoxidadas na cadeia transportadora de elétrons, aumentando assim o fluxo de elétrons neste processo, bem como a oxidação de monossacarídeos em reação catalisada por traços de íons de cobre e de ferro; (ii) aumento do fluxo da glicose pela via dos poliois; o O<sub>2</sub><sup>-</sup> estimula a atividade da aldose redutase, aumentando a redução da glicose em sorbitol, diminuindo assim os níveis de NADPH e dificultando a regeneração da GSNP, contribuindo para o aumento estresse oxidativo; (iii) ativação da proteína quinase C (PKC); a conversão de sorbitol em frutose aumenta a relação NADH/NAD<sup>+</sup>, condição favorável para a síntese “de novo” de diacilglicerol, um importante ativador da proteína quinase C (PKC) (DARLEY-USMAR et al., 1995; BROWNLEE, 2005). Quando ativada, a PKC participa no aumento da expressão de genes que contribuem para a patogênese das complicações vasculares (vasculopatias) do DM, aumentando a expressão de componentes que promovem oclusão vascular trombótica, aumento da permeabilidade vascular, inflamação, entre outros.

Estudos têm associado o estresse oxidativo no DM à exposição crônica de tecidos muito vascularizados à hiperglicemia. Além de promover aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, a hiperglicemia também interfere negativamente na capacidade antioxidante endógena de indivíduos diabéticos, que reflete em prejuízos na remoção de espécies reativas (SANTINI et al., 1997).

Com o objetivo de entender os mecanismos de interação entre o DM e suas complicações, também tem sido amplamente explorados os produtos finais de glicação avançada (AGE) (GROSSI; GENCO, 1998). A formação de AGE tem início com o processo de glicação não enzimática, especialmente de proteínas, o qual ocorre em duas fases, uma precoce e outra avançada. Na fase precoce, os produtos são instáveis e reversíveis, portanto acredita-se que não há relação dos mesmos com as complicações metabólicas do DM, esses produtos tendem a não se acumularem nos tecidos. Porém, na fase avançada, os AGE formados se ligam irreversivelmente às proteínas teciduais, resultando em seu acúmulo (VLASSARA; BUCALA, 1996). Os AGE também são continuamente formados no organismo de indivíduos saudáveis, desde o período embrionário, acumulando-se com a idade; em indivíduos diabéticos,

devido à alta oferta de glicose circulante, os AGE formam-se de maneira acelerada (MELPOMENI PEPPA; JAIME URIBARRI; HELEN VLASASARA, 2003).

Portanto, uma das consequências da hiperglicemia é a glicação não enzimática das proteínas plasmáticas e celulares, que ocorre via reação entre a glicose e os grupos NH<sub>2</sub> na cadeia lateral de resíduos de lisina das proteínas, que levam à formação de uma base de Schiff, que sofrem rearranjos, originando produtos mais estáveis (cetoaminas), e estas culminam na geração de produtos de glicação precoce ou produtos de Amadori. Os produtos de Amadori têm meia vida curta, e tendem a não se acumularem nos tecidos, logo, estes produtos não devem estar relacionados com complicações microvasculares. Entretanto, a hiperglicemia faz com que os produtos de Amadori sofram reações de fragmentação, oxidação, desidratação, condensação, dando origem aos AGE ou produtos de Maillard que, ao contrário dos produtos precoces, formam ligações cruzadas com as proteínas, o que faz com que os mesmos sejam irreversíveis (VLASSARA; BUCALA, 1996; BIERHAUS et al., 1998; MELPOMENI PEPPA; JAIME URIBARRI; HELEN VLASASARA, 2003).

Outra via de formação de AGE é a via do estresse carbonílico, na qual a oxidação dos lipídeos ou de açúcares gera compostos dicarbonílicos intermediários altamente reativos (HUEBSCHMANN et al., 2006). A formação de AGE pode também ocorrer via intermediários gerados na glicólise ou na auto-oxidação de glicose, produzindo aldeídos, tais como o metilglioxal e o glioxal, que interagem com aminoácidos para a formação de AGE (MEADE; MILLER; GERRARD, 2003).

Outro processo decorrente da formação de AGE é a ligação do mesmo com seu receptor RAGE (receptores de produtos finais de glicação avançada), presentes nas membranas plasmáticas de diferentes tipos celulares, principalmente macrófagos, linfócitos, fibroblastos e células endoteliais, e sua expressão está aumentada em indivíduos diabéticos (BRETT et al., 1993; GOH; COOPER, 2008).

Quando ocorre a ligação AGE-RAGE, os AGE alteram o metabolismo celular e provocam o aumento na geração de radicais de oxigênio, induzindo o estresse oxidativo celular, o qual em partes é responsável por danos vasculares, aumento da expressão da molécula de adesão VCAM-1, capaz de agregar monócitos na parede endotelial e dessa forma aumenta a probabilidade de formação de trombos e aterosclerose (RAMASAMY et al., 2005).

No DM, podemos observar órgãos-alvo onde há maior acúmulo de AGE: rins (MIYATA et al., 1998), vasos retinianos (MURATA et al., 1997) e nervos periféricos (CHEN

et al., 2004). Dentre as vias que levam ao desenvolvimento das lesões vasculares no DM, a geração de AGE é considerada a mais importante.

Em estudo de Dikalov (2011), foi demonstrado que a hiperglicemia acelera o processo de respiração celular, ocasionando um aumento na produção de  $O_2^{\cdot-}$  nas mitocôndrias e maior formação de AGE, que por sua vez, ligam-se aos RAGE de membrana e estimulam ainda mais a formação de  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$ .

Os AGE podem danificar as células por três mecanismos: (i) modificação de estruturas intracelulares, (ii) interação de AGE com proteínas da matriz extracelular, este mecanismo modifica a sinalização entre matriz e célula, provocando um desequilíbrio, e (iii) modificação de lipídeos e proteínas sanguíneas, as quais se ligadas a receptores específicos, estimulam a produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, e podem contribuir assim para a doença cardiovascular. Um estudo realizado por Vlassara et al. (2002), em indivíduos diabéticos e não diabéticos, mostrou que a redução no consumo de AGE na dieta pode ser eficaz na redução da inflamação crônica e na melhora do quadro de estresse oxidativo, portanto este estudo mostra que uma dieta equilibrada promove melhor eficácia concomitante às terapias antidiabéticas.

A glicação não enzimática de proteínas e os radicais lipídicos formados durante a peroxidação lipídica resultam em estresse carbonílico (NIKI et al., 2005).

Em sistemas orgânicos, os aldeídos mais comumente encontrados são: malondialdeído, glioxal, metilglioxal, acroleína, entre outros (LIU et al., 2010).

Sabe-se que os aldeídos derivados de lipídeos têm maior estabilidade em relação aos seus radicais livres precursores, dessa forma, podem atuar como mensageiros tóxicos, quando se difundem a partir do local de peroxidação lipídica, ocasionando a lesão oxidativa (LIU et al., 2010). Aldeídos reativos endógenos podem fazer ligações covalentes com resíduos de lisina, histidina e cisteína e assim formar ligações cruzadas nas proteínas, as quais promovem a lise da estrutura e perda de função da proteína (FRITZ; PETERSEN, 2011). Estas alterações têm como resultado o desencadeamento de modificações moleculares irreversíveis e formação de adutos, nomeados produtos finais de lipoperoxidação avançada (ALE) além dos próprios AGE (NIKI et al., 2005).

### 1.3 Memória metabólica

Vários mecanismos bioquímicos e fatores genéticos estão envolvidos na fisiopatologia do DM e suas complicações, com impactos sobre os programas de transcrição celular em órgãos-alvo, levando à expressão aberrante de genes pró-inflamatórios, pró-apoptóticos e pró-fibróticos (WORONIECKA et al., 2011; FORBES; COOPER, 2013). Tal fato pode ser justificado devido a uma “memória” de exposição prolongada das células às elevadas concentrações de glicose (NATHAN et al., 2005).

A hiperglicemia culmina em aumento nas concentrações intracelulares de glicose em células que captam glicose de maneira independente de insulina, estimulando a superprodução de  $O_2^{\cdot-}$  em nível mitocondrial, principalmente. Esta superprodução de  $O_2^{\cdot-}$  é um dos principais eventos envolvidos na ativação de diversas outras vias envolvidas na patogênese de complicações diabéticas, como por exemplo a via dos polióis, aumento na formação de AGE, ativação da proteína quinase C (PKC) e do fator de transcrição nuclear kappa B (NK- $\kappa$ B) e aumento no fluxo da glicose pela via da hexosamina (NISHIKAWA et al., 2000). Diversas proteínas mitocondriais são alvo de processos glicativos em condições de hiperglicemia, fazendo com que as mitocôndrias aumentem a produção de  $O_2^{\cdot-}$  (NISHIKAWA et al., 2000). No entanto, tem sido observado que, mesmo quando a glicemia em indivíduos com DM é normalizada, as mitocôndrias que tiveram seus componentes glicados continuam a superproduzir  $O_2^{\cdot-}$ , ativando assim os mesmos processos envolvidos na geração das complicações diabéticas. Esta hipótese tem sido denominada de “memória metabólica” (BROWNLEE, 2001).

Dentre os mecanismos que participam do estabelecimento da “memória metabólica”, estudos demonstram que a hiperglicemia crônica é capaz de promover um aumento na acetilação de resíduos de lisina em histonas, uma condição associada ao aumento da transcrição de determinados genes (NISHIKAWA, 2000).

Mecanismos da epigenética envolvem a modificação da expressão gênica e do fenótipo sem causar alteração na sequência de DNA (BIRD, 2007; BONASIO; REINBERG, 2010). Embora diferentes tipos de células de um mesmo indivíduo tenham sequência idêntica de DNA, as modificações epigenéticas, tais como metilação e modificações pós traducionais de proteínas como as histonas contidas na cromatina, são diferentes. Fatores ambientais, tais como infecções e alterações nutricionais, podem promover modificações epigenéticas e predispor indivíduos a doenças (JIRTLE; SKINNER, 2007)

A acetilação de histonas está normalmente associada a genes transcricionalmente ativos, enquanto que a metilação conduz à ativação ou repressão de genes, dependendo do local específico e/ou do nível de metilação (JENUWEIN; ALLIS, 2001; MARTIN; ZHANG, 2005; KOUZARIDES, 2007).

Ensaio clínico e pesquisas em humanos e em modelos animais têm sido realizados para melhor compreender os mecanismos moleculares responsáveis pela “memória metabólica”, a fim de aprimorar os tratamentos para pacientes diabéticos com o intuito de amenizar ou até mesmo prevenir complicações do DM em associação à correção da glicemia (JENUWEIN; ALLIS, 2001; MARTIN; ZHANG, 2005; KOUZARIDES, 2007).

Um estudo clínico realizado no período de 1983 a 1993, conhecido como “*Diabetes Control and Complication Trial*” (DCCT), selecionou indivíduos com DM tipo 1 para o tratamento do diabetes em duas abordagens: (i) tratamento convencional, uma ou duas injeções de insulina/dia, insulina de ação rápida ou intermediária; (ii) tratamento intensivo, três ou mais injeções de insulina/dia ou terapia com bomba de insulina com monitoramento glicêmico. Indivíduos em tratamento convencional mantiveram valores médios de HbA1c de 9,1% ao longo de 6,5 anos, enquanto que indivíduos em tratamento intensivo mantiveram HbA1c de 7,2%. A partir 1993, todos os pacientes, nas abordagens (i) e (ii), foram acompanhados no estudo observacional “*Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*” (EDIC); a partir deste momento, os pacientes foram orientados a seguir o tratamento intensivo. Nos anos posteriores, os valores médios de HbA1c dos dois grupos de tratamento apresentaram-se iguais. Independente dos valores de HbA1c, nos primeiros 4 anos de continuidade dos pacientes no estudo EDIC, foram observadas menores frequências de complicações crônicas do DM no grupo de indivíduos em tratamento intensivo desde o DCCT, o que demonstrou o efeito duradouro de um bom controle metabólico sobre a evolução das complicações crônicas (NATHAN, 2014).

Em um estudo realizado por Roy et al. (1990), relacionou-se a influência de uma condição de “memória hiperglicêmica” para a superprodução de fibronectina e de colágeno em células endoteliais, mesmo após a normalização da glicose em ratos diabéticos.

Um estudo em cães, realizado por Engerman, kern (1987) para avaliar se a progressão da retinopatia diabética pode ser interrompida quando há o re-estabelecimento da normoglicemia, mostrou que os animais continuaram apresentando complicações de retina mesmo após atingir níveis normais de glicemia.

Kowluru; Abbas; Odenbach (2004) conduziram um estudo com ratos diabéticos (indução com estreptozotocina), sendo divididos em 4 grupos: (i) animais com hiperglicemia não controlada por 13 meses; (ii) animais com hiperglicemia não controlada por 6 meses seguido de controle glicêmico por 7 meses; (iii) animais diabéticos tratados desde o início do experimento; (iv) animais não diabéticos. Os níveis de HbA1c, a LPO e os níveis de GSNP nos animais diabéticos com glicemia controlada logo após indução foram semelhantes aos níveis encontrados em animais normais, porém os animais que tiveram a correção da glicemia tardiamente apresentaram valores alterados de HbA1c, LPO e de GSNP e semelhantes aos animais diabéticos não tratados. Tais evidências sugerem que a hiperglicemia pode deixar uma “memória” em indivíduos que apresentaram condições não controladas de glicemia, favorecendo o desenvolvimento de futuras complicações do DM, mesmo após o controle glicêmico estabelecido.

#### **1.4 Alimentos funcionais**

Na década de 80, o governo japonês estava preocupado com o envelhecimento da população. Com a intenção de melhorar a qualidade de vida da população, o termo “alimento funcional” foi lançado, como o objetivo de se desenvolver alimentos mais saudáveis, que consistiam na incorporação de determinados compostos bioativos em alimentos em pequenas quantidades (SIBBEL, 2007; HENRY, 2010; ZERAIK et al., 2010).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera como alimento funcional, todo aquele alimento ou ingrediente que, além de nutrir, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, e que seja seguro para consumo sem a necessidade de supervisão médica (ANVISA, 1999a). Além disso, inclui o conceito para alegação de propriedade funcional, como aquela relacionada ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano (ANVISA, 1999a). Essas alegações para determinações de ácidos graxos, carotenoides, fibras alimentares, fitoesteróis, probióticos entre outros, já estão cientificamente aprovadas (BRASIL, 2010).

Diversos estudos evidenciam o papel dos alimentos funcionais e de seus compostos na prevenção e controle de inúmeros problemas de saúde, com objetivo de controlar problemas cardíacos e cardiovasculares (CARDOSO et al., 2013), processos inflamatórios e estresse oxidativo (JACOB et al., 2008). Alimentos funcionais com potencial antihiperglicemiante têm

sido estudados como futura opção para terapias adjuvantes ou complementares para o DM (KARTHIKESAN; PARI; MENON, 2010).

### 1.5 Curcumina

A *Curcuma longa* L. é uma planta pertencente à família Zingiberaceae, popularmente conhecida como açafrão-da-terra, com amplo cultivo em países asiáticos, principalmente Índia e China (AGGARWAL et al., 2007). Dos rizomas do açafrão-da-terra isola-se a curcumina, um polifenol (diferuloilmetano) de coloração amarela.

Inúmeros estudos têm demonstrado os efeitos benéficos da curcumina em diversas patologias, tais como: DM (SRIVIVASAN et al., 2003), câncer (YOUSSEF et al., 2004), mal de Alzheimer (RINGMAN et al., 2005), mal de Parkinson (ZBARSKY et al., 2005), doenças pulmonares (KALPANA; RAJASEKHARAN; MENON, 2005), esclerose múltipla (VERBEEK; VAN TOL; VAN NOORT, 2005), dislipidemia (BABU; SRINIVASAN, 1999), epilepsia (GUPTA; BRIVAL; SHARMA, 2009), doenças renais (KUWABARA et al., 2006), dentre outras (SUETH-SANTIAGO et al., 2015). Possui ainda propriedades antiinflamatória (BALASUBRAMANYAM et al., 2003), antioxidante (FUJISAWA et al., 2004; YOUSSEF et al., 2004; AK; GÜLÇİN, 2008), antibacteriana (NAZ et al., 2010), antiaterogênica (OLSZANECKI et al., 2005), antiparasitária (PÉREZ-ARRIAGA et al., 2006), antifúngica (KIM; CHOE; LEE, 2003), antimalárica (NANDAKUMAR et al., 2006).

Em relação às propriedades antioxidantes, a curcumina age impedindo a LPO, desta forma confere proteção a outras biomoléculas que também são alvo de ataques por peróxidos e radicais lipídicos, como por exemplo o DNA (KUNCHANDY; RAO, 1990). Resultados anteriores de nosso laboratório obtidos nos estudos de Gutierrez et al. (2012) e Arcaro et al. (2014) estimulam a investigação das atividades antidiabética e antioxidante da curcumina em modelo experimental de DM.

Gutierrez et al. (2012) demonstraram que o tratamento de ratos diabéticos (indução por estreptozotocina) com 90 mg/kg de curcumina incorporada em iogurte por 31 dias foi capaz de promover melhoria em diversos parâmetros fisiológicos e bioquímicos classicamente alterados neste modelo experimental de DM. Houve redução significativa nos níveis plasmáticos de glicose, triacilgliceróis, marcadores de dano hepático [aspartato (AST) e alanina (ALT) aminotransferases], nos níveis urinários de glicose, ureia e proteína, e promoveu aumento no conteúdo de glicogênio hepático. Ratos diabéticos tratados com curcumina também

apresentaram redução na ingestão alimentar e hídrica, no volume urinário e aumento no ganho de peso corporal.

Considerando que um dos problemas associados à curcumina é a sua baixa biodisponibilidade quando administrada oralmente, o estudo de Arcaro et al. (2014) teve como objetivo aumentar a biodisponibilidade da curcumina ao realizar a co-administração com piperina, um alcalóide isolado dos frutos de *Piper nigrum* e que possui atividade *bioenhancer*, via inibição de processos de biotransformação no fígado e intestino. Um dos achados deste estudo foi relacionado ao potencial antioxidante *in vivo* da curcumina em ratos diabéticos: ratos diabéticos tratados durante 45 dias com curcumina incorporada em iogurte apresentaram redução no estresse oxidativo, uma vez que houve um aumento significativo nas atividades hepáticas das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px e nos níveis de GSNP, e houve redução nos níveis de marcadores de lesão oxidativa em lipídeos (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBARS) e em proteínas (proteínas carboniladas, PCO). A atividade antidiabética da curcumina observada no tratamento por 45 dias foi semelhante aos achados de Gutierrez et al. (2012).

Outro achado deste estudo de Arcaro et al. (2014) trata das consequências da associação de 90 mg/kg de curcumina com piperina (doses de 20 e 40 mg/kg); foi observado que o tratamento de ratos diabéticos com iogurte enriquecido com curcumina e 20 mg/kg de piperina não promoveu alterações nas atividades antidiabética e antioxidante da curcumina. Surpreendentemente, o tratamento de ratos diabéticos com iogurte enriquecido com curcumina e 40 mg/kg de piperina anulou completamente os efeitos benéficos da curcumina, além de causar alterações relacionadas à toxicidade hepática (aumento nos níveis de ALT). Assim, estes achados mostraram que a coadministração de curcumina e a piperina não trouxe qualquer vantagem às ações antidiabéticas e antioxidantes da curcumina, o que nos dá indícios de que tais atividades sejam atribuídas a algum (s) metabólito (s) da curcumina.

Majithiya; Pharm e Balaraman (2005) monitoraram as alterações temporais de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em ratos diabéticos sem tratamento e tratados cronicamente (24 semanas) com 200 mg/kg de curcumina (suspensão em 0,5% de carboximetil celulose). Houve redução na atividade de SOD em rins de ratos diabéticos a partir da 8ª semana de diabetes em relação aos animais normais, redução esta que não foi prevenida pelo tratamento com curcumina. Em relação à CAT, apesar de ser observado um aumento abrupto na atividade da enzima em rins de ratos no início do diabetes (até a 4ª semana), este aumento foi seguido de

uma queda significativa, alcançando valores de atividade de CAT bem menores em comparação aos valores observados em rins de ratos normais, e novamente o tratamento com curcumina não foi capaz de reduzir e/ou prevenir a perda na capacidade antioxidante. Similarmente, os níveis de GSNP também foram significativamente reduzidos em rins de ratos diabéticos (tratados ou não com curcumina) em relação aos animais normais. Mesmo com esta perda na capacidade antioxidante, o aumento nos níveis de TBARS em rins de ratos diabéticos tratados com curcumina foi menor que o aumento observado em ratos diabéticos não tratados, evidenciando que a curcumina apresentou atividade antioxidante *in vivo*, reduzindo a peroxidação lipídica no DM. No entanto, deve-se ressaltar que o tratamento com curcumina em carboximetil- celulose não foi capaz de reduzir a glicemia destes animais, o que talvez explique as diferenças dos achados encontrados neste trabalho em relação aos resultados de Arcaro et al. (2014), que além de encontrarem redução nos marcadores de lesão oxidativa, também encontraram aumento na atividade antioxidante endógena e atividade anti-hiperglicemiante.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Realizar estudo temporal das alterações relacionadas ao estresse oxidativo em animais diabéticos tratados com insulina ou iogurte enriquecido com curcumina.

### **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar, após 0, 7, 15, 30 e 74 dias de tratamento, as alterações nos parâmetros de estresse oxidativo e atividade antioxidante de ratos normais e diabéticos tratados com iogurte ou iogurte enriquecido com curcumina e ratos diabéticos tratados com insulina.

Os parâmetros estudados foram:

Parâmetros fisiológicos e relacionados ao metabolismo de carboidratos: peso corporal e glicemia.

Parâmetros bioquímicos plasmáticos relacionados ao estresse oxidativo e atividade antioxidante: níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), atividade da paraoxonase (PON1).

Parâmetros bioquímicos teciduais (fígado) relacionados ao estresse oxidativo e atividade antioxidante: níveis de proteínas carboniladas (PCO), atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px, e níveis de glutathiona reduzida (GSNP).

Parâmetro relacionado ao estresse glico-oxidativo (plasma): níveis de AGE no plasma.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos ( $150 \pm 10$  g) provenientes do Biotério Central do Câmpus de Botucatu, UNESP. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, com ciclo claro/escuro de 12 horas e condições controladas de temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  e de umidade relativa de  $55 \pm 5\%$ . Todos os procedimentos de manejo e manipulação animais do presente trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, (CEUA/FCF/CAR n° 26/2015, ANEXO I).

#### **3.2 Indução do diabetes mellitus experimental**

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (máximo 5 animais por caixa) com água e ração *ad libitum*, onde permaneceram durante 3 dias para adaptação antes de qualquer manipulação relacionada ao procedimento experimental. Posteriormente, os animais foram submetidos a jejum de 12 horas para posterior indução do DM experimental, via administração de 40 mg/kg de estreptozotocina (STZ), solubilizada em tampão citrato 10 mM (pH 4,5). A STZ foi administrada via acesso à veia jugular, após anestesia dos ratos com anestésico volátil isoflurano. Animais normais foram submetidos ao mesmo procedimento, porém receberam apenas tampão citrato.

#### **3.3 Tratamento de animais normais e diabéticos com iogurte enriquecido com curcumina**

Após três dias da administração de STZ ou de tampão citrato, os animais foram divididos em cinco diferentes grupos, que foram constituídos a partir de valores semelhantes das médias de glicemia e peso corporal. Os grupos experimentais foram os seguintes:

- Grupo normal (não diabético) tratado com iogurte (NIOG);
- Grupo normal (não diabético) tratado com 90 mg/kg de iogurte (NCUR) enriquecido com curcumina;
- Grupo diabético tratado com iogurte (DIOG);
- Grupo diabético tratado com 90 mg/kg de curcumina (DCUR) incorporada no iogurte;

- Grupo diabético tratado com 4 U/dia de insulina (DINS).

A incorporação da curcumina ao iogurte ocorreu em ambiente termostatzado a 25°C, durante 90 segundos, sob rotação de 27000 rpm em homogeneizador modelo Metabo. Foi utilizada curcumina (Sigma®, ~ 70%) administrada em duas doses diárias de 45 mg/kg. A administração foi feita via gavagem, duas vezes ao dia, às 8:00h e 17:00h, em volume de 0,5 mL de iogurte por administração para cada animal.

A insulina (Humolin®) foi preparada em solução de cloreto de sódio 0,85% (g/mL) e administrada por via subcutânea, em duas doses diárias de 2 U, totalizando 4 U/dia, nos mesmos horários da gavagem, durante todo o período experimental.

Para a determinação da glicemia, o plasma foi obtido do sangue coletado pela cauda dos animais, após vasodilatação periférica, em eppendorfs heparinizados (HEMOFOL®). O sangue coletado foi centrifugado durante 10 minutos a 2500 rpm e o plasma obtido foi utilizado para a dosagem de glicemia.

Ao final de cada experimento, os animais foram eutanasiados por decapitação, o sangue foi coletado e o fígado foi retirado e congelado à -80°C para posterior determinação dos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e atividade antioxidante (TBARS, PCO, SOD, CAT, GSH-PX, GSNP, PON, AGE).

### **3.4 Metodologias das dosagens bioquímicas**

**3.4.1** A dosagem de glicemia foi realizada pelo método da glicose oxidase (TRINDER, 1969; HALL, 2003), utilizando kit Labtest®. A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose na amostra, produzindo ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio oxida a 4aminoantipirina na presença de fenol, sob ação da peroxidase, formando antipirilquinonimina, monitorada espectrofotometricamente em 505 nm. A intensidade de absorção de luz é proporcional à concentração de glicose na amostra.

**3.4.2** Para a determinação de TBARS no plasma, a amostra foi submetida à desproteinização pelo método de Pilz; Meineke; Gleiter (2000). A concentração de TBARS foi determinada fluorimetricamente, em comprimentos de onda de excitação e emissão de 510 e 553 nm, respectivamente. Foi realizada curva analítica com 1,1',3,3'tetrametoxipropano. Os resultados foram expressos em µmol de TBARS/L.

**3.4.3** As proteínas carboniladas no fígado foram determinadas pelo método descrito por Levine et al. (1994). Os grupos carbonilas presentes nas proteínas reagem com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) em meio ácido formando 2,4-dinitrofenilhidrazona, que absorve luz em 370 nm. A concentração de PCO na amostra foi obtida utilizando o coeficiente de extinção molar da hidrazona ( $22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) e expressa em nmol de PCO/mg de proteína.

**3.4.4** A atividade da enzima SOD no fígado foi determinada de acordo com Beauchamp; Fridovich (1971). A oxidação da xantina gera o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  em reação catalisada pela xantina oxidase, o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  reduz o *nitroblue tetrazolium* (NBT) a uma formazana. O ensaio é baseado na inibição da redução do NBT na presença de SOD na amostra, monitorada em 550 nm. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução do NBT em 50%.

**3.4.5** A atividade da enzima CAT no fígado foi determinada pelo método descrito por Beers; Sizer (1952), via monitoramento do desaparecimento do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em 230 nm. Os resultados foram expressos em mmol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumido/min/mg de proteína.

**3.4.6** A atividade da enzima GSH-Px no fígado foi determinada pelo método descrito por Rush; Sandiford (2003). A GSH-Px catalisa a oxidação de GSNP na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Na presença de glutathione redutase (GSH-Rd), a glutathione oxidada (GSSH) é reduzida à GSNP com oxidação concomitante do NADPH à  $\text{NADP}^+$ . A oxidação do NADPH é monitorada pela diminuição da absorbância em 340 nm. Os resultados foram expressos em mmol de NADPH consumido/min/mg de proteína.

**3.4.7** A atividade de PON1 no plasma foi determinada de acordo com Costa et al. (1990), com modificações. A atividade de PON1 foi medida pela hidrólise do paraoxon e liberação de *p*-nitrofenol. A mistura para o ensaio foi composta por 10  $\mu\text{L}$  de plasma em tampão Tris/HCl 15 mM (pH 8,5) contendo  $\text{CaCl}_2$  0,15 mM, NaCl 0,3 M e 1,2 mM de paraoxon. Uma solução-mãe de paraoxon 120 mM foi preparada em acetona e mantida em gelo; antes da utilização, esta solução-mãe foi diluída a 1:40 em água e a sua concentração foi monitorada a 265 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar do paraoxon em água ( $8.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (BUDAVARI et al., 2006). O ensaio foi realizado a  $37^\circ\text{C}$  e iniciado pela adição de paraoxon. A atividade foi monitorada medindo-se a absorbância a 405 nm por 5 minutos. Os resultados foram calculados assumindo o coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenol ( $18.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (RICHTER et al., 2008). A atividade de PON1 foi expressa em unidades/litro (unidade =  $\mu\text{mol}$  paraoxon hidrolisado/min).

**3.4.8** Para a determinação dos AGE, foram utilizadas amostras de plasma, nas quais foram adicionados 4,6 M de clorofórmio, 0,15 M de ácido tricloacético (TCA) e 1,5 M de NaOH, sendo alcançadas, após a mistura, concentrações de 0,45 M de clorofórmio, 0,12 M de TCA e 0,1 M de NaOH. A determinação dos AGE foi feita de acordo com metodologias realizadas por Münch et al. (1997) e Zilin et al. (2001) com modificações. Após homogeneização em vórtex durante 20 segundos, as amostras foram centrifugadas à 13.000 G. Em seguida, alíquota do sobrenadante foi retirada para quantificação, via fluorescência, de AGE totais

( $\lambda_{exc}$  370 nm;  $\lambda_{em}$  440 nm) (PENNACCHI et al., 2015). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias corrigidas por proteína (UA/mg proteína).

**3.4.9** As concentrações de proteínas no sobrenadante de homogenato de fígado foram determinados de acordo com Lowry et al. (1951). O princípio do método baseia-se em uma mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu), que é reduzido quando reage com proteínas, na presença de cobre (II), e produz um composto azul escuro. As concentrações de proteínas foram determinadas espectrofotometricamente a 660 nm; os resultados foram expressos como mg/mL, sendo a curva analítica foi feita com albumina bovina sérica.

### **3.5 Análise estatística**

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão (EPM). Análise de variância One-way ANOVA seguida do teste Student-Newman-Keuls foi utilizada para comparar os resultados inter-grupos. Test t student pareado foi utilizado para as comparações intra-grupos. Test t não pareado foi utilizado para comparações entre animais normais e diabéticos no T0. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas pelo programa GraphPad InStat® 5 (GraphPad Software, USA).

#### 4. RESULTADOS

Exceto para os grupos de animais normais, todos os experimentos foram iniciados com animais diabéticos, três dias após a administração de STZ (denominado no estudo como tempo zero, 0). Três dias é o tempo necessário para que ocorra a completa eliminação do fármaco diabetogênico STZ, bem como é o tempo necessário e suficiente para o estabelecimento do DM experimental com níveis característicos de glicemia do diabetes (GUTIERRES et al., 2012; ARCARO et al., 2014; ASSIS et al., 2017).

Portanto, o que chamamos de “tempo 0” nos experimentos temporais trata-se do dia onde ocorre a composição dos grupos, e ainda não há tratamento (iogurte, curcumina em iogurte ou insulina).

Para avaliar se este curto tempo de DM (3 dias) já é capaz de promover alterações em biomarcadores do estresse oxidativo, foram realizados experimentos com um grupo de animais normais e um grupo de animais diabéticos, 3 dias após a administração de citrato ou STZ, respectivamente, com o intuito de avaliar as alterações em biomarcadores de estresse oxidativo e enzimas antioxidantes, sem a realização de qualquer intervenção (iogurte, insulina ou curcumina em iogurte).

Podemos observar que, 3 dias após a administração de citrato ou STZ, animais normais e diabéticos, respectivamente, apresentaram os mesmos valores médios de peso corporal, no entanto cabe salientar que o peso corporal de ratos normais era menor no dia da indução do DM (Tabela 1). O fato de os animais normais e diabéticos apresentarem o mesmo peso corporal 3 dias após a indução do DM é explicado pelo maior ganho de peso corporal de animais normais em relação aos animais diabéticos, tal como indicado pelos valores de delta peso de cada grupo (Tabela 1).

Tal como esperado, os níveis glicêmicos de animais diabéticos (3 dias pós-STZ) foram cerca de 4 vezes maiores em relação aos valores observados em animais normais (Tabela 1).

**Tabela 1:** Peso corporal (g) no dia da administração de STZ ou citrato e peso corporal e glicemia (mg/dL) no dia do pareamento.

DM	Peso corporal 3 dias pós-STZ	Peso corporal (g)	Peso corporal (mg/dL) (g)	Delta peso (g)	Glicemia na indução do
Normal	130,1 ± 0,93		163,4 ± 4,54	33,33 ± 3,97	105,4 ± 2,88
Diabético	143,0 ± 3,20 #		163,3 ± 3,76	20,11 ± 1,65 #	469,0 ± 21,95 #

# diferenças inter-grupo, normal vs diabético, teste t não pareado e teste t pareado (p<0,05).

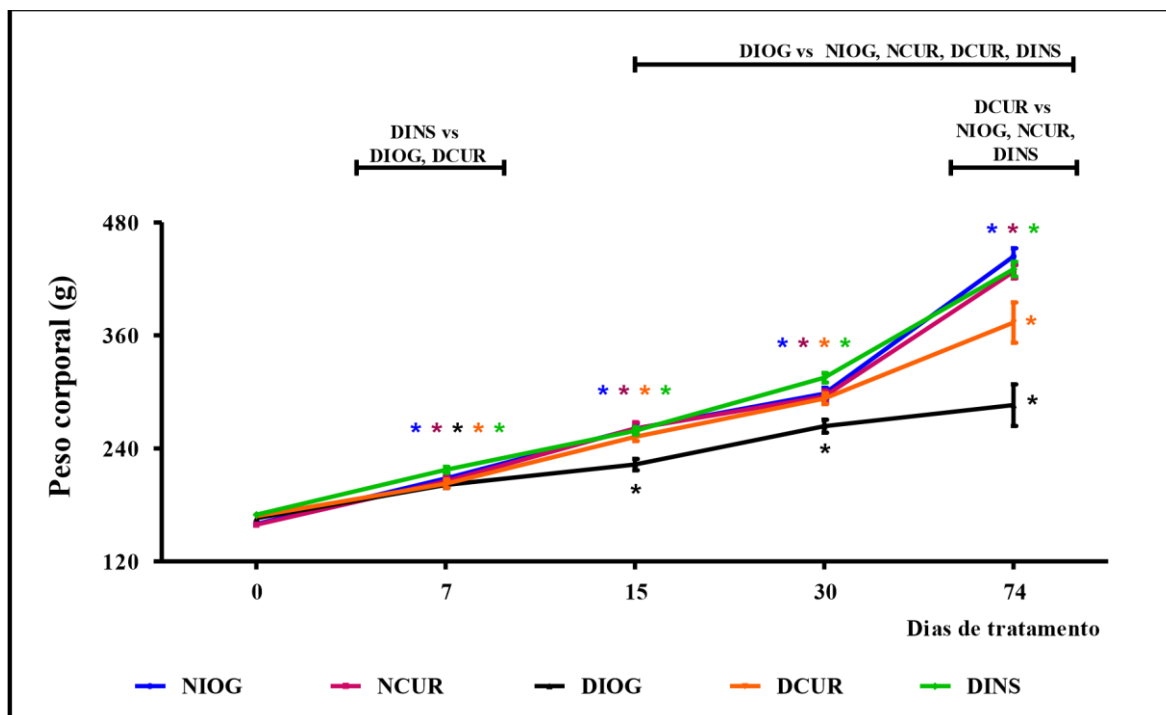
É possível observar que o grupo DINS apresentou um maior ganho de peso corporal, desde o 7º dia de tratamento, em relação aos grupos DIOG e DCUR, alcançando valores de peso corporal semelhantes aos animais normais, NIOG e NCUR (Figura 1).

Animais diabéticos tratados com iogurte (DIOG) apresentaram menor ganho de peso corporal, desde o 7º dia de tratamento, quando comparados aos valores obtidos nos demais grupos.

Animais diabéticos tratados com curcumina em iogurte (DCUR) apresentaram um maior ganho de peso corporal, a partir do 15º dia de tratamento, em relação ao grupo DIOG.

Animais normais tratados com curcumina em iogurte (NCUR) não apresentaram diferenças em relação ao peso corporal quando comparados aos animais normais tratados com iogurte (NIOG), o que significa que a curcumina não interfere neste parâmetro em animais normais (Figura 1).

**Figura 1:** Peso corporal (g) de ratos normais e diabéticos não tratados e tratados por 0, 7, 15, 30 e 74 dias com iogurte, curcumina em iogurte ou insulina.



Valores expressos como média  $\pm$  EPM. Comparações inter-grupos foram realizadas com One-way ANOVA seguido de teste Student-Newman-Keuls e para comparações intra-grupos foi realizado test t não pareado ( $p < 0,05$ ), barras horizontais. \* Diferenças intra-grupo em relação ao tempo 0 ( $p < 0,05$ ).

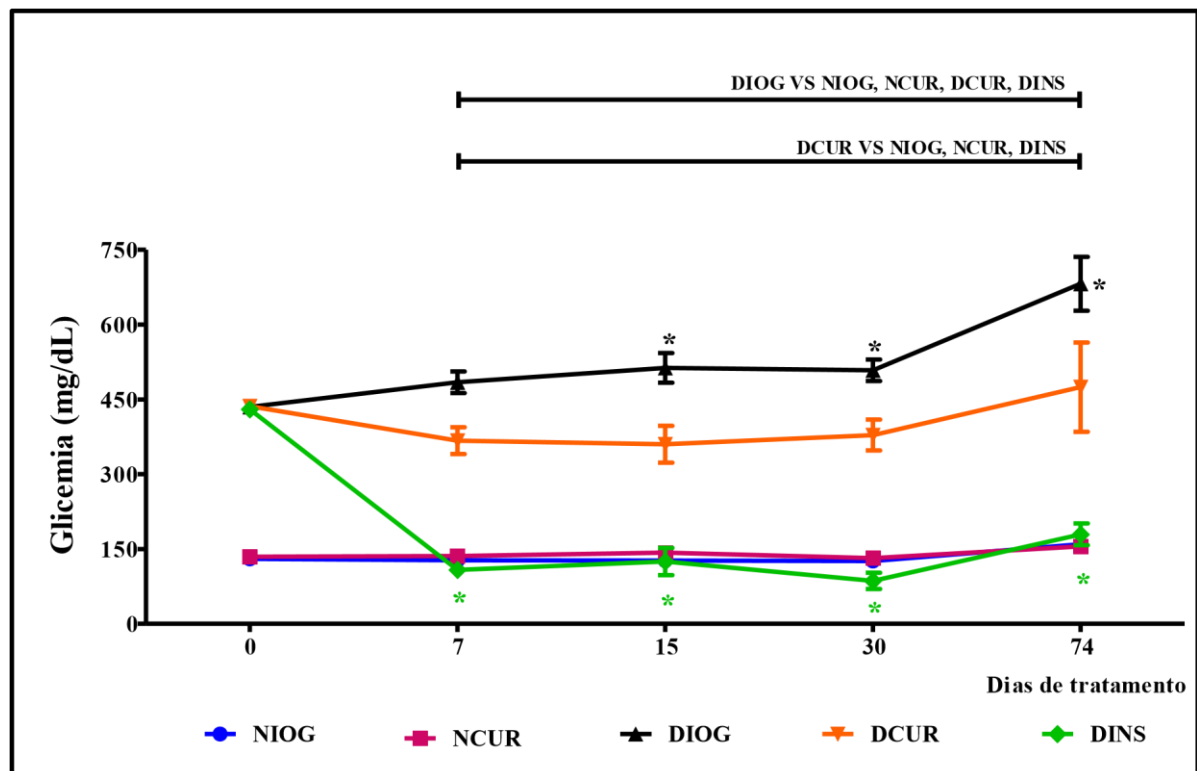
Pode ser observado que a indução do DM com a administração de estreptozotocina foi efetiva, uma vez que todos os grupos de animais diabéticos (DIOG, DCUR e DINS) apresentaram, no dia 0, valores médios de glicemia elevados em relação aos animais normais, e semelhantes entre os grupos diabéticos (435, 436 e 430 mg/dL, respectivamente), o que permitiu o pareamento para as futuras comparações inter e intra-grupos nos diferentes tempos, após o início dos tratamentos (Figura 2).

Independente do período experimental, o grupo DIOG apresentou um aumento gradual na glicemia, evidenciando a piora do quadro de DM. Tal como esperado, os ratos diabéticos que receberam insulina (DINS) apresentaram uma redução significativa da glicemia, desde o 7º dia de tratamento, apresentando médias de glicemia semelhantes aos valores encontrados em animais não diabéticos (NIOG e NCUR) (Figura 2).

O tratamento de ratos diabéticos com 90 mg/kg de curcumina em iogurte (DCUR) foi capaz de promover níveis glicêmicos menores, a partir do 7º dia em relação aos animais do grupo DIOG e a manutenção desses níveis até o final do tratamento (Figura 2), corroborando achados anteriores de nosso laboratório (GUTIERRES et al., 2012; ARCARO et al., 2014; ASSIS et al., 2017).

Animais normais tratados com curcumina em iogurte (NCUR) e animais normais tratados apenas com iogurte (NIOG) apresentaram valores constantes de glicemia e dentro da normalidade, desde o início do tratamento até o último dia de experimento (Figura 2), o que demonstra que a curcumina ou iogurte não interferem na glicemia de animais normais.

**Figura 2:** Glicemia (mg/dL) de ratos normais e diabéticos tratados por 7, 15, 30 e 74 dias com iogurte, curcumina em iogurte ou insulina.



Valores expressos como média  $\pm$  EPM. Comparações inter-grupos foram realizadas com One-way ANOVA seguido de teste StudentNewman-Keuls ( $p < 0,05$ ), barras horizontais. \* Para comparações intra-grupos foi realizado test t não pareado em relação ao tempo 0, ( $p < 0,05$ ).

A determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) permite o monitoramento de alterações desses biomarcadores relacionados à peroxidação lipídica e dentre eles o malondialdeído. No presente estudo, foram determinados os níveis de TBARS no plasma de animais normais e diabéticos, tratados com iogurte ou curcumina em iogurte, durante 7, 15, 30 e 74 dias de tratamento, e mesmo antes do início dos tratamentos.

Animais diabéticos após 3 dias da administração de STZ já apresentaram um aumento significativo nos níveis circulantes de TBARS, em relação aos animais normais (Tabela 2).

**Tabela 2:** TBARS plasmático ( $\mu\text{mol/L}$ ) de ratos normais e diabéticos 3 dias após a administração de citrato ou STZ, respectivamente.

	<b>TBARS plasmático (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>
<b>Normal</b>	$7,73 \pm 0,201$
<b>Diabético</b>	$17,22 \pm 0,671 \#$

# Diferenças inter-grupo, normal vs diabético, teste t não pareado, para comparações intra-grupos foi realizado teste t não pareado em relação ao tempo 0, ( $p < 0,05$ ).

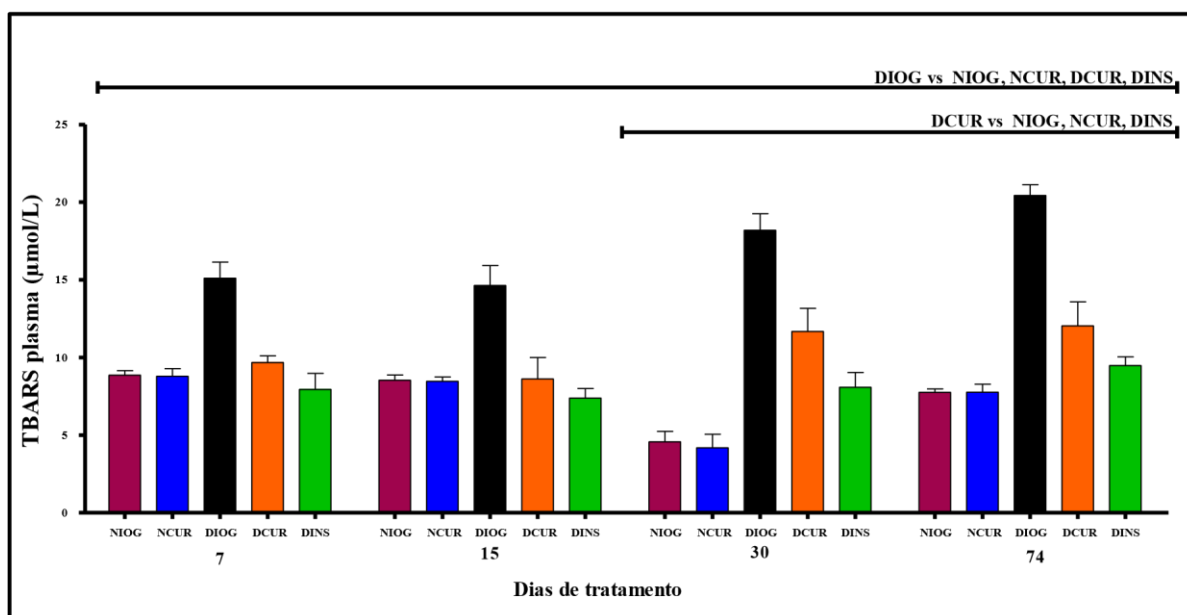
Animais do grupo DIOG, quando comparados com os grupos NIOG, NCUR, DCUR e DINS, também apresentaram concentrações elevadas de TBARS no plasma, desde o 7º dia até o 74º dia de experimento (Figura 3). Estes dados indicam que o processo de lipoperoxidação no DM tem início precoce, sendo possível detectar uma elevação em biomarcadores circulantes de LPO três dias após a indução do DM. Além disso, estes valores elevados permaneceram com a cronicidade do diabetes.

Ratos diabéticos tratados com curcumina apresentaram níveis plasmáticos de TBARS significativamente menores quando comparados aos valores observados no grupo DIOG, a partir de xx dias de tratamento, evidenciando o potencial antioxidante *in vivo* da curcumina (Figura 3).

Os animais do grupo DINS apresentaram valores reduzidos de TBARS, em relação ao grupo DIOG (Figura 3), em todos os tempos de tratamento estudados, demonstrando que o tratamento com insulina foi capaz de prevenir a LPO nestes animais (Figura 3).

Não foram observadas alterações nos níveis de TBARS em animais normais, independente do tratamento (iogurte ou curcumina em iogurte) (Figura 3).

**Figura 3:** TBARS plasmático ( $\mu\text{mol/L}$ ) de ratos normais e diabéticos tratados por 7, 15, 30 e 74 dias com iogurte, curcumina em iogurte ou insulina.



Valores expressos como média  $\pm$  EPM. Comparações inter-grupos foram realizadas com One-way ANOVA seguido de teste Student-Newman-Keuls (barras horizontais) e para comparações intra-grupos foi realizado test t não pareado ( $p < 0,05$ ).

Os níveis de PCO no fígado de animais normais e diabéticos após 3 dias da administração de STZ foram semelhantes, o que indica que o curto período de instalação do DM não foi suficiente para promover oxidação em proteínas, pelo menos no fígado (Tabela 3).

**Tabela 3:** PCO hepático (nmol/mg de proteína) de ratos normais e diabéticos 3 dias após a administração de citrato ou STZ, respectivamente.

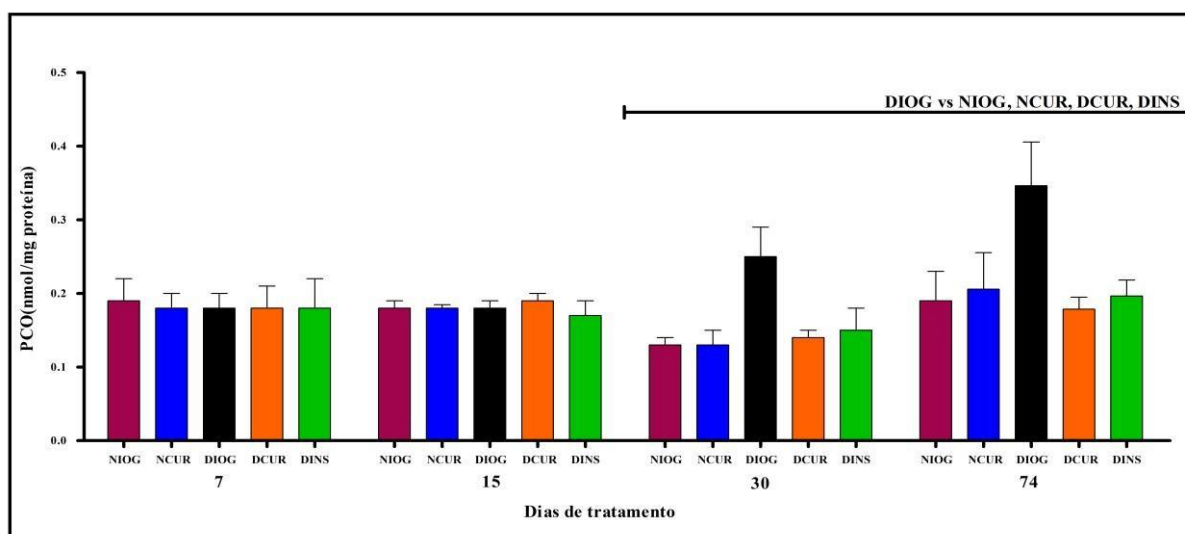
	PCO hepático (nmol/mg de proteína)
<b>Normal</b>	0,202 $\pm$ 0,024
<b>Diabético</b>	0,209 $\pm$ 0,012

Valores expressos como média  $\pm$  EPM. Comparações inter-grupos foram realizadas com One-way ANOVA seguido de teste Student-Newman-Keuls (barras horizontais) e para comparações intra-grupos foi realizado test t não pareado ( $p < 0,05$ ).

Foi possível observar um aumento progressivo nos níveis hepáticos de PCO no grupo DIOG, a partir de 30 dias de experimento (Figura 4). Tal fato indica ocorrer um aumento na oxidação de proteínas no fígado destes animais, uma condição esperada para o modelo experimental que, em conjunto com os níveis aumentados de TBARS no plasma, indicam a instalação do estresse oxidativo no modelo experimental de DM.

Os níveis de PCO no fígado de ratos diabéticos tratados com curcumina ou insulina foram 44% e 40% menores, respectivamente, quando comparados aos valores observados em animais do grupo DIOG, após 30 dias de experimento. Após 74 dias de experimento, o comportamento deste biomarcador em animais DCUR e DINS foi semelhante ao observado com 30 dias de tratamento, isto é, os níveis de PCO dos ratos tratados com curcumina ou insulina apresentaram-se 40% e 37% menores, respectivamente, em relação aos animais do grupo DIOG (Figura 4). Frente a esses resultados, presume-se que o tratamento de ratos diabéticos com curcumina favoreceu uma condição de equilíbrio nas defesas antioxidantes desses animais, uma vez que os níveis de PCO dos animais DCUR e DINS foram semelhantes aos níveis de PCO dos animais NIOG e NCUR. Além disso, é possível notar que a concentração de PCO foi constante em animais DCUR e DINS, nos diferentes tempos de tratamento; tal fato nos permite sugerir que a manutenção nos níveis glicêmicos devido ao tratamento com curcumina em associação a sua ação antioxidante *per se* podem inibir a oxidação de proteínas no fígado. Já a geração de espécies reativas pode estar diminuída nos animais do grupo DINS devido ao efetivo controle da glicemia.

**Figura 4:** PCO hepático (nmol/mg de proteína) de ratos normais e diabéticos tratados por 7, 15, 30 e 74 dias com iogurte, curcumina em iogurte ou insulina.



Valores expressos como media  $\pm$  EPM. Comparações inter-grupos foram realizadas com One-way ANOVA seguido de teste Student-Newman-Keuls (barras horizontais) e para comparações intra-grupos foi realizado test t não pareado ( $p < 0,05$ ).

Tal como observado na Tabela 4, animais com 3 dias de DM não apresentaram alterações na atividade da SOD no fígado, uma vez que a atividade desta enzima foi semelhante aos valores observados em animais normais. No entanto, podemos sugerir que ratos com 3 dias de DM já estejam em uma situação de estresse oxidativo, uma vez que os níveis de TBARS plasmático apresentaram-se elevados. Assim podemos sugerir que a determinação dos níveis de TBARS no plasma seja uma abordagem experimental mais sensível para a detecção de possíveis injúrias oxidativas ocasionadas pela hiperglicemia, em comparação à determinação dos níveis de PCO hepático, uma vez que os níveis de PCO também foram semelhantes entre animais normais e diabéticos, 3 dias após a administração de STZ (Tabela 4).

**Tabela 4:** Atividade da SOD (U/mg de proteína) em fígado de ratos normais e diabéticos 3 dias após a administração de citrato ou STZ, respectivamente.

Atividade da SOD (U/mg de proteína)	
Normal	225,9 $\pm$ 10,997
Diabético	208,3 $\pm$ 14,571

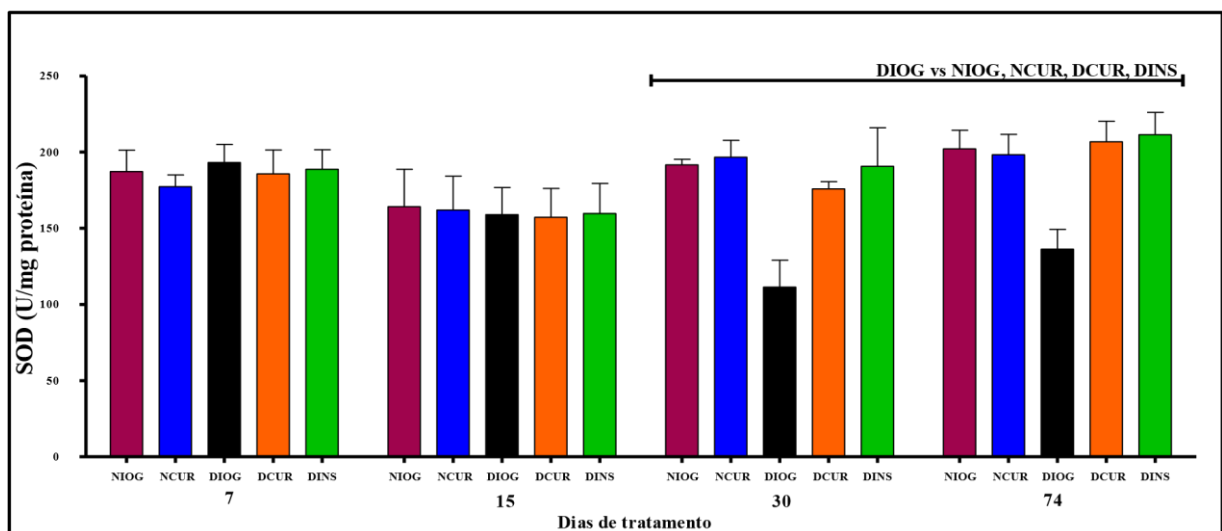
Valores expressos como media  $\pm$  EPM. Comparações inter-grupos foram realizadas com One-way ANOVA seguido de teste Student-Newman-Keuls (barras horizontais) e para comparações intra-grupos foi realizado test t não pareado ( $p < 0,05$ ).

Animais do grupo DIOG apresentaram uma queda na atividade de SOD no fígado somente a partir do 30º dia de experimento, quando comparados aos animais de todos os demais grupos. Tal queda na atividade da SOD também foi observada após 74 dias de experimento, em animais DIOG (Figura 5).

As atividades de SOD em fígado de animais diabéticos tratados com curcumina ou com insulina foram 58% e 71% maiores, respectivamente, em relação aos valores observados no grupo DIOG, após 30 dias de tratamento. Estes efeitos benéficos dos tratamentos sobre a atividade da SOD foram mantidos após 74 dias de tratamento (Figura 5).

Novamente foi possível observar o efeito protetor da curcumina, uma vez que as atividades da SOD em fígado de animais diabéticos tratados com curcumina ou insulina foram semelhantes aos valores encontrados em animais normais, durante todo período experimental (Figura 5). Tal fato reforça as evidências de melhora nas defesas antioxidantes em animais diabéticos que receberam curcumina, assim como a melhora no estresse oxidativo em animais diabéticos que receberam insulina. Tais benefícios podem ser associados ao melhor controle glicêmico promovido pela insulina, ou até mesmo pela curcumina, culminando assim em menor geração de espécies reativas de oxigênio.

**Figura 5:** Atividade da SOD (U/mg de proteína) em fígado de ratos normais e diabéticos tratados por 7, 15, 30 e 74 dias com iogurte, curcumina em iogurte ou insulina.



Valores expressos como média  $\pm$  EPM. Comparações inter-grupos foram realizadas com One-way ANOVA seguido de teste Student-Newman-Keuls (barras horizontais) e para comparações intra-grupos foi realizado test t não pareado ( $p < 0,05$ ).

Tal como observado para a atividade de SOD, a atividade hepática de CAT também foi semelhante entre animais normais e diabéticos, 3 dias após administração de STZ (Tabela 5). Este resultado corrobora os achados de atividade de SOD, uma vez que a CAT é dependente da geração do substrato  $H_2O_2$ , que é produto da SOD após promover a dismutação de  $O_2^{\cdot-}$ .

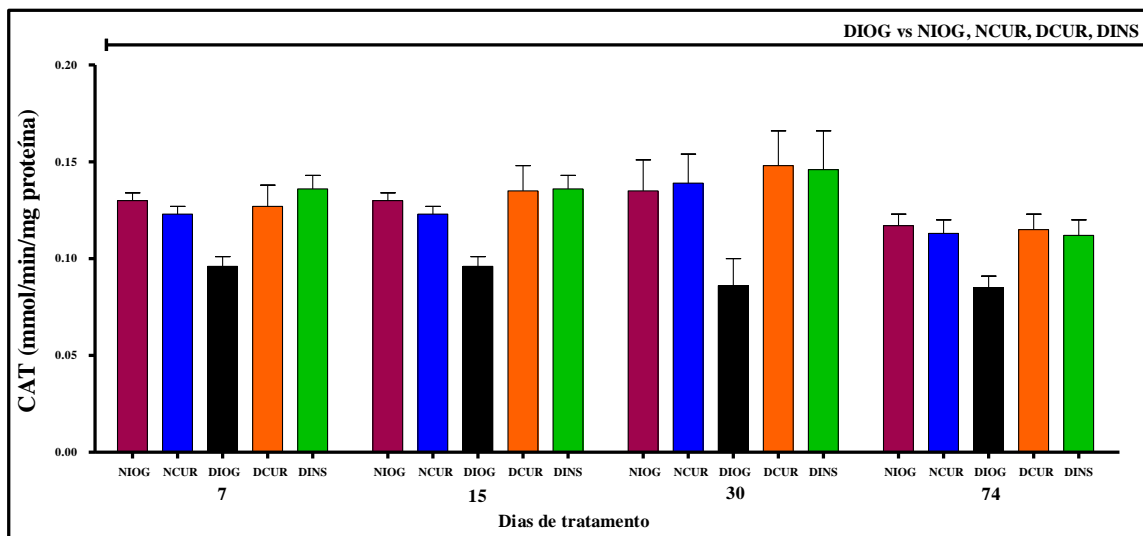
**Tabela 5:** Atividade da CAT (mmol/min/mg de proteína) em fígado de ratos normais e diabéticos 3 dias após a administração de citrato ou STZ, respectivamente.

<b>Atividade da CAT (mmol/min/mg de proteína)</b>	
<b>Normal</b>	0,122 ± 0,006
<b>Diabético</b>	0,115 ± 0,010

A atividade da CAT mostrou-se reduzida em fígado de animais DIOG; porém, em comparação com a queda na atividade da SOD, a queda na atividade de CAT ocorreu precocemente, isto é, após 7 dias de experimento. A redução na atividade de CAT em animais DIOG foi observada também após 15, 30 e 74 dias de experimento (Figura 6), porém sem queda progressiva.

Foi possível observar a eficácia do tratamento de ratos diabéticos com insulina no reestabelecimento da normoglicemia, o que parece refletir em maior capacidade de proteger as defesas antioxidantes. Animais do grupo DINS apresentaram atividade de CAT 42% maior em relação aos animais DIOG, após 7 dias de tratamento (Figura 6). O tratamento com iogurte enriquecido com curcumina foi tão eficaz quanto a insulina na prevenção da perda da atividade de CAT em fígado de ratos diabéticos, desde o 7º dia até o 74º dia de tratamento (Figura 6). Desse modo, podemos sugerir que o tratamento com curcumina é benéfico na prevenção ou atenuação da perda da proteção antioxidante no DM.

**Figura 6:** Atividade da CAT (mmol/min/mg de proteína) em fígado de ratos normais e diabéticos tratados por 7, 15, 30 e 74 dias com iogurte, curcumina em iogurte ou insulina.



Valores expressos como média  $\pm$  EPM. Comparações inter-grupos foram realizadas com One-way ANOVA seguido de teste Student-Newman-Keuls (barras horizontais) e para comparações intra-grupos foi realizado test t não pareado ( $p < 0,05$ ).

A semelhança nos valores médios da atividade de GSH-Px no fígado de animais normais e diabéticos 3 dias após a administração de STZ (Tabela 6) reproduz os achados de SOD e CAT, sugerindo que este período de DM não foi suficiente para interferir na atividade de enzimas antioxidantes no fígado destes animais.

**Tabela 6:** Atividade da GSH-Px (mmol/min/mg de proteína) em fígado de ratos normais e diabéticos 3 dias após a administração de citrato ou STZ, respectivamente.

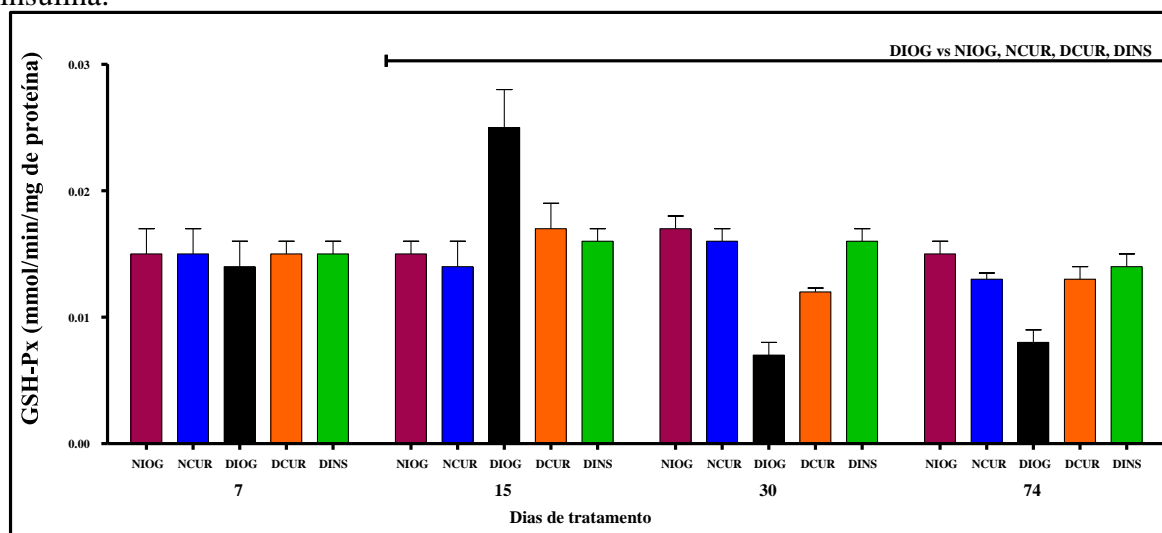
Atividade da GSH-Px (mmol/min/mg de proteína)	
<b>Normal</b>	0,016 $\pm$ 0,0012
<b>Diabético</b>	0,013 $\pm$ 0,0009

A atividade da GSH-Px em fígado de animais DIOG apresentou um aumento de 40% após 15 dias de experimento, em relação aos valores encontrados em animais NIOG e nos demais grupos (Figura 7). Podemos sugerir que este aumento na atividade da GSH-Px seja consequência de uma contrapartida compensatória nas defesas antioxidantes no fígado de animais diabéticos frente ao aumento na geração de espécies reativas, bem como pode ser uma

compensação à queda observada na atividade da CAT, no mesmo tempo de experimento. Nota-se que, mesmo com a queda na atividade da CAT após 15 dias de experimento, os níveis de PCO não estão aumentados em fígado de ratos diabéticos, neste mesmo período, o que pode ser um reflexo da combinação entre a manutenção na atividade da SOD e maior atividade de GSH-Px. No entanto, após 30 e 74 dias de experimento, a atividade da GSH-Px no fígado de animais DIOG diminuiu significativamente, tal como observado neste mesmo grupo para as demais enzimas antioxidantes SOD e CAT.

Após 30 e 74 dias de tratamento, o tratamento com curcumina em iogurte ou com insulina foi capaz de prevenir a queda na atividade da GSH-Px em fígado de animais diabéticos (Figura 7). Frente a estes resultados, podemos sugerir que a curcumina é capaz de proteger os sistemas de defesas antioxidantes endógenos. A combinação entre o potencial antioxidante *per se* da molécula de curcumina, em associação ao seu efeito antihiper-glicêmico, pode ser importante para as ações antioxidantes *in vivo* da curcumina, prevenindo ou atenuando o quadro de estresse oxidativo no DM.

**Figura 7:** Atividade da GSH-Px (mmol/min/mg de proteína) em fígado de ratos normais e diabéticos tratados por 7, 15, 30 e 74 dias com iogurte, curcumina em iogurte ou insulina.



Valores expressos como média  $\pm$  EPM. Comparações inter-grupos foram realizadas com One-way ANOVA seguido de teste Student-Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ), barras horizontais e para comparações intra-grupos foi realizado test t não pareado ( $p < 0,05$ ).

Os níveis de GSNP em fígado de animais normais e diabéticos 3 dias após a administração de citrato ou estreptozotocina, respectivamente, apresentaram-se semelhantes (Tabela 7). Tal fato indica que 3 dias de diabetes não foram suficientes para causar alterações nos níveis desse metabólito em fígado de animais diabéticos, e corrobora os achados da atividade da enzima GSH-Px, que também não foi alterada neste período de instalação do DM.

**Tabela 7:** Concentração de GSNP (mmol/g de tecido) no fígado de ratos normais e diabéticos 3 dias após a administração de citrato ou STZ, respectivamente.

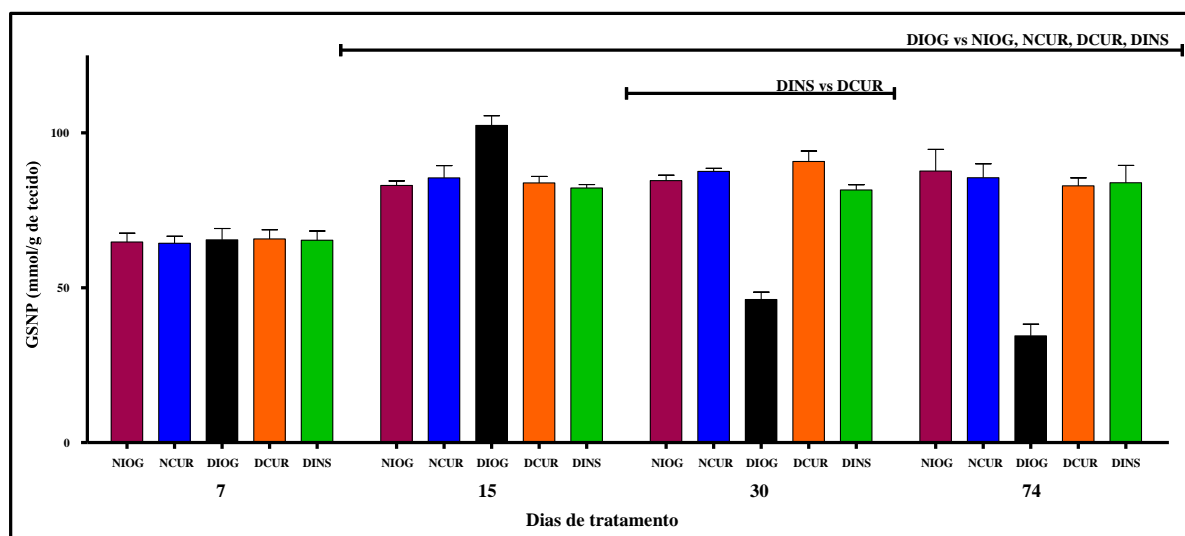
<b>Concentração de GSNP (mmol/g de tecido)</b>	
<b>Normal</b>	58,926 ± 2,610
<b>Diabético</b>	56,291 ± 0,834

Após 15 dias de experimento, houve um aumento de 19% nos níveis de GSNP em fígado de animais do grupo DIOG em comparação aos valores observados nos animais NIOG (Figura 8). Este aumento nos níveis de GSNP em fígado de animais diabéticos DIOG, após 15 dias de experimento, corrobora o aumento observado na atividade de GSH-Px, no mesmo período (Figura 7), reiterando a hipótese de efeito compensatório no sistema antioxidante dependente de glutatona frente ao estabelecimento de estresse oxidativo no diabetes.

Após 30 dias de experimento, os níveis de GSNP em fígado de animais diabéticos foram 45% menores em relação aos níveis encontrados em fígado de animais NIOG (Figura 8). Cabe salientar que neste mesmo período também houve uma queda na atividade de GSH-Px em fígado de animais DIOG.

Com 15 dias de tratamento os níveis de GSNP hepático nos animais diabéticos tratados com curcumina (DCUR) ou insulina (DINS) foram semelhantes aos níveis observados nos grupos de animais normais (NIOG e NCUR). Após 30 dias de tratamento, os animais dos grupos DCUR e DINS apresentaram valores de GSNP ainda maiores, 96% e 77% respectivamente, em relação aos animais do grupo DIOG. Com 74 dias de tratamento, os níveis de GSNP hepático dos animais do grupo DCUR e DINS foram 140% e 143% maiores, respectivamente, em relação ao grupo DIOG, e continuaram semelhantes aos níveis de GSNP observados no fígado de animais normais (NIOG e NCUR).

**Figura 8:** Concentração de GSNP (mmol/g de tecido) em fígado de ratos normais e diabéticos tratados por 7, 15, 30 e 74 dias com iogurte, curcumina em iogurte ou insulina.



Valores expressos como media  $\pm$  EPM. Comparações inter-grupos foram realizadas com One-way ANOVA seguido de teste Student-Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ), barras horizontais e para comparações intra-grupos foi realizado test t não pareado ( $p < 0,05$ ).

A semelhança nos níveis de PON1 no plasma de animais normais e diabéticos, 3 dias após a administração de citrato ou estreptozotocina, respectivamente, mostram que este período de instalação do DM não foi suficiente para causar alterações neste biomarcador (Tabela 8).

**Tabela 8:** Atividade da PON1 no plasma (U/L) em fígado de ratos normais e diabéticos 3 dias após a administração de citrato ou STZ, respectivamente.

Atividade da PON1 (U/L)	
<b>Normal</b>	1287,78 $\pm$ 47,178
<b>Diabético</b>	1251,11 $\pm$ 52,736

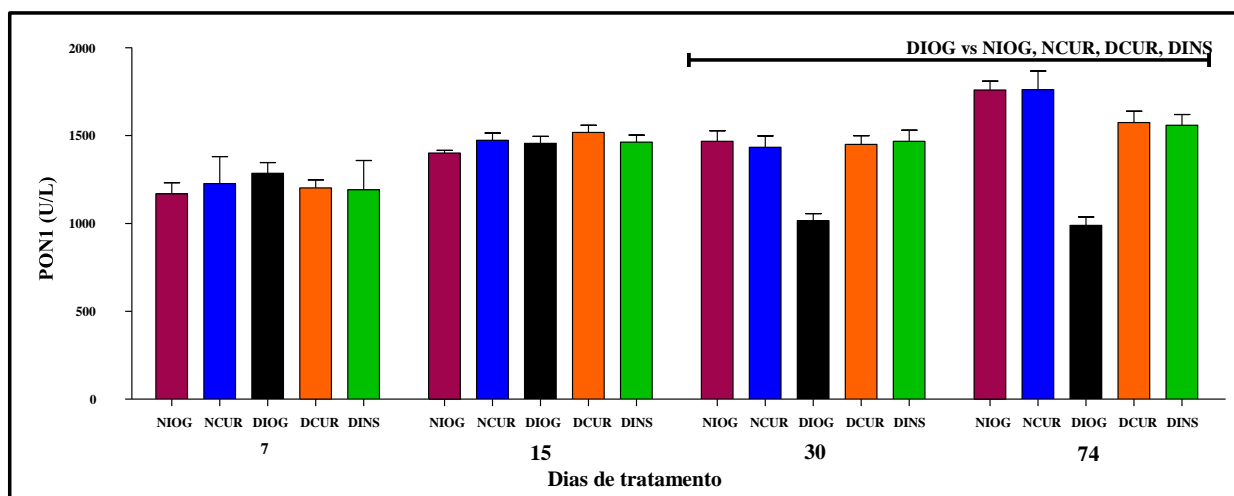
Após 30 dias de experimento, a atividade da PON1 no plasma de animais diabéticos tratados com iogurte (DIOG) apresentou uma diminuição significativa (30%) em relação aos valores observados em NIOG; essa diminuição foi mantida até 74 dias de experimento (Figura 9). Pode-se correlacionar esta redução na atividade da PON1 em animais diabéticos tratados com iogurte (DIOG) à exposição a possíveis peróxidos lipídeos, e acredita-se que tal evento

pode estar relacionado à glicação da lipoproteína HDL e consequente perda da sua função (KLEEMOLA et al., 2002).

Em relação à atividade da PON1 em animais DCUR e DINS, foi observada melhora na atividade da PON1 a partir de 30 dias de tratamento, onde os valores de PON1 no plasma de animais diabéticos tratados com curcumina (DCUR) ou com insulina (DINS) foram 43% e 44% maiores, respectivamente, em relação aos valores observados em animais do grupo DIOG. Após 74 dias de tratamento, a capacidade da curcumina ou da insulina em preservar a atividade de PON1 foi maior ainda, uma vez que os valores de PON1 nos grupos DCUR e DINS foram 59% e 57% maiores, respectivamente, em relação ao grupo DIOG (Figura 9).

Frente ao exposto, nota-se o benefício do tratamento com curcumina ou insulina em amenizar as complicações ocasionadas pela hiperglicemia no DM e consequentemente amenizar o quadro de estresse oxidativo.

**Figura 9:** Atividade da PON no plasma (U/L) de ratos normais e diabéticos tratados por 7, 15, 30 e 74 dias com iogurte, curcumina em iogurte ou insulina.



Valores expressos como média  $\pm$  EPM. Comparações inter-grupos foram realizadas com One-way ANOVA seguido de teste Student-Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ), barras horizontais e para comparações intra-grupos foi realizado test t não pareado ( $p < 0,05$ ).

Os níveis de AGE no plasma de animais normais e diabéticos, três dias após a administração de citrato ou estreptozotocina, estão apresentados na Tabela 9. Não existem diferenças nos níveis de AGE entre animais normais e diabéticos, três dias após a instalação do DM.

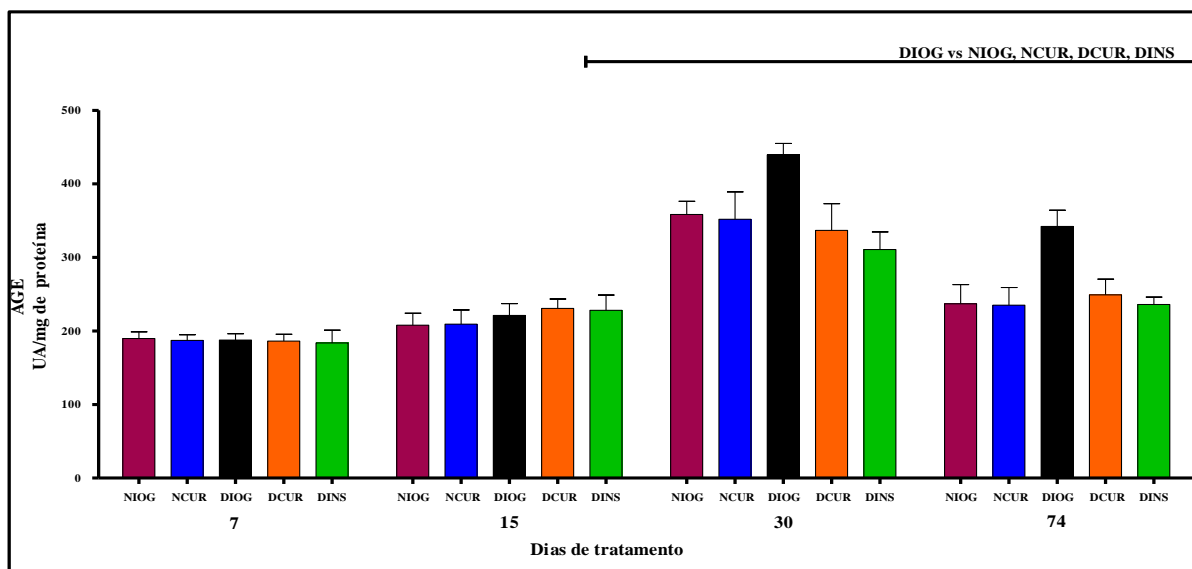
**Tabela 9:** Níveis de AGE (UA de fluorescência/ mg de proteína) no plasma de ratos normais e diabéticos 3 dias após a administração de citrato ou STZ, respectivamente.

Níveis de AGE (UA / mg de proteína)	
Normal	258,18 ± 34,877
Diabético	254,34 ± 41,446

A primeira alteração nos níveis de AGE foi observada a partir de 30 dias de experimento no grupo (DIOG), onde os níveis de AGE foram significativamente maiores (18%) quando comparados aos valores em animais NIOG (Figura 10).

Os tratamentos com curcumina em iogurte ou com insulina foram eficazes em prevenir o aumento nos níveis de AGE em ratos diabéticos, uma vez que os níveis deste biomarcador nos grupos DCUR e DINS foram semelhantes aos níveis observados em animais normais (NIOG e NCUR), em todo o período experimental, bem como foram 23% e 29% menores em relação ao grupo DIOG, após 30 e 74 dias de tratamento, respectivamente (Figura 10).

**Figura 10:** Concentração de AGE (UA de fluorescência/ mg de proteína) no plasma de ratos normais e diabéticos tratados por 7, 15, 30 e 74 dias com iogurte, curcumina em iogurte ou insulina.



Valores expressos como média ± EPM. Comparações inter-grupos foram realizadas com Oneway ANOVA seguido de teste Student-Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ), barras horizontais.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo trazem duas contribuições importantes referentes à compreensão das alterações em biomarcadores de estresse oxidativo e atividade antioxidante em animais submetidos ao modelo experimental de diabetes mellitus, via administração de estreptozotocina. Em primeiro lugar, as alterações nos marcadores de lesão oxidativa e atividade antioxidante são tempo-dependentes: o aumento nos níveis de marcador de lesão oxidativa em lipídeos (TBARS) aparece de forma precoce em animais diabéticos (3 dias pósSTZ), bem como a queda na atividade da enzima antioxidante CAT no fígado (10 dias pósSTZ); as demais alterações observadas em animais diabéticos (aumento nos níveis de PCO, queda nas atividades de SOD e GSH-Px e nos níveis de GSNP) encontram-se na dependência da cronicidade do estado de deficiência insulínica / hiperglicemia (33 dias pós-STZ). Em segundo lugar, independente do momento das alterações nos biomarcadores de estresse oxidativo (aumento em marcadores de lesão oxidativa e/ou queda nas defesas antioxidantes), o tratamento oral com iogurte enriquecido com curcumina foi capaz de atenuar, ou mesmo prevenir, o estabelecimento de estresse oxidativo em animais diabéticos, em magnitude comparável ao benefício promovido pelo tratamento com insulina.

O alcance da normoglicemia é essencial na prevenção das complicações desencadeadas pelo DM, inclusive aquelas relacionadas ao estresse oxidativo. A hiperglicemia está intimamente relacionada ao aumento na geração de ERO que, uma vez formadas, podem interferir nos sistemas antioxidantes endógenos; diversos estudos têm relatado uma menor atividade das enzimas antioxidantes no fígado de ratos diabéticos (EVELSON et al., 2005; LUCCHESI et al., 2013; ARCARO et al., 2014; ASSIS et al., 2017), tal como foi observado no presente estudo.

Especificamente no fígado, a exposição prolongada aos ERO está associada com o estabelecimento de esteatose e com a progressão para esteato-hepatite não-alcóolica (VIDELA, 2009). Recentemente, recente revisão de BILAL et al., 2016, reúne uma série de evidências sobre a diversidade de alterações bioquímicas e morfológicas no fígado de animais submetidos ao modelo experimental de DM, via administração de fármacos diabetogênicos, seja STZ ou Aloxano (ALX). Dentre os diversos prejuízos observados, destacam-se esteatose, esteato-hepatite e fibrose hepática. A revisão reitera que a extensão das alterações morfológicas e as lacerações ultra-estruturais são intrinsicamente dependentes do tempo de diabetes. Por fim,

a revisão também destaca que, dentre os mecanismos promotores destas alterações hepáticas, o estresse oxidativo tem participação crucial.

De acordo com Cubero e Trautwein (2011), o estresse oxidativo pode causar injúria e destruição de hepatócitos via aumento na geração de peróxidos e radicais livres, estes podem danificar diversos componentes celulares, em especial proteínas, alvos de processos de oxidação que geram derivados sulfônicos, de nitrosilação, glutationilação, formação de pontes dissulfeto, todas estas modificações podem culminar em prejuízos na funcionalidade destas moléculas. Além disso, dependendo da natureza da injúria disparada pelo estresse oxidativo, e do seu tempo de duração, diferentes processos sinalizatórios podem ser iniciados ou exacerbados nos hepatócitos, incluindo as vias sinalizatórias que envolvem MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos), ERK1/2 (quinases 1/2 reguladoras de sinal extracelular), JNK (quinase c-Jun N-terminal) e NF- $\kappa$ B (fator de necrose tumoral kappa B). Dentre as injúrias relacionadas ao estresse oxidativo no fígado e que envolvem a participação das vias sinalizatórias supra mencionadas, podemos destacar a indução de resistência à insulina (via ERK1/2), apoptose de hepatócitos (via NF- $\kappa$ B) e morte celular (via JNK). Ainda nesta revisão de Cubero e Trautwein (2011), é reiterada a importância da prospecção de novas opções terapêuticas que sejam capazes de diminuir as injúrias hepáticas com a atenuação do estresse oxidativo, tendo em vista a diversidade de processos bioquímicos “irregulares” que podem se instalar devido à falta de controle destes processos.

Os resultados obtidos com os biomarcadores de lesão oxidativa e glicativa, em especial os aumentos nos níveis de TBARS (plasma) e PCO (fígado), AGE (plasma) bem como as alterações nos sistemas antioxidantes, as quais envolvem queda nas atividades das enzimas SOD, CAT, GSH-Px (fígado), PON1 (plasma) e redução nos níveis de GSNP (fígado), substanciam a instalação do estresse oxidativo neste modelo experimental de DM.

De acordo com os resultados deste estudo, o biomarcador que respondeu de maneira bem precoce ao estabelecimento de estresse oxidativo em animais com DM estreptozotocínico foi o TBARS, que reflete alterações relativas à lesão oxidativa em lipídeos (lipoperoxidação): com apenas 3 dias de diabetes, os níveis de TBARS foram significativamente maiores em plasma de animais DIOG em relação aos valores observados em animais NIOG. Hidroperóxidos gerados em situações de estresse oxidativo podem promover toxicidade direta às células, ou por meio de produtos tóxicos de degradação de radicais hidroxil. Eles também podem reagir com metais de transição e formar aldeídos, como o malondialdeído, que causa

danos às membranas celulares. O aumento nos níveis de TBARS é uma evidência indireta da intensa produção de ERO e seus efeitos lesivos em lipídeos. Diversos trabalhos utilizando ratos em modelo experimental de DM induzido com estreptozotocina ou aloxana apontam alterações referentes a aumento nos níveis de TBARS em associação ao descontrole glicêmico (JAIN, 1989; ARAGNO et al., 1999; ARCARO et al., 2014; ASSIS et al., 2017). No entanto, uma das principais contribuições do presente estudo é a caracterização precoce desta alteração relativa ao estresse oxidativo no DM, com apenas 3 dias de deficiência insulínica.

Outro dado interessante observado no presente estudo foi o aumento em marcadores do sistema antioxidante dependente de glutatona em fígado de animais diabéticos, após 15 dias de experimento (18 dias pós-STZ): houve um aumento significativo tanto nos níveis de GSNP quanto na atividade de GSH-Px em fígado de animais diabéticos (DIOG), em relação aos valores observados em animais normais (NIOG).

O comportamento das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px em condições de estresse oxidativo muitas vezes são controversos. Como observado no DM e em outros modelos experimentais com estresse oxidativo, em diferentes tecidos tais enzimas podem se encontrar com níveis/atividades aumentados ou diminuídos. O aumento na expressão destas enzimas, e conseqüentemente na atividade, pode depender de mecanismo regulado em nível transcricional (KENSLE; WAKABAYASHI; BISWAI, 2007).

O Nrf2 (fator de transcrição nuclear) encontra-se inativo no citoplasma, ligado à proteína *Kelch-like EHC-associated protein 1* (Keap1), a qual impede sua translocação para o núcleo. Este fator é ativado em condições de desequilíbrio no estado redox da célula, como é o caso de condições de estresse oxidativo, onde há aumento na geração de ERO e seus subprodutos de danos oxidativos, sobrepondo-se a capacidade antioxidante. Resíduos de cisteína na proteína Keap1 desempenham um papel crítico na manutenção do Nrf2 no citoplasma. No entanto, em situações de estresse oxidativo, há dissociação do complexo Nrf2/Keap1, fazendo com que o Nrf2 torne-se ativo e assim transportado para o núcleo (DAHL; MULCAHY, 2001; DE VRIES et al., 2008). No núcleo das células, o Nrf2 se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE), que está associado às regiões promotoras dos genes que codificam enzimas detoxificantes e antioxidantes (WILMES et al., 2011). Assim, quando ativado por Nrf2, o ARE estimula a transcrição gênica de SOD, CAT, GSH-Px GSH-Rd, peroxirredoxinas, NADPH quinona oxidoreductase (NQO) e heme-oxigenases1-(HO-1) e tioredoxina (Trx). O aumento na expressão destas enzimas, representa um potente mecanismo

de defesa antioxidante. Uma vez restabelecido o equilíbrio redox da célula, o Nrf2 é dissociado do núcleo pelo Keap1 e posteriormente transportado para o citoplasma, onde pode ser ubiquitinado e degradado (KENSLE; WAKABAYASHI; BISWAI, 2007).

A ativação de Nrf2 em situações de estresse oxidativo pode ser o mecanismo que explica o aumento observado nos níveis de GSNP e na atividade de GSH-Px em fígado de ratos diabéticos DIOG, após 15 dias de experimento (18 dias pós-STZ). Podemos sugerir que este aumento em componentes no sistema da glutathiona seja uma resposta compensatória nas defesas antioxidantes frente a seguinte combinação: (i) aumento na geração de ERO devido à hiperglicemia; (ii) queda precoce observada na atividade da CAT. Esse efeito compensatório de aumento no sistema antioxidante da glutathiona mostrou-se eficiente, ao menos neste período do estudo, uma vez que observamos níveis de PCO (marcador de lesão oxidativa em proteínas) semelhantes em fígados de animais normais (NIOG) e diabéticos (DIOG), com 15 dias de experimento.

Respostas compensatórias de aumento na atividade de determinados sistemas antioxidantes frente ao aumento nos níveis de espécies reativas e/ou perda ou diminuição de defesas antioxidantes é um mecanismo comumente observado (LEI et al., 2016). No DM, existem relatos de aumento na atividade e/ou expressão de GSH-Px em associação a diversas complicações do DM; os autores sugerem que tal aumento seja um mecanismo para prevenir danos teciduais ainda maiores (BOLAJOKO et al., 2008; KORKMAZ-ICÖZ et al., 2015).

Todavia, após 30 dias de experimento (33 dias pós-STZ), tal resposta compensatória de aumento nas defesas antioxidantes dependentes de glutathiona foi perdida, uma vez que observamos redução nos níveis de GSNP e na atividade de GSH-Px no fígado de animais diabéticos DIOG, acompanhada por aumento nos níveis de PCO, sugerindo ser a cronicidade da hiperglicemia no DM prevalente sobre os mecanismos compensatórios que promovem aumento na expressão e/ou proteção de enzimas antioxidantes. Em relação à queda nos níveis de GSNP no DM, a participação da via dos polióis tem papel significativo: o aumento nos níveis intracelulares de glicose (devido à hiperglicemia) leva a um aumento no fluxo pela via dos polióis, onde a enzima aldose redutase reduz a glicose a sorbitol, oxidando a coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) neste processo. O aumento na oxidação de NADPH pela via dos polióis culmina em prejuízos na regeneração de moléculas de glutathiona em sua forma reduzida (GSNP), condição que favorece a elevação das ERO (LEE; CHUNG, 1999; GIACCO; BROWNLEE, 2010). Em relação à redução na atividade de GSH-

Px, evidências apontam que a enzima seja inativada por hidroperóxidos, incluindo hidroperóxido de *t*-butila (BLUM; FRIDOVICH, 1985; PIGEOLET et al., 1990), agravando o quadro de estresse oxidativo, conforme observado pelo aumento progressivo nos níveis de PCO no fígado. Estudos também têm associado a diminuição na atividade de enzimas antioxidantes em ratos diabéticos com uma diminuição na expressão do mRNA e na síntese proteica destas enzimas (SADI; BOZAN; YILDIZ, 2014). Por todos estes motivos, estudos futuros do laboratório devem ser projetados para compreender o papel de Nrf2 no controle das respostas temporais observadas nos sistemas antioxidantes em diferentes tempos do DM experimental.

As enzimas SOD e CAT não apresentaram respostas compensatórias frente ao estabelecimento de estresse oxidativo nesse modelo experimental de diabetes. No presente estudo, foram observadas somente reduções nas atividades destas enzimas, a partir de 7 dias de experimento (10 dias pós-STZ) para CAT e 30 dias de experimento (33 pós-STZ), para SOD.

A baixa atividade de CAT com apenas 7 dias de diabetes (10 dias pós-STZ), pode ser explicada pelo fato da CAT ser mais vulnerável ao processo de glicação, em comparação à SOD. Em estudo de Yan e Harding (1997), onde as enzimas CAT e SOD foram incubadas na presença de diferentes açúcares (glicose, frutose, ribose, glicose-6-fosfato), observou-se que ambas as enzimas são vulneráveis à presença destes açúcares, apresentando redução em suas atividades. No entanto, para as incubações realizadas na presença de glicose, notou-se que: (i) quando CAT foi incubada com *10 mM de glicose*, foi observada uma redução significativa na atividade da enzima, em especial após 3 dias, chegando a perder aproximadamente 65% de atividade após 6 dias de incubação, em comparação à CAT incubada na ausência de glicose; (ii) quando SOD foi incubada com *50 mM de glicose*, foi observada uma lenta e discreta redução na atividade da enzima e, após 8 dias de incubação, houve manutenção de aproximadamente 80% na atividade, em comparação à SOD incubada pelo mesmo período e na ausência de glicose. Portanto, podemos sugerir que a SOD necessita de ambos, maiores níveis de glicose e maior tempo de exposição para ser observado o efeito do processo de glicação, ao contrário da CAT, que foi mais sensível e em menores concentrações do monossacarídeo. Apesar de a SOD ser vulnerável aos efeitos da glicação de maneira “tardia”, existem evidências de que, quando glicada, SOD é inativada e *clivada*, liberando íons cobre presentes em seu sítio ativo (OOKAWARA et al., 1992; FUJII et al., 1996). Tal condição é propícia ao aumento na geração de HO<sup>\*</sup> caso seja considerada a possibilidade de acúmulo de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> devido à perda precoce na atividade da CAT, após a glicação. Este aumento na geração de HO<sup>•</sup> após inativação de SOD pode explicar, pelo menos em parte, os resultados do presente estudo onde também houve a redução na atividade da GSH-Px de forma “tardia”, em paralelo à redução na atividade de SOD, em fígado de animais diabéticos, após 30 dias de experimento (33 dias pós-STZ); existem evidências que mostram inativação da GSH-Px na presença de HO<sup>•</sup> (PIGEOLET et al., 1990; TABATABAIE; FLOYD, 1994).

A glicose em excesso, além de ocasionar glicação de proteínas e consequentemente inativação destas, também pode se auto-oxidar e assim aumentar a geração de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, ou ainda ativar a enzima NADPH oxidase, diminuindo os níveis de NADPH e aumentando ainda mais o O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Em condições onde o aumento na produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ultrapasse a capacidade de remoção deste ânion pela ação da enzima SOD, podem ser observados prejuízos nas ações das demais enzimas antioxidantes. Também existem evidências de inativação da CAT pelo aumento nos níveis de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (SHIMIZU; KOBAYASHI; HAYASHI, 1984).

Em interessante estudo de Pigeolet et al. (1990), as atividades das enzimas SOD, CAT e GSH-Px foram testadas na presença de diversos oxidantes (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hidroperóxido de cumeno, hidroperóxido de *t*-butila, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, HO<sup>•</sup>), com o intuito de observar também a suscetibilidade dessas proteínas aos excessos de seus substratos. Os resultados obtidos com este estudo foram interessantes e respaldam muitos de nossos achados em animais diabéticos. (i) Nas condições testadas, notou-se que a CAT foi a única enzima vulnerável aos efeitos deletérios de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, sendo inativada, a enzima também foi inativada na presença de HO<sup>•</sup>, bem como, teve sua atividade reduzida de forma significativa quando incubada na presença de hidroperóxido de cumeno e hidroperóxido de *t*-butila. Se esses achados forem analisados em conjunto com a rápida perda da atividade de CAT quando incubada na presença de glicose (YAN; HARDING, 1997) e também consideramos sua inativação na presença de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (SHIMIZU; KOBAYASHI; HAYASHI, 1984), podemos sugerir que a CAT é uma enzima bastante suscetível a perda de sua atividade em condições de hiperglicemia e aumento de espécimes oxidantes, o que corrobora o achado do presente estudo, com redução na atividade de CAT em fígado de ratos diabéticos desde o sétimo dia de experimento (10 dias pós-STZ). (ii) Nas condições testadas, a GSH-Px também foi inativada na presença de HO<sup>•</sup> corroborando nossa hipótese de que a GSH-Px possa ter sua atividade diminuída em condições de aumento na geração de HO<sup>•</sup>. A GSH-Px também apresentou redução na atividade quando incubada na presença de hidroperóxido de cumeno e hidroperóxido de *t*-butila. Esses hidroperóxidos orgânicos são frequentemente

utilizados para indução de peroxidação lipídica. Analisando em conjunto, a vulnerabilidade da GSH-Px à hidroperóxidos orgânicos (indutores de lipoperoxidação), bem como, a queda tardia em sua atividade em fígado de animais diabéticos, parecem sugerir a necessidade de um ambiente oxidativo suficientemente agressivo, altamente indutor de lipoperoxidação, para que a enzima perca sua atividade.

Este conjunto de evidências pode explicar as alterações temporais diferenciais nas atividades de CAT, SOD e GSH-Px em fígado de animais diabéticos (DIOG) observadas neste estudo.

Animais diabéticos tratados com curcumina incorporada em iogurte tiveram melhora no peso corporal e no controle glicêmico, em relação aos animais diabéticos que receberam apenas iogurte, tais resultados corroboram estudos anteriores do laboratório (GUTIERRES et al, 2012; ARCARO et al, 2014; ASSIS et al, 2017). O tratamento de ratos diabéticos com curcumina também diminuiu o estresse oxidativo, tal como anteriormente observado (ARCARO et al, 2014; ASSIS et al, 2017).

Diversos estudos têm demonstrado os mecanismos através dos quais ocorre melhora nos níveis glicêmicos de animais diabéticos tratados com curcumina. Tem sido demonstrado que a curcumina é capaz de aumentar a atividade da enzima glicoquinase, que catalisa a fosforilação da glicose em glicose-6-fosfato no fígado, e assim utilizada na síntese de glicogênio hepático (SEO et al., 2008). Em estudo realizado por Gutierrez et al. (2015) para avaliar os efeitos da curcumina em ratos diabéticos, observou-se que houve melhora na tolerância à glicose e na sensibilidade à insulina, os quais foram associados ao aumento nos níveis de fosforilação de AKT e na translocação de GLUT 4 para a membrana plasmática de músculos *gastrocnemius*, alterações que devem ter relação com um aumento na captação de glicose. Outros estudos têm demonstrado que a redução na glicemia após o tratamento com curcumina também tem relação com o aumento na captação de glicose via aumento na expressão de GLUT 4, com a redução na produção hepática de glicose pela inibição da gliconeogênese, ambos processos associados na ativação da AMPK proteína quinase dependente de AMP (FUJIWARA et al., 2008; NA et al., 2011). Há evidências de que a curcumina atua na inibição da gliconeogênese hepática, por inibir a atividade das enzimas chave da via, glicose-6-fosfatase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (G6Pse e PEPCK) (FUJIWARA et al., 2008).

Além do seu potencial antihiperlicêmico, a curcumina é um potente antioxidante. Estudos têm demonstrado que a curcumina é capaz de capturar  $H_2O_2$ ,  $HO^\bullet$ ,  $O_2^{\bullet-}$ , radical peroxila ( $ROO^\bullet$ ), bem como é capaz de quelar íons  $Fe^{2+}$  (AK; GÜLÇİN, 2008; BARZEGAR; MOOSAVI-MOVAHEDI, 2011). A curcumina é capaz também de inibir a lipoperoxidação (MEGHANA; SANJEEN; RAMESH, 2007). A atenuação na geração e/ou a captura de espécies reativas, com destaque ao ânion  $O_2^{\bullet-}$ , após o tratamento de ratos diabéticos com curcumina em iogurte, pode amenizar os efeitos deletérios deste radical sobre diversas biomoléculas. Embora o ânion  $O_2^{\bullet-}$  apresente permeabilidade limitada, ele é precursor de outras espécies altamente reativas, em especial o radical  $HO^\bullet$  que participa da oxidação tanto de lipídeos (GIROTTI, 1998) quanto de proteínas (PENNATHUR et al., 2001). Assim, podemos explicar a redução significativa nos níveis dos biomarcadores de lipoperoxidação (TBARS) e de oxidação de proteínas (PCO) em animais diabéticos que foram tratados com curcumina.

No entanto, estudos têm indicado que compostos bioativos têm sido potenciais promotores de Nrf2 (WILMES et al., 2011). Evidências indicam que a curcumina também é capaz de aumentar a transcrição de Nrf2 (YANG et al., 2009), bem como é capaz de aumentar sua translocação para o núcleo das células (LIU et al., 2015; ZHAO et al., 2011). Assim, nossos achados sobre o aumento na atividade das enzimas antioxidantes em fígado de animais diabéticos tratados com curcumina pode ser consequência dos seguintes eventos: (i) menor geração de espécies oxidantes devido à redução na glicemia e/ou devido ao potencial antioxidante *per se* da curcumina, protegendo assim as enzimas de modificações pós-traducionais (glicação, oxidação) que levam à perda nas suas atividades e/ou (ii) ativação de Nrf2, culminando em maior expressão das enzimas antioxidantes.

Yang et al. (2015), ao estudarem os efeitos da suplementação de curcumina (500 mg/dia) durante 30 dias a indivíduos com DM tipo 2, observou que a curcumina em linfócitos destes pacientes foi capaz de reduzir a microalbuminúria e os níveis plasmáticos de malondialdeído, em associação a aumento nos níveis de Nrf2 e de enzimas antioxidantes. No entanto, em estudo semelhante realizado por Jiménez-Osorio et al. (2016), a suplementação curcumina (320 mg/dia) durante 8 semanas a indivíduos com DM tipo 2 não promoveu melhorias na proteinúria, apesar de ter sido observado um aumento na capacidade antioxidante plasmática, no entanto sem aumento nas enzimas antioxidantes (eritrócitos) ou na ativação de Nrf2 (linfócitos). Estes dados reiteram a necessidade de continuidade dos estudos, para avaliar o potencial antioxidante da curcumina, *in vivo*.

Alterações significativas na PON1 são observadas em pacientes com DM tipo 1 e DM tipo 2 (JURETIC et al., 2006; KAPPELLE et al., 2011). Portanto, a função da enzima PON1 tem sido intensamente estudada para o monitoramento de várias doenças, inclusive o DM (KULKA, 2016). Em condições de hiperglicemia e hipertrigliceridemia, ocorre aumento no estresse oxidativo e na peroxidação lipídica em macrófagos e em lipoproteínas (GRIENDLING; ALEXANDER, 1997). A enzima PON é associada com a HDL protege a LDL e a HDL contra a oxidações, além de eliminar lipídeos oxidados das células (AVIRAM, 2004). Evidências indicam que a atividade sérica da PON1 se encontra diminuída no DM (ABBOTT et al., 1995), aumentando, portanto, o risco cardiovascular. Tem sido demonstrado que a PON1 é uma enzima que pode atuar de maneira suicida, com o intuito de prevenir a oxidação de HDL. Essa teoria é apoiada pela observação da diminuição da atividade da PON1 quando exposta a peróxidos de lipídeos. A atividade diminuída da PON1 pode ser relacionada à glicação do HDL e conseqüente perda de funcionalidade, processo que ocorre no diabetes. Em trabalho realizado por Assis et al (2017), foi observado que o tratamento de ratos diabéticos com iogurte enriquecido com curcumina preservou a atividade da PON1.

As reações de glicação das proteínas propiciam a formação de AGE, que são responsáveis pelas principais causas de diferentes complicações que ocorrem no diabetes (NEGRE-SALVAYRE et al., 2009); altos níveis de glicose podem culminar na glicação de várias proteínas estruturais e funcionais, incluindo proteínas plasmáticas e colágeno (KHAN et al., 2009).

Postula-se que a curcumina seja eficaz na remoção de AGE por induzir a expressão gênica do receptor R1 (AGE-R1). Estudos sugerem que o AGE-R1, além de promover a detoxificação e depuração de AGE, atenua o estresse oxidativo (CAI et al., 2008; JIANGUO et al., 2012). Evidências também sugerem que a curcumina é capaz de inibir a atividade de quinase regulada por sinal extracelular (ERK), bem como estimular a atividade de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR $\gamma$ ) (JIANGUO et al., 2012). Em estudo realizado por Sajithlal et al. (1998), foi observado o efeito da curcumina sobre AGE e ligações *cross-link* no colágeno de tendão, pele e cauda de ratos diabéticos. O tratamento com curcumina foi eficaz na prevenção de formação de AGE e de ligações *cross-link* em colágeno na cauda de ratos diabéticos, e reduziu de forma significativa o estresse oxidativo.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo corroboram os achados de estudos anteriores do nosso laboratório, onde o tratamento de ratos diabéticos com iogurte enriquecido com curcumina é capaz de prevenir o aumento progressivo nos níveis de glicose plasmática, sem causar hipoglicemia, uma vez que nos animais normais tratados com essa preparação não foi observado nenhum episódio de hipoglicemia. Observou-se também que o iogurte, veículo utilizado para a administração da curcumina, não interfere na glicemia, no ganho ou queda de peso corporal em comparação ao grupo de animais normais. Ratos diabéticos tratados com curcumina não apresentaram a elevação progressiva na glicemia, tal como observado nos animais diabéticos tratados somente com iogurte, evidenciando assim o potencial antidiabético da curcumina em iogurte.

Além disso, animais diabéticos tratados com curcumina apresentaram redução no estresse oxidativo, uma vez que os níveis de biomarcadores de lesão oxidativa foram diminuídos, houve aumento nas atividades / níveis de antioxidantes endógenos, com perfis semelhantes aos apresentados pelos animais diabéticos tratados com insulina, considerado “tratamento padrão” para o DM tipo 1, os quais foram por diversas vezes, semelhantes aos níveis observados nos animais normais. Em síntese, animais diabéticos tratados com curcumina apresentaram: menores níveis em biomarcadores de estresse oxidativo e glicativo; (i) TBARS plasmático, (ii) PCO hepático, (iii) AGE plasmático; maiores atividades de enzimas antioxidantes, (i) SOD, (ii) CAT, (iii) GSH-Px, (iv) PON1 e maiores níveis de GSNP.

Pode ser reconhecida a eficácia da curcumina em iogurte em preservar os sistemas de defesas antioxidantes (no plasma e fígado) de animais diabéticos, e o efeito temporal dos marcadores e em prevenir modificação oxidativa de proteínas hepáticas e a redução da LPO. Evidências preliminares também sugerem que a curcumina seja benéfica na atenuação das modificações causadas pelo estresse glico-oxidativo. Tais resultados indicam que futuros estudos devem ser realizados com o objetivo de avançar no potencial uso da curcumina como terapia complementar aos fármacos antihiperlipidêmicos, com o objetivo de atenuar o desenvolvimento das complicações a longo prazo do DM.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, C.A.; MACKNESS, M.I.; KUMAR, S.; BOULTON, A.J.; DURRINGTON, P.N. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.15, n.11, p. 1812-1818, 1995.
- ABDOLLAHI, M.; RANJBAR, A.; SHADNIA, S.; NIKFAR, S.; REZAIEE, A. Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical Science Monitor Basic Research**, v.10, p.141-7, 2004.
- ACHESON, K. J. Carbohydrate for weight and metabolic control: Where do we stand? **Nutrition**, v.26, p.141-145, 2010.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA - ANVISA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm> < acesso em: 13/01/2017.
- AGGARWAL, B.B.; SUNDARAM, C.; MALANI, N.; ICHIKAWA, H. Curcumin: the Indian solid gold. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.595, p.1-75, 2007.
- AK, T.; GÜLÇİN, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **ChemicoBiological Interactions**, v.174, p.27-37, 2008.
- AL-MEHDI, A.B.; DODIA, C.; JAIN, M.K.; FISHER, A.B. A phospholipase A 2 inhibitor decreases generation of thiobarbituric acid reactive substance during lung ischemiareperfusion. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v.1167, n.1, p. 56-62, 1993.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, 33, Supl. 1, p. S62-9, 2011.
- ARAGNO, M.; TAMAGNO, E.; GATTO, V.; BRIGNARDELLO, E.; PAROLA, S.;
- DANNI, O.; BOCCUZZI, G. Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocintreated rats against oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 11-12, p. 1467-1474, 1999.
- ARCARO, C. A.; GUTIERRES, V. O.; ASSIS, R. P.; MOREIRA, T. F.; COSTA, P. I.; BAVIERA, A. M.; BRUNETTI, I. L. Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic rats. **PLoS One**, v.9, p. e113993, 2014.

ASSIS, R. P.; ARCARO, C. A.; GUTIERRES, V. O.; OLIVEIRA, J. O.; COSTA, P. I.; BAVIERA, A. M.; BRUNETTI, I. L. Combined Effects of Curcumin and Lycopene or Bixin in Yoghurt on Inhibition of LDL Oxidation and Increases in HDL and Paraoxonase Levels in Streptozotocin-Diabetic Rats. **International Journal of molecular Science**, v.18, n.4, p.1-20, 2017.

AVIRAM, M. Introduction to the serial review on paraoxonases, oxidative stress, and cardiovascular diseases. **Free Radical Biology & Medicine Journal**, v. 37, n. 9, p. 13011303, 2004.

BABU, P.S.; SRINIVASAN, K. Renal lesions in streptozotocin-induced diabetic rats maintained on onion and capsaicin containing diets. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v.10 p.477-483, 1999.

BALASUBRAMANYAM, M.; KOTESWARI, A. A.; KUMAR, R.S.; MONICKARAI, S..F; MAHESWARI, J.U.; MOHAN, V. Curcumin-induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: Novel therapeutic implications. **Journal of Biosciences**, v. 28 p. 715-721, 2003.

BANDEIRA, S.M; FONSECA, L.J.S; GUEDES, G.S; RABELO, L.A; GOULART, M.O.F.; VASCONCELOS, S.M.L. Oxidative Stress as an Underlying Contributor in the Development of Chronic Complications in Diabetes Mellitus International. **Journal of Molecular Science**, v.14, p.3265-3284, 2013.

BARBER, A.D; HARRIS, S.R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. **American Pharmacy**, v.34, n.9, p.26-35, 1994.

BARZEGAR, A.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin. **PLoS ONE**, v.6, p.1-7, 2011.

BATISTA, F.; MONTEIRO, A.C. Estudo comparativo entre a sensibilidade protetora dos pés e mãos em portadores de Diabetes Mellitus. **Diabetes Clínica, Atibaia**, v.10, p.206-211, 2006.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, p.276-87, 1971.

BEERS, R.F.J.R.; SIZER, I.W. A spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal Biological Chemistry**, v.195, p.133-140, 1952.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal Food Science & Nutrition**, v.47, p.233-261, 1996.

BIERHAUS, A.; HOFMANN, M. A.; ZIEGLER, R.; NAWROTH, P. P. 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.

- BILAL, H.M.; RIAZ, F.; MUNIR, K.; SAQIB, A.; SARWAR, M. R. Histological in the liver of diabetics rats: A review oh pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in type 1 diabetic mellitus. **Endocrinology, Nutrition & Metabolism**, v.3, p.1-9, 2016.
- BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447 n. 7143 p. 396-398, 2007.
- BLUM, J.; FRIDOVICH, I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. **Archives of biochemistry and biophysics**, v.240, n.2, p.500-508, 1985.
- BOLAJOKO, E. B.; MOSSANDA, K. S.; ADENIYI, F.; AKINOSUN, O.; FASANMADE, A.; MORAPANE, M. Antioxidante and oxidant stress status in type 2 diabetic and diabetic foot ulcer. **South African Medicinal Journal**, v. 98, n.8, p. 614-617, 2008.
- BONASIO, R; TU, S.; REINBERG, D. Molecular signals of epigenetic states. **Science, USA**, v. 330, p. 612–616, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Gestação de alto risco: manual técnico / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. 5ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. p. 302.
- BRETT, J.; SCHMIDT, A.M.; YAN, S.D.; ZOU, Y.S.; WEIDMAN, E.; PINSKY, D.; NOWYGRAD, R.; NEEPER, M.; PRZYSIECKI, C.; SHAW, A.; MIGHELI, A.; STERN, D.; Survey of the Distribution of a Newly Characterized Receptor for Advanced Glycation End Products in Tissues. **American Journal Pathology**, v.143, n.6, p.1699-1712, 1993.
- BROWNLE, M. The pathobiology of diabetic complications – a unifying mechanism. **Diabetes**, v.56, p.1615-1625, 2005.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p.813–820, 2001.
- BUDAVARI, S.; O'NEIL, M. J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P. E.; KINNEARY, J. F. **The Merck Index**: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 12th ed. New Jersey: Merck, 2006. p. 1208.
- CAI, W.; HE, J. C.; ZHU, L.; CHEN, X.; STRIKER, G. E.; VLASSARA, H. AGE-receptor-1 counteracts cellular oxidant stress induced by AGEs via negative regulation of p66shc-dependent FKHRL1 phosphorylation. **American Physiological Cell Physiology**, v. 294, n.1, p. C-145-152, 2008.
- CARDOSO, G. A.; SALGADO, J. M.; CESAR, M. D. C.; DONADO-PESTANA, C. M. The effects of green tea consumption and resistance training on body composition and resting metabolic rate in overweight or obese women. **Journal of medicinal food**, v.16, p. 120-127, 2013.

CECARINI, V.; GEE, J.; FIORETTI, E.; AMICI, M.; ANGELETTI, M.; ELEUTERI, A. M.; KELLER, J.N. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1773, n.2, p.93-104, 2006.

CHEN, A. S.; TAGUCHI, T.; SUGIURA, M.; WAKASUGI, Y.; WANG, M. W.; MIWA, I. Pyridoxal- aminoguanidine adduct is more effective than aminoguanidine in preventing neuropathy and cataract in diabetic rats. **Hormone Metabolic Research**, v. 36, n. 3, p. 183187, 2004.

COSTA, L. G.; MCDONALD, B. E.; MURPHY, S. D.; OMENN, G. S.; RICHTER, R. J.; MOTULSKY, A. G.; FURLONG, C. E. Serum Paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxontocicity in rats. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 103, p.66-76, 1990.  
CUBERO, F. J.; TRAUTWEIN, C. Oxidative Stress and Liver Injury. In: MONGA, S.P.S.; CAGLE, P.T. **Molecular Pathology of Liver Diseases**. New York: springer, 2011. p. 427-435.

DAHL, E. L.; MULCAHY, R.T. Cell-type specific differences in glutamate cysteine ligase transcriptional regulation demonstrate independent subunit control. **Toxicology Sciences**, v. 61, n.2, p. 265-367, 2001.

DARLEY-USMAR, V.; WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. **FEBS letters**, v. 369.2, p. 131-135, 1995.

DE VRIES, H. E.; WITTE, M.; HONDIUS, D.; ROZEMULLER, A. J.; DRUKARCH, B.; HOOZEMANS, J.; VAN HORSSSEN, J. Nrf2-induced antioxidant protection: a promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease. **Free Radical Biology & Medicine Journal**, v. 45, n.10, p. 1375-1383, 2008.

DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H.; BECHARA, E. J. H.; CATALINI, L. H. Singlet molecular oxygen: generation, reactivity, identification and biological effects. **Ciência e Cultura**, v.47, p. 297-313, 1995.

DIKALOV, S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. **Free Radical Biology & Medicine**, v.51, n.7, p. 1289-1301, 2011.

EBERHARDT, M.K. **Reactive oxygen metabolites: chemistry and medical consequences**. Boca Raton, Fl.: CRC Press, 2001. p.280-282

EISENBARTH, G.S.; BUSE, J. B. Type 1 Diabetes Mellitus. In: MELMED, S.; POLONSKY, K. S.; LARSEN, P. R.; RONENBERG, H. M. Editors. **Williams Textbook of Endocrinology**. 12<sup>th</sup>. ed. Philadelphia : Elsevier/Saunders, 2012. p. 1436-1461.

ENGERMAN, R. L; KERN, T.S. Progression of incipient diabetic retinopathy during good glycemic control. **Diabetes**, v. 36, p.808–812, 1987.

EVELSON, P.; SUSEMIHL, C.; VILLARREAL, I.; LLESUY, S.; RODRÍGUEZ, R.; PEREDO, H.; LEMBERG, A.; PERAZZO, J.; FILINGER, E. Hepatic morphological changes and oxidative stress in chronic streptozotocin-diabetic rats. **Annals of Hepatology**, v.4, n. 2, p. 115-120, 2005.

FAJANS, S. S; BELL, G. I; POLONSKY, K. S. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of Maturity-Onset Diabetes of the Young. **New England Journal of Medicine**, v.345, p.971-80, 2001.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 43 p. 61-8, 1997.

FORBES, J. M; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiological Reviews**, v.93, p.137–188, 2013.

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

FRITZ, K. S; PETERSEN, D. R. Exploring the Biology of Lipid Peroxidation Derived Protein Carbonylation. **Chemical Research in Toxicology**, v.24, n.9, p.1411-1419, 2011.

FUJII, J.; MYINT, T.; OKADO, A.; KANETO, H.; TANIGUCHI, N. Oxidative stress caused by glycation of Cu, Zn-superoxide dismutase and its effects on intracellular componentes. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v.11, p. 34-40, 1996.

FUJISAWA, S.; ATSUMI, T.; ISHIHARA, M.; KADOMA, Y. Cytotoxicity, reactive oxygen species-generation activity and radical scavenging activity of curcumin and other related compounds. **Anti-Cancer Research**, v. 24, p. 563-570, 2004.

FUJIWARA, H.; HOSOKAWA, M.; ZHOU, X.; FUJIMOTO, S.; FUKUDA, K.; TOYODA, K.; NISHI, Y.; FUJITA, Y.; YAMADA, K.; YAMADA, Y.; SEINO, Y.; INAGAKI, N. Curcumin inhibits glucose production in isolated mice hepatocytes. **Diabetes Research Clinical Practice**, v. 80, p. 185-191, 2008.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, v.107 p.1058-1070, 2010.

GIROTTI, A.W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **Lipid Research**, v. 39, p. 1529-1542, 1998.

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

GREEN, K; BRAND, M.D; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v.53, p.110-8, 2004.

GRIENDLING, K. K.; ALEXANDER, R. W. Oxidative stress and cardiovascular disease. **Circulation**, v. 96, n.10, p. 3264-3265, 1997.

GROSSI, S.G.; GENCO, R. J. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. **Annals of Periodontology**, v.3, p. 51-61, 1998.

GUILLAUSSEAU, P.J.; MASSIN, P.; DUBOIS-LAFORGUE, D.; TIMSIT, J.; VIRALLY, M.; GIN, H.; BERTIN, E. et al. Maternally inherited diabetes and deafness: a multicenter study. **Annals of Internal Medicine**, v.134, p. 721-728, 2001.

GUPTA, Y. K.; BRIVAL, S.; SHARMA, M. Protective effect of curcumin against kainic acid induced seizures and oxidative stress in rats. **Indian Journal Physiology Pharmacology**, v.53, p.39-46, 2009.

GUTIERRES, V.O.; CAMPOS, M.L.; ARCARO, C.A.; ASSIS, R.P.; BALDAN-CIMATTI, H.M.; PECCININI, R.G.; PAULA-GOMES, S.; KETTEHUT, I.C.; BAVIERA, A.M.; BRUNETTI, I.L. Curcumin pharmacokinetic and pharmacodynamic evidences in streptozotocin-diabetic rats support the antidiabetic activity to be via metabolite(s). **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, p.1-13, 2015.

GUTIERRES, V.O.; PINHEIRO, C.M.; ASSIS, R.P.; VENDRAMINI, R.C.; PEPATO, M.T.; BRUNETTI, I. L. Curcumin-supplemented yoghurt improves physiological and biochemical markers of experimental diabetes. **The British Journal of Nutrition**, v.108, p.440-8, 2012.

HALL, M. Carbohydrates. In: ANDERSON, S.C.; COCKAINE, S. **Clinical Chemistry: Concepts and Applications**. New York: McGraw-Hill, 2003. cap. 10, p.153-178.

HALLIWELL, B.; GUTTERRIDGE, J. M. C. **Free radical in Biology and Medicine**. 3<sup>rd</sup>. ed. New York: Oxford Science Publications, 2010.

HENRY, C. J. Functional foods. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 64 n. 7, p. 657–659, 2010.

HUEBSCHMANN, A.G.; REGENSTEINER, J.G.; VLASSARA, H.; REUSCH, J. E. Diabetes and advanced glycoxidation end products. **Diabetes Care**, v.29, n.6, p. 1420-1432, 2006.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, **“IDF Diabetes Atlas,”** 7 ed. Brussels, Belgium, 2015.

JACOB, K.; PERIAGO, M. J.; BÖHM, V.; BERRUEZO, G. R. Influence of lycopene and vitamin C from tomato juice on biomarkers of oxidative stress and inflammation. **British Journal of Nutrition, Cambridge**, v. 99, p.137-146, 2008.

JAIN, S. K. The neonatal erythrocyte and its oxidative susceptibility. **Seminars in Hematology**, v. 26, n.4, p. 286-300, 1989.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science, USA**, v. 293, n. 5532, p.1074–1080, 2001.

JIANGUO, L.; YOUCAI, T.; QIAOHUA, K.; ANPING, C. Curcumin eliminates the inhibitory effect of advanced glycation end-products (AGEs) on gene expression of AGE receptor-1 in hepatic stellate cells in vitro. **Laboratory Investigation**, v.92, n.6, p. 827841, 2012.

JIMÉNEZ-OSORIO, A. S.; GARCÍA-NIÑO, W. R.; GONZÁLEZ-REYES, S.; ÁLVAREZMEJÍA, A. E. ; GUERRA-LEÓN, S.; SALAZAR-SEGOVIA, J. et al. The Effect of Dietary Supplementation With Curcumin on Redox Status and Nrf2 Activation in Patients With Nondiabetic or Diabetic Proteinuric Chronic Kidney Disease: A Pilot Study. **Journal of Renal Nutrition**, v. 26, n.4, p. 237-244, 2016.

JIRTLE, R. L.; SKINNER, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, p. 253-262, 2007.

JURETIĆ, D.; MOTEJLKOVA, A.; KUNOVIĆ, B.; REKIĆ, B.; FLEGAR-MESTRIĆ, Z.; VUJIĆ, L.; MESIĆ, R.; LUKAC-BAJALO. J.; SIMEON-RUDOLF, V. Paraoxonase/arylesterase in serum of patients with type II diabetes mellitus. **Acta Pharmaceutica**, v.56, p. 59-68, 2006.

KALPANA, C.; RAJASEKHARAN, K. N.; MENON, V. P. Modulatory effects of curcumin and curcumin analog on circulatory lipid profiles during nicotine-induced toxicity in wistar rats. **Journal of Medicinal Food**, v.8, p.246-250, 2005.

KAPPELLE, P.J.; BIJZET, J.; HAZENBERG, B.P.; DULLAART, R.P. Lower serum paraoxonase-1 activity is related to higher serum amyloid a levels in metabolic syndrome.

**Archives of Medical Research**, v.42, p.219-225, 2011.

KARTHIKESAN, K.; PARI, L.; MENON, V. P. Combined treatment of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid exerts potential antihyperglycemic effect on streptozotocina nicotinamide induced diabetic rats. **General Physiology and Biophysics**, v. 29, p. 23-30, 2010.

KENSLER, T.W; WAKABAYASHI, N.; BISWAL, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.47, p.89-116, 2007.

KHAN, N.; BAKSHI, K. S.; JAGGI, A. S.; SINGH, N. Ameliorative potential of spironolactone in diabetes induced hyperalgesia in mice. **Yakugaku Zasshi**, v. 129, p. 593-599, 2009.

KIM, M.; CHOI, G.; LEE, H. S. Fungicidal property of Curcuma longa L. rhizomederived curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.1578-1581, 2003.

KLEEMOLA, P. R.; JAUHAINEN, M.; PALHLMAN, R.; ALFTHAN, G. MUTANEN, M. Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. **Atherosclerosis**, v. 160, n. 2, p. 425-432, 2002.

KORKMAZ-ICÖZ, S.; LEHNER, A.; LI, S.; VATER, A.; RADOVITS, T.; HEGEDŰS, P.; RUPPERT, M.; BRLECIC, P.; ZORN, M; KARCK, M.; SZABÓ, G. Mild Type 2 Diabetes Mellitus Reduces the Susceptibility of the Heart to Ischemia/Reperfusion Injury: Identification of Underlying Gene Expression Changes. **Journal of Diabetes Research**, v.2015, p. 1-16, 2015.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinc, oxidative stress and physical activity. **Revista de Nutrição**. v. 16, n. 4 p. 433-441, 2003.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v.128, n. 4, p. 693-705, 2007.

KOWLURU, R. A; ABBAS, S. N; ODENBACH, S. Reversal of hyperglycemia and diabetic nephropathy: effect of reinstatement of good metabolic control on oxidative stress in the kidney of diabetic rats. **Journal Diabetes Complications**, v.18, n. 5, p.282-288, 2004.

KULKA, M. A review of paraoxonase 1 properties and diagnostic applications. **Polish Journal of Veterinary Science**, v. 19, p. 225-232, 2016.

KUNCHANDY, E.; RAO, M. N. A. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 58, p. 237-240, 1990.

KUWABARA, N.; TAMADA, S.; IWAI, T.; TERAMOTO, K.; YUKIMURA, T.; NAKATANI, T.; MIURA, K. Attenuation of renal fibrosis by curcumin in rat obstructive nephropathy. **Urology**, v. 67 p. 440-446, 2006.

LEE, A. Y; CHUNG, S. S. Contributions of Polyol Pathway to oxidative stress in diabetic cataract. **FASEB Journal**, v.13, n. 1, p. 23-30, 1999.

LEI, X. G.; ZHU, J. H.; CHENG, W. H.; BAO, Y.; HO, Y.S; REDDI, A. R; HOLMGREN, A; AENÉR, E. S. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: Basic mechanisms and health implications. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 1. p. 307-364, 2016.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. R.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v.233, p.346-57, 1994.

LIU, Z.; DOU, W.; ZHENG, Y.; WEN, Q.; QIN, M.; WANG, X.; TANG, H.; ZHANG, R.; LV, D.; WANG, J.; ZHAO, S. Curcumin upregulates Nrf2 nuclear translocation and protects

rat hepatic stellate cells against oxidative stress. **Molecular Medicine Reports**, v.13, n. 2, p, 1717-1724, 2015.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, v.193, p.265-75, 1951.

LUCCHESI, A. N.; FREITAS, N. T.; CASSETTARI, L. L.; MARQUES, S. F.; SPADELLA, C. T. Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.28, p.502-508, 2013.

MACNEE, W. Oxidants/antioxidants and COPD. **Chest Journal**, v.117, p.117303S-17S, 2000.

MADONNA, R.; DE CATERINA, R. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes--part I: pathways of vascular disease in diabetes. **Vascular Pharmacology**, v.54, p.68-74, 2011.

MAJITHIYA, J. B.; PHARM, M.; BALARAMAN, R. Time-Dependent Changes in Antioxidant Enzymes and Vascular Reactivity of Aorta in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Treated With Curcumin. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.46, p. 687-705, 2005.

MARTIN, C.; ZHANG, Y. The diverse functions of histone lysine methylation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.6, p.838–849, 2005.

MARUICHI, M.D; AMADEI, G; ABEL, M.N. Diabetes Mellitus Gestacional. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v.57, p. 124-128, 2012.

MCLELLAN, K. C. P.; BARBALHO, S.M.; CATTALINI, M.; LERARIO, A.C. Diabetes mellitus do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida. **Revista de Nutrição**, v. 20, p. 515-524, 2007.

MEADE, S.J.; MILLER, A.G.; GERRARD, J.A. The role of dicarbonyl compounds in nonenzymatic crosslinking: a structure-activity study. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v.11, n.6, p. 853-862, 2003.

MEGHANA, K.; SANJEEV, G.; RAMESH, B. Curcumin prevents streptozotocin-induced islet damage by scavenging free radicals: a prophylactic and protective role. **European Journal of Pharmacology**, v. 577, p.183-191, 2007.

MELPOMENI PEPPA, M. D.; JAIME URIBARRI, M. D.; HELEN VLASSARA, M. D. Glucose, Advanced Glycation End Products, and Diabetes. Complications: What Is New and What Works. **Clinical Diabetes**, v. 21, n. 4, p.186-187, 2003.

METZGER, B.E; GABBE, S.G; PERSSON, B; BUCHANAN, T.A; CATALANO, P.A; DAMM, P; DYER A.R; LEIVA, A; HOD, M; KITZMILER, J.L; LOWE, L.P; MCINTYRE, H.D; OATS, J.J; OMORI, Y; SCHMIDT, M.I. International association of diabetes and pregnancy study group (HAPO)/consensus panel, Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy **Diabetes Care**, v.33, p.676-682, 2010.

MIYATA, T.; UEDA, Y.; HORIE, K.; NANGAKU, M.; TANAKA, S.; DE STRIHO, C.V.Y.; KUROKAWA. Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine. **Kidney International**, v. 53, n. 2, p. 416-22, 1998.

MÜNCH, G.; KEIS, R.; WEBELS, A.; BOHNER, P.R.I.; HEIDLAND, A.; NIWA, T.; LEMEKE, H-D.; SCHINZEL, R. Determination of Advanced Glycation End Products in Serum by Fluorescence Spectroscopy and Competitive ELISA). **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v.35, p. 669-677, 1997.

MURATA, T.; NAGAI, R.; ISHIBASHI, T.; INOMUTA, H.; IKEDA, K.; HORIUCHE, S. The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas. **Diabetologia**, v. 40, n. 7, p. 7649, 1997.

NA, L.X.; ZHANG, L.Y.; LI, Y.; LIU, Y. L.; LI, R.; KONG.T.; SUN, C. H. Curcumin improves insulin resistance in skeletal muscle of rats. **Nutrition Metabolism and Cardiovascular Disease**, v.21, p.526-33, 2011.

NANDAKUMAR, D. N.; NAGARAI, V. A.; VATHSALA, P. G.; RANGARAJAN, P.; PADMANABAN, G. Curcumin-artemisin combination therapy for malaria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 1859-1860, 2006.

NATHAN, D. M.; CLEARY, P. A.; BACKLUND, J. Y.; GENUTH, S. M.; LACHIN, J. M.; ORCHARD, T. J.; RASKIN, P.; ZINMAN, B. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with Type 1 diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v.353, p.2643-2653, 2005.

NATHAN, D.M. For the DCCT/EDIC Research Group. The Diabetes Control and Complications Trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview. **Diabetes Care**, v.37, p. 9-16, 2014.

NAZ, S.; JABEEN, S.; ILYAS, S.; MANZOOR, F.; ASLAM, F.; ALI, A. Antibacterial activity of *Curcuma longa* varieties against different strains of bacteria. **Pakistan Journal of Botany**, v. 42, p. 455-462, 2010.

NEGRE-SALVAYRE, A.; SALVAYRE, R.; AUGÉ, N.; PAMPLONA, R.; PORTERO-OTÍN, M. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, p. 3071-3109, 2009.

NIKI, E.; YOSHIDA, Y.; SAITO, Y.; NOGUCHI, N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.338, n. 1, p. 668-676, 2005.

NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; DU, X. L.; YAMAGISHI, S.; MATSUMURA, T.; KANEDA, Y.; YOREK, M. A.; BEEBE, D.; OATES, P. J.; HAMMES, H. P.; GIARDINO, I.

BROWNLEE, M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v.404, p. 787-790, 2000.

OLOFSSON, E. M.; MARKLUND, S. L.; BEHNDIG, A. Enhanced diabetes- induced cataract in copper-zinc superoxide dismutase-null mice. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.50 p.2913-8, 2009.

OLSZANECKI, R.; JAWIEN, J.; GAIDA, M.; MATEUSZUK, L.; KORABIOWSKA, M.; CHLOPICKI, S.; KORBUT, R. Effect of curcumin on atherosclerosis in apoE/ LDL-R double knockout mice. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.56, p.627-635, 2005.

OOKAWARA, T.; KAWAMURA, N.; KITAGAWA, Y.; TANIGUCHI, N. Site-specific and random fragmentation of Cu, Zn-superoxide dismutase by glycation reaction. Implication of reactive oxygen species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n.26, p. 18505-18510, 1992.

ORRENIUS, S.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.47, p.143183, 2007.

PENNACCHI, P.C.; DE ALMEIDA, M.E.; GOMES, O.L.; FAIÃO-FLORES, F.; DE ARAÚJO CREPALDI, M.C.; DOS SANTOS M.F.; DE MORAES.; BARROS, S.B.; MARIA-ENGLER, S.S. Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study the Pathogenesis of Skin Aging. **Tissue Engineering: Part A**, v. 21, n. 17 -18, p. 24172425, 2015.

PENNATHUR, S.; WAGNER, J. D.; LEEUWENBURGH, C.; LITWAK, K. N.; HEINECKE, J. W. A hydroxyl radical-like species oxidizes cynomolgus monkey artery wall proteins in early diabetic vascular disease. **Clinical Investigation**, v.107, p.853-60, 2001.

PÉREZ-ARRIAGA, L.; MENDOZA-MAGAÑA, M. L.; CORTÉS-ZÁRATE, R.; CORONARIVERA, A.; BOCADILLA-MORALES, L.; TROYO-SANROMÁN, R.;

RAMÍREZHERRERA, M. A. Cytotoxic effect of curcumin on Giardia lamblia trphozoites. **Acta Tropica**, v. 98, p. 152-161, 2006.

PIGEOLET, E.; CORBISIER, P.; HOUBION, A.; LAMBERT, D.; MICHIELS, C.; RAES, M.; ZACHARY, M. D; REMACLE, J. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 51, n. 3, p. 283-297,1990.

PILZ, J.; MEINEKE, I.; GLEITER, C. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4dinitrophenylhydrazine derivative. **Journal of Chromatography. B: Analytical Technologies in the Biomedical and the Life Sciences**, v.742, p.315-25, 2000.

PORTER, N. A.; CALDWELL, S. E.; MILLS, K. A. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, v.30, n.4 p.277-290, 1995.

PRADA, P.O; SAAD, M.J.A. Bases moleculares da sinalização da insulina. In: CINTRA, D.E.; ROPELLE, E.R.; PAULI, J.R. **Obesidade e diabetes: fisiopatologia e sinalização celular**. São Paulo: Sarvier, 2011. p.419-425.

RAMASAMY, R.; VANNUCCI, S. J.; YAN, S.S.D.; HEROLD, K.; YAN, S.F.; SCHMIDT, A.M. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. **Glycobiology**, v.15, n. 7, p. 16R-28R, 2005.

RICHTER, R. J.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. **Circulation Cardiovascular Genetics**, v.1, p, 147-152, 2008.

RINGMAN, J.M.; FRAUTSCHY, S.A.; COLE, G.M.; MASTERMAN, D.L.; CUMMINGS, J.L. A potential role of the curry spice curcumin in Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, v. 2, p.131-136, 2005.

ROY, S.; SALA, R.; CAGLIERO, E.; LORENZI M. Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: phenomenon with a memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.87, p. 404-408, 1990.

RUSH, J. W.; SANDIFORD, S. D. Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. **Clinical Biochemistry**, v.36, n. 5, p.345-51, 2003.

SADI, G.; BOZAN, D.; YILDIZ, H.B. Redox regulation of antioxidante enzymes: Posttranslation modulaiton of catalase and glutathione peroxidase activity resveratrol in diabetic rats liver. **Molecular and Celular Biochemistry**, v. 393, n. 1-2, p. 111-122, 2014.

SAJITHLAL, G.B.; PANDARINATHAN, C.; CHANDRAKASAN, G. Effect of Curcumin on the Advanced Glycation and Cross-linking of Collagen in Diabetic Rats. **Molecular and Cellular Pharmacology**, v. 56, p. 1607-1614, 1998.

SANTINI, S. A.; MARRA, G.; GIARDINA, B.; COTRONEO, P.; MORDENTE, A.; MARTORANA, G. E.; MANTO, A.; GHIRLANDA, G. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. **Diabetes**, v. 46, n.11, p. 1853-1858, 1997.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, p. 308-13, 2004.

SEO, K.I.; CHOI, M.S.; JUNG, U.J.; KIM, H.J.; YEO, J.; JEON, S.M.; LEE, M.K. Effect of curcumin supplementation on blood glucose, plasma insulin, and glucose homeostasis related enzyme activities in diabetic db/db mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.52, p.995-1004, 2008.

SHIMIZU, N.; KOBAYASHI, K.; HAYASHI, K. The reaction of superoxide radical with catalase. Mechanism of the inhibition of catalase by superoxide radical. **Journal of Biological Chemistry** v. 259, n.7, p. 4414-4418, 1984.

SIBBEL, A. The sustainability of functional foods. **Social Science & Medicine**, v. 64, p. 554–561, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**: 2014/2015. Organização José Egídio Paulo de Oliveira e Sérgio Vencio. São Paulo: AC Farmacêutica, 2016.

SRIVIVASAN, A.; MENON, V. P.; PERIASWAMY, V.; RAJASEKARAN, K. N. Protection of pancreatic beta-cell by the potential antioxidant bis-o-hydroxycinnamoyl methane, analogue of natural curcuminoid in experimental diabetes. **Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 6 p. 327-333, 2003.

SUETH-SANTIAGO, V.; MENDES-SILVAA, G. P.; DECOTÉ-RICARDO, D.; LIMAA, M. E. F. Curcumina, o pó dourado do açafraão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 38, p. 538-552, 2015.

TABATABAIE, T; FLOYD, R.A. Susceptibility of glutathione peroxidase and glutathione reductase to oxidative damage and the protective effect of spin trapping agents. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 314, n.1, p.112-119, 1994.

TANNUS, L. R. M.; OLIVEIRA, D. S.; MATHEUS, A. S.; CUNHA, E. F.; GOMES, M. B. Diabetes mellitus do tipo 1A na primeira infância de gêmeos dizigóticos: associação entre fatores genéticos e ambientais. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v.51, p.142-145, 2007.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. **Journal Clinical Pathology**, v.22, p.158-161, 1969.

VACA, C.E.; WILHEM, J.; HARMS-RINGDAHL, M.1998. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 195, p. 137-149, 1988.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30.5, p.1323-38, 2007.

VERBEEK, R.; VAN TOL, E. A.; VAN NOORT, J. M. Oral flavonoids delay recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, p. 220-228, 2005.

VIDELA, A. L. Oxidative stress signaling underlying liver disease and hepatoprotective mechanisms. **World Journal of Hepatology**, v.1, n.1, p. 72-78, 2009.

VLISSARA, H.; BUCALA, R. Recent progress in advanced glycation and diabetic vascular disease: role of advanced glycation end product receptors. **Diabetes**, v. 3, p. 65-66, 1996.

VLISSARA, H.; PALACE, M.R. Diabetes and advanced glycation end products. **Journal Internal Medicine**, v.251, p. 87-101, 2002.

WELCH, K. D.; VAN EDEN, M. E.; AUST, S. D. Modification of ferritin during iron loading. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 3, p. 1999-1006; 2002.

WILMES, A.; CREAN, D.; AYDIN, S.; PFALLER, W.; JENNINGS, P.; LEONARD, M. O. Identification and dissection of the Nrf2 mediated oxidative stress pathway in human renal proximal tubule toxicity. **Toxicology In vitro Journal**, v.25, n.3, p. 613-622, 2011.

WORONIECKA, K. I.; PARK, A. S.; MOHTAT, D.; THOMAS, D. B.; PULLMAN, J. M.; SUSZTAK, K. Transcriptome analysis of human diabetic kidney disease. **Diabetes**, v.60, p.2354–2369, 2011.

YAN, H.; HARDING, J. J. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. **Biochemical Journal**, v.328, n.2, p. 599-605, 1997.

YANG, C.; ZHANG, X.; FAN, H.; LIU, Y. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia, **Brain Research**, v.1282, p.133-141, 2009.

YANG, H.; XU, W.; ZHOU, Z.; LIU, J.; LI, X.; CHEN, L.; WENG, J.; YU, Z. Curcumin attenuates urinary excretion of albumin in type II diabetic patients with enhancing nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2) system and repressing inflammatory signaling efficacies. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 123, n.6, p.360-367, 2015.

YOUSSEF, K. M.; EL-SHERBENY, M. A.; EL-SHAFIE, F. S.; FARAG, H. A.; AL- DEEB, O. A.; AWADALLA, S. A. Synthesis of curcumin analogues as potencial antioxidant, cancer chemopreventive agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 337, p. 42-54, 2004.

ZBARSKY, V.; DATLA, K. P.; PARKAR, S.; RAI, D. K.; ARUOMA, O. I.; DEXTER, D. T. Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. **Free Radical Research**, v. 39 p. 1119-1125, 2005.

ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um 110 alimento funcional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 459- 471, 2010.

ZHAO, S. G.; LI, Q.; LIU, Z. X.; WANG, J. J; WANG, X. X.; QIN, M.; WEN, Q.S. Curcumin attenuates insulin resistance in hepatocytes by inducing Nrf2 nuclear translocation. **Hepato-Gastroenterology**, v. 58, p. 360-367, 2011.

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

# *ANEXOS*

## ANEXO I

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 26/2015

Interessada: MONALISA FREITAS DE PAULA

Orientador: Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

Projeto: Avaliação temporal de biomarcadores de lesão oxidativa e de atividade antioxidante em modelo experimental de diabetes mellitus

### **Parecer nº 49/2015 – Comissão de Ética no Uso de Animais**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP (campus Araraquara), reunida em 16 de junho de 2015, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: “Avaliação temporal de biomarcadores de lesão oxidativa e de atividade antioxidante em modelo experimental de diabetes mellitus”, apresentado pela pós-graduanda MONALISA FREITAS DE PAULA, sob orientação do Professor Doutor Iguatemy Lourenço Brunetti, do Departamento de Análises Clínicas desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução. O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em JANEIRO de 2017 em formulário para este fim.

Araraquara, 24 de junho de 2015.




Profª Drª CARLOS CESAR CRESTANI Coordenador da CEUA

## ANEXO II

### AULA DA DEFESA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JULIO DE MESQUITA FILHO"**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CÂMPUS DE ARARAQUARA**



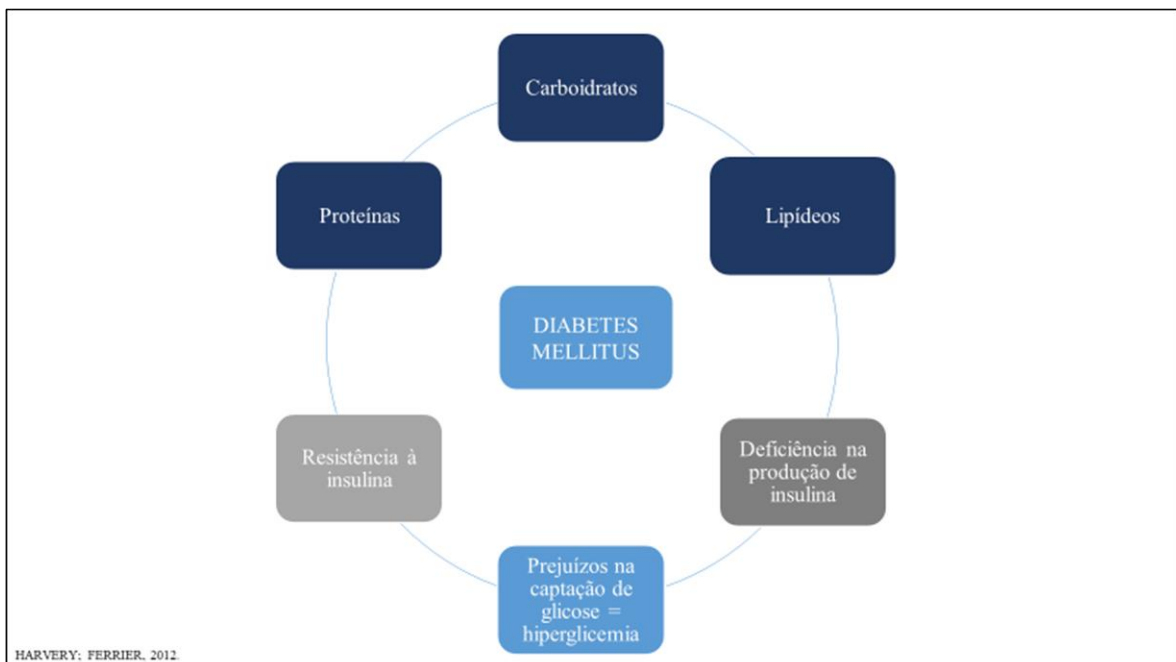
Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia

**Defesa de Mestrado**

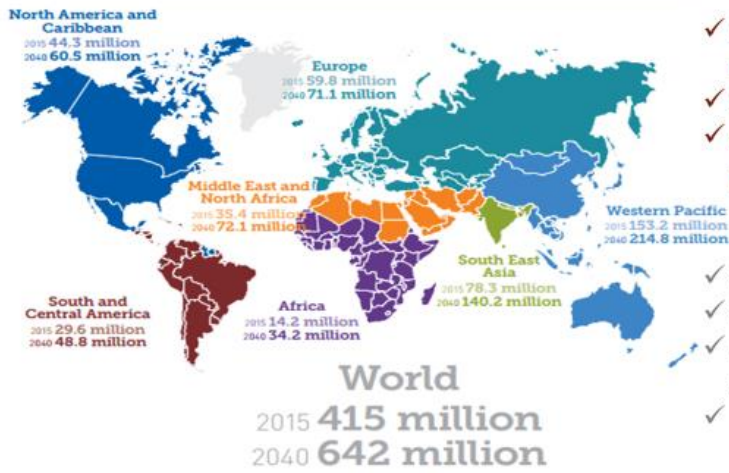
**“COMPORTAMENTO TEMPORAL DOS BIOMARCADORES DE  
LESÃO OXIDATIVA E DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM  
RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM INSULINA OU  
CURCUMINA”**

Monalisa Freitas De Paula  
Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

Agosto  
2017



Estimated number of people with diabetes worldwide and per region in 2015 and 2040 (20-79 years)



### Brasil

- ✓ Entre os 10 países de maior incidência
- ✓ Despesas
- ✓ Quantificar e estimar, planejar, alocar recursos

- ✓ 2015, 1 em 11 pessoas
- ✓ 2040, 1 em 10 pessoas
- ✓ 1 óbito a cada 6 segundos
- ✓ complicações

IDF, 2015.



ADA, 2010.

## DM tipo 1

- Deficiência na produção e secreção de insulina
- Destruição auto-imune das células beta pancreáticas nas ilhotas de Langerhans no pâncreas
- Sintomas
  - 80-90% de células destruídas
- Anticorpos anti-ilhota
- Administração exógena de insulina

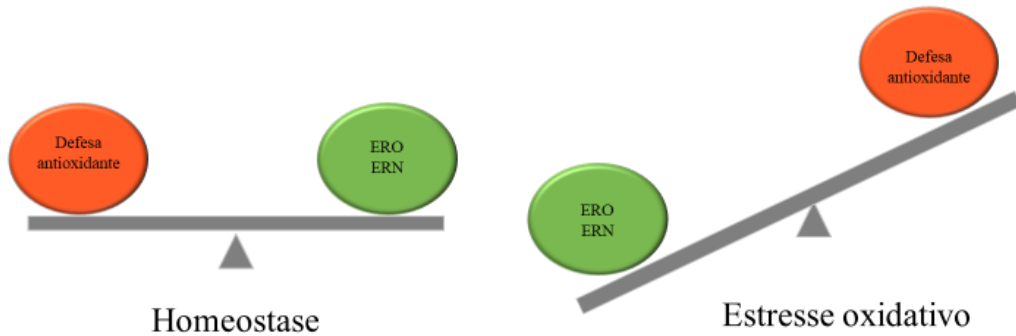
TANUS *et al.*, 2007; ADA, 2010; EISENBARTH; BUSE, 2012.

## DM tipo 2

- Diminuição da sensibilidade tecidual à insulina
  - — [insulina] normal, porém resposta ↓ em:
    - Músculo esquelético
    - Tecido adiposo
    - Fígado
- ↓ na ativação de intermediários da sinalização da insulina
  - ↓ Receptor de insulina (IR)
  - ↓ afinidade dos IR à insulina
  - queda na ativação da sinalização de insulina (IRS1, AKT)
  - ↓ na quantidade ou translocação transportador de glicose dependente de insulina (GLUT4)
  - concomitantemente pode haver deficiência parcial na produção insulina (disfunção pancreática)

SAAD, 2011.

## Espécies reativas



HALLIWELL; GUTTERIDE, 2010.

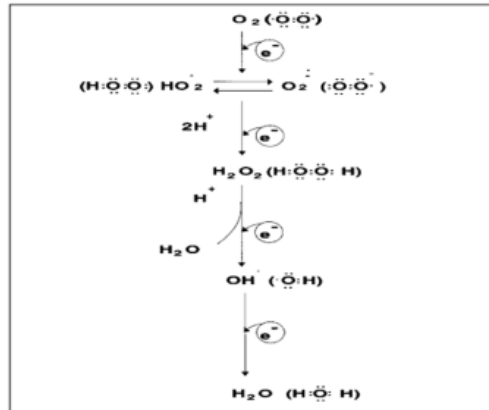


HALLIWELL; GUTTERIDE, 2010.

Cadeia transportadora de elétrons



O O<sub>2</sub> é oceptor final de elétrons na CTE



Redução tetravalente do oxigênio

SCHENEIDER, OLIVEIRA, 2004.

➤ Redução Univalente do O<sub>2</sub>: O<sub>2</sub> + COQH• = O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não possui elétron desemparelhado

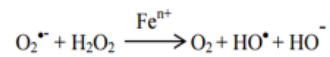
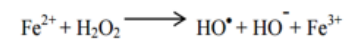
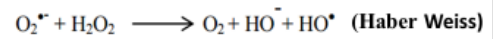
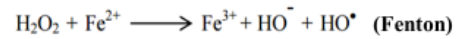
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> participa da geração de HO•

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Fe e/ou Cu = OH•

FERRO + Transferrina

COBRE + Ceruloplasmina

Previne Fenton / Haber Weiss



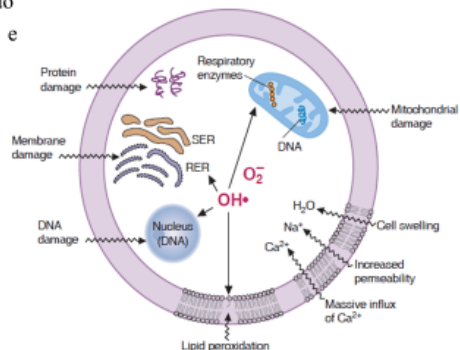
# Estresse Oxidativo

➤ ERO reagem com diversos componentes celulares, especialmente ácido graxo poli-insaturado presentes em fosfolípidos, esteróis de colesterol e triacilgliceróis

## OH<sup>•</sup>

➤ OH<sup>•</sup>, considerado um radical muito deletério:

- ✓ difunde-se rapidamente
- ✓ Atravessa membranas
- ✓ Altera reatividade com biomoléculas
- ✓ OH<sup>•</sup> + DNA (mutações)
- ✓ modificação estrutura membrana
- ✓ prejudica trocas iônicas/ entrada e saída, nutrientes e substâncias tóxicas



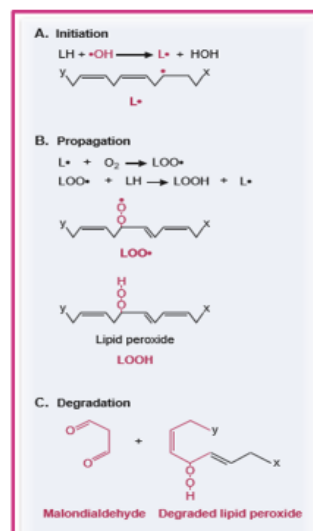
BARBER, HARRIS, 1994; BENZIE, 1996; FERREIRA; MATSUBARA, 1997.

# Estresse Oxidativo

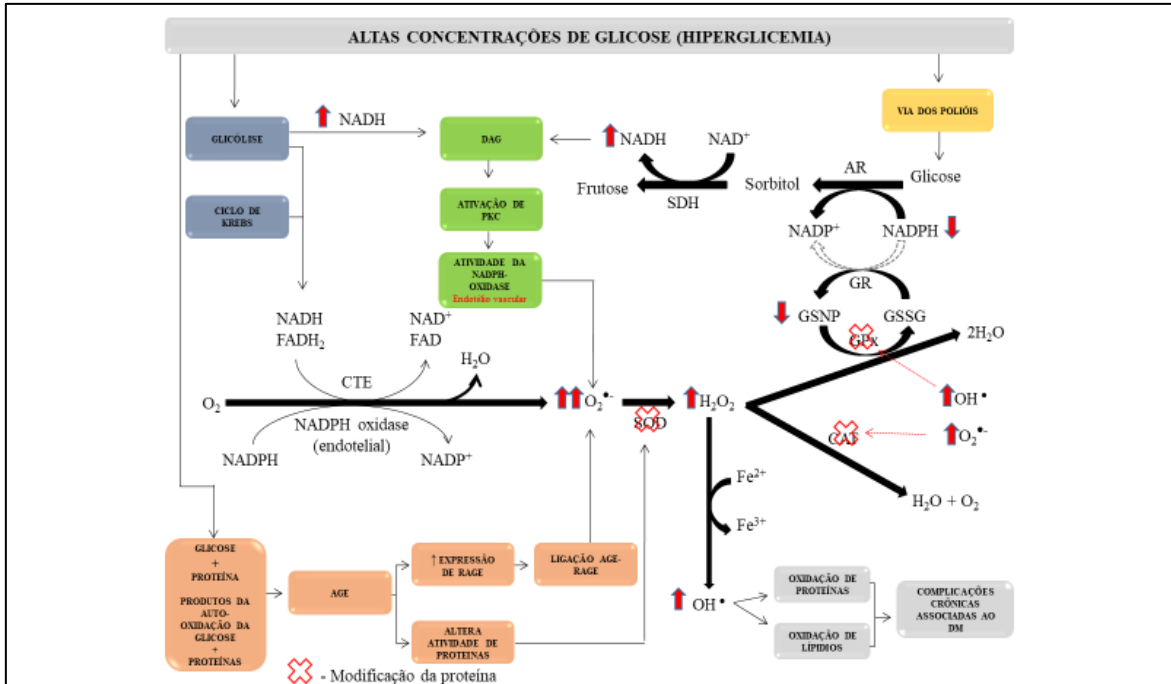
➤ Etapas da LPO (iniciação, propagação e degradação)

➤ OH<sup>•</sup> + lipídeos

- radical lipídico (L<sup>•</sup>)
- radical peroxila (LOO<sup>•</sup>)
- lipoperóxido (LOOH)
- degradação: malondialdeído e outros peróxidos-lipídicos
  - Ataque do OH<sup>•</sup> a um lipídio de membrana
  - Leva a formação radical lipídico
  - Radical lipídico reage com oxigênio e forma radical peroxila
  - Radical peroxila com lipídio-poliinsaturado
  - Que é degradado em malondialdeído e outros lipoperóxidos



BARBER, HARRIS, 1994; FERREIRA; MATSUBARA, 1997.



## O excesso de ERO pode ser controlado!

*“Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”.*

Halliwell, 2000.

## Curcumina: atividades antidiabética e antioxidante



BALASUBRAMANYAM *et al.*, 2003; SRIVIVASAN *et al.*, 2003; FUJISAWA *et al.*, 2004; YOUSSEF *et al.*, 2004; RINGMAN *et al.*, 2005; ZBARSKY *et al.*, 2005; NAZ *et al.*, 2010.

## Incorporação da Curcumina no Iogurte

### ➤ Fator limitante

↓ solubilidade em soluções aquosas

↓ biodisponibilidade quando administrada oralmente

### ➤ Alimento funcional

- Iogurte (fonte de proteína, cálcio, vitamina B12, zinco e outros)

### ➤ Consumo

- diminuição na absorção intestinal e nos níveis circulantes de colesterol
- melhoria no sistema imune
- ↓ incidência do DM tipo 2



ANDERSON; GILLILAND, 1999; ASHRAF; SHAH, 2014; WISE, 2014.

## Curcumin-supplemented yoghurt improves physiological and biochemical markers of experimental diabetes

Vânia O. Gutierrez, Clara M. Pinheiro, Renata P. Assis, Regina C. Vendramini, Maria T. Pepato and Iguatemy L. Brunetti\*

Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP at Araraquara, UNESP – Univ Estadual Paulista, Rua Expedicionários do Brasil 1621, Araraquara, CEP 14801-902, SP, Brazil

(Submitted 26 January 2011 – Final revision received 14 September 2011 – Accepted 14 September 2011 – First published online 9 November 2011)



### RESEARCH ARTICLE

## Piperine, a Natural Enhancer, Nullifies the Antidiabetic and Antioxidant Activities of Curcumin in Streptozotocin-Diabetic Rats

Carlos Alberto Arcaro, Vânia Ortega Gutierrez, Renata Pires Assis, Thais Fernanda Moreira, Paulo Inácio Costa, Amanda Martins Baviera, Iguatemy Lourenço Brunetti\*



International Journal of  
Molecular Sciences



### Article

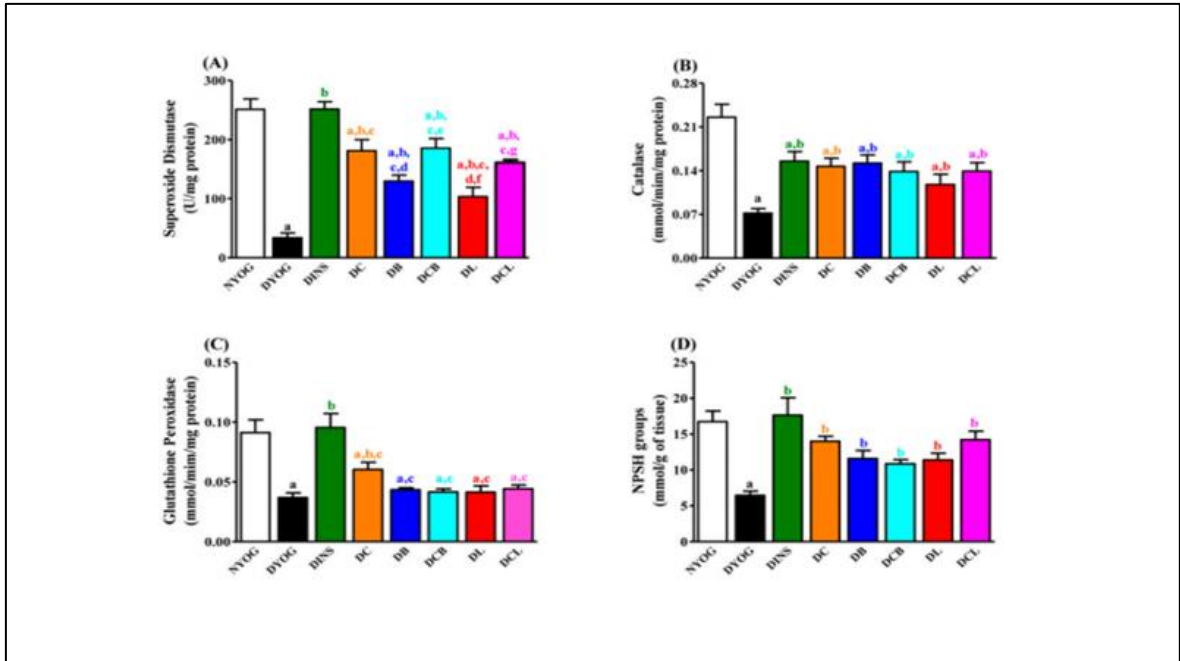
## Combined Effects of Curcumin and Lycopene or Bixin in Yoghurt on Inhibition of LDL Oxidation and Increases in HDL and Paraoxonase Levels in Streptozotocin-Diabetic Rats

Renata Pires Assis, Carlos Alberto Arcaro, Vânia Ortega Gutierrez, Juliana Oriel Oliveira, Paulo Inácio Costa, Amanda Martins Baviera and Iguatemy Lourenço Brunetti \*

Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University-UNESP, Araraquara, São Paulo 14800-903, Brazil; renatapires\_17@hotmail.com (R.P.A.); carlos\_arcaro@hotmail.com (C.A.A.); vania\_ortega@hotmail.com (V.O.G.); juorie@hotmail.com (J.O.O.); costapi@fcar.unesp.br (P.I.C.); baviera@fcar.unesp.br (A.M.B.)

\* Correspondence: brunetti@fcar.unesp.br; Tel.: +55-16-3301-5703; Fax: +55-16-3322-0073

Academic Editors: Lorenza Speranza, José L. Quiles and Sara Franceschelli  
Received: 19 December 2016; Accepted: 29 January 2017; Published: 4 February 2017



A maioria dos estudos que tentam compreender o papel do estresse oxidativo em complicações diabéticas, bem como a investigação da eficácia de intervenções antioxidantes contra distúrbios diabéticos, muitas vezes são experimentos crônicos.

Estudos temporais sobre as mudanças em biomarcadores de dano oxidativo e defesas antioxidantes na progressão da diabetes ainda são escassos.

MAJITHIVA; BALARAMAN, 2015; HUANG *et al.*, 2012; KNAS *et al.*, 2016.

## Objetivo

- Realizar o estudo temporal até 74 dias, nos tempos de tratamento 7, 15, 30 e 74 dias;
- Monitorar as alterações relacionadas ao estresse oxidativo em animais diabéticos tratados com insulina ou com curcumina incorporada ao iogurte.

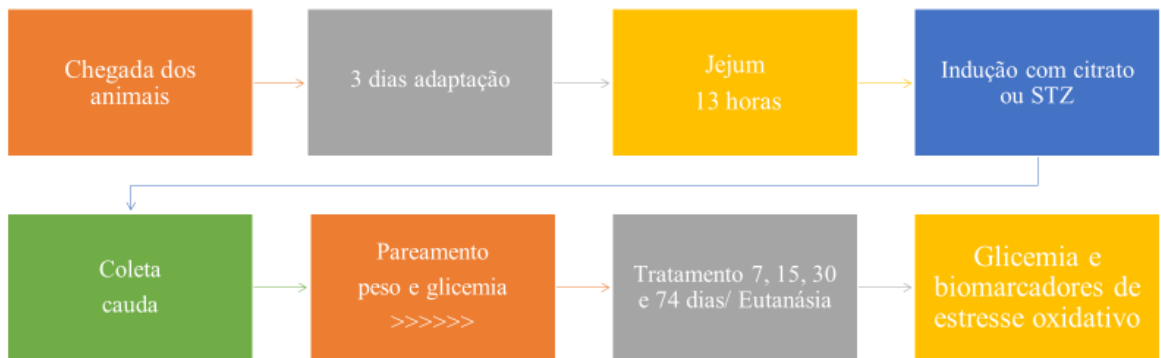
## Material e métodos

### Animais

- Ratos Wistar machos ( $150 \pm 10$  g)
- Biotério Central do Câmpus de Botucatu-UNESP
- Os animais permaneceram no Biotério Setorial do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara-UNESP
- Sala climatizada (23°C) e ciclo claro/escuro de 12 horas
- Ração e água *ad libitum*
- CEUA/FCF/CAr nº 26/2015



## Material e métodos



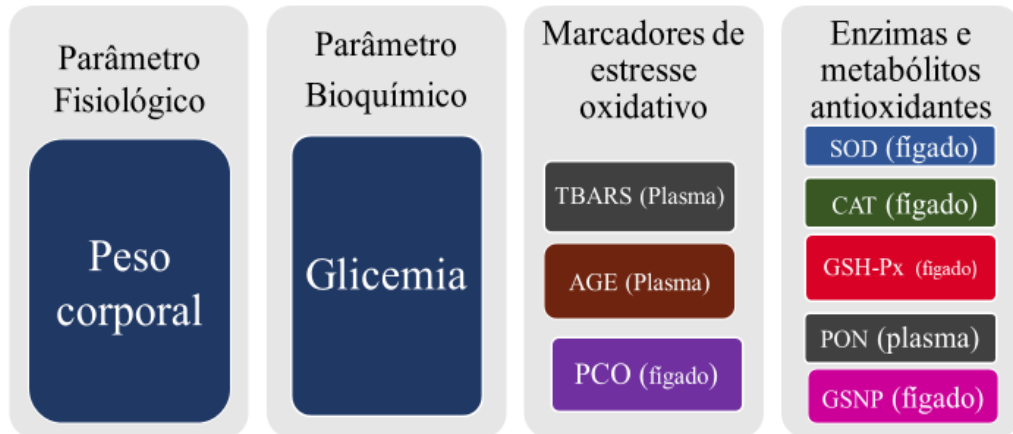
## Material e métodos

### Grupos

- Normal, não diabético, tratado com iogurte (NIOG);
- Normal, tratado com curcumina incorporada em iogurte (90 mg/kg/dia) (NCUR);
- Diabético tratado com iogurte (DIOG);
- Diabético tratado com curcumina incorporada em iogurte (90 mg/kg) (DCUR);
- Diabético tratado com insulina (4U/dia) (DINS).



## Material e métodos

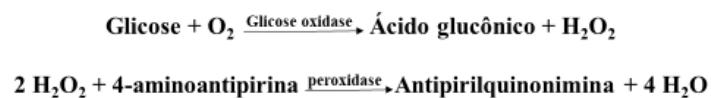


## Material e métodos

➤ **PESO CORPORAL (SEMANALMENTE)**

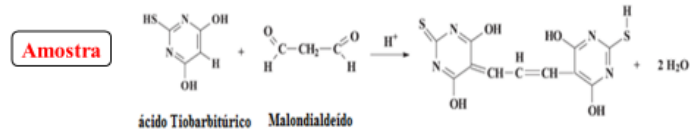
➤ **GLICEMIA, MÉTODO DA GLICOSE-OXIDASE (TRINDER, 1969)**

A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose a ácido glucônico e  $H_2O_2$ . O  $H_2O_2$  formado reage com 4-aminoantipirina, por ação catalisadora da peroxidase formando uma antipirilquinonimina (vermelha), que absorve luz em 505 nm. A intensidade de absorção é proporcional a concentração de glicose na amostra.



**BIOMARCADORES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO E  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

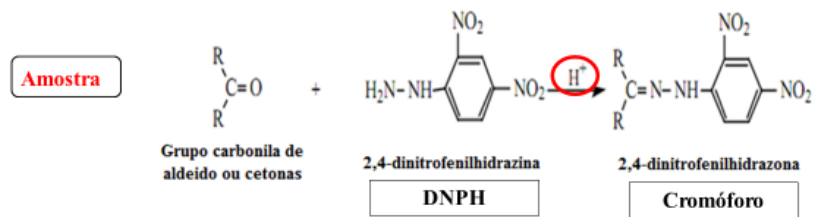
✓ **SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)**  
(Kohn; Liversedge, 1944)



- Desproteinização (Pilz *et al.*, 2000);
- Plasma
  - determinado fluorimetricamente ( $\lambda_{\text{excitação}} = 510 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{emissão}} = 553 \text{ nm}$ );
- Curva analítica com o padrão 1,1',3,3'-tetrametoxipropano para a quantificação de TBARS nas amostras, resultados foram expressos em  $\mu\text{mol/L}$  de TBARS.

**BIOMARCADORES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO E  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

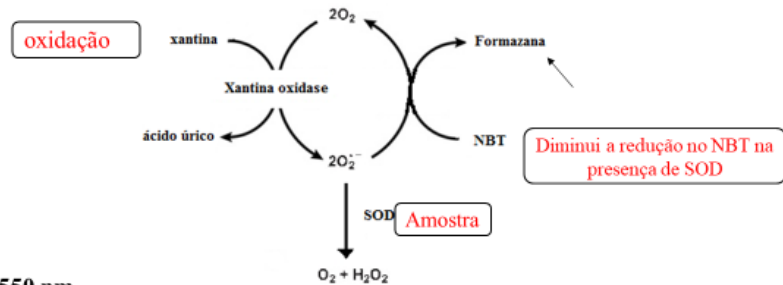
✓ **PROTEÍNAS CARBONILADAS (PCO)** (Levine *et al.*, 1994)



- $\lambda = 370 \text{ nm}$
- A concentração de PCO na amostra foi obtida utilizando  $\epsilon$  da hidrazona ( $22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )
- $\mu\text{mol}$  de PCO/mg de proteína

**BIOMARCADORES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO E  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

✓ **SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)** (Beauchamp; Fridovich, 1971)



- $\lambda = 550 \text{ nm}$
- Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína
- 1U de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução do NBT em 50%.

**BIOMARCADORES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO E  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

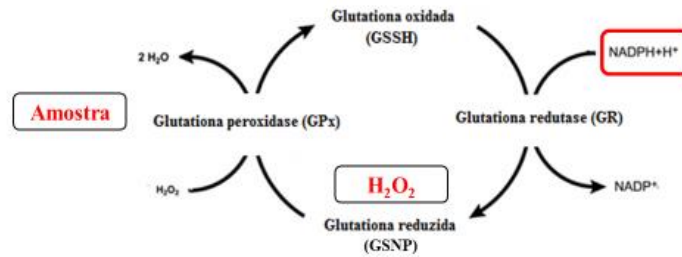
✓ **CATALASE (CAT)** (Beers; Sizer, 1952)



- $\lambda = 230 \text{ nm}$
- Os resultados foram expressos em mmol de  $H_2O_2$  consumido/min/mg de proteína

**BIOMARCADORES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO E  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

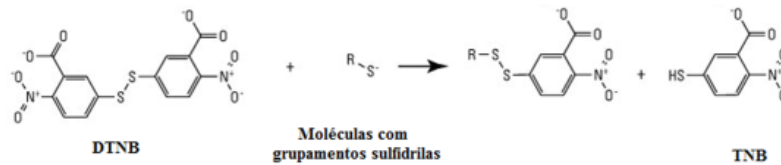
✓ **GLUTATIONA PEROXIDASE (GSH-Px)** (Rush; Scandiford, 2003).



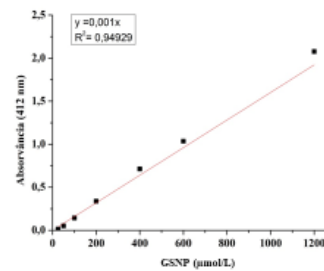
- A oxidação do NADPH é monitorada pela diminuição da absorbância
- $\lambda = 340 \text{ nm}$
- Os resultados foram expressos em mmol de NADPH consumido/min/mg de proteína.

**BIOMARCADORES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO E  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

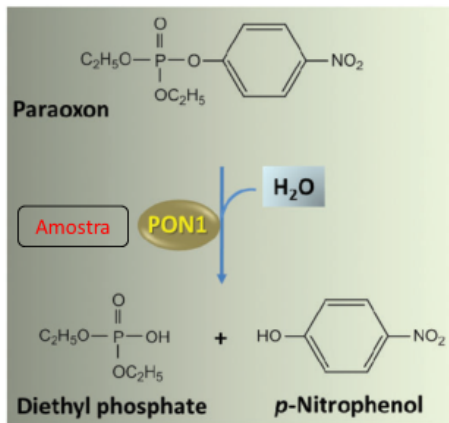
✓ **GLUTATIONA REDUZIDA (GSNP)** (Sedlak; Lindsay, 1968)



- $\lambda = 412 \text{ nm}$
- mmol de GSNP/g tecido



**BIOMARCADORES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO E  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

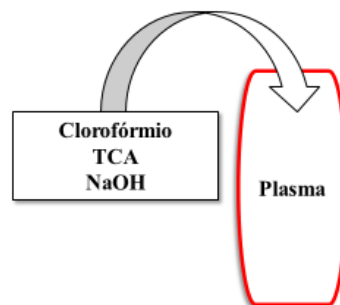


✓ **PARAOXONASE 1 (PON1)** (Costa *et al.*, 1990)

- Atividade da PON1 foi medida pela hidrólise do paraxon e liberação de *p*-nitrofenol que absorve luz em 405 nm;
- Os resultados foram calculados assumindo o coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenol ( $18.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (Richter *et al.*, 2008);
- A atividade de PON1 foi expressa em unidades/litro (unidade =  $\mu\text{mol}$  paraxon hidrolisado/min).

**BIOMARCADORES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO E  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

- ✓ **PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA** (Münch *et al.*, 1997; Zilin *et al.*, 2001; Pennacchi *et al.*, 2015)



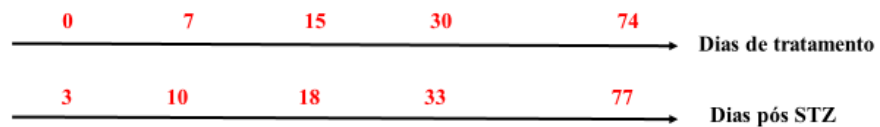
"Essas proteínas são conhecidas por serem melhores solúveis em um meio alcalino".

- **Quantificação AGE totais: fluorescência** ( $\lambda_{\text{exc}}$  370 nm;  $\lambda_{\text{em}}$  440 nm) . Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias corrigidas por proteína (UA/mg proteína).

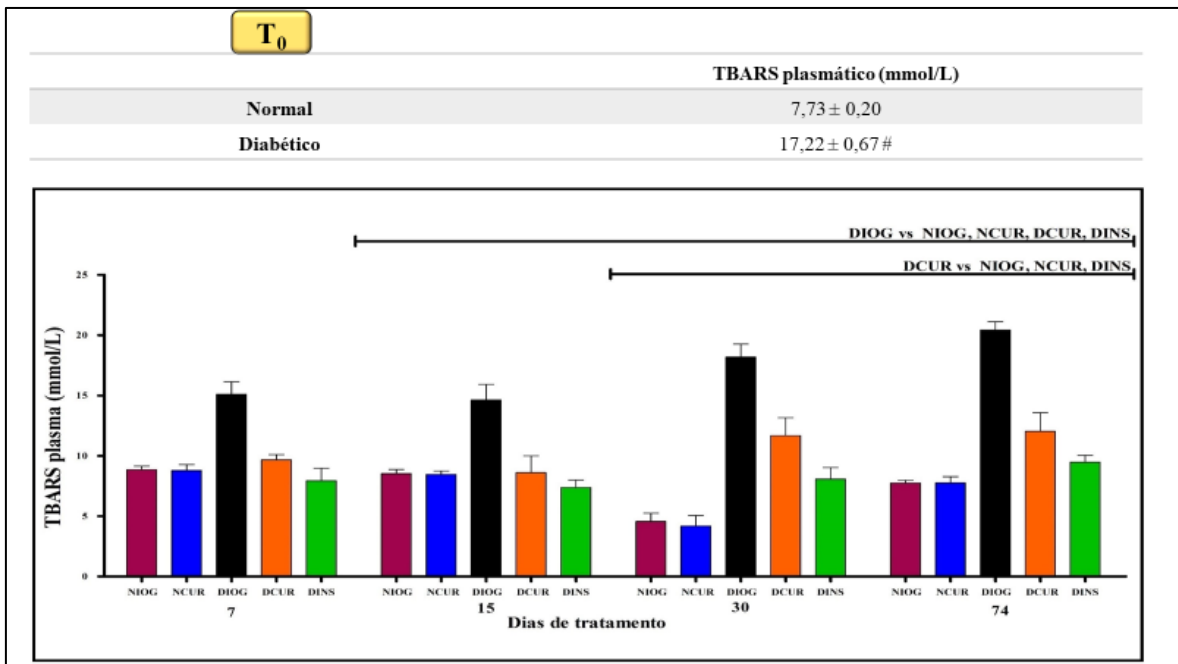
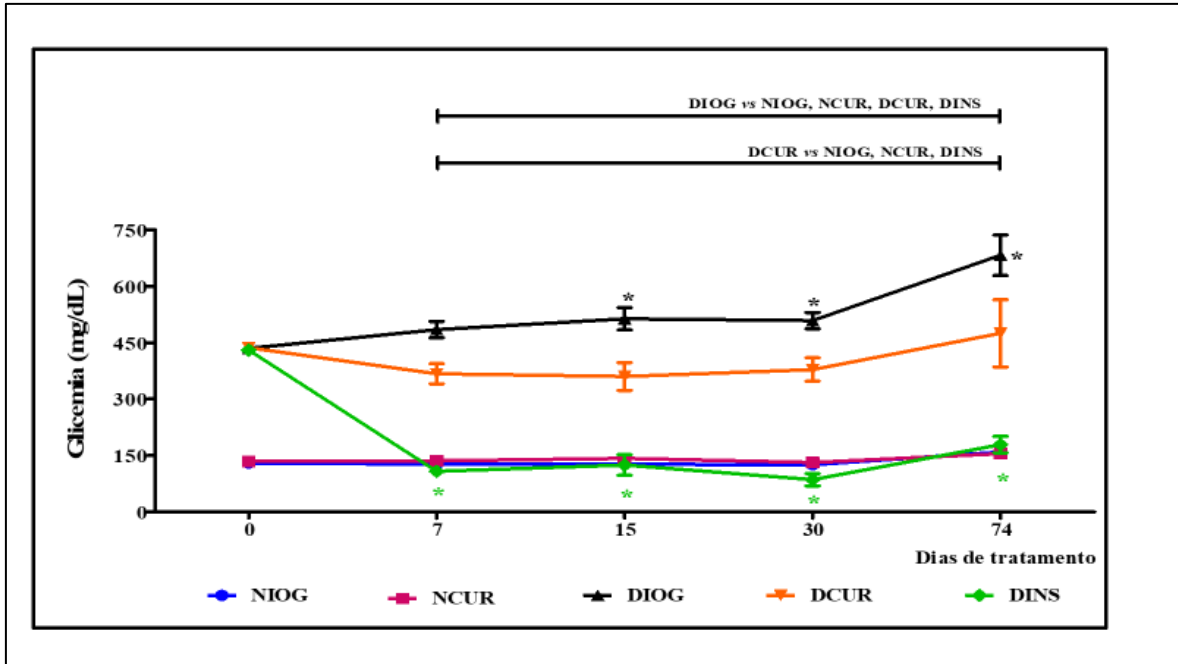
## Análise estatística

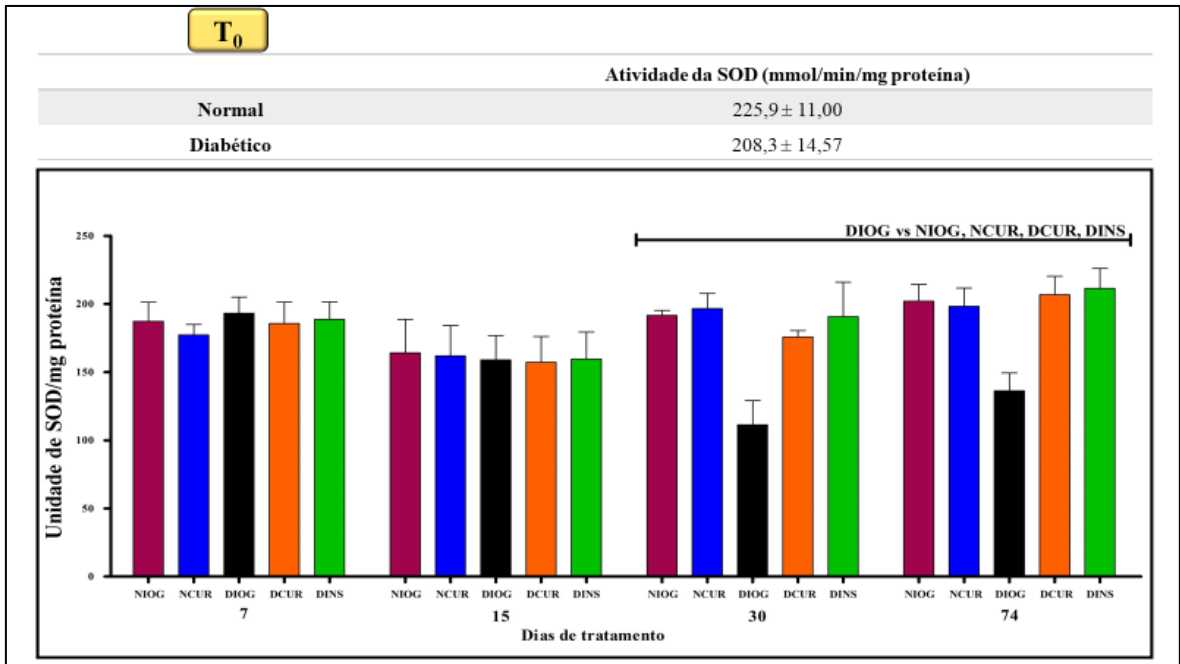
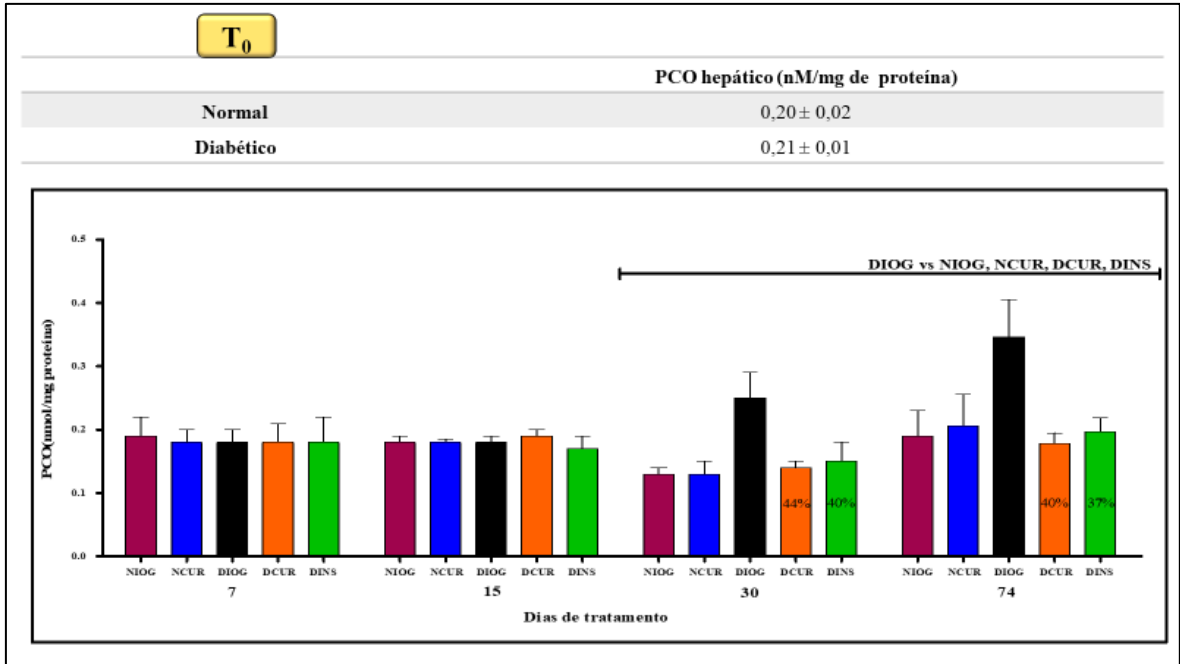
- Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM);
- Análise de variância One-way (ANOVA) seguida pelo Student-Newman-Keuls, para comparações inter-grupos temporais de parâmetros bioquímicos, e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e atividade antioxidante;
- Test t Student pareado, para as comparações intra-grupos de parâmetro fisiológico e bioquímico em relação ao dia 0;
- Foram consideradas diferenças significativas quando  $p < 0,05$ . As análises supracitadas, foram realizadas utilizando o programa GraphPad InStat® 5.0 (GraphPad Software, USA).

## Resultados



	Peso corporal		Delta peso (g)	Glicemia (mg/dL)
	Peso corporal na indução do DM (g)	Peso corporal 3 dias pós-STZ (g)		
<b>Normal</b>	130,05 $\pm$ 0,93	163,4 $\pm$ 4,54	33,33 $\pm$ 3,97	105,4 $\pm$ 2,88
<b>Diabético</b>	143 $\pm$ 3,20	163,3 $\pm$ 3,76	20,11 $\pm$ 1,65	469,0 $\pm$ 21,95 #

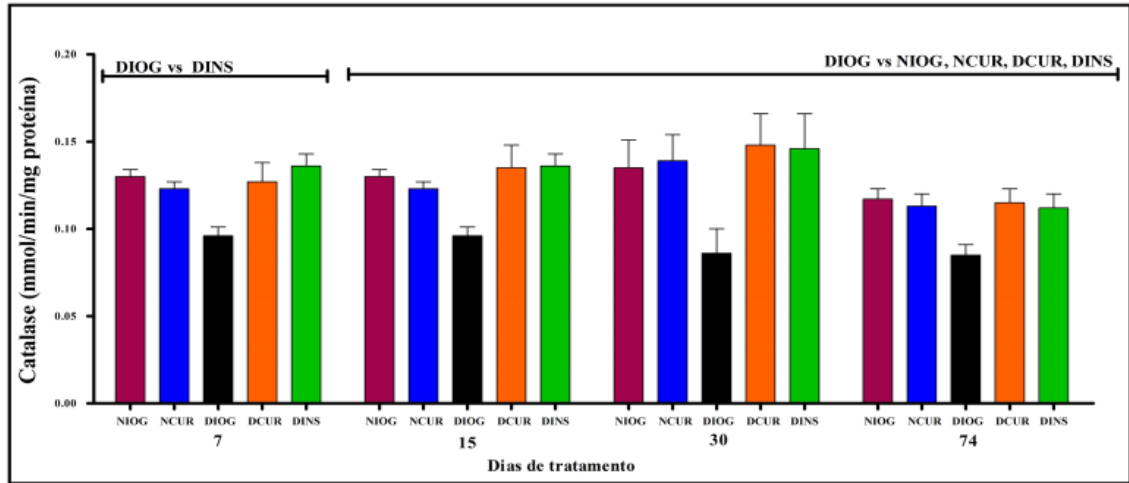




T<sub>0</sub>

Atividade da CAT (mmol/min/mg proteína)

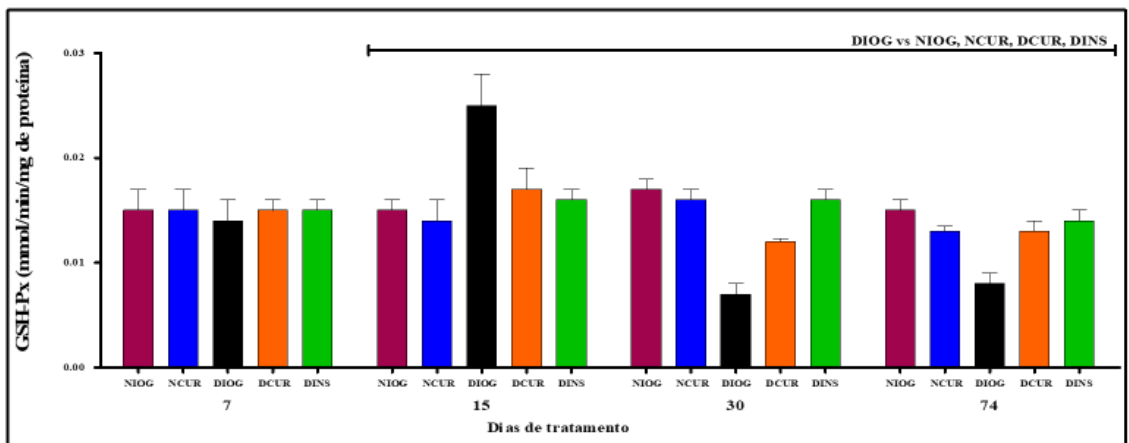
Normal	0,122 ± 0,006
Diabético	0,115 ± 0,010



T<sub>0</sub>

Atividade da GSH-Px (mmol/min/mg de proteína)

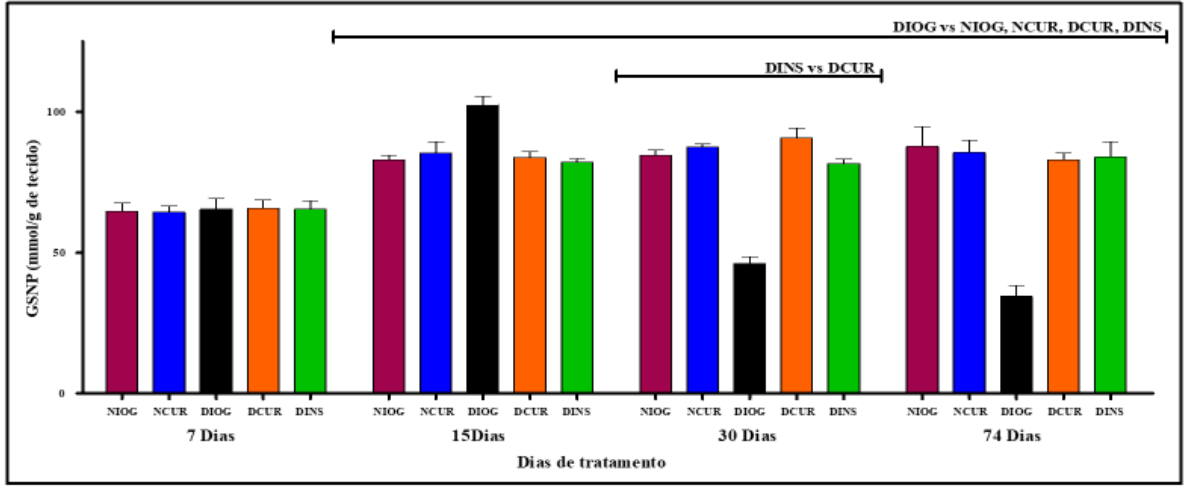
Normal	0.016 ± 0.0012
Diabético	0.013 ± 0.0009



**T<sub>0</sub>**

Concentração de GSNP (mmol/g de tecido)

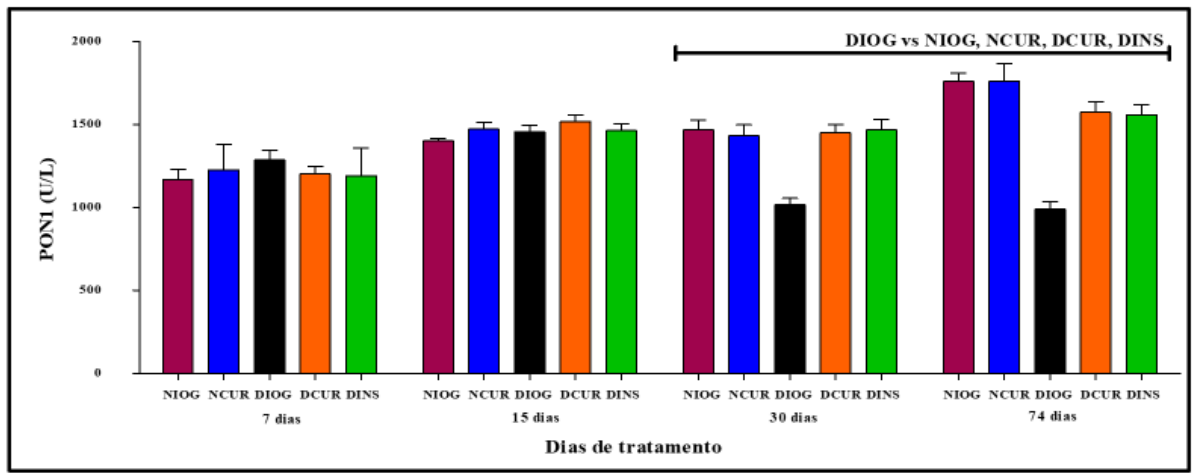
Normal	58,926 ± 2,610
Diabético	56,291 ± 0,834



**T<sub>0</sub>**

Atividade da PON1 (U/L)

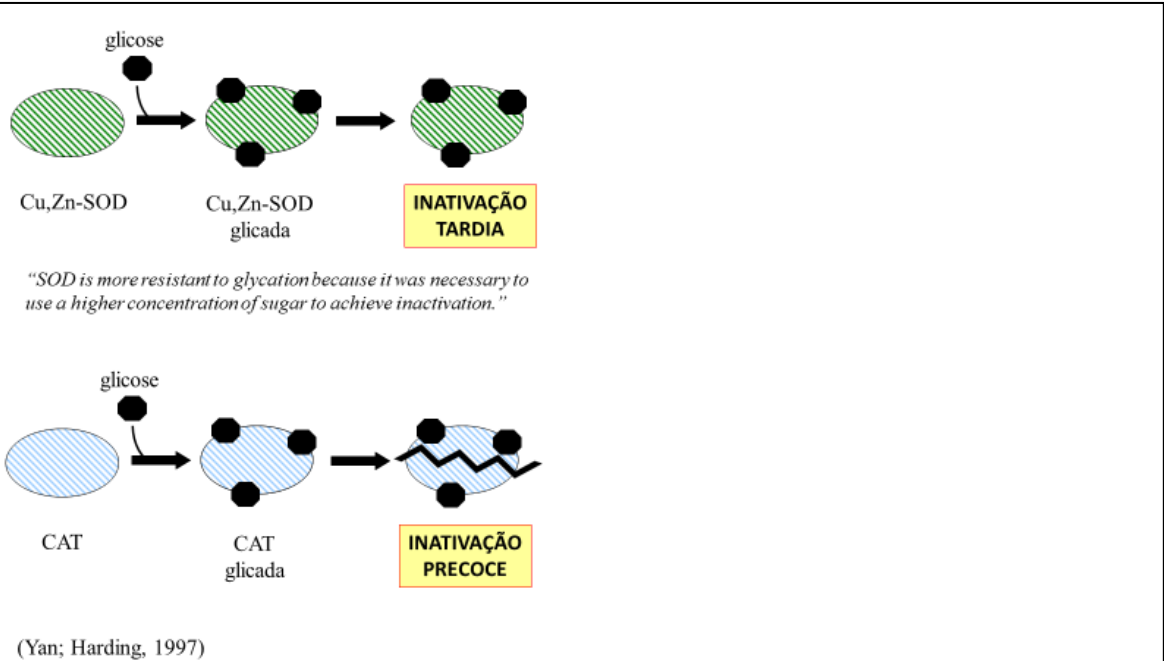
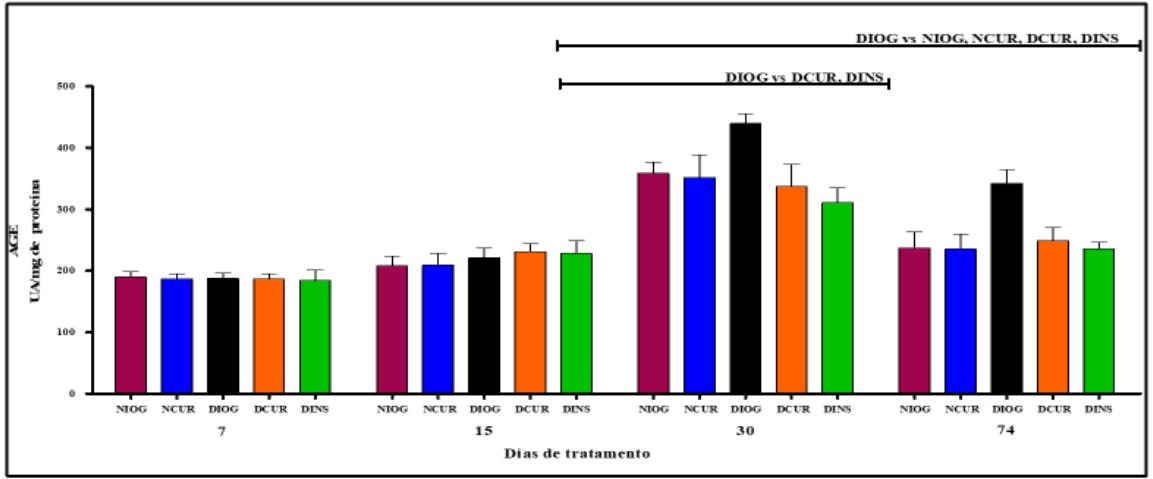
Normal	1287,78 ± 47,178
Diabético	1251,11 ± 52,736

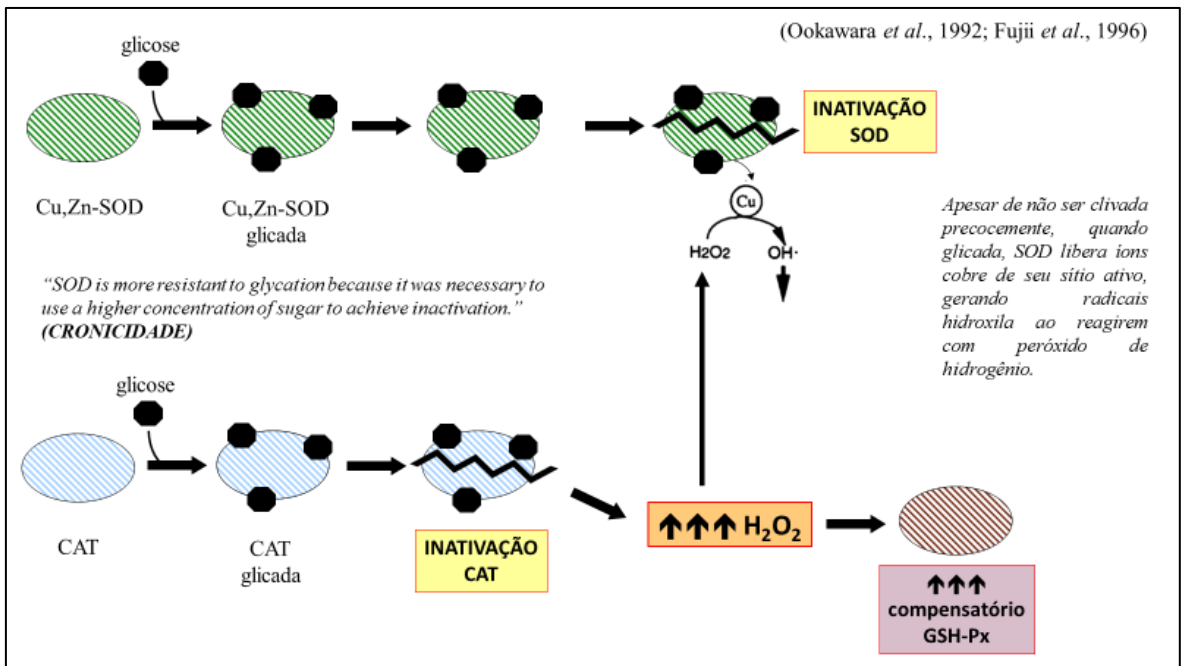
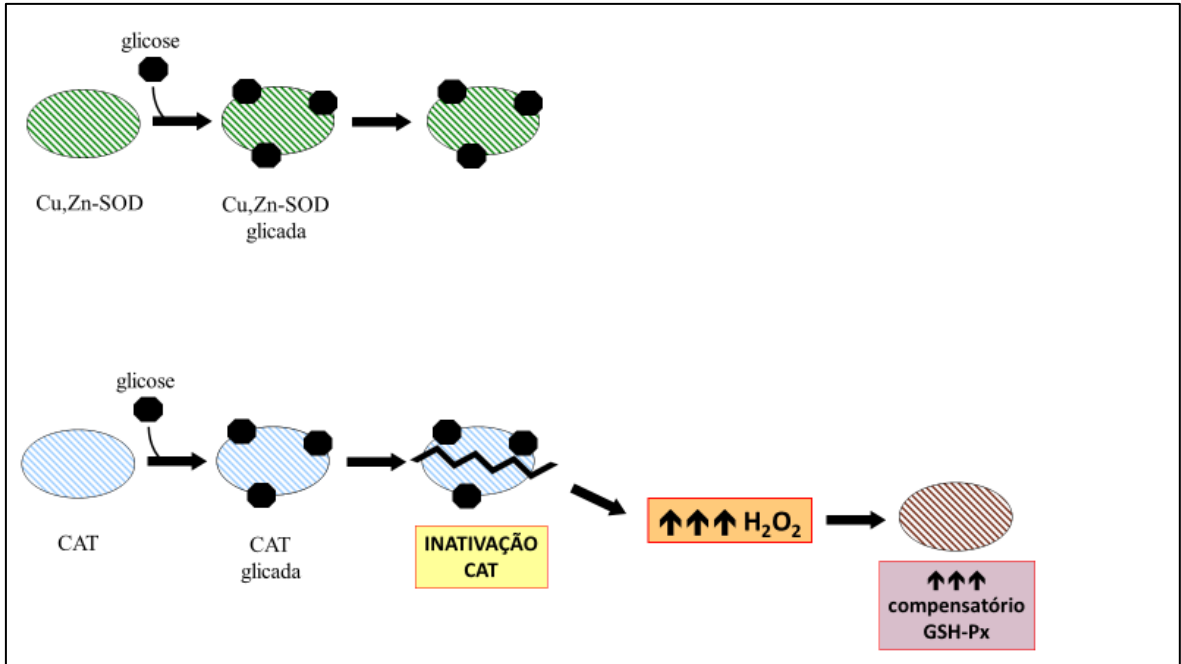


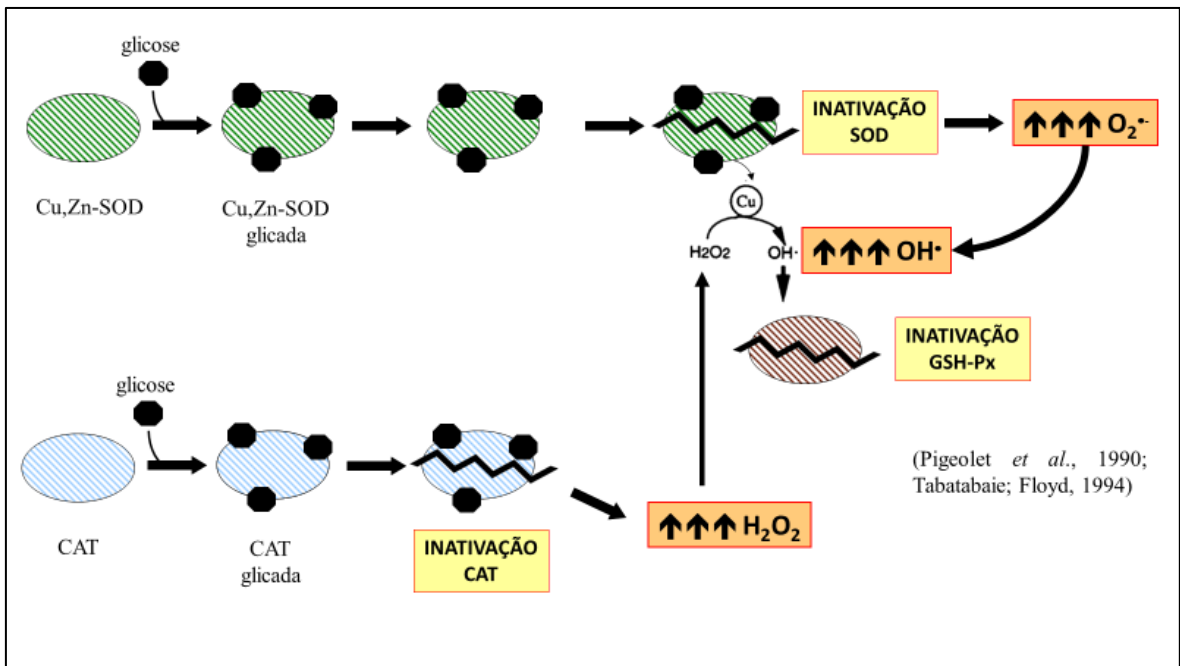
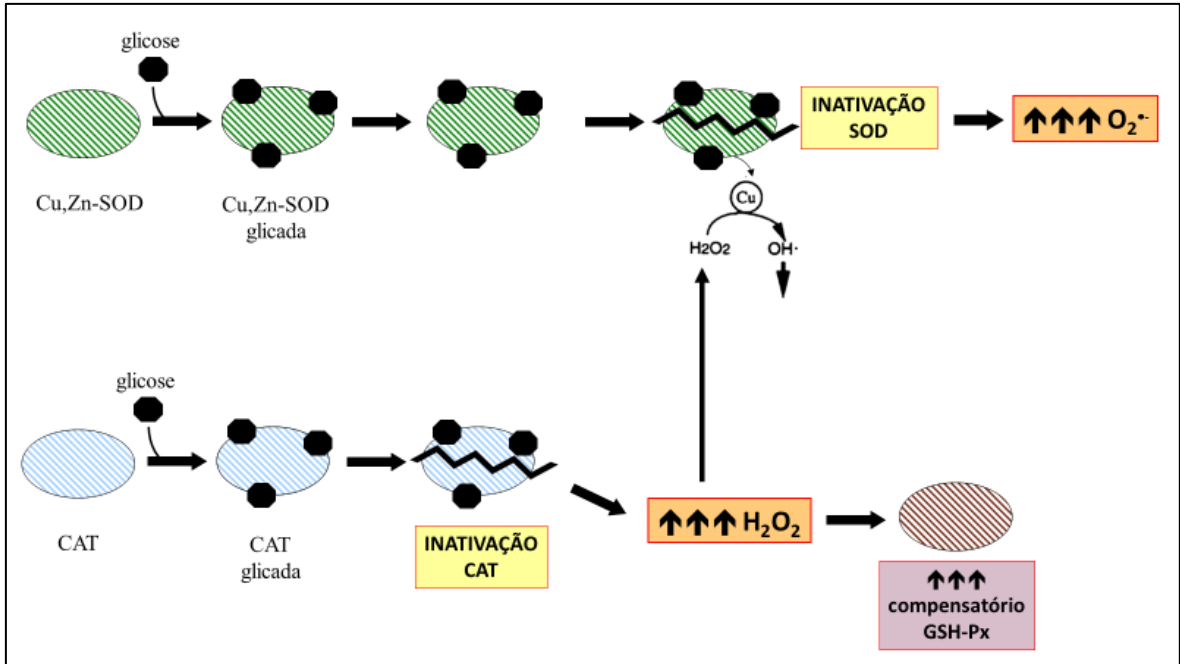
T<sub>0</sub>

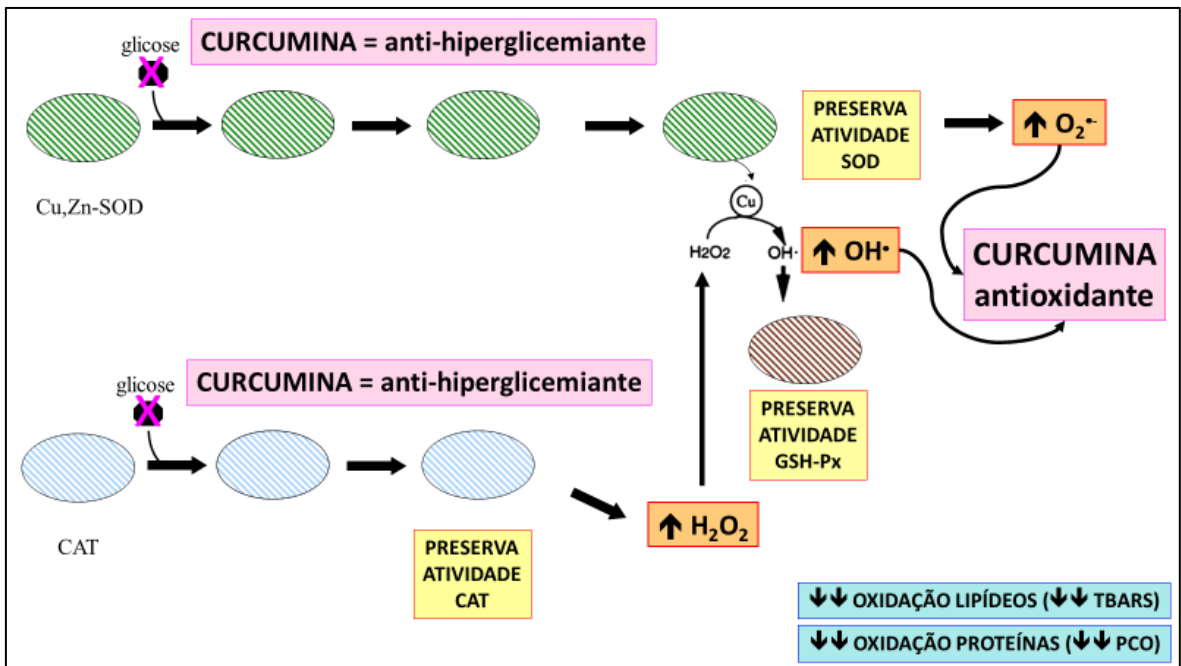
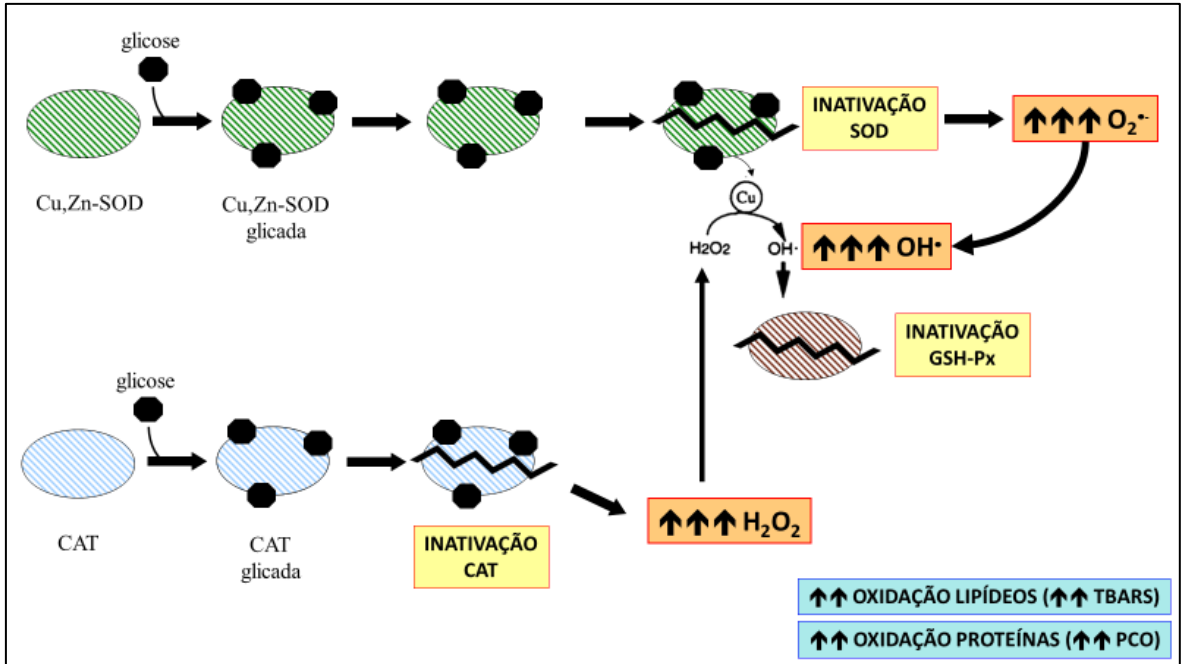
Níveis de AGE (UA/mg de proteína)

Normal	258,18 ± 34,877
Diabético	254,34 ± 41,446









## Conclusões

- Nossos achados sobre o aumento na atividade das enzimas antioxidantes em fígado de animais diabéticos tratados com curcumina pode ser consequência dos seguintes eventos:
- (i) menor geração de espécies oxidantes devido à redução na glicemia e/ou devido ao potencial antioxidante *per se* da curcumina, protegendo assim as enzimas de modificações pós-traducionais (glicação, oxidação) que levam à perda nas suas atividades e/ou
- (ii) ativação de Nrf2 pela curcumina, culminando em maior expressão das enzimas antioxidantes.
- Nrf2 fator de transcrição nuclear que aumenta a expressão de enzimas (SOD, CAT, GSH-Px)

## Conclusões

Curcumina melhorou parâmetros bioquímicos e fisiológicos

- peso corporal
  - glicemia (sem causar hipoglicemia)
  - melhorou estresse oxidativo do DM
  - melhorou estresse glicativo no DM
- Futuros estudos devem ser realizados com objetivo de avançar o potencial uso da curcumina como terapia complementar aos fármacos anti-hiperglicêmico com objetivo de atenuar o desenvolvimento das complicações ao longo prazo do DM.

## *CAPÍTULO II*

## Submission Confirmation



Thank you for your submission

**Submitted to** Canadian Journal of Physiology and Pharmacology

**Manuscript ID** cjp-2018-0184

**Title** TEMPORAL CHANGES IN BIOMARKERS OF OXIDATIVE DAMAGE AND ANTIOXIDANT DEFENSES IN STREPTOZOTOCIN-DIABETIC RATS AND THE EFFECTS OF CURCUMIN

**Authors** Paula, Monalisa  
Aesis, Renata  
Arcaro, Carlos  
Lima, Tayra  
Costa, Mariana  
Baviera, Amanda  
Brunetti, Igustemy

**Date Submitted** 17-Apr-2018

[Author Dashboard](#)

**TEMPORAL CHANGES IN BIOMARKERS OF OXIDATIVE DAMAGE AND  
ANTIOXIDANT DEFENSES IN STREPTOZOTOCIN-DIABETIC RATS AND  
THE EFFECTS OF CURCUMIN**

Monalisa Freitas Paula<sup>1</sup>, Renata Pires Assis<sup>1</sup>, Carlos Alberto Arcaro<sup>1</sup>, Tayra Ferreira  
Oliveira de Lima<sup>1</sup>, Mariana de Campos da Costa<sup>1</sup>, Amanda Martins Baviera<sup>1</sup>, Iguatemy  
Lourenço Brunetti<sup>1\*</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup>São Paulo State University (UNESP), School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara,  
Department of Clinical Analysis

**\* Corresponding author**

Iguatemy Lourenço Brunetti

Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP

Rod Araraquara Jaú, km 01 - s/n, Campos Ville, 14801 360, Araraquara, São Paulo,  
Brazil

Phone: +55 16 3301 5703

Fax: +55 16 3322 0073

E-mail: brunetti@fcar.unesp.br

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the temporal changes in biomarkers of oxidative damage and antioxidants defenses in diabetic rats and the effects of the treatment with curcumin. We examined the temporal changes (3, 10, 18, 33, 77 days of diabetes) of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein carbonyl groups (PCO), non-protein sulphhydryl groups (NPSH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and paraoxonase (PON1) in plasma or liver of normal and diabetic rats treated with curcumin-enriched yoghurt. The onset of oxidative stress was evident in rats with 3 days of diabetes, with increased plasma TBARS. Decreases in antioxidant defenses initiated with 10 days of diabetes, with drop in hepatic CAT. A compensatory response occurred with 18 days of diabetes, with increases in both GSH-Px and NPSH levels. After 33 days of diabetes, decreases were observed in CAT, SOD, GSH-Px and NPSH, followed by increases in hepatic PCO. Plasma PON1 was also decreased after 33 days of diabetes. Treatment with curcumin-enriched yoghurt attenuated all disturbances related to oxidative stress in diabetic rats. Curcumin was useful as a supplementation having antioxidant potential, thus appearing as an interesting option to be studied as a complementary therapy for diabetic complications.

**Keywords:** diabetes mellitus; oxidative stress; complementary therapy; curcumin; antioxidant.

## 1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic syndrome characterized by chronic hyperglycemia resulting from a deficiency in pancreatic insulin production and/or insulin resistance in target tissues, leading to various abnormalities in carbohydrate, lipid, and protein metabolism (American Diabetes Association 2009). Prolonged exposure to high glucose levels participates in the onset of microvascular and macrovascular complications of DM. Two reviews by Brownlee elegantly explain the bulk of changes related to hyperglycemia during its tissue-damaging effects: increased glucose flux through the polyol pathway, increased generation of advanced glycation end-products (AGE), increased expression of the receptor for AGE (RAGE), activation of isoforms of protein kinase C (PKC), and increased activity of the hexosamine pathway are the main mechanisms participating in the onset of the diabetic complications due to long-term high glucose exposure (Giacco and Brownlee 2010). All these mechanisms are closely related to a unified process accelerated by hyperglycemia: the overproduction of reactive oxygen species (ROS), mainly superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) by mitochondria. Increases of superoxide and other ROS activate PARP (poly (ADP-ribose) polymerase), which inhibits GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) via post-translational (polymers of ADP-ribose) modifications, so activating the mechanisms described above (Brownlee 2005).

Oxidative stress is implicated in the pathogenesis and the onset of the diabetic complications, and is often described as “a disturbance in the prooxidant-antioxidant balance in favor of the former” (Sies 1985), or according its updated definition, “an imbalance between oxidants and antioxidants in favor of the oxidants, leading to a disruption of redox signaling and control and/or molecular damage” (Sies and Jones

2007). In time, it is important to mention that Professor Helmut Sies timely revisits the definition of “oxidative stress”. Recently, it was published a review gathering possible classifications of “subforms of oxidative stress”, in view of a great variety of prooxidant and antioxidant enzymes and compounds, presenting intensity scales, ranging from physiological oxidative stress (eustress) to excessive, toxic oxidative stress (distress) (Sies et al. 2017).

Given the bulk of evidences of the role of oxidative stress/distress in the pathogenesis of both type 1 (Liu et al. 2016) and type 2 DM (Watson 2014) and its complications, therapeutic antioxidants arise as complementary options to current antihyperglycemic therapies, attempting to prevent or attenuate the diabetic complications. It is crescent the studies focusing on explain the importance of complementary antioxidant therapies to current antihyperglycemic drugs (Testa et al. 2017), since the comprehension of the phenomenon named “metabolic memory”, when the risk of diabetic complications persists even after maintenance of normoglycemia in individuals under intensive antihyperglycemic treatment. Changes in the composition and structure of macromolecules (including epigenetic changes), promotion of inflammatory processes and increased activation of RAGE due to oxidative stress are proposed as molecular basis for the “metabolic memory” in the course of diabetic complications (Jax 2010; Ceriello 2012). Curcumin (diferuloylmethane) is a yellow pigment isolated from the dried rhizomes of *Curcuma longa* L. (turmeric); turmeric is largely used as a dietary spice. A wide range of beneficial effects towards the metabolic disturbances associated with DM has been attributed to curcumin (Gutierrez et al. 2012; Zhang et al. 2013; Assis et al. 2017) which motivates its choice in this study.

In addition to prospect the effectiveness of antioxidant interventions in prevent or attenuate the diabetic complications related to oxidative stress/distress, to understand the onset as well as the progression of the changes related to oxidative stress/distress in DM may be helpful to delineate more specific interventions against the broad changes in oxidant/antioxidant status that can occur in the course of diabetes. Most studies attempting to understand the role of oxidative stress in diabetic complications as well as the investigation of the effectiveness of antioxidant interventions against diabetic disturbances often perform long-term, chronic experiments. Studies focusing the temporal changes in biomarkers of oxidative damage and antioxidant defenses in the progression of diabetes are still sparse (Majithiya and Balaraman 2005; Huang et al. 2012; Knaś et al. 2016).

The aim of this study was to evaluate the temporal changes in biomarkers of oxidative damage and antioxidants defenses in plasma and liver of rats submitted to an experimental model of type 1 DM (induced by streptozotocin). The effects of the treatment with curcumin-enriched yoghurt were also investigated.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Animals*

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing  $150 \pm 10$  g were housed in polypropylene boxes, under controlled conditions of temperature ( $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) and humidity ( $55\% \pm 5\%$ ) with a 12 h light/dark cycle. Rats received water and lab chow diet (Presence, Paulínia, São Paulo, Brazil) *ad libitum* throughout the experimental period. The experimental procedures were approved by the Committee for Ethics in

Animal Experimentation from the School of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara, SP (CEUA/FCF/CAR resolution number 26/2015), which followed the animal ethics guidelines of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Eighth Edition, 2011, published by The National Academies Press).

### *2.2. Induction of experimental diabetes mellitus*

After an acclimation period, experimental type 1 diabetes mellitus (T1DM) was induced by a single intravenous injection of 40 mg/kg streptozotocin (STZ, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolved in 0.01 M citrate buffer (pH 4.5), in previously 12 h fasted rats. Normal rats received only citrate buffer. For this procedure, all animals were anesthetized with isoflurane (Isoforine, Cristália, Itapira, São Paulo, Brazil).

Three days after STZ administration, rats with post-prandial glycemia values of approximately 430 mg/dL were used as the diabetic groups. Glycemia levels were determined using the glucose oxidase method (Trinder 1969) using a commercial kit (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil). Diabetic animals were sorted into the different experimental groups using matched values of hyperglycemia and body weight.

### *2.3. Experimental design and treatment*

Diabetic rats were sorted into three groups (8 rats/group): treated with yoghurt (**DYOG**); 90 mg/kg curcumin in yoghurt (**DCUR**); 4U insulin (**DINS**). It was also performed the following groups of normal rats (8 rats/group): treated with yoghurt (**NYOG**); 90 mg/kg curcumin in yoghurt (**NCUR**). The doses of insulin and curcumin

were chosen based on previous studies from our laboratory (Gutierrez et al. 2012; Arcaro et al. 2014; Assis et al. 2017).

Extracts of *Curcuma longa* rhizomes (65% curcumin, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), were mixed with commercial plain yoghurt using a homogenizer (27,000 rpm) for 90 seconds at a controlled ambient temperature (25°C).

The treatments with yoghurt (DYOG, NYOG) or with curcumin-enriched yoghurt (NCUR, DCUR) were performed by gavage, twice a day with a half-dose, at 08:00 h and 17:00 h, for 7, 15, 30 and 74 days (10, 18, 33 and 77 days of DM, respectively). The half-dose of the curcumin was administered in 0.5 mL of yoghurt, totalizing 1.0 mL/rat/day. DINS rats received two subcutaneous injections of insulin, 2U/rat each injection, at 08:00 h and 17:00 h, during 7, 15, 30, and 74 days of treatment.

At the end of each period, rats were euthanized by decapitation and blood samples were collected with heparin (Hemofol, Itapira, São Paulo, Brazil; 5,000 UI/mL). Blood was centrifuged for 10 minutes at 2,500 rpm and the plasma obtained was separated for the biochemical determinations, such as glycemia and biomarkers of oxidative damage (malondialdehyde) and antioxidant defense (paraoxonase 1).

A piece of the liver was also removed and frozen (-80°C) for the subsequent use for the analysis of biomarker of oxidative damage (protein carbonyl groups), activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase) and non-protein sulfhydryl group levels.

## 2.4. Oxidative stress biomarkers

### 2.4.1. Lipid peroxidation (LPO)

Plasma was previously deproteinized according to Pilz et al. (2000). Malondialdehyde (MDA) is one of the diene products of LPO, which was measured using a thiobarbituric acid (TBA) reaction (Kohn and Liversedge 1944). Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels were measured fluorometrically with excitation and emission wavelengths of 510 and 553 nm, respectively; 1,1,3,3-tetramethoxypropane (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as standard. The results were expressed as  $\mu\text{mol/L}$  of TBARS.

### 2.4.2. Protein carbonyl groups

The protein carbonyl groups (PCO) were determined according to Levine et al. (1994). The carbonyl groups in proteins reacts with 2,4-dinitrophenylhydrazine (MERCK, Darmstadt, Germany) to form 2,4 dinitrophenylhydrazone, which was monitored spectrophotometrically at 370 nm. The concentration of PCO was obtained by the molar extinction coefficient of the hydrazone ( $22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Results were expressed as nmol/mg protein.

### 2.4.3. Non-protein sulphydryl (NPSH) groups

Non-protein sulphydryl groups (NPSH) represent an indirect measurement of reduced glutathione (GSH) and were determined according to Sedlak and Lindsay (1968), measuring the reduction of 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (Sigma

Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 412 nm. Results were expressed as mmol/g tissue (liver).

## *2.5. Activities of the antioxidant enzymes*

### *2.5.1. Sample preparation*

Liver was used for the determination of the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px). Liver samples (0.1 g) were homogenized in 1 mL of sodium phosphate buffer (10 mmol/L, pH 7.4) at 4°C. The homogenates were centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C and the supernatants were used for the analysis of the activities of SOD, CAT and GSH-Px.

The protein levels in the supernatants were determined according to Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as standard.

### *2.5.2. SOD activity*

SOD activity was evaluated according to Beauchamp and Fridovich (1971). The oxidation of xanthine generates superoxide radical anion by the catalytic action of xanthine oxidase, which reduces nitroblue tetrazolium chloride (NBT) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) to a formazan product. In the presence the SOD, inhibition of NBT reduction occurs, which is monitored at 550 nm. The results were expressed as U/mg protein. One unit of SOD is defined as the enzyme amount required to inhibit the rate of NBT reduction by 50%.

### 2.5.3. *CAT activity*

CAT activity was measured by monitoring the disappearance of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (MERCK, Darmstadt, Germany) at 230 nm (Beers and Sizer 1952). The results were expressed as mmol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumed/min/mg protein.

### 2.5.4. *GSH-Px activity*

GSH-Px activity was evaluated according to Rush and Sandiford (2003). GSH-Px catalyzes the oxidation of GSH in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In the presence of glutathione reductase (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), the oxidized glutathione is reduced to GSH with concomitant oxidation of NADPH (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) to NADP<sup>+</sup>. NADPH disappearance was monitored at 340 nm. The results were expressed as mmol of NADPH consumed/min/mg protein.

### 2.5.5. *PON1 Activity*

Paraoxonase 1 (PON1) activity was determined according to Costa et al. (1990), with modifications according to Assis et al. (2017). Plasma PON1 activity was measured by the hydrolysis of paraoxon (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and release of *p*-nitrophenol, monitored at 405 nm. The PON1 activity was expressed in units/liter, where unit = μmol paraoxon hydrolyzed/min.

## 2.6. *Statistical analysis*

Data are expressed as mean ± standard error of mean (SEM). Statistical analysis was performed using One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-NewmanKeuls test to compare the temporal inter-group differences in body weight and

in biochemical and oxidative stress biomarkers. Paired Student's t test was used to compare the intra-group changes in the parameters relative to day 0. Data were considered statistically different at  $p < 0.05$ . Statistical analyses were performed using the program Graphpad InStat 3.05 (GraphPad Software, USA).

### **3. Results**

#### *3.1. Characterization of the experimental model of type 1 diabetes mellitus (T1DM)*

Except for groups having normal rats (NYOG and NCUR groups), all other groups were composed of diabetic rats (DYOG, DCUR, DINS groups); the experiments were started with diabetic rats 3 days after the administration of STZ. For this reason, in order to assess if 3 days of DM is sufficient to cause oxidative stress/distress, changes in biomarkers of oxidative damage and antioxidant defenses were monitored in normal and STZ-diabetic rats, without any treatment, i.e., yoghurt, curcumin-enriched yoghurt or insulin (Table 1); then, in this study, 3 days of DM is referred as “day 0”.

Glycemia of NYOG and NCUR rats remained within normal values over the course of the experiment (Figure 1), and similar to the values of normal rats at day 0 (Table 1). The induction of DM in rats was shown to be effective, since all rats with diabetes (3 days after STZ administration) showed glycemia levels about 4-fold higher than the values of normal rats (Table 1). Regardless of the experimental period, DYOG rats showed a progressive increase in glycemia levels, evidencing the worsening of the DM, mainly after 15 days of treatment (18 days after STZ administration) (Figure 1). As expected, DINS rats had a significant reduction of glycemia from the 7<sup>th</sup> day of treatment onwards, reaching values near to normoglycemia (Figure 1). Diabetic rats

treated with curcumin-enriched yoghurt (DCUR) showed a decrease in glycemia levels from the 7<sup>th</sup> day of treatment in comparison with DYOG rats, which was maintained throughout the treatment (Figure 1). This beneficial effect of curcumin-enriched yoghurt on glycemia of STZ-diabetic rats is in agreement with previous findings of our laboratory (Gutierrez et al. 2012; Arcaro et al. 2014; Assis et al. 2017).

Normal rats had body weight values lower than diabetic rats on the day of DM induction; however, 3 days after STZ administration, diabetic rats presented values of body weight similar those of normal rats (Table 1). It can be explained by the lower body weight gain of diabetic rats in comparison with normal rats (Table 1), which is typical for the catabolic state caused by the insulin deficiency. Among all groups having diabetic rats, DYOG group had the lowest body weight gain, mainly after the 15<sup>th</sup> day of treatment (Figure 2). Diabetic rats treated with insulin (DINS) showed an evident body weight gain, when compared with DYOG and DCUR rats, reaching body weight values similar those of NYOG and NCUR rats. Diabetic rats treated with curcumin-enriched yoghurt (DCUR) showed significant and progressive body weight gain in comparison with DYOG rats (Figure 2). NCUR rats showed values of body weight similar those of NYOG rats (Figure 2).

### *3.2. Temporal changes in biomarkers of oxidative damage*

The onset of oxidative stress/distress in diabetic rats was evident 3 days after the STZ administration (day 0), since diabetic rats showed a significant increase in plasma levels of TBARS when compared with values of normal rats (Table 1). This finding indicates that lipoperoxidation in DM is one of the earliest change related to oxidative stress/distress observed in this experimental model of T1DM, at least in

plasma. At this same period of diabetes, the hepatic levels of carbonyl protein groups (PCO) and other parameters in liver (see 3.3.) were unchanged in diabetic rats (Table 1).

After the beginning of the treatments, TBARS levels remained higher in plasma of DYOg rats, from the 7<sup>th</sup> to the 74<sup>th</sup> day of experiment, compared with all other groups (Figure 3A); it must be emphasized that TBARS levels were significantly increased in DYOg rats until 74 days of treatment in comparison with day 0, suggesting a worsening in lipoperoxidation, in parallel with hyperglycemia.

Although the TBARS levels were increased with 3 days of DM, increases in PCO in DYOg rats were noted only after 30 days of experiment (i.e., 33 days of DM), indicating a slow rate of protein oxidation in liver (Figure 3B). Taken together, the increase in hepatic PCO levels after 33 days of DM, and the increase in plasma TBARS levels after 3 days of DM confirm the installation of oxidative stress/distress in STZ-diabetic rats. All the changes related to increased oxidative damage in lipids and proteins of STZ-diabetic rats, in all periods studied, were corrected with insulin treatment (DINS group), demonstrating the effectiveness of the insulin therapy in prevent the establishment of oxidative stress/distress in diabetic rats (Figures 3A and B).

Normal rats treated with yoghurt (NYOG) or with curcumin-enriched yoghurt (NCUR) had no changes in plasma TBARS (Figure 3A) or in hepatic PCO levels (Figure 3B), since day 0 and throughout the treatments.

During all the experimental period, diabetic rats treated with curcumin-enriched yoghurt (DCUR) showed decreases in plasma TBARS, whose levels were minor than values found in diabetic rats at day 0 (Table 1), and reached values similar those of

NYOG and NCUR rats (Figure 3A). Treatment with curcumin-enriched yoghurt also decreased the hepatic levels of PCO, from the 30<sup>th</sup> day of treatment (Figure 3B). The decreases in both TBARS and PCO reiterate the *in vivo* antioxidant potential of curcumin in STZ-diabetic rats, as previously observed in our laboratory (Arcaro et al. 2014; Assis et al. 2017). In addition, it is important to mention that PCO levels were maintained low in liver of DCUR and DINS rats, during all periods studied, allowing us to suggest that (i) a better glycemia management due to the treatments (insulin, curcumin-enriched yoghurt), and (ii) the antioxidant potential of curcumin *per se*, both are important to prevent or attenuate the oxidation of proteins in liver.

### *3.3. Temporal changes in biomarkers of antioxidant defenses*

Three days after STZ administration (day 0), diabetic rats had no changes in the activities of the antioxidant enzymes SOD, CAT and GSH-Px in liver, as well as in hepatic NPSH levels and in PON1 activity in plasma, when compared with normal rats (Table 1).

In addition to the increases in biomarkers of oxidative damages, the establishment of oxidative stress/distress is also related to losses in antioxidant defenses. Regarding this aspect, it can be noted that the first antioxidant enzyme to show a drop in its activity in STZ-diabetic rats was CAT: the activity of CAT was decreased in liver of DYOG rats after 7 days of experiment (10 days of DM), when compared with day 0 (Table 1), and this decrease was maintained until the end of treatment (Figure 4A), whereas the activity of SOD was declined only after 30 days of experiment (33 days of DM) (Figure 4B).

It is interesting to note that a biphasic pattern occurred in the glutathione antioxidant system in liver of STZ-diabetic rats. After 15 days of experiment (18 days of DM), DYOG rats had an increase in both the GSH-Px activity (Figure 5A) and the NPSH levels (Figure 5B), when compared with NYOG rats, which can be interpreted as a compensatory response of the antioxidant defenses due to the establishment oxidative stress in diabetes. However, after 30 days of experiment (33 days of DM), decreases were observed in the activity of GSH-Px (Figure 5A) and in the NPSH levels (Figure 5B), which is a behavior similar to other antioxidant enzymes (SOD, CAT) at this same period.

It is interesting to note that, after this decrease in the antioxidant defenses in liver of DYOG rats after 30 days of experiment, in parallel occurred the increase in PCO levels (Figure 3B).

Corroborating the profile of decreases in the antioxidant defenses observed in liver of STZ-diabetic rats after 30 days of experiment, decreases in the activity of PON1 were also observed from the 30<sup>th</sup> day of experiment (Figure 6).

The drops in the activities of antioxidant enzymes in liver and plasma as well as in NPSH levels in DYOG rats from the 30<sup>th</sup> of experiment were maintained until 74 days of experiment (77 days of DM) (Figures 4, 5 and 6).

Treatment of STZ-diabetic rats with insulin (DINS) or with curcumin-enriched yoghurt (DCUR) increased the activities of SOD (Figure 4B), GSH-Px (Figure 5A) and PON1 (Figure 6) as well as increased the NPSH levels (Figure 5B), from the 30<sup>th</sup> day of the treatment onward. Similarly, these treatments prevented the decrease in the CAT activity in liver of diabetic rats, from the 7<sup>th</sup> days of treatment (Figure 4A).

#### 4. Discussion

The findings of the present study have two important contributions regarding the understanding of the changes in biomarkers of oxidative stress in STZ-diabetic rats. First, the changes in biomarkers of oxidative damage and antioxidant defenses are dependent on the progression of diabetes: the increase in lipid oxidative biomarker (TBARS) appears earlier in STZ-diabetic rats (3 days of diabetes), as well as the drop in the activity of the CAT in liver (10 days of DM); other changes observed in STZ-diabetic rats (increase in PCO levels, decreases in SOD and GSH-Px activities, decrease in NPSH levels) depend on the progression of insulin deficiency/hyperglycemia state (33 and 77 days of DM). Second, regardless the period of the changes in biomarkers of oxidative stress (increases in markers of oxidative damage, decreases in antioxidant defenses), the oral treatment with curcumin-enriched yoghurt was able to attenuate the establishment of oxidative stress in STZ-diabetic rats, in magnitude comparable to the benefit promoted by the insulin treatment.

According to Cubero and Trautwein (2011), oxidative stress can cause injury and destruction of hepatocytes related to damages of several cellular components, mainly proteins, via nitrosylation, glutathionation, formation of disulfide bridges, among others mechanisms. Recently, review of Bilal et al. (2016) brings evidence on the diversity of biochemical and morphological changes occurring in liver of animals submitted to experimental T1DM induced by diabetogenic drugs, such as streptozotocin or alloxan. Among the several damages observed in experimental T1DM, it can be highlighted steatosis, steatohepatitis, and liver fibrosis. The authors also reiterate that the extent of the morphological changes and the ultra-structural lacerations are closely related to the

chronicity of diabetes. Finally, the review also highlights that, among the mechanisms causing pathophysiological variations in liver of T1DM animals, oxidative stress plays a crucial role.

Previous studies have also monitored the temporal changes in biomarkers of oxidative or nitrosative damages in various tissues with the progression of diabetes. Huang et al. (2012) observed that both the  $O_2^{\cdot-}$  production and the nitrosative changes in endothelial nitric oxide synthase were progressively increased in arteries of *db/db* mice, when these changes were monitored during 6 weeks, 3 and 9 months of diabetes; this progressive worsening in biomarkers of oxidative/nitrosative stress was closely related with aggravation of endothelial dysfunction. Monitoring the temporal changes (one and two weeks of DM) in biomarkers of oxidative stress in salivary glands of STZ-diabetic rats, Knaś et al. (2016) observed that some oxidative damage biomarkers increased in the 1st week of diabetes, such as 4-hydroxynonenal, whereas 8-isoprostanes, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and oxidized-LDL/MDA were increased in salivary glands only after 2 weeks of diabetes; authors concluded that the oxidative damage in the course of diabetes caused dysfunction of salivary glands. In comparison with these cited studies, the one main contribution of our present study is the early detection of changes in a biomarker of oxidative damage due to diabetes. TBARS, which reflects increases in lipid oxidative injury, was the biomarker earlier related with the onset of oxidative stress in STZ-diabetic rats: with only 3 days of diabetes, TBARS levels were significantly higher in plasma of DYOG animals (Figure 3A), when compared with NYOG. In liver, the onset of oxidative stress was noted after 10 days of diabetes, with a significant decrease in the activity of CAT (Figure 4A), worsening after 33 days of diabetes, with increases in PCO (Figure

3B) and decreases in the activities of SOD and GSH-Px (Figures 4B and 5A, respectively), and decreases in the NPSH levels (Figure 5B).

Another interesting finding of this study was the biphasic pattern in markers of glutathione antioxidant system in liver of STZ-diabetic rats: there was a significant increase in both NPSH levels (Figure 5B) and GSH-Px activity (Figure 5A) in liver of DYOG rats with 18 days of DM, followed by reductions after 33 and 77 days of DM. The behavior of antioxidant enzymes SOD, CAT and GSH-Px under conditions of oxidative stress are often controversial. It can be suggested that this increase in components of the glutathione system in DYOG rats was a compensatory response of the antioxidant defenses due to the following combination: (i) increased ROS generation due to hyperglycemia; (ii) early drop in the CAT activity. This compensatory response in the glutathione antioxidant system seems to be effective, at least in this period, since the levels of hepatic PCO, a marker of oxidative damage in proteins, were low and similar between DYOG and NYOG animals (Figure 3B), in the 15<sup>th</sup> day of experiment (18 days of DM). Compensatory responses causing increases in the activity of antioxidant systems against the raise in reactive species and/or due to loss of antioxidant defenses are commonly observed (Lei et al. 2016). In DM, there is evidence of increases in the activity and/or expression of GSH-Px in association with various DM complications; it has been suggested that this increase is a mechanism to prevent even greater tissue damages (Bolajoko et al. 2008; Korkmaz-Icöz et al. 2015).

However, after 30 days of experiment (33 days of DM), the increased antioxidant compensatory response of the glutathione system was lost, since reductions were observed in both NPSH levels (Figure 5B) and GSH-Px activity (Figure 5A) in liver of STZ-diabetic rats, which were accompanied by increases in PCO levels (Figure

3B), suggesting that the hyperglycemia maintenance in DM prevailed over the compensatory mechanisms increasing antioxidant responses. Regarding the decrease in the NPSH levels in DM, the polyol pathway plays a significant role: the raise in the intracellular glucose levels (due to hyperglycemia) leads to an increased flow through the polyol pathway, where aldose reductase reduces glucose to sorbitol, oxidizing NADPH (coenzyme nicotinamide adenine dinucleotide phosphate); the increased NADPH oxidation leads to losses in the glutathione regeneration in its reduced form (GSH), favoring the raise of ROS (Brownlee 2005). In relation to the decrease in the GSH-Px activity, it has been observed that this enzyme is inactivated by hydroperoxides, including t-butyl hydroperoxide (Pigeolet et al. 1990), which aggravates the oxidative stress, as observed by the progressive increase in hepatic PCO. It has been also found that decreases in the activities of antioxidant enzymes in diabetic rats are related to decreases in mRNA expression and/or protein synthesis of these enzymes (Sadi et al. 2014).

The enzymes SOD and CAT did not present a compensatory response due to the establishment of oxidative stress in STZ-diabetic rats. In liver of STZ-diabetic rats, CAT activity dropped down before SOD; CAT activity was decreased after 10 days of DM (Figure 4A), whereas SOD activity was decreased after 33 days of DM (Figure 4B). Corroborating our findings, Majithiya and Balaraman (2005) also observed that CAT activities in aorta, kidney, and liver were significantly reduced in early stages of diabetes, in comparison with the activities of SOD, which were unchanged.

The early drop in the activity of CAT observed in liver of STZ-diabetic rats can be explained by the fact that CAT seems to be more vulnerable to glycation process, when compared to SOD. In a study by Yan and Harding (1997), where CAT and SOD

were incubated in the presence of different sugars (glucose, fructose, ribose, glucose-6-phosphate), it was observed that both enzymes are vulnerable to the presence of these sugars, having decreases in its activities. However, for incubations with glucose, it was noted that: (i) when CAT was incubated with **10 mM glucose**, a significant reduction in its activity was observed, mainly after 3 days, losing 65% of its activity after 6 days of incubation, when compared with CAT incubated in the absence of glucose; (ii) when SOD was incubated with **50 mM glucose**, a slow and discrete reduction in its activity was observed and, after 8 days of incubation, but approximately 80% of its activity was maintained, when compared with SOD incubated for the same period and in the absence of glucose. Therefore, it can be suggested that SOD requires both higher glucose levels and longer exposure time to this monosaccharide, to be vulnerable to the glycation process; unlike CAT, which was more sensitive to the glycation process, even under lower concentrations of glucose. Although SOD seems to be vulnerable to the effects of glycation later, evidence showing that, when glycated, SOD is inactivated and cleaved, releasing copper ions from its active site (Fujii et al. 1996). If applied to our findings with STZ-diabetic rats, this condition can lead to an increased generation of hydroxyl radical (HO<sup>•</sup>), via Fenton reaction, considering the possibility of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation due to the early loss of CAT activity after glycation. This increase in HO<sup>•</sup> generation after the inactivation of SOD may explain, at least in part, the results of the present study about the later reduction in the activity of GSH-Px (Figure 5A), and in parallel with the reduction in SOD activity (Figure 4B), in liver of rats after 33 days of diabetes; there is evidence that GSH-Px is inactivated in the presence of increased levels of HO<sup>•</sup> (Tabatabaie and Floyd 1994).

In an interesting study by Pigeolet et al. (1990), the activities of SOD, CAT and GSH-Px were assayed in the presence of various oxidants ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , cumene hydroperoxide, t-butyl hydroperoxide,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{HO}^{\cdot}$ ), in order to investigate the susceptibility of these enzymes to their own substrates. The results obtained were very interesting and support many of our findings in STZ-diabetic animals. (i) Under the conditions tested, it was noted that CAT was the only enzyme vulnerable to the deleterious effects of  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , being inactivated; the enzyme was also inactivated in the presence of  $\text{HO}^{\cdot}$ , as well as had its activity significantly reduced when incubated with cumene hydroperoxide and t-butyl hydroperoxide. If these findings are analyzed together with the rapid loss of activity when CAT was incubated in the presence of glucose (Yan and Harding 1997), as well as considering its inactivation in the presence of  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Shimizu et al. 1984), it can be then suggested that CAT is an enzyme quite susceptible to loss its activity under conditions of hyperglycemia and increased levels of oxidants, corroborating the findings of the present study, about the early drop in the CAT activity in liver of STZ-diabetic rats from the 10<sup>th</sup> day diabetes (Figure 4A). (ii) Under the conditions tested, GSH-Px was also inactivated in the presence of  $\text{HO}^{\cdot}$ , corroborating our hypothesis that GSH-Px may have its activity decreased under conditions of increased  $\text{HO}^{\cdot}$  generation. GSH-Px also had a decrease in its activity when incubated in the presence of cumene hydroperoxide and t-butyl hydroperoxide; these organic hydroperoxides are often used for the induction of lipid peroxidation. Taken together, the vulnerability of GSH-Px to organic hydroperoxides, as well as the late drop in its activity in liver of STZ-diabetic rats (Figure 5A), it seems that GSH-Px is vulnerable to loss its activity during sufficiently aggressive oxidative conditions, highly inductive of lipoperoxidation.

STZ-diabetic rats treated with curcumin-enriched yoghurt had improvements in body weight gain (Figure 2) and in glycemia control (Figure 1), in comparison with diabetic animals receiving only yoghurt; such results corroborate previous studies from our laboratory (Gutierrez et al. 2012; Arcaro et al. 2014; Assis et al. 2017). The treatment of diabetic rats with curcumin-enriched yoghurt also decreased oxidative stress, as previously observed (Arcaro et al. 2014; Assis et al. 2017). Independently of the period where the changes in oxidative stress biomarkers were observed, the treatment with curcumin-enriched yoghurt was able to attenuate the establishment of oxidative stress in STZ-diabetic rats. Corroborating our findings, Majithiya and Balaraman (2005) investigated the changes in antioxidant enzymes and oxidative damage in kidneys of STZ-diabetic rats; the authors observed that the activity of SOD and the levels of MDA were progressively worsened with the progression of diabetes (from 8 until 24 weeks); however, the treatment of diabetic rats with curcumin attenuated these disturbances, in all periods of diabetes.

Various studies have demonstrated the mechanisms by which curcumin has antihyperglycemic effect. STZ-diabetic rats treated for 15 days with curcumin-enriched yoghurt had improvements in both glucose tolerance and insulin sensitivity, which were associated with an increase in the AKT phosphorylation and in the translocation of GLUT4 to plasma membrane of *gastrocnemius* muscles, which may lead to an increase in the glucose uptake (Gutierrez et al. 2015). It has been also shown that curcumin is able to reduce the hepatic glucose production via inhibition of gluconeogenesis (Fujiwara et al. 2008).

In addition to its antihyperglycemic potential, curcumin is also a strong antioxidant. Studies have shown that curcumin is able of capturing  $H_2O_2$ ,  $HO^\bullet$ ,  $O_2^{\bullet-}$ ,

peroxyl radical (ROO<sup>•</sup>), as well as is capable to inhibit lipoperoxidation (Meghana et al. 2007; Barzegar and Moosavi-Movahedi 2011). The attenuation in the generation and/or the capture of reactive species, with emphasis on O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, after the treatment of diabetic rats with curcumin, can mitigate the deleterious effects of this radical on several biomolecules. Although the O<sub>2</sub><sup>•-</sup> has limited permeability, it is a precursor of other highly reactive species, especially HO<sup>•</sup>, which participates in the oxidation of both lipids (Girotti 1998) and proteins (Pennathur et al. 2001). Taken together, we can thus explain the significant reductions in biomarkers of lipoperoxidation (TBARS, Figure 3A) and protein oxidation (PCO, Figure 3B) in STZ-diabetic rats after the treatment with curcumin-enriched yoghurt.

Bioactive compounds able to activate the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) can bring beneficial effects against the disturbances related to oxidative stress in various chronic diseases, including DM (Kumar et al. 2014). Nrf2 is a transcription factor tightly associated with Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), which targets Nrf2 for ubiquitination and degradation. When exposed to oxidative or nitrosative conditions, cysteine residues in Keap1 are modified and conformational alterations allow to Nrf2 its stabilization and accumulation in the nucleus of the cells, where coordinates the transcription of antioxidant enzymes (Nguyen et al. 2009). Evidence indicates that curcumin is able to enhance Nrf2 transcription (Yang et al. 2009) as well as to increase its translocation to the cell nucleus (Liu et al. 2016). Thus, our findings about the increase in the activities of antioxidant enzymes in liver of diabetic animals treated with curcumin-enriched yoghurt may be a consequence of the following events: (i) diminished generation of oxidant species due to reduction in glycemia and/or due to the antioxidant potential *per se* of curcumin, thus protecting the

enzymes against post-translational (glycation, oxidation) modifications that lead to loss in their activities; (ii) activation of Nrf2, culminating in an enhanced expression of antioxidant enzymes.

PON1 is associated to HDL, protecting both LDL and HDL against oxidation (Aviram et al. 1998). Its antioxidant activity is associated with its ability to hydrolyze lipid peroxides, including peroxides of cholesteryl esters; PON1 also modulates the susceptibility of HDL to glycation (Goswami et al. 2009; Gugliucci and Menini 2015). Evidence indicates that serum PON1 activity is decreased in DM (Abbott et al. 1995), thus increasing the risk of diabetic macrovascular complications. According our data, it can be observed that STZ-diabetic rats had diminished PON1 activity since the 33th day of diabetes, and the treatment with curcumin-enriched yoghurt virtually prevented the decrease in PON1 activity in diabetic rats (Figure 6), as previously observed (Assis et al. 2017). Considering that the treatment with insulin also had similar effects to curcumin, the antihyperglycemic effect of curcumin may be helpful to prevent the fall in the PON1 activity due to DM, mainly because PON1 is suitable for glycation, a modification that inhibits its activity (Mastorikou et al. 2008).

In conclusion, the findings of the present study about the monitoring of the temporal changes in oxidative stress/distress in STZ-diabetic rats suggested that lipid peroxidation biomarkers seem to be early related to the onset of oxidative stress/distress. Although have occurred compensatory responses of the glutathione-dependent antioxidant system (glutathione peroxidase and reduced glutathione) due to the initial loss of antioxidant defenses (in this case, catalase), the hyperglycemia maintenance and worsening overlapped these responses, leading to significant falls in antioxidant defenses, culminating in increased levels of biomarkers of protein oxidative

damage. All these changes were prevented by the treatment with curcumin-enriched yoghurt, which support the need of further investigations into the use of curcumin as a complementary option to current antihyperglycemic drugs attempting to attenuate the diabetic complications.

## **5. Conflicts of interest**

None.

## **6. Acknowledgements**

We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarship for M. F. Paula and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 1998/09152-6) for the financial support.

## 7. References

Abbott C.A., Mackness M.I., Kumar S., Boulton A.J., Durrington P.N. 1995. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**:1812-1818.

American Diabetes Association. 2009. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. *Diabetes Care* **32**:S62-S67.

Arcaro C.A., Gutierrez V.O., Assis R.P., Moreira T.F., Costa P.I., Baviera A.M., Brunetti I.L. 2014. Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic rats. *PLoS One* **9**:e113993.

Assis R.P., Arcaro C.A., Gutierrez V.O., Oliveira J.O., Costa P.I., Baviera A.M., Brunetti I.L. 2017. Combined Effects of Curcumin and Lycopene or Bixin in Yoghurt on Inhibition of LDL Oxidation and Increases in HDL and Paraoxonase Levels in Streptozotocin-Diabetic Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **18**: pii: E332.

Aviram M., Rosenblat M., Bisgaier C.L., Newton R.S., Primo-Parmo S.L., La Du B.N. 1998. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions, A possible peroxidative role for paraoxonase. *J. Clin. Invest.* **101**:1581-1590.

Barzegar A., Moosavi-Movahedi A.A. 2011. Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin. *PLoS One* **6**:e26012.

Beauchamp C., Fridovich I. 1971. Superoxide Dismutase: Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**:276-287.

Beers R.F., Sizer I.W. 1952. A spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **195**:133-140.

Bilal H.M., Riaz F., Munir K., Saqib A., Sarwar M.R. 2016. Histological changes in the liver of diabetic rats: A review of pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in type 1 diabetes mellitus. *Cogent Medicine* **3**:1275415.

Bolajoko E.B., Mossanda K.S., Adeniyi F., Akinosun O., Fasanmade A., Moropane M. 2008. Antioxidant and oxidative stress status in type 2 diabetes and diabetic foot ulcer. *S. Afr. Med. J.* **98**:614-617.

Brownlee M. 2005. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* **54**:1615-1625.

Ceriello A. 2012. The emerging challenge in diabetes: the "metabolic memory". *Vascul. Pharmacol.* **57**:133-138.

Costa L.G., McDonald B.E., Murphy S.D., Omenn G.S., Richter R.J., Motulsky A.G., Furlong C.E. 1990. Serum Paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **103**:66-76.

Cubero F.J., Trautwein C. 2011. Oxidative Stress and Liver Injury. In: Monga S, editor. *Molecular Pathology of Liver Diseases. Molecular Pathology Library.* Boston: Springer.

Fujii J., Myint T., Okado A., Kaneto H., Taniguchi N. 1996. Oxidative stress caused by glycation of Cu,Zn-superoxide dismutase and its effects on intracellular components. *Nephrol. Dial. Transplant.* **11** (Suppl 5):34-40.

Fujiwara H., Hosokawa M., Zhou X., Fujimoto S., Fukuda K., Toyoda K., Nishi Y., Fujita Y., Yamada K., Yamada Y., Seino Y., Inagaki N. 2008. Curcumin inhibits glucose production in isolated mice hepatocytes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **80**:185-191.

Giacco F., Brownlee M. 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* **107**: 1058-1070.

Girotti A.W. 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* **39**:1529-1542.

Goswami B., Tayal D., Gupta N., Mallika V. 2009. Paraoxonase: a multifaceted biomolecule. *Clin. Chim. Acta* **410**:1-12.

Gugliucci A., Menini T. 2015. Paraoxonase 1 and HDL maturation. *Clin. Chim. Acta* **439**:5-13.

Gutierrez V.O., Campos M.L., Arcaro C.A., Assis R.P., Baldan-Cimatti H.M., Peccinini R.G., Paula-Gomes S., Kettelhut I.C., Baviera A.M., Brunetti I.L. 2015. Curcumin Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evidences in Streptozotocin-Diabetic Rats Support the Antidiabetic Activity to Be via Metabolite(s). *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2015**:678218.

Gutierrez V.O., Pinheiro C.M., Assis R.P., Vendramini R.C., Pepato M.T., Brunetti I.L. 2012. Curcumin-supplemented yoghurt improves physiological and biochemical markers of experimental diabetes. *Br. J. Nutr.* **108**:440-448.

Huang A., Yang Y.M., Feher A., Bagi Z., Kaley G., Sun D. 2012. Exacerbation of endothelial dysfunction during the progression of diabetes: role of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **302**:R674- R681.

Jax T.W. 2010. Metabolic memory: a vascular perspective. *Cardiovasc. Diabetol.* **9**:51.

Knaś M., Maciejczyk M., Daniszewska I., Klimiuk A., Matczuk J., Kołodziej U., Waszkiel D., Ładny J.R., Żendzian-Piotrowska M., Zalewska A. 2016. Oxidative Damage to the Salivary Glands of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes-

Temporal Study: Oxidative Stress and Diabetic Salivary Glands. *J. Diabetes Res.* **2016**:4583742.

Kohn H.I., Liversedge M. 1944. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **82**:92-300.

Korkmaz-Icöz S., Lehner A., Li S., Vater A., Radovits T., Hegedűs P., Ruppert M., Brlecic P., Zorn M., Karck M., Szabó G. 2015. Mild Type 2 Diabetes Mellitus Reduces the Susceptibility of the Heart to Ischemia/Reperfusion Injury: Identification of Underlying Gene Expression Changes. *J. Diab. Res.* **2015**:1-16.

Kumar H., Kim I.S., More S.V., Kim B.W., Choi D.K. 2014. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Nat. Prod. Rep.* **31**: 109-139.

Lei X.G., Zhu J.H., Cheng W.H., Bao Y., Ho Y.S., Reddi A.R., Holmgren A., Arnér E.S. 2016. Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications. *Physiol. Rev.* **96**:307-364.

Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymology* **233**:346-357.

Liu C., Mathews C.E., Chen J. 2016. Oxidative stress and type 1 diabetes. In: Armstrong D, Stratton RD, editors. *Oxidative Stress and Antioxidant Protection: The Science of Free Radical Biology and Disease*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.

Liu Z., Dou W., Zheng Y., Wen Q., Qin M., Wang X., Tang H., Zhang R., Lv D., Wang J., Zhao S. 2016. Curcumin upregulates Nrf2 nuclear translocation and protects rat hepatic stellate cells against oxidative stress. *Mol. Med. Rep.* **13**:1717-1724.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.

Majithiya J.B., Balaraman R. 2005. Time-dependent changes in antioxidant enzymes and vascular reactivity of aorta in streptozotocin-induced diabetic rats treated with curcumin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **46**:697-705.

Mastorikou M., Mackness B., Liu Y., Mackness M. 2008. Glycation of paraoxonase-1 inhibits its activity and impairs the ability of high-density lipoprotein to metabolize membrane lipid hydroperoxides. *Diabet. Med.* **25**:1049-1055.

Meghana K., Sanjeev G., Ramesh B. 2007. Curcumin prevents streptozotocin-induced islet damage by scavenging free radicals: a prophylactic and protective role. *Eur. J. Pharmacol.* **577**:183-191.

Nguyen T., Nioi P., Pickett C.B. 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **284**:13291-13295.

Pennathur S., Wagner J.D., Leeuwenburgh C., Litwak K.N., Heinecke J.W. 2001. A hydroxyl radical-like species oxidizes cynomolgus monkey artery wall proteins in early diabetic vascular disease. *J. Clin. Invest.* **107**:853-860.

Pigeolet E., Corbisier P., Houbion A., Lambert D., Michiels C., Raes M., Zachary M.D., Remacle J. 1990. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech. Ageing Dev.* **51**:283-297.

Pilz J., Meineke I., Gleiter C. 2000. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **742**:315-325.

Rush J.W., Sandiford S.D. 2003. Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. *Clin. Biochem.* **36**:345-351.

Sadi G., Bozan D., Yildiz H.B. 2014. Redox regulation of antioxidant enzymes: post-translational modulation of catalase and glutathione peroxidase activity by resveratrol in diabetic rat liver. *Mol. Cell. Biochem.* **393**:111-122.

Sedlak J., Lindsay R.H. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellmann's reagent. *Anal. Biochem.* **25**:192-205.

Shimizu N., Kobayashi K., Hayashi K. 1984. The reaction of superoxide radical with catalase. Mechanism of the inhibition of catalase by superoxide radical. *J. Biol. Chem.* **259**: 4414-4418.

Sies H. 1985. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H., editor. *Oxidative Stress*. London: Academic Press, 1-8.

Sies H., Berndt C., Jones D.P. 2017. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* **86**:715-748.

Sies H., Jones D. 2007. Oxidative stress. In: Fink G, editor. *Encyclopedia of Stress*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 45-48.

Tabatabaie T., Floyd R.A. 1994. Susceptibility of glutathione peroxidase and glutathione reductase to oxidative damage and the protective effect of spin trapping agents. *Arch. Biochem. Biophys.* **314**:112-119.

Testa R., Bonfigli A.R., Prattichizzo F., La Sala L., De Nigris V., Ceriello A. 2017. The "Metabolic Memory" Theory and the Early Treatment of Hyperglycemia in Prevention of Diabetic Complications, *Nutrients* **9**: pii: E437.

Trinder P. 1969. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. *J. Clin. Pathol.* **22**:158-161.

Watson J.D. 2014. Type 2 diabetes as a redox disease. *Lancet* **383**:841-843.

Yan H., Harding J.J. 1997. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem. J.* **328**:599-605.

Yang C., Zhang X., Fan H., Liu Y. 2009. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia. *Brain. Res.* **1282**:133-141.

Zhang D.W., Fu M., Gao S.H., Liu J.L. 2013. Curcumin and diabetes: a systematic review. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2013**:636053.

## TABLES

**Table 1:** Physiological, biochemical and oxidative stress/distress biomarkers of normal and STZ-diabetic rats (3 days of DM, “day 0”).

	<b>Normal rats</b>	<b>Diabetic rats</b>
	130.1 ±	143.0 ±
<b>Body weight, day of DM induction (g)</b>	0.93	3.20 #
	163.4 ±	163.3 ±
<b>Body weight, 3 days after DM induction (g)</b>	4.54	3.76
	33.33 ±	20.11 ±
<b>Body weight gain (g)</b>	3.97	1.65 #
	105.4 ±	469.0 ±
<b>Glycemia (mg/dL)</b>	2.88	21.95 #
	7.73 ±	17.22 ±
<b>Plasma TBARS (µmol/L)</b>	0.201	0.671 #
	0.202 ±	0.209 ±
<b>Liver PCO (nmol/mg protein)</b>	0.024	0.012
	225.9 ±	208.3 ±
<b>Liver SOD (U/mg protein)</b>	10.997	14.571
	0.122 ±	0.117 ±
<b>Liver CAT (mmol/min/mg protein)</b>	0.006	0.004
	0.016 ±	0.013 ±
<b>Liver GSH-Px (mmol/min/mg protein)</b>	0.0012	0.0009

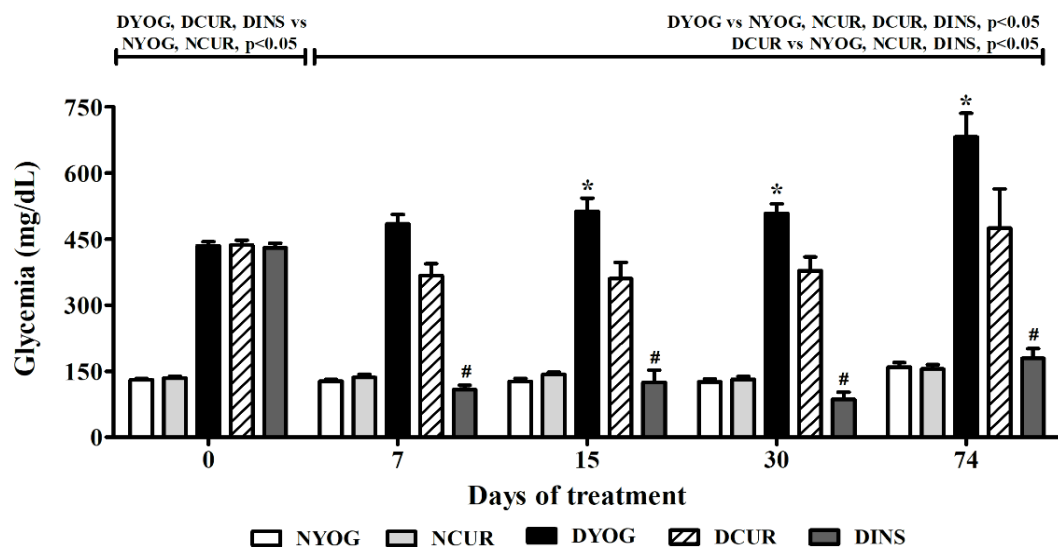
	58.93 ±	59.29 ±
<b>Liver NPSH (mmol/g tissue)</b>	2.610	1.834
	1287.78 ±	1251.11 ±
<b>Plasma PON1 (U/L)</b>	47.178	52.736

Values are expressed as means ± SEM, n = 8/group.

Differences between groups were considered significant at  $p < 0.05$  and were analyzed with One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test. #, differences with normal rats.

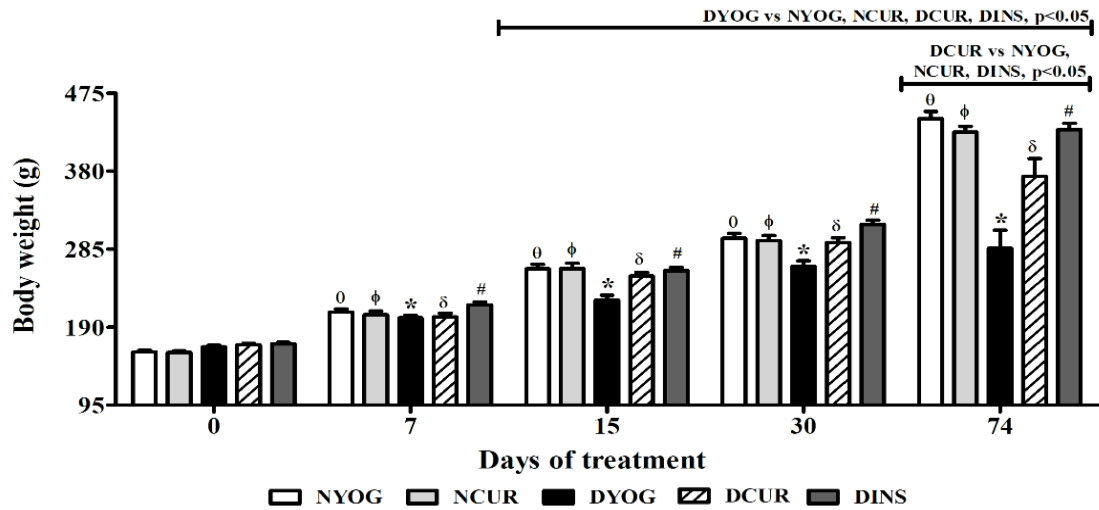
### FIGURE CAPTIONS

**Figure 1.** Temporal changes in glycemia (mg/dL) of normal and STZ-diabetic rats treated for 7, 15, 30, and 74 days with yoghurt enriched with curcumin.



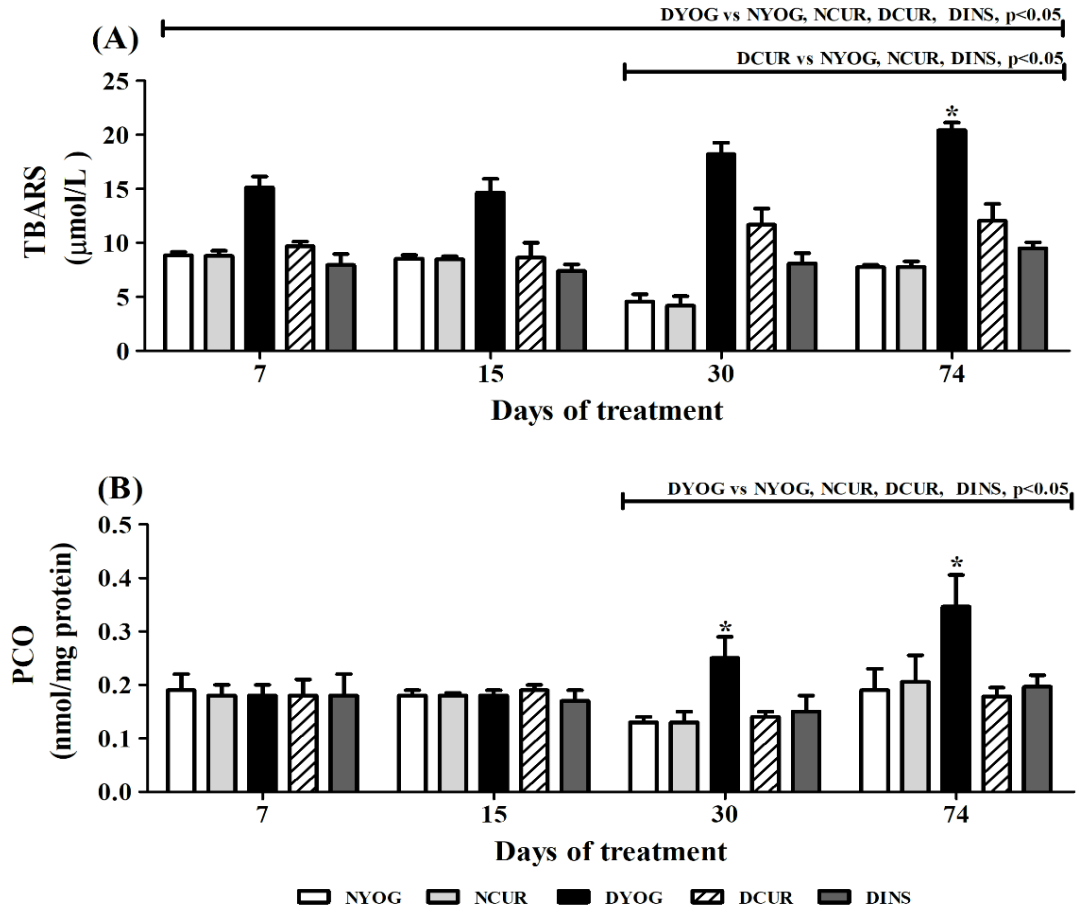
Values are expressed as means ± SEM, n = 8. Differences between groups were considered significant at  $p < 0.05$  and were analyzed with one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test (horizontal bars). Differences in the same group relative to day 0 were analyzed using a paired Student's t test;  $\theta$  for NYOG,  $\phi$  for NCUR, \* for DYOG,  $\delta$  for DCUR, # for DINS ( $p < 0.05$ ).

**Figure 2.** Temporal changes in body weight (g) of normal and STZ-diabetic rats treated for 7, 15, 30, and 74 days with yoghurt enriched with curcumin.



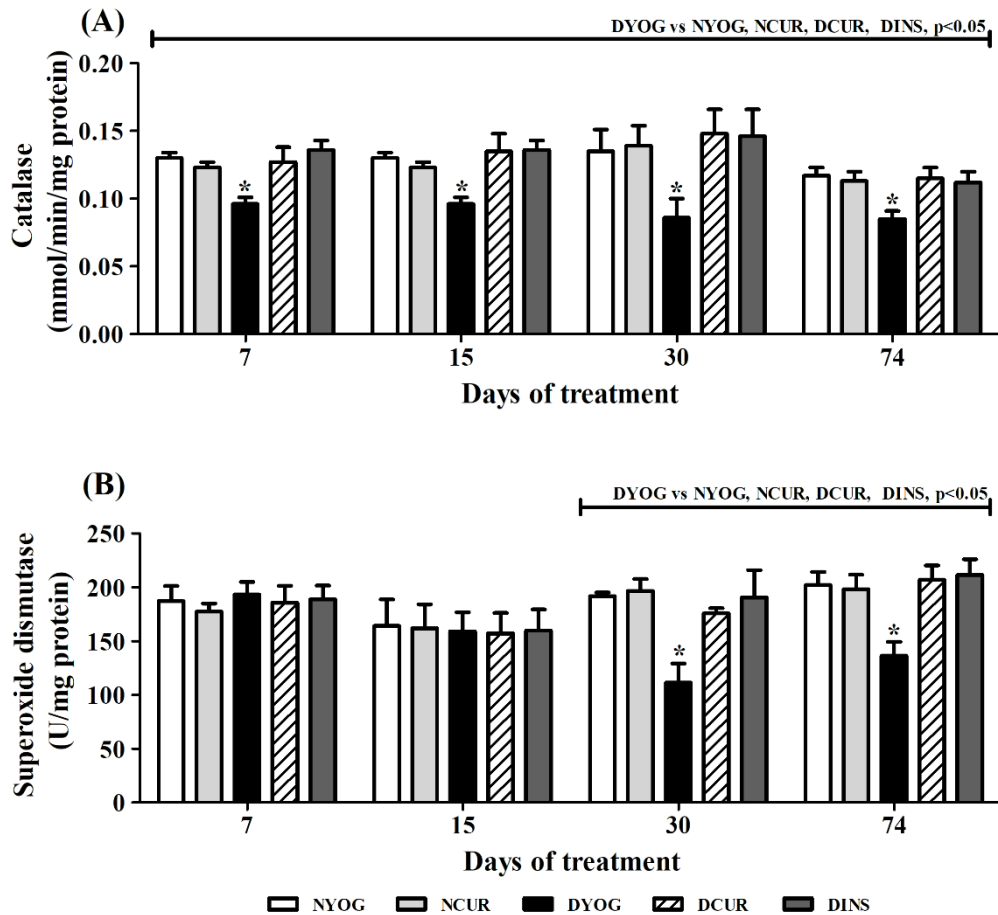
Values are expressed as means  $\pm$  SEM, n = 8. Differences between groups were considered significant at  $p < 0.05$  and were analyzed with one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test (horizontal bars). Differences in the same group relative to day 0 were analyzed using a paired Student's t test; \* for DYOG, # for DINS ( $p < 0.05$ ).

**Figure 3.** Temporal changes in plasma levels of TBARS (A) and hepatic levels of PCO (B) of normal and STZ-diabetic rats treated for 7, 15, 30, and 74 days with yoghurt enriched with curcumin.



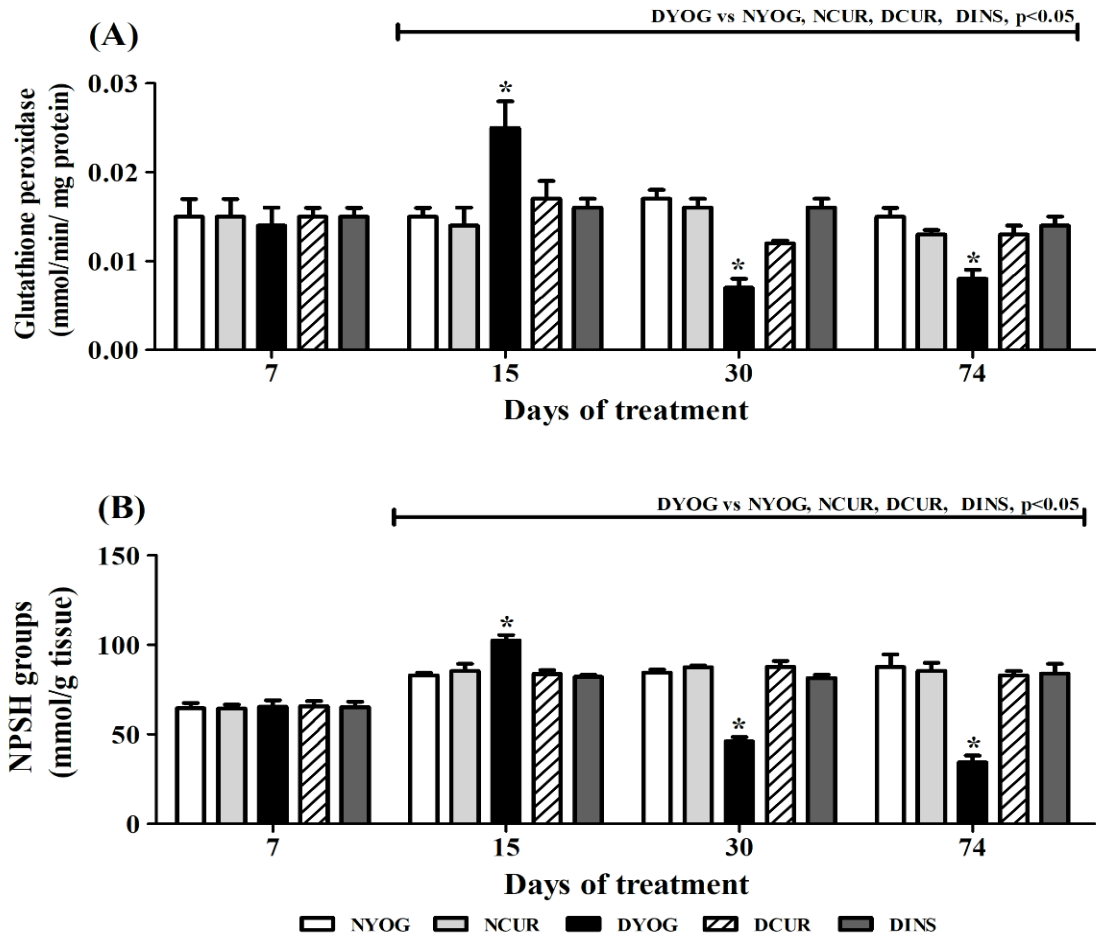
Values are expressed as means  $\pm$  SEM, n = 8. Differences between groups were considered significant at  $p < 0.05$  and were analyzed with one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test (horizontal bars). Differences in the same group relative to day 0 (Table 1) were analyzed using a paired Student's t test; \* for DYOG ( $p < 0.05$ ).

**Figure 4.** Temporal changes in hepatic activities of CAT (A) and SOD (B) of normal and STZ-diabetic rats treated for 7, 15, 30, and 74 days with yoghurt enriched with curcumin.



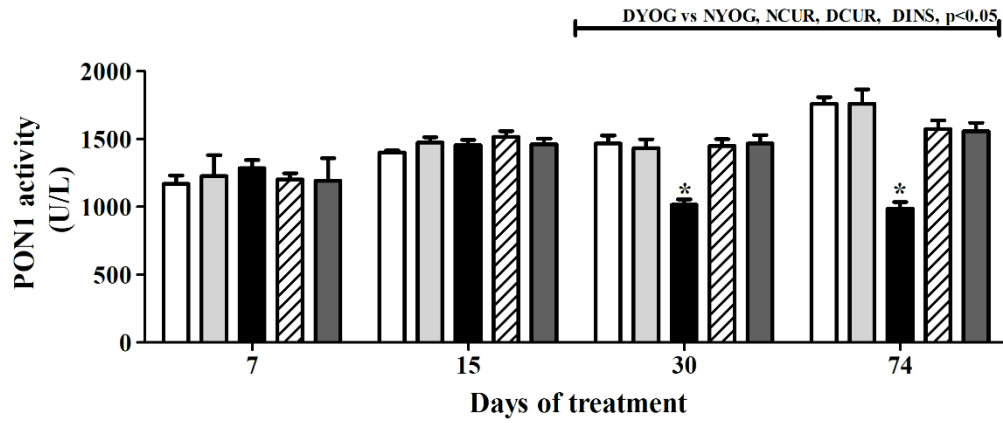
Values are expressed as means  $\pm$  SEM,  $n = 8$ . Differences between groups were considered significant at  $p < 0.05$  and were analyzed with one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test (horizontal bars). Differences in the same group relative to day 0 (Table 1) were analyzed using a paired Student's  $t$  test; \* for DYOG ( $p < 0.05$ ).

**Figure 5.** Temporal changes in hepatic activities of GSH-Px (A) and levels of NPSH (B) of normal and STZ-diabetic rats treated for 7, 15, 30, and 74 days with yoghurt enriched with curcumin.



Values are expressed as means  $\pm$  SEM,  $n = 8$ . Differences between groups were considered significant at  $p < 0.05$  and were analyzed with one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test (horizontal bars). Differences in the same group relative to day 0 (Table 1) were analyzed using a paired Student's  $t$  test; \* for DYOG ( $p < 0.05$ ).

**Figure 6.** Temporal changes in plasma levels of PON1 of normal and STZ-diabetic rats treated for 7, 15, 30, and 74 days with yoghurt enriched with curcumin.



Values are expressed as means  $\pm$  SEM,  $n = 8$ . Differences between groups were considered significant at  $p < 0.05$  and were analyzed with one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test (horizontal bars). Differences in the same group relative to day 0 (Table 1) were analyzed using a paired Student's  $t$  test; \* for DYOG ( $p < 0.05$ ).