



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade De Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Efeitos da co-administração de metformina e licopeno sobre as
alterações metabólicas e estresse glico-oxidativo no diabetes
mellitus**

Ingrid Delbone Figueiredo

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Araraquara - SP
2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



Ingrid Delbone Figueiredo

**Efeitos da co-administração de metformina e licopeno
sobre as alterações metabólicas e estresse glico-oxidativo
no diabetes mellitus**

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

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Araraquara - SP
2019

F475e Figueiredo, Ingrid Delbone.
Efeitos da co-administração de metformina e licopeno sobre as alterações metabólicas e estresse glico-oxidativo no diabetes mellitus / Ingrid Delbone Figueiredo. – Araraquara: [S.n.], 2019.
121 f. : il.

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

Orientadora: Amanda Martins Baviera.

1. Diabetes mellitus. 2. Licopeno. 3. Metformina. 4. Estresse glico-oxidativo. I. Baviera, Amanda Martins, orient. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITOS DA CO-ADMINISTRAÇÃO DE METFORMINA E LICOPENO SOBRE AS ALTERAÇÕES METABÓLICAS E ESTRESSE OXIDATIVO NO DIABETES MELLITUS"

AUTORA: INGRID DELBONE FIGUEIREDO

ORIENTADORA: AMANDA MARTINS BAVIERA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. AMANDA MARTINS BAVIERA

Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara - UNESP



Profa. Dra. SILVIA DE PAULA GOMES

Departamento de Ciências Biológicas - DECBI / Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP



Prof. Dr. MARIO ROBERTO MAROSTICA JUNIOR

Departamento de Alimentos e Nutrição / Universidade Estadual de Campinas

Araraquara, 05 de dezembro de 2019

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por toda força que colocou em meu coração permitindo minha chegada até aqui.

Aos meus pais Fabiana e Humberto que me criaram e com todas as dificuldades existentes, conseguiram financiar meus estudos que me ajudaram chegar até aqui. O amor incondicional e o exemplo de vocês me inspiram dia após dia.

Ao meu irmão Cairê, meu exemplo de vida, obrigada pelos conselhos e palavras de carinho que me confortaram nos momentos difíceis.

Aos meus avós, primos, tios e toda minha família pelo apoio incondicional.

À minha orientadora Profa. Dra. Amanda Martins Baviera, pela paciência, dedicação e incentivo. Com sua orientação, consegui realizar esta dissertação e seus conhecimentos me fizeram ter vontade de sempre me dedicar aos estudos. Obrigada pelas palavras de incentivo, pelos ensinamentos que me guiaram ao longo destes dois anos e me tornaram o que sou hoje. Graças à professora, tive a oportunidade de realizar o Curso de Mestrado na UNESP. Meus sinceros agradecimentos pela confiança que me foi depositada e que me permitiu chegar até aqui.

Ao professor Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, pelos inúmeros ensinamentos, palavras de sabedoria, motivação que me guiaram ao longo destes anos. Suas palavras certamente estão guardadas em meu coração e serão levadas comigo para sempre.

À minha amiga e colega de trabalho Tayra Ferreira, essencial para realização deste trabalho. Obrigada pela parceria, ensinamentos e por me ajudar tanto com a execução desta dissertação. Agradeço pelas palavras de apoio e pela amizade que certamente será carregada comigo por todo sempre. Sentirei saudades!

Aos colegas do laboratório de Bioquímica e Enzimologia: Renata, Anderson, Marcel, Maiara, Mariana, Maíra, Juliana, Camila e Bruno, meus sinceros agradecimentos. Cada um de vocês, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho. Vocês me ensinaram muito nestes anos e certamente me lembrarei de vocês e deste período da minha vida com muita alegria. Sentirei saudades da convivência, das risadas e parceria. Obrigada por tudo!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo incentivo financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica crônica caracterizada por deficiência na produção pancreática de insulina e/ou prejuízos em suas ações teciduais, culminando principalmente em hiperglicemia. A manutenção da hiperglicemia por longos períodos é um dos principais fatores envolvidos no estabelecimento e manutenção do estresse glico-oxidativo, o qual está implicado no desenvolvimento das complicações micro e macrovasculares do DM, resultando em morbidade e mortalidade significativas. A metformina tem sido um dos principais agentes antidiabéticos orais utilizados para o tratamento do DM; entretanto, é crescente o interesse no uso de produtos naturais como terapia complementar, seja por seus benefícios aditivos aos efeitos da terapia clássica, seja pelo potencial antioxidante. O licopeno é um carotenoide encontrado em diversos vegetais, em especial tomates frescos e seus derivados. Diversos estudos vêm demonstrando vários benefícios atribuídos ao licopeno: redução da glicemia, dislipidemia, inflamação e em biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo. Diante do exposto, o licopeno surge como uma opção terapêutica complementar interessante aos fármacos já utilizados no tratamento do DM. O objetivo deste estudo é investigar o potencial antidiabético do iogurte enriquecido com metformina ou licopeno, isolados ou co-administrados, em ratos diabéticos, avaliando parâmetros fisiológicos, bioquímicos, marcadores do estresse glico-oxidativo e potencial antioxidante. Ratos Wistar machos, normais ou diabéticos (indução com 40 mg/kg de estreptozotocina) foram tratados com iogurte, insulina (4U/animal, subcutânea), 250 mg/kg de metformina em iogurte, 45 mg/kg de licopeno em iogurte, 250 mg/kg de metformina + 45 mg/kg de licopeno em iogurte. Os tratamentos foram realizados durante 30 dias. Foram analisados: (i) parâmetros fisiológicos: peso corporal, ingestão alimentar, ingestão hídrica e volume urinário; massas de tecidos adiposos (retroperitoneal e epididimal); massas de tecidos musculares (EDL e *soleus*) (ii) parâmetros bioquímicos: glicemia, colesterol, HDL-colesterol, triacilgliceróis, alanina aminotransferase (ALT), teste de tolerância à glicose oral (TTGO); (iii) biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo no plasma, fígado e rim: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteínas carboniladas (PCO), produtos finais de glicação avançada (AGEs fluorescentes); (iv) atividades de enzimas antioxidantes: paraoxonase 1 (PON 1; plasma), superóxido dismutase (SOD; fígado e rim), catalase (CAT; fígado e rim), glutathione peroxidase (GSH-Px; fígado e rim), glutathione redutase (GSH-Rd; fígado e rim), níveis dos grupos tióis não proteicos (fígado e rim). Animais diabéticos controles, tratados com iogurte, apresentaram piora em todos os parâmetros analisados, bem como estabelecimento de estresse glico-oxidativo e intolerância à glicose. Porém, observou-se a instalação de um mecanismo compensatório ao estresse oxidativo em fígado e rim destes animais, com aumentos nas atividades das enzimas GSH-Px e GSH-Rd. O tratamento de ratos diabéticos com insulina foi eficaz na melhoria de todos os parâmetros analisados. Os tratamentos de ratos diabéticos com metformina ou com licopeno incorporados em iogurte, isoladamente, promoveram melhoras significativas em quase todos os parâmetros alterados no DM experimental. O tratamento com a associação metformina + licopeno em iogurte também foi benéfico frente aos parâmetros analisados, com destaque para a promoção de redução aditiva na glicemia, triacilgliceróis, colesterol total, ALT, TBARS (rim e plasma), PCO (rim e

fígado), AGEs fluorescentes (plasma e fígado), e aumento nas atividades de SOD (fígado e rim), CAT (fígado e rim) e PON 1 (plasma). O tratamento de ratos diabéticos com a terapia combinada metformina + licopeno em iogurte promove uma diversidade de efeitos benéficos em biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo, surgindo como uma opção promissora não somente no controle da glicemia mas também na atenuação ou até mesmo prevenção das complicações do DM, especialmente em fígado e rins.

Palavras-chave: diabetes mellitus, licopeno, metformina, estresse glico-oxidativo

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic syndrome characterized by pancreatic deficiency in the insulin production and/or impairments in its actions, culminating in hyperglycemia. The maintenance of hyperglycemia for long periods is one main factor involved in the onset and maintenance of glycoxidative stress, and it is implicated in the development of micro and macrovascular complications of DM, which result in significant morbidity and mortality. Metformin has been the main oral antidiabetic agent used for the treatment of DM; however, there is a growing interest in the use of natural products as complementary therapy, either because of its additive benefits to the effects of classical therapy or for its antioxidant potential. Lycopene is a carotenoid found in many vegetables, especially fresh tomatoes and their derivatives. Many studies have shown the several benefits attributed to lycopene: reduction of glycemia, dyslipidemia, inflammation, and biomarkers related to glycoxidative stress. In view of this, lycopene has appearing as an interesting complementary therapeutic option to drugs already used for the treatment of DM. The objective of this study was to investigate the antidiabetic potential of yoghurt enriched with metformin or lycopene, isolated or co-administered, in diabetic rats, evaluating physiological, biochemical parameters, biomarkers of oxidative damage, and antioxidant defenses. Male Wistar, normal or diabetic rats (induction with 40 mg/kg streptozotocin) were treated with yoghurt, insulin (4U/animal, subcutaneous), 250 mg/kg metformin in yoghurt, 45 mg/kg lycopene in yoghurt, 250 mg/kg metformin + 45 mg/kg lycopene in yoghurt. The treatments were performed for 30 days. The following parameters were analyzed: (i) physiological parameters: body weight, food intake, water intake, and urinary volume; weights of adipose tissues (retroperitoneal and epididymal) and skeletal muscles (EDL and *soleus*); (ii) biochemical parameters: glycemia, cholesterol, HDL-cholesterol, triacylglycerols, alanine aminotransferase (ALT), oral glucose tolerance test (OGTT); (iii) biomarkers related to glycoxidative stress in plasma, liver and kidney: thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), carbonyl proteins groups (PCO), advanced glycation end products (fluorescent AGEs); (iv) activities of antioxidant enzymes: paraoxonase 1 (PON 1; plasma), superoxide dismutase (SOD; liver and kidney), catalase (CAT; liver and kidney), glutathione peroxidase (GSH-Px; liver and kidney), glutathione reductase (GSH-Rd; liver and kidney), non protein thiol groups (liver and kidney). Control, diabetic animals treated with yoghurt presented a worsening in all parameters analyzed, as well as establishment of glycoxidative stress and glucose intolerance. However, it was observed the onset of a compensatory mechanism against oxidative in liver and kidney of these animals, with increases in the activities of GSH-Px and GSH-Rd. The treatment of diabetic rats with insulin was effective in promoting improvements in all studied parameters. The treatments of diabetic rats with metformin or with lycopene incorporated into yoghurt, alone, promoted significant improvements in almost all altered parameters in the experimental DM. The treatment with the combination of metformin + lycopene into yoghurt had beneficial effects in various parameters, mainly promoting further effects on the reduction of glycemia, triacylglycerols, total cholesterol, ALT, TBARS (kidney and plasma), PCO (kidney and liver), fluorescent AGEs (plasma and liver), and increased the activities of antioxidant enzymes SOD (liver and kidney), CAT (liver

and kidney) and PON 1 (plasma). The treatment of diabetic rats with the combined therapy metformin + lycopene into yoghurt promoted a wide range of beneficial effects on biomarkers related to glycoxidative stress, therefore appearing as a promising option not only for the glycemic control but also for the attenuation or even prevention of DM complications, mainly in liver and kidneys.

Keywords: diabetes mellitus, lycopene, metformin, glycoxidative stress

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Vias pelo qual a hiperglicemia exacerba o estresse glico-oxidativo no DM.....	22
FIGURA 2: Mecanismos que promovem o aumento na produção de AGEs.....	23
FIGURA 3: Sistemas de defesas antioxidantes do organismo.....	28
FIGURA 4: Estrutura da metformina.....	29
FIGURA 5: Estrutura do licopeno.....	33
FIGURA 6: Massas dos músculos esqueléticos de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno incorporados em iogurte, após 30 dias.....	47
Massas dos tecidos adiposos brancos, epididimal e retroperitoneal de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno incorporados em iogurte, após 30 dias.....	48
FIGURA 8: Níveis plasmáticos de glicose e área sob a curva (AUC) da glicemia de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno incorporados em iogurte, após 30 dias.....	49
FIGURA 9: Teste de tolerância oral à glicose, área sob a curva (AUC) da glicemia no TTGO e glicemia após 12 horas de jejum de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno incorporados em iogurte, após 28 dias.....	50
FIGURA 10: Níveis plasmáticos de triglicerídeos (mg/dL), colesterol (mg/dL) e colesterol-HDL (mg/dL) de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno incorporados em iogurte, após 30 dias.....	52
FIGURA 11: Níveis de alanina aminotransferase (ALT) em plasma de ratos não diabéticos e ratos diabéticos tratados com insulina, metformina e/ou licopeno, após 30 dias.....	53
FIGURA 12: Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, proteínas carboniladas e AGEs fluorescentes no plasma de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno, após 30 dias.....	56
FIGURA 13: Atividade de PON 1 em plasma de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno incorporados em iogurte, após 30 dias.....	57
FIGURA 14: Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, proteínas carboniladas e de AGEs florescentes no fígado de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno, após 30 dias.....	58

FIGURA 15: Atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase no fígado de ratos não diabéticos e ratos diabéticos tratados com insulina, metformina e/ou licopeno, após 30 dias.....	60
FIGURA 16: Níveis de grupos tióis não proteicos e atividades das enzimas glutationala redutase e glutationala peroxidase no fígado de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno, após 30 dias.....	61
FIGURA 17: Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, proteínas carboniladas e AGEs fluorescentes no rim de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno, após 30 dias.....	63
FIGURA 18: Atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase no rim de ratos não diabéticos e ratos diabéticos tratados com insulina, metformina e/ou licopeno, após 30 dias.....	65
FIGURA 19: Níveis de grupos tióis não proteicos e atividades das enzimas glutationala redutase e glutationala peroxidase no rim de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno, após 30 dias.....	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Parâmetros fisiológicos (peso corporal, ingestão alimentar, ingestão hídrica e volume urinário) de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno incorporados em iogurte, no início (dia 0), meio (dia 15) e fim (dia 30) do experimento.....46

TABELA 2: Alterações relativas (% em relação ao DIOG) no biomarcadores do metabolismo de carboidratos e lipídeos, estresse glico-oxidativo e defesas antioxidantes no plasma, fígado e rim de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno incorporados em iogurte, após 30 dias de tratamento.....67 e 68

LISTA DE ABREVIATURAS

4-HNE	4-Hidroxinonenal
ACC	Acetil-CoA carboxilase
ADA	Associação Americana de Diabetes
ADP	Adenosina difosfato
AGEs	<i>Advanced glycation end products</i>
AGE-R	<i>AGE-receptors</i>
AGL	Ácidos graxos livres
AkT	Proteína quinase B
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
ALX	Aloxana
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	3'5'-adenosina-monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinase dependente de AMP
Apo B	Apolipoproteína B
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAT	Catalase
CEL	Nε(carboxietil) lisina
CML	Nε-(carboximetil) lisina
CRTC2	<i>CREB-regulated transcriptional coactivator-2</i>
DAG	Diacilglicerol
DHGNA	Doenças hepática gordurosa não alcoólica
DINS	Ratos diabéticos tratados com 4U/dia de insulina
DIOG	Ratos diabéticos tratados com iogurte
DLIC	Ratos diabéticos tratados com 45 mg/kg de licopeno em iogurte
DLICMET	Ratos diabéticos tratados com 250 mg/kg de metformina + 45 mg/kg de licopeno em iogurte
DM	Diabetes mellitus
DMET	Ratos diabéticos tratados com 250 mg/kg de metformina em iogurte
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina
DTNB	5,5-Ditio-2-nitrobenzoico
EASD	Associação Européia dos Estudos em Diabetes
EDL	<i>Extensor digitorum longus</i>
EPM	Erro padrão da média
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio

G6Pase	Glicose-6-fosfatase
GADPH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFAT	Glutamina frutose-6-fosfato aminotransferase
γ -GT	γ -glutamil transpeptidase
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon-1
GLUT 2	Transportador de glicose do tipo 2
GLUT 4	Transportador de glicose do tipo 4
GOLD	Dímero de lisina derivado de glioxal
GSH	Glutathiona reduzida
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
GSH-Rd	Glutathiona redutase
GSSG	Glutathiona oxidada
GST	Glutathiona-S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA
HOCl	Ácido hipocloroso
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IKK	Inibidor de fator nuclear kappa
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
LpL	Lipase lipoproteica
LPO	Lipoperoxidação ou peroxidação lipídica
LSH	Lipase hormônio sensível
MDA	Malondialdeído
MMP-2	Metaloproteinase de matriz 2
MOLD	Dímero de lisina derivado de metilglioxal
MPO	Mieloperoxidase
MTP	Proteína microssomal de transferência de triacilglicerol
NaCl	Cloreto de sódio
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NaOH	Hidróxido de sódio
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium</i>
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NIOG	Ratos normais, não diabéticos, tratados com iogurte
NO	Óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	Radical anion superóxido
OH [•]	Radical hidroxila

OONO ⁻	Peroxinitrito
PCO	Proteínas carboniladas
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PON 1	Paraoxonase 1
RAGE	<i>Receptor for AGEs</i>
SOD	Superóxido dismutase
STZ	Estreptozotocina
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TTGO	Teste oral de tolerância à glicose
TZP	Triazepnona
UCP	<i>Uncoupling protein</i>
UKPDS	Estudos Clínicos Prospectivos em Diabetes do Reino Unido
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELA

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 Diabetes Mellitus	21
2.2 Estresse glico-oxidativo no DM	23
2.3 Metformina.....	31
2.4 Licopeno.....	34
3. OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Animais	38
4.2 Indução do diabetes mellitus experimental	38
4.3 Desenho experimental.....	39
4.4 Determinações bioquímicas	40
4.4.1 Glicemia, método da glicose oxidase	40
4.4.2 Colesterol total, método da colesterol oxidase	41
4.4.3 Triacilglicerol, método enzimático de reações acopladas	41
4.4.4 Colesterol-HDL, método indireto por inibição seletiva	41
4.4.5 Determinação dos níveis de alanina aminotransferase (ALT).....	41
4.4.6 Avaliação da peroxidação lipídica	42
4.4.7 Quantificação de grupos carbonilas de proteínas.....	42
4.4.8 Atividade de paraoxonase 1	43
4.4.9 Determinação da concentração de grupos tióis não proteicos	43
4.4.10 Atividades de enzimas antioxidantes em fígado e rim	43
4.4.11 Estimativa dos produtos finais de glicação avançada.....	44
4.4.12 Dosagem de proteínas totais.....	45
4.4.13 Análise dos resultados.....	45
5. RESULTADOS	46
5.1 Parâmetros fisiológicos e bioquímicos de animais diabéticos não tratados e tratados com 4U/animal de insulina, 250 mg/kg de metformina e/ou 45 mg/kg de licopeno em iogurte.....	46
5.2 Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo no plasma de animais diabéticos não tratados e tratados com 4U/animal de insulina, 250 mg/kg de metformina e/ou 45 mg/kg de licopeno em iogurte.....	57

5.3	Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo no fígado de animais diabéticos não tratados e tratados com 4U/animal de insulina, 250 mg/kg de metformina e/ou 45 mg/kg de licopeno em iogurte.....	60
5.4	Biomarcadores dos sistemas antioxidantes no fígado de animais diabéticos não tratados e tratados com 4U/animal de insulina, 250 mg/kg de metformina e/ou 45 mg/kg de licopeno em iogurte	62
5.5	Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo no rim de animais diabéticos não tratados e tratados com 4U/animal de insulina, 250 mg/kg de metformina e/ou 45 mg/kg de licopeno em iogurte.....	65
6.	DISCUSSÃO	71
7.	CONCLUSÕES.....	100
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
	ANEXO 1: CEUA/FCF/CAR nº 23/2017.....	121

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica caracterizada por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018). Em longo prazo, a manutenção da hiperglicemia está associada ao desenvolvimento de complicações microvasculares do DM, dentre elas nefropatia, retinopatia e neuropatia diabéticas, bem como das complicações macrovasculares, incluindo as doenças cardiovasculares e acidente vascular cerebral. Tais complicações são as principais causas das elevadas taxas de morbidade e mortalidade associadas ao DM (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018; RAINS; JAIN, 2011).

O aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) bem como dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), devido à hiperglicemia crônica participam do estabelecimento de um quadro de estresse glico-oxidativo nos diversos tecidos, o qual contribui para patogênese das complicações micro e macrovasculares (CHILELLI et al. 2013; ROCHETTE et al., 2014).

Outro caminho através do qual os AGEs podem contribuir para o desenvolvimento das complicações diabéticas ocorre via a ativação de receptores específicos presentes nas membranas plasmáticas, os receptores de AGEs (RAGE) (SINGH et al., 2014). A interação AGE-RAGE está relacionada à indução de estresse oxidativo, via ativação de diversas cascatas de sinalização que aumentam a expressão de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios, resultando em danos celulares e contribuindo, portanto, para o estabelecimento das complicações do DM (HO et al., 2010; OTT et al., 2014; OU; HUANG et al., 2017). Além disto, a hiperglicemia crônica pode ocasionar alterações em longo prazo nas células, fenômeno este conhecido como “memória metabólica”, caracterizada pela persistência das complicações relacionadas ao DM mesmo após o alcance de um efetivo controle glicêmico (CERIELLO et al., 2012).

Uma vez que a hiperglicemia é um dos principais fatores envolvidos no estabelecimento das complicações do DM, o tratamento da doença tem como principal objetivo a manutenção dos níveis glicêmicos próximos à normalidade. A metformina tem sido um dos principais agentes antidiabéticos orais utilizados para o tratamento do DM. Os mecanismos da ação relacionados ao potencial antihiperglicêmico incluem principalmente redução na produção hepática de glicose via inibição da gliconeogênese e aumento da sensibilidade periférica à insulina nos tecidos periféricos. Também tem sido atribuída à

metformina a capacidade de redução da ingestão alimentar e do peso corporal, bem como promoção de melhora no perfil lipídico e na esteatose hepática, e também modula marcadores inflamatórios como NF-kB e IL-6 (PERNICOVA; KORBONITS, 2014). No entanto, cerca de 20% dos pacientes que fazem uso contínuo da metformina apresentam alguns distúrbios gastrointestinais, tais como diarreia, dispepsia, náuseas e vômitos, em intensidade proporcional à dose do fármaco (500 / 750 mg); tais distúrbios são citados pelos pacientes como a principal causa de descontinuidade do uso da metformina (OKAYASU et al., 2012; HOWLETT; BAILEY, 1999).

Portanto, estratégias terapêuticas que diminuam a dose da metformina, sem afetar a resposta antihiperlipidêmica, são extremamente interessantes para a redução dos efeitos adversos do fármaco. Uma destas estratégias é baseada na associação de metformina com preparações ou produtos de origem natural com atividade antidiabética. Revisão de Prabhakar e Kumar (2014) reúne uma série de estudos que demonstram os benefícios associados ao uso combinado de fármacos comerciais (metformina, glimepiride, pioglitazona, gliclazida, entre outros) com ativos naturais (ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido cumárico, eugenol, entre outros), reduzindo os efeitos adversos dos fármacos comerciais. Outro benefício atribuído aos ativos naturais é o seu potencial antioxidante, o que torna a associação com a metformina ainda mais vantajosa.

A presença de compostos biologicamente ativos nos fitoterápicos e alimentos funcionais explicam o seu potencial na prevenção, redução de riscos e/ou tratamento de doenças. Esteroides vegetais, carotenóides, fibras, alcaloides e polifenóis são exemplos de compostos bioativos que possuem um amplo espectro de atividades biológicas importantes no combate a doenças (PERERA; LI, 2012; PAZ et al., 2015). Vários estudos têm sido realizados com extratos, frações e/ou compostos derivados de alimentos ou plantas medicinais com o objetivo de esclarecer seu potencial antihiperlipidêmico e/ou anti-glicação, permitindo que seu uso possa ter um papel importante como terapia adjuvante no DM (KARTHIKESAN; MENON., 2010; ABBAS et al., 2016).

Nosso laboratório tem se dedicado ao estudo do potencial antidiabético e antioxidante do iogurte enriquecido com compostos presentes em alimentos funcionais e/ou fitoquímicos (GUTIERRES et al., 2012; ARCARO et al., 2014; GUTIERRES et al., 2015; GUTIERRES et al., 2019), incluindo o licopeno (ASSIS et al., 2017). O iogurte é um dos alimentos lácteos mais consumidos em todo o mundo; o enriquecimento/fortificação do iogurte tem sido

considerado uma opção prática como veículo de compostos bioativos de outros alimentos funcionais, de plantas medicinais e antioxidantes (GAHRUIE et al., 2015).

O licopeno é um carotenóide isômero acíclico do β -caroteno, altamente insaturado, responsável pela coloração vermelha de tomates frescos e seus produtos processados. É também encontrado em alguns microrganismos e outros vegetais, tais como melancia, mamão e goiaba. Após sua absorção, o licopeno é transportado via lipoproteína de baixa densidade (LDL), onde pode atuar como um potente antioxidante *in vivo* (RAO et al., 1998).

Estudos têm demonstrado que o consumo de suco de tomate promove diversos benefícios à saúde, reduzindo os níveis de biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo, inflamação e dislipidemia (JACOB et al., 2008; GHAVIPOUR et al., 2015). Muitos dos benefícios relacionados à ingestão de tomate e seus derivados têm sido atribuídos à presença do licopeno.

Diante ao exposto, e sabendo-se que muitas das complicações observadas no DM estão relacionadas com a manutenção do estresse glico-oxidativo, torna-se extremamente interessante o estudo dos benefícios que podem ser alcançados no tratamento de animais em modelo de DM com a combinação metformina e licopeno.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes Mellitus

O DM é uma síndrome metabólica caracterizada por deficiência na secreção de insulina pelas células beta pancreáticas e/ou da resistência dos tecidos alvo às ações deste hormônio, culminando em diversos prejuízos no controle do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Além da hiperglicemia, outras alterações são observadas no DM, tais como: elevados níveis circulantes de triglicerídeos, aumento dos ácidos graxos, colesterol e da lipoproteína de baixa densidade (LDL), e diminuição dos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018; ROCHETTE et al., 2014). Dentre as principais manifestações clínicas descritas, estão: glicosúria, poliúria, perda de peso, polidipsia, polifagia e visão turva (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018).

O DM é classificado principalmente em: (i) DM tipo 1, que tem como característica a destruição das células beta do pâncreas, em geral mediada por autoimunidade, culminando em deficiência absoluta de insulina; (ii) DM tipo 2, onde observa-se predominância de resistência insulínica com disfunção pancreática e deficiência relativa de insulina; (iii) outros tipos específicos de DM, tais como defeito genético das células beta do pâncreas, endocrinopatias, dentre outras causas; (iv) DM gestacional, quando a intolerância à glicose tem início na gravidez ou primeiramente detectada durante a gestação (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018).

No DM tipo 1, a hiperglicemia se desenvolve rapidamente e independe da presença de resistência à insulina; no entanto, após longos períodos de hiperglicemia, a resistência à insulina pode surgir e aumentar gradualmente. Já no DM tipo 2, a resistência à insulina está presente por vários anos antes que a hiperglicemia crônica se desenvolva. Na resistência à insulina, ocorre uma diminuição da sensibilidade tecidual às ações da insulina, nos principais tecidos-alvo, incluindo músculo esquelético, tecido adiposo, fígado e pâncreas (LAAKSO; KUUSISTO, 2014). No fígado, a resistência à insulina culmina em aumento na produção hepática de glicose, uma vez que não ocorre inibição nos processos de glicogenólise e gliconeogênese (SALTIEL, 2001). Vários mecanismos podem ocasionar a resistência à insulina, ao interferirem com a capacidade de ativação de componentes da cascata de sinalização deste hormônio, incluindo a exposição crônica aos elevados níveis de glicose, lipídeos, estresse oxidativo, inflamação, entre outros (KAUL et al, 2015).

A insulina é um hormônio cujas ações são essencialmente anabólicas, e participa da regulação do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. No metabolismo de carboidratos, a insulina é responsável pelos seguintes eventos: aumentar a translocação de vesículas contendo os transportadores de glicose, GLUT 4, para a membrana plasmática das células, aumentando a captação da glicose; aumenta a oxidação da glicose para geração de energia, estimula a glicogênese, ou seja, a síntese de glicogênio (KAHN; SALTIEL, 2005). Estes mecanismos que promovem estimulação da captação e utilização da glicose, em combinação com a inibição na produção hepática de glicose, contribuem para a manutenção da glicemia em valores de normalidade.

No metabolismo lipídico, a insulina é responsável pelos seguintes eventos: estimular a atividade da lipase lipoproteica (LpL), enzima presente nos capilares sanguíneos que banham os tecidos adiposos e musculares, e assim promove a hidrólise dos triglicerídeos das lipoproteínas circulantes e aumenta a captação de ácidos graxos; inibir a lipase hormônio sensível (LHS), presente nos tecidos adiposos, enzima responsável pela hidrólise de triglicerídeos, disponibilizando assim menos ácidos graxos livres (AGL) (KAH; SALTIEL, 2005).

Já no metabolismo de proteínas, a insulina é responsável pelos seguintes eventos: inibir a degradação de proteínas, liberando menos aminoácidos pelos tecidos; aumentar a captação de aminoácidos pelos tecidos; aumentar a velocidade da síntese proteica (STAMP; NAIR, 2005).

Diversos modelos animais têm sido amplamente utilizados em pesquisas acerca do DM. Estudos iniciais utilizavam cães pancreatectomizados para confirmar o papel central do pâncreas na homeostase da glicose, culminando na descoberta e purificação da insulina. Atualmente, a maioria dos experimentos são realizados com roedores (REES; ALCOLADO, 2005). Para induzir o DM experimental em animais, podem ser utilizadas estratégias farmacológicas, especialmente via administração dos compostos diabetogênicos estreptozotocina (STZ) e aloxana (ALX). A STZ é captada pelas células beta pancreáticas, via transportador de glicose GLUT 2, e ocasiona a alquilação do ácido desoxirribonucleico (DNA), culminando em danos ao DNA que induzem a ativação de poli-ADP ribosilação, cuja consequência é a apoptose das células β -pancreáticas. Além disso, ocorre liberação tóxica de óxido nítrico (NO) e a formação de espécies reativas de oxigênio, incluindo radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) e peroxinitrito ($OONO^{\cdot-}$), que também participam de promoção dos danos ao DNA. Como resultado, as

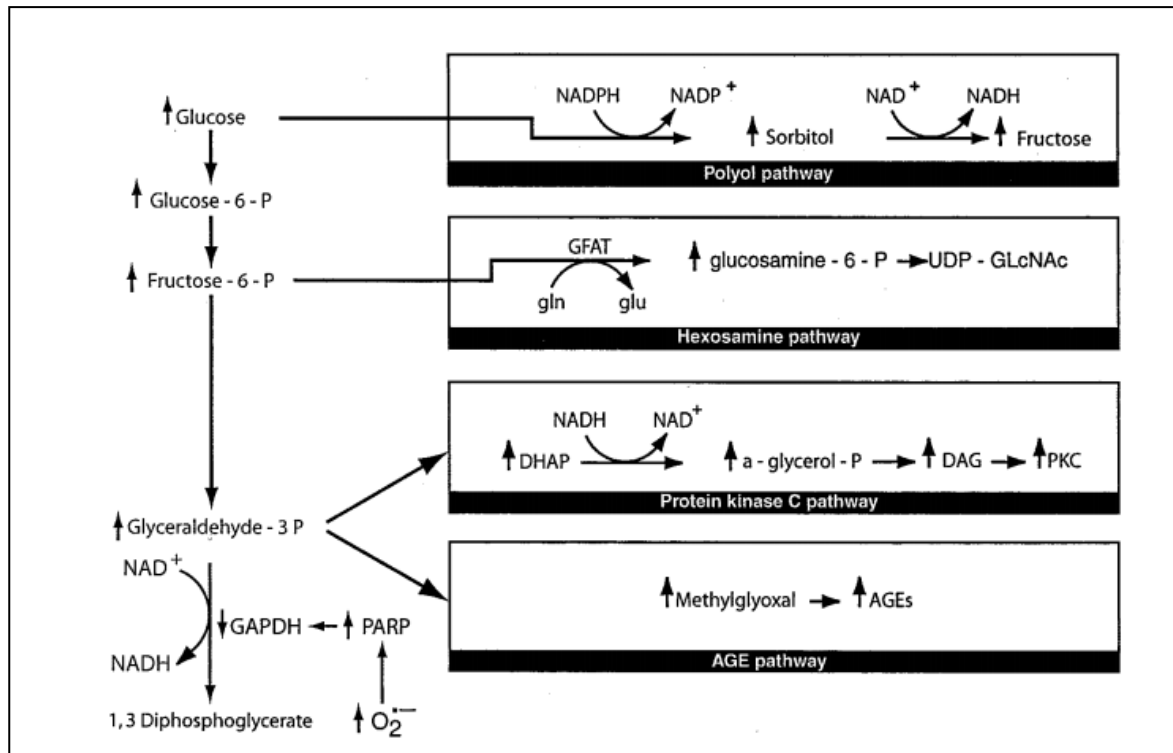
células β pancreáticas são destruídas também por necrose (SZKUDELSKI, 2001). Como ocorre uma destruição maciça e significativa das células beta pancreáticas, a administração de STZ leva ao desenvolvimento de modelo de DM que mimetiza as alterações do DM tipo 1, onde a hiperglicemia é elevada e consequentemente as complicações da doença aparecem rapidamente, tornando-se um modelo interessante para o estudo do potencial de compostos que previnem e/ou atenuam as complicações do DM relacionadas à hiperglicemia.

2.2 Estresse glico-oxidativo no DM

A manutenção da hiperglicemia, em longo prazo, é responsável por ocasionar alterações nos tecidos através de cinco mecanismos: (i) aumento do fluxo de glicose e de outros açúcares pela via dos polióis; (ii) aumento na formação intracelular de AGEs; (iii) aumento na expressão dos receptores de AGE (RAGE) na superfície das células; (iv) ativação proteína quinase C (PKC); (v) aumento da via da hexosamina. Todos estes eventos são exacerbados pelo estresse oxidativo, especialmente pelo aumento na geração de ERO na cadeia transportadora de elétrons, na mitocôndria (BROWNLEE, 2005).

A via dos polióis é composta por enzimas que pertencem a família das aldo-ceto-redutases, e podem utilizar como substratos uma ampla variedade de compostos carbonílicos, e reduzi-los aos seus respectivos álcoois de açúcar (polióis), com a oferta de poder redutor da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). A glicose é convertida em sorbitol por ação da enzima aldose redutase e para isso acontecer, há oxidação de NADPH. Posteriormente, ocorre formação de frutose por ação da sorbitol desidrogenase que, por sua vez, utiliza o NAD^+ como cofator. Uma das principais consequências de aumento no fluxo desta via é a menor disponibilidade da NADPH, molécula necessária para a regeneração da glutatona em sua forma reduzida (GSH), culminando na diminuição drástica deste antioxidante endógeno e aumentando assim o estresse oxidativo induzido por hiperglicemia (CHUNG et al., 2003).

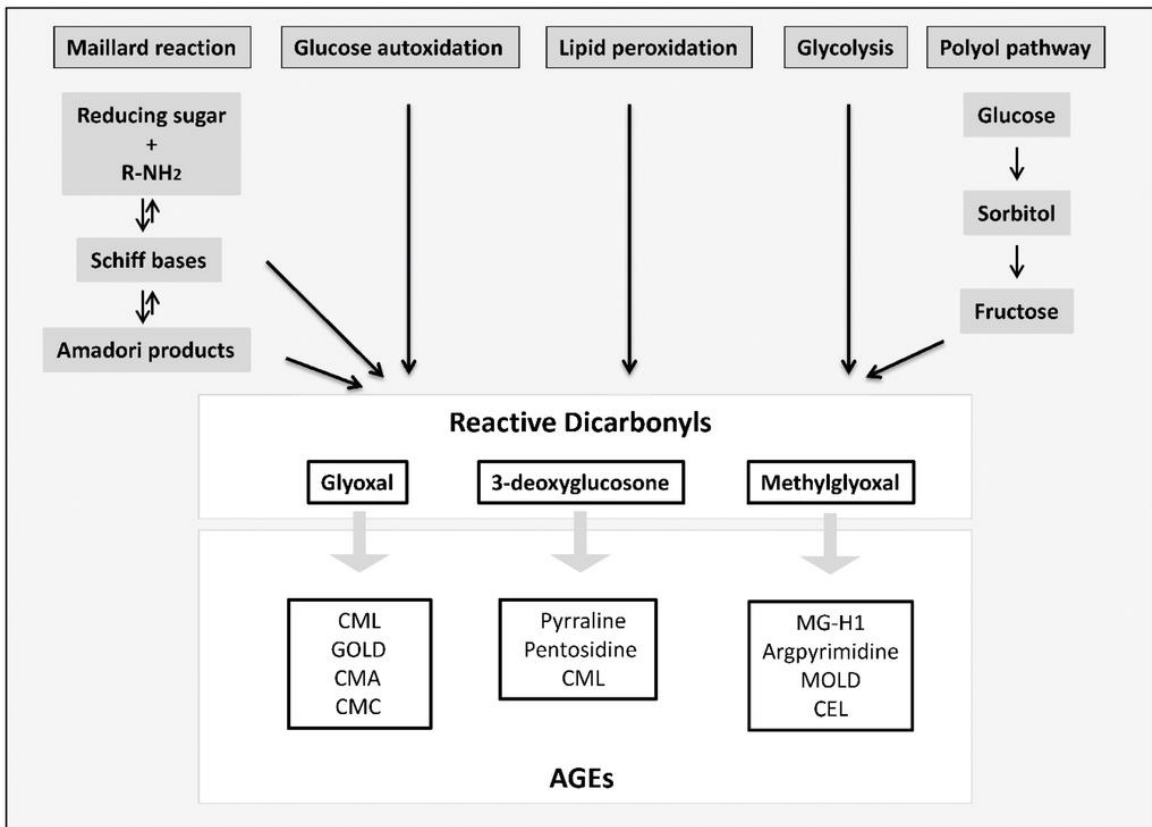
Figura 1: Vias pelo qual a hiperglicemia exacerba o estresse glico-oxidativo no DM



A hiperglicemia promove o aumento da produção mitocondrial de radical ânion superóxido através da ativação de quatro mecanismos que induzem a inibição da gliceraldeído-3-P desidrogenase (GADPH). O aumento da oferta de glicose exacerba a produção de sorbitol com utilização de NADPH, no qual promove um esgotamento dos níveis de GSH; o aumento da oferta de frutose 6-P, através da ação da glicosamina-6-fosfato aminotransferase (GFAT), é convertido em glicosamina-6P que pode ser transformado em UDP-N-GlcNAc ocasionando danos às proteínas citoplasmáticas e nucleares; o aumento do gliceraldeído 3P pode promover o aumento da produção do diacilglicerol (DAG), no qual pode ativar a PKC e também promove o aumento da formação de metilglioxal. **Fonte:** Adaptado Brownlee, 2005.

O aumento na formação dos produtos finais de glicação avançada, os AGEs é o segundo mecanismo pelo qual a hiperglicemia é responsável pelo aumento do estresse glico-oxidativo (NOWOTNY et al., 2015). A produção de AGEs ocorre inicialmente com o processo de glicação de proteínas, via reação de Maillard, quando grupos carbonílicos de monossacarídeos reagem com grupos amino de proteínas, gerando bases de Schiff, que se rearranjam em produtos de Amadori (BIERHAUS et al., 1998). Os produtos de Amadori são convertidos em dicarbonílicos altamente reativos (glioxal, metilglioxal, 3-deoxiglicosona). Estas dicarbonílicos, após desidratação e rearranjos, levam à formação de diversos AGEs, sendo os mais conhecidos Nε-(carboximetil) lisina (CML), Nε-(carboxietil) lisina (CEL), dímero de lisina derivado de glioxal (GOLD) e metilglioxal (MOLD), arg-pirimidina, pirralina, pentosidina e vesperlisinas (NOWOTNY et al., 2015).

Figura 2: Mecanismos que promovem o aumento da produção de AGEs



A produção exacerbada de AGEs pode ser devido a cinco mecanismos: (i) reação espontânea não enzimática de açúcares redutores com grupos amino de proteínas, via reação de Maillard; (ii) auto-oxidação da glicose; (iii) produtos da peroxidação lipídica; (iv) aumento do gliceraldeído-3P pela inibição da gliceraldeído-3P desidrogenase (GADPH) e (v) aumento da via dos polióis. Todos estes mecanismos são responsáveis pelo aumento da formação das dicarbonilas reativas que podem, através de rearranjos, aumentar a produção de AGEs. **Fonte:** adaptado NOWOTNY et al., 2015.

No DM não controlado, há produção exacerbada de AGEs nas matrizes intra e extracelulares; o aumento de AGEs na matriz intracelular pode ocasionar danos via os seguintes mecanismos: (i) perda da função das proteínas que são modificadas pelos AGEs; (ii) ligação dos AGEs aos receptores RAGE, presentes nas superfícies celulares de macrófagos, células do endotélio vascular, células musculares lisas, dentre outras. A ligação dos AGEs aos seus receptores RAGE é responsável por aumentar ainda mais a produção de ERO que, por sua vez, ativa o fator nuclear kappa B (NF-κB), culminando em aumento na produção de citocinas inflamatórias, tais como IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF-α) (SINGH et al., 2014; SANAJOU et al., 2018).

O receptor RAGE é encontrado em uma variedade de células, tais como células endoteliais, neuronais, fibroblastos, macrófagos, entre outras. No rim, os RAGE são encontrados em células epiteliais tubulares, glomerulares e mesangiais (OTT et al., 2014;

PASUPULATI et al., 2016). Já no fígado, os RAGE são encontrados nos hepatócitos e células perissinusoidais (YAMAGISHI; MATSUI., 2015). Em condições fisiológicas normais, a expressão de receptores RAGE é baixa, mas pode ser regulada em resposta ao estresse e/ou inflamação (HYOGO et al., 2008; YAMAGISHI; MATSUI, 2015). A interação AGE-RAGE de forma exacerbada regula diversos eventos intracelulares via ativação de vários componentes sinalizatórios, resultando em disfunção celular. Em condições patológicas, receptores RAGE quando ativados estimulam a cascata sinalizatória PI3K-Akt-IKK com ativação de NF-kB, culminando em sua translocação para o núcleo. Também promove um aumento na produção de ERO, apoptose e a autofagia. O NF-kB, além de mediar a inflamação, também aumenta a expressão de RAGE e inibe a expressão de glioxalase I (OTT et al., 2014; PASUPULATI et al., 2016; EMEL'YANOV, 2017). Os sistemas enzimáticos dependentes de glioxalase e aldeído desidrogenase são responsáveis por detoxificar adutos de açúcares precoces (produtos de Amadori) e compostos carbonílicos reativos, tais como glioxal e metilglioxal (OTT et al., 2014; PASUPULATI et al., 2016; EMEL'YANOV, 2017).

Além dos sistemas que eliminam os precursores de AGEs, existe também o complexo AGE-R, que consiste em três receptores distintos: AGE-R1/OST-48, AGE-R2/80K-H e AGE-R3/galectin-3, que está envolvido na sinalização de AGE e na endocitose de proteínas modificadas por AGEs. O receptor AGE-R1/OST-48 é encontrado nas células mesangiais, endoteliais, neuronais, fibroblastos, macrófagos, entre outras. No rim, sua expressão está diminuída em patologias, incluindo o DM (OTT et al., 2014; PASUPULATI et al., 2016). No fígado também há expressão de AGE-R1/OST-48, AGE-R2/80K-H e AGE-R3/galectin-3, sendo destacado o AGE-R3, e estes encontram-se diminuídos em patologias como o DM e cirrose, por exemplo (BUTSCHEID et al., 2007). Este receptor, quando ativado, aumenta a velocidade de remoção dos AGEs, uma vez que promove a endocitose e degradação de proteínas modificadas, portanto também possui um papel protetor contra agressões mediadas pelo estresse oxidativo, e assim previne lesões celulares e teciduais (OTT et al., 2014; PASUPULATI et al., 2016).

O quarto mecanismo pelo qual a hiperglicemia ocasiona o aumento no estresse oxidativo é através da ativação da via da PKC. Trata-se de uma enzima que apresenta 11 isoformas e é amplamente distribuída em todos os tecidos. É responsável pela fosforilação de resíduos de treonina/serina de diversos alvos proteicos; sua função depende de cálcio. Diversos mecanismos são citados como ativadores da atividade desta enzima: (i) aumento da produção de ERO; (ii) aumento na disponibilidade de NADH devido a maior velocidade da

via dos polióis; (iii) aumento da ligação AGE-RAGE (INOUCHI et al., 1992; KOYA; KING, 1998; GIACCO; BROWNLEE, 2010).

Tanto o aumento na disponibilidade de NADH quanto a produção exacerbada de $O_2^{\cdot-}$ durante o estresse oxidativo ocasionam a inibição de uma enzima chamada gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), a qual é responsável por catalisar a oxidação do glicerol-3-fosfato em dihidroxicetona-fosfato. Assim, uma vez que a enzima é inibida, ocorre o acúmulo de seu substrato, o gliceraldeído-3-fosfato, podendo assim favorecer a formação de metilglioal (precursor de AGEs) e/ou o aumento na produção de diacilglicerol (DAG). A regulação da via DAG-PKC é importante na manutenção da permeabilidade vascular, contratilidade, proliferação celular, angiogênese, ação de citocinas e adesão leucocitária (KOYA; KING, 1998). O aumento de DAG culmina na ativação da PKC que, uma vez ativada, é responsável pelo aumento da expressão de fatores pró-trombóticos e pró-inflamatórios (BROWNLEE, 2001; MADONNA; DE CATERINA, 2011; ROCHETTE et al., 2014).

A última via, não menos importante, pelo qual a hiperglicemia é responsável pelo aumento do estresse glico-oxidativo é pelo aumento da via da hexosamina. Em um quadro de hiperglicemia crônica e resistência à insulina, há um excesso da oferta de glicose e ácidos graxos para as vias oxidativas, e isto contribui para a patogênese das complicações relacionadas ao DM via aumento do fluxo da frutose-6-fosfato para a via da hexosamina. (KOLM-LITTY et al., 1998; GIACCO; BROWNLEE, 2010). Nesta via, a frutose-6-fosfato é deslocada da via glicolítica e se torna substrato de uma enzima chamada glutamina frutose-6-fosfato aminotransferase (GFAT), que converte a frutose-6-fosfato em glicosamina-6-fosfato, utilizando a glutamina como fonte de amina (GIACCO; BROWNLEE, 2010; COSTANTINO et al., 2017). O excesso de frutose-6-fosfato no DM pode ser explicado tanto pelo aumento na oferta de glicose para a via glicolítica, como também pela inibição da GAPDH. Assim, as concentrações de frutose-6-fosfato aumentam dentro da célula e aumenta, consequentemente, a ação da enzima GFAT. O excesso de glicosamina-6-fosfato é convertido em UDP-N-GlcNAc, causando orto-glico-n-acilação em resíduos de serina e treonina de proteínas citoplasmáticas e nucleares, alterando suas funções (GIACCO; BROWNLEE, 2010). Além disto, a glicosamina-6-fosfato pode interagir com diversas biomoléculas, alterando suas funções biológicas, incluindo o DNA (GIACCO; BROWNLEE, 2010; COSTANTINO et al., 2017).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) e/ou pela redução nas defesas antioxidantes. O estresse oxidativo no DM participa do estabelecimento das complicações crônicas microvasculares (retinopatias, neuropatias, nefropatias) e macrovasculares (doenças cardiovasculares e cerebrovasculares) (MADONNA; DE CATERINA, 2011). Já o estresse glicativo culmina na geração de AGEs e também tem papel crucial nas complicações diabéticas (EMEL'YANOV et al., 2010; TITOV et al., 2013). Vale destacar que galactose, frutose, ribose, triose e monossacarídeos fosforilados possuem maior reatividade no processo de glicação em comparação à glicose; no entanto, devido às altas concentrações de glicose no sangue e matriz extracelular no DM, o papel da glicose no processo de glicação de biomoléculas se torna importante (EMEL'YANOV, 2017). A formação de ligações cruzadas em proteínas é uma das principais características atribuídas aos AGEs; tais ligações modificam as estruturas das proteínas e prejudicam sua funcionalidade, contribuindo para a perda de função das biomoléculas, e precede o estabelecimento das complicações diabéticas, além de participar no processo de estabelecimento de resistência à insulina (LAPOLLA et al., 2005; VAN BUREN; LE WINTER, 2011; SOMPONG et al., 2013; SINGH et al., 2014).

Além dos danos causados em proteínas, as ERO e ERN encontram-se associadas com a oxidação de lipídeos, tanto circulantes, como àqueles presentes em LDL. ERO e ERN também oxidam lipídeos encontrados em membranas plasmáticas; este processo é chamado de peroxidação lipídica (LPO) e um dos produtos formados é o malondialdeído (MDA), utilizado como um importante biomarcador da peroxidação lipídica. Os lipídeos são particularmente vulneráveis à oxidação por ERO, e isto pode resultar na lipoperoxidação. A LPO é um processo no qual ERO atacam lipídeos, especialmente aqueles que possuem ligações duplas carbono-carbono, incluindo os ácidos graxos poli-insaturados, resultando em uma variedade de produtos. Os principais produtos primários da LPO são os hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e alguns dos produtos secundários são o malondialdeído (MDA), mais mutagênico, e o 4-hidroxinonenal (4-HNE), mais tóxico (MARNETT, 1999; AYALA et al., 2014). As células respondem à LPO de acordo com as condições metabólicas específicas e capacidade de reparo, podendo assim promover a sobrevivência ou induzir a morte celular. Sob condições fisiológicas ou baixas taxas de LPO, as células estimulam sua manutenção e sobrevivência por meio de defesas antioxidantes, porém sob altas taxas de LPO as células não conseguem reparar os danos, e assim ocorre a indução da apoptose ou necrose (AYALA et al., 2014).

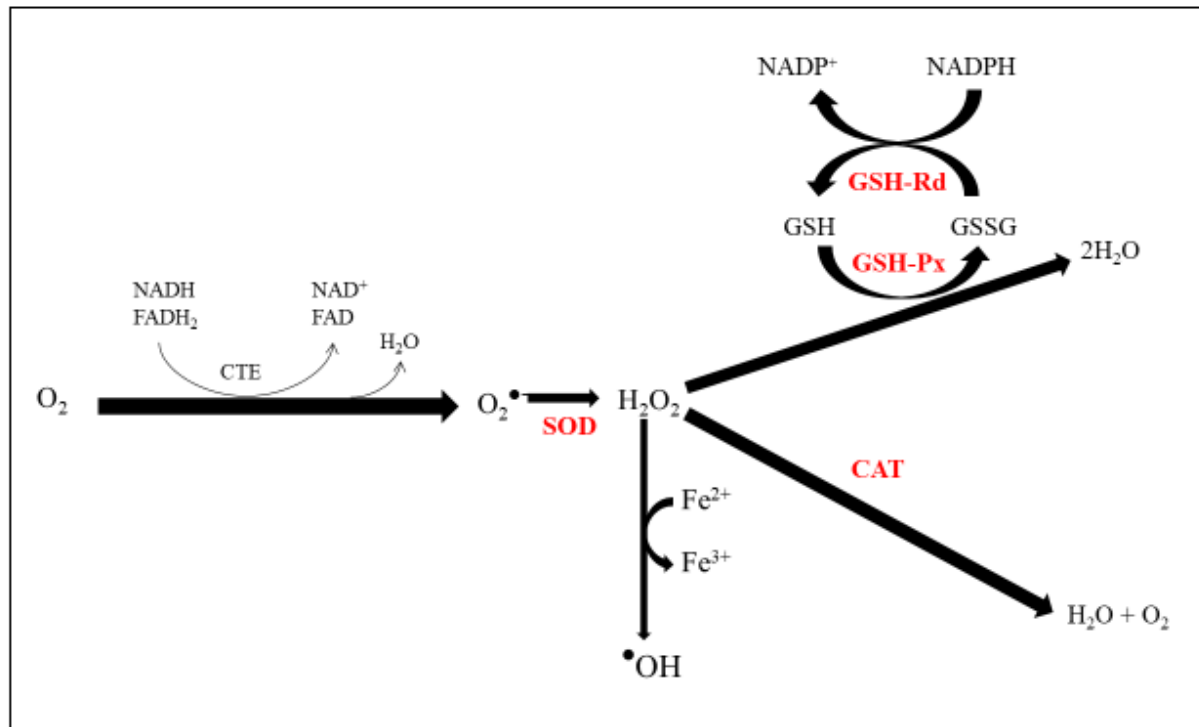
As proteínas são importantes alvos de ERO e/ou de subprodutos secundários do estresse glico-oxidativo, e dão origem as proteínas carboniladas (PCO). PCO é um marcador geral de dano oxidativo às proteínas e reflete o dano celular induzido por diversos ERO (DALLE-DONNE et al., 2006; SUZUKI et al., 2010). As PCO podem ser formadas pelos seguintes processos: (i) oxidação direta de cadeias laterais de aminoácidos (lisina, arginina, prolina e treonina); (ii) clivagem oxidativa de proteínas; (iii) via ataque dos produtos originados na LPO; (iv) via ação de açúcares redutores ou seus produtos de oxidação, via glico-oxidação (DALLE-DONNE et al., 2006).

A prevalência de vias aeróbicas para a obtenção de energia (metabolismo oxidativo) favorece a produção de ERO, o que o levou ao desenvolvimento dos mecanismos de defesa na forma de agentes ou sistemas antioxidantes. Tem-se como conceito que o antioxidante é capaz de diminuir a velocidade, impedir ou eliminar os danos oxidativos em moléculas alvo. No DM, além do aumento na produção de ERO, também ocorre uma diminuição nas atividades de algumas enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT), atribuída às alterações observadas nestas proteínas por ação das ERO ou após eventos glicativos (SINDHU et al. 2014; RAJENDRAN et al., 2014; ARCARO et al. 2014).

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

São conhecidas as ações antioxidantes endógenas da molécula de glutathione. Sabe-se que níveis diminuídos deste antioxidante estão relacionados com a exacerbação do estresse glico-oxidativo no DM. A molécula de glutathione reduzida (GSH) é oxidada (GSSG) pela ação da enzima glutathione peroxidase (GSH-Px), esta utiliza como substrato H_2O_2 bem como hidroperóxidos lipídicos. A regeneração da glutathione em sua forma reduzida ocorre via ação da glutathione redutase (GSH-Rd), a qual utiliza como poder redutor o NADPH, para reduzir GSSG em GSH (BHABAK; MUGESH, 2010).

Figura 3: Sistemas de defesas antioxidantes do organismo.



O oxigênio, através da cadeia transportadora de elétrons (CTE), promove o aumento da geração de radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que é dismutado pela ação da superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 pode ser eliminado sob a forma de água através da ação de duas enzimas antioxidantes: (i) catalase (CAT) e (ii) glutatona peroxidase (GSH-Px). Para GSH-Px exercer sua atividade é necessária a oxidação da molécula de GSH em GSSG. O ciclo é restaurado pela ação da glutatona redutase (GSH-Rd), no qual promove a redução da GSH com concomitante oxidação do NADPH à $NADP^+$. Por fim, o excesso de H_2O_2 pode reagir com o ferro, através da reação de Fenton, originando o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$). **Fonte:** Do autor, 2019.

Quando as ERO e ERN atacam componentes na LDL, ocorre a formação da LDL-oxidada, que é fagocitada pelos macrófagos, iniciando o processo de geração das células espumosas e formação da placa aterosclerótica. A paraoxonase 1 (PON 1) é uma enzima plasmática que circula associada à HDL; é responsável por proteger as lipoproteínas (especialmente a LDL) contra o ataque das ERO, sendo sua principal função a hidrólise de peróxidos lipídicos, tais como ésteres de colesterol e fosfolípidos (AVIRAM et al., 2000). Portanto, a atividade da PON 1 é de extrema importância e contribui para o potencial antiaterogênico da HDL (ROZENBERG et al., 2003).

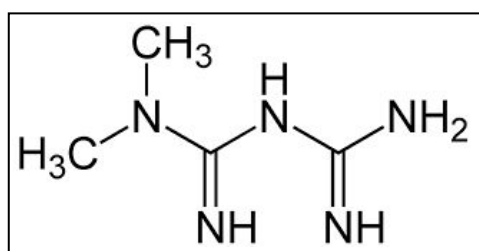
Mazur (1946) e Aldridge (1953) desempenharam um papel fundamental na identificação e classificação da PON 1. Inicialmente ela foi identificada como A-esterase, mas depois se tornou conhecida como paraoxonase devido à sua capacidade de desintoxicar o composto organofosforado paraoxon, um metabólito tóxico do Paration (pesticida agrícola). A PON 1 pertence a uma família de três tipos de paraoxonase, PON 1, PON 2 e PON 3. PON 1

e PON 3 são sintetizadas principalmente no fígado e encontradas principalmente no plasma em associação à HDL. Atualmente, a PON 1 é considerada a paraoxonase mais importante, pois possui a capacidade de hidrolisar vários intermediários oxidados, bem como a homocisteína tiolactona, um aminoácido sulfurado que participa do metabolismo da metionina, e tem sido considerado um fator de risco para aterosclerose cerebral, coronariana e periférica. Desta forma, a PON 1 tem papel protetor via atenuação do estresse oxidativo e proteção das membranas celulares contra a peroxidação lipídica, atenuando a aterosclerose (CHISTIakov et al., 2017; SHUNMOOGAM et al., 2018).

2.3 Metformina

A metformina (dimetilbiguanida) é um derivado da guanidina, o composto ativo hipoglicemiante da *Galega officinalis*. É o medicamento mais prescrito para o tratamento da hiperglicemia crônica em pacientes com DM tipo 2, em conjunto com as medidas para promoção de mudanças no estilo de vida, e que incluem dietas específicas, controle do peso corporal, prática de exercícios físicos. Trata-se de um antidiabético oral utilizado como fármaco de primeira linha de tratamento do DM nos protocolos desenvolvidos pela Associação Americana de Diabetes (ADA) e Associação Europeia dos Estudos em Diabetes (EASD), os quais foram baseados em estudos clínicos prospectivos em diabetes realizados no Reino Unido (UKPDS) (NATHAN et al., 2009; VIOLLET et al., 2012).

Figura 4: Estrutura da metformina.



Fonte: Adaptado Beissweiger e Ruggiero, 2003.

Dentre os benefícios alcançados no tratamento do DM tipo 2 com a metformina, destaca-se sua ação antihiperglicêmica sem ocasionar episódios de hipoglicemia; amenização dos quadros de resistência à insulina, diminuindo assim as complicações do DM; atua como

sensibilizador à insulina, reduzindo os níveis plasmáticos da insulina de jejum (GUNTON et al., 2003; VIOLLET et al., 2012). Também é descrita a ação benéfica da metformina na modulação de componentes do eixo das incretinas, aumentando os níveis plasmáticos do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) e induzindo a expressão gênica do receptor da incretina nas ilhotas pancreáticas (MAIDA et al., 2011; VIOLLET et al., 2012). Sabe-se que as incretinas são hormônios produzidos pelo trato gastrointestinal e liberados quando os alimentos ingeridos alcançam o trato gastrointestinal. Uma vez liberadas, as incretinas estimulam a secreção de insulina, contribuindo assim, no controle glicêmico. O hormônio incretina predominante é o GLP-1 que além de estimular a secreção de insulina, suprime a liberação do glucagon, desacelera o esvaziamento gástrico, melhora a sensibilidade à insulina e reduz o consumo de alimentos, através do aumento da saciedade (CHACRA, 2006).

Uma vez que a hiperglicemia é um dos principais fatores envolvidos no estabelecimento das complicações do DM, o tratamento da doença tem como principal objetivo a manutenção dos níveis glicêmicos próximos à normalidade. Recente revisão de Rena et al (2017) reúne os principais mecanismos através dos quais a metformina tem ação antihiperglicêmica. Uma vez nos hepatócitos, e após atravessar a membrana plasmática e a membrana mitocondrial interna, a metformina inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons, diminuindo a produção mitocondrial de ATP. Assim, ocorre aumento na razão ADP:ATP e AMP:ATP, e consequentemente há ativação da enzima AMPK (proteína quinase dependente de AMP). O aumento na razão AMP:ATP também inibe a enzima frutose-1,6-bifosfatase, culminando em inibição aguda da gliconeogênese. Em relação à AMPK, uma vez ativada, esta fosforila a enzima ACC (acetil-CoA carboxilase), inibindo assim a lipogênese, e consequentemente ocorre aumento na oxidação de ácidos graxos, reduzindo assim os estoques de lipídeos no fígado, e em última instância tais eventos culminam em aumento na sensibilidade hepática à insulina. A AMPK também fosforila e ativa a enzima fosfodiesterase do tipo 4B (PDE 4B), levando à redução nos níveis de AMPc, não havendo, portanto, ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA, induzida por glucagon) e assim também ocorre inibição da gliconeogênese. Por fim, AMPK também fosforila CRTC2 (*CREB-regulated transcriptional coactivator-2*), um fator de transcrição que, quando fosforilado, é inibido (retido no citoplasma) e assim não haverá a transcrição de genes que codificam para PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinase) e G6Pase (glicose-6-fosfatase), enzimas chave da gliconeogênese.

Também são descritas as ações da metformina no aumento da sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos e estas ações ocorrem via alguns mecanismos: (i) aumento da atividade tirosina quinase do receptor de insulina; (ii) aumento da translocação dos GLUT 4 para a membrana plasmática celular; (iii) aumento da expressão dos receptores de insulina; (iv) aumento da capacidade de restauração de componentes envolvidos na sinalização de insulina (PERNICOVA; KORBONITS, 2014).

Além dos benefícios já descritos da metformina na promoção de redução da glicemia no DM, ainda merecem destaque as suas ações inibitórias sobre os níveis de AGEs e no aumento das defesas antioxidantes (TANAKA et al., 1997; RAHBAR et al., 2000; BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2001; BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2003; ALDINI et al., 2007). Em relação as suas ações relacionadas à diminuição dos níveis de AGEs, a metformina é capaz de reagir com alguns precursores de AGEs, em especial glioxal e metilglioxal. Estudos cinéticos bem como espectros de fragmentação em massa dos produtos gerados pela reação da metformina com o glioxal e metilglioxal demonstraram a formação de um composto denominado triazepinona. A reação inicia-se com a condensação do glioxal com o grupo amino primário da metformina e após uma desidratação ocorre a formação do derivado de triazepinona. Dados experimentais e clínicos sustentam a hipótese de que a ação da metformina em reduzir as complicações relacionadas ao DM tem relação, pelo menos em parte, com a sua capacidade em diminuir os níveis de compostos dicarbonílicos e consequentemente dos AGEs (BEISSWENGER; RUGGIERO, 2001; ALDINI et al., 2007).

Mamputu et al. (2003) descreveram a capacidade da metformina em inibir a adesão e a migração de monócitos para o endotélio vascular, e assim inibe a formação de células espumosas. Estes resultados sugerem outros mecanismos pelos quais a metformina pode reduzir o risco de complicações vasculares em pacientes com DM tipo 2. Chukwunonso et al. (2016) observaram que ratos diabéticos (indução com 130 mg/kg *i.v* de aloxana) tratados com 25 mg/kg de metformina, durante 14 dias apresentaram aumento nos níveis séricos dos antioxidantes endógenos, incluindo SOD, CAT e GSH, bem como diminuição nos níveis séricos dos produtos de peroxidação, atenuando as complicações relacionadas ao DM.

A associação de metformina com produtos naturais parece ser uma opção promissora para a atenuação das complicações diabéticas. Em estudo recente de nosso laboratório, foi observado que o tratamento de ratos diabéticos durante 30 dias com a associação de metformina (250 mg/kg) e curcumina (90 mg/kg) em iogurte promoveu diminuição da dislipidemia e de marcadores do estresse glico-oxidativo, bem como promoveu aumento na

atividade da enzima antioxidante PON 1, sugerindo assim que a associação da metformina com este antioxidante de origem natural pode trazer benefícios no combate às complicações do DM, neste caso as complicações cardiovasculares (ROXO et al., 2019).

É crescente no número de estudos com resultados promissores no desenvolvimento de terapias combinadas de antidiabéticos orais (metformina) com bioativos naturais ou mesmo combinações de diferentes antioxidantes naturais entre si para suplementação em indivíduos diabéticos (BOLIGNANO et al., 2017) ou modelos experimentais da doença. A presença de compostos biologicamente ativos nos fitoterápicos e alimentos funcionais explicam o seu potencial na prevenção, redução de riscos e/ou tratamento de doenças. Esteroides vegetais, carotenóides, fibras, alcaloides e polifenóis são exemplos de compostos bioativos que possuem um amplo espectro de atividades biológicas importantes no combate a doenças (PERERA; LI, 2012; PAZ et al., 2015).

2.4 Licopeno

Algumas substâncias de origem natural podem atuar de forma sinérgica com fármacos já utilizados clinicamente, permitindo a redução das doses necessárias para produzir o efeito desejado e, conseqüentemente, minimizando os efeitos adversos (CASANOVA; COSTA, 2017). O licopeno é um carotenoide isômero acíclico do β -caroteno com onze duplas ligações conjugadas e duas ligações não conjugadas, portanto é altamente insaturado. É responsável pela coloração vermelha de tomates frescos e seus produtos processados (CEFALI et al., 2009). É também encontrado em alguns microrganismos e outros vegetais, tais como melancia, mamão e goiaba. Após sua absorção, o licopeno é transportado via LDL, onde pode atuar como um potente antioxidante in vivo (YANG et al., 2012).

Sabe-se que a LDL contém uma grande quantidade de ácidos graxos insaturados (em fosfolípídeos), os quais podem ser alvos das espécies reativas produzidas em excesso no DM. Assim, quando estas espécies reativas oxidam componentes estruturais da LDL, geram inúmeros aldeídos ativos que, por sua vez, reagem com resíduos de lisina das apolipoproteínas (apo B) presentes na LDL, modificando-as, formando a LDL oxidada. Portanto, a formação de LDL oxidada tem correlação direta com o aumento nos níveis de colesterol e de LDL, bem como com a produção aumentada das espécies reativas. No entanto, a HDL é capaz de reverter/atenuar este quadro via remoção dos fosfolípídeos oxidados na membrana da LDL, tornando-a menos “prejudicial”. Assim, o licopeno, sendo um potente

Em relação aos benefícios do licopeno no DM, tem sido demonstrado que o carotenoide atenua a disfunção endotelial e o estresse oxidativo, reduzindo os níveis de LDL-ox, portanto contribui para a redução do risco cardiovascular (ZHU et al., 2011). O licopeno também é capaz de proteger os rins contra a nefropatia diabética, via redução do estresse oxidativo, promovendo aumento nas enzimas antioxidantes SOD, CAT (ALI e ACHA, 2009) e GSH-Px, e redução nos níveis de malondialdeído (MDA), marcador de peroxidação lipídica (GUO et al., 2015). Ainda, foram descritas as ações protetoras do licopeno contra o dano oxidativo no DNA, proteínas e lipídeos e também na modulação da comunicação intercelular, inibindo a proliferação de células tumorais no endométrio e pulmões (ZHANG et al., 1991; LEVY et al., 1995; RAO et al., 1998.; ALI; AGHA, 2009). Estudo realizado por Ozmen et al. (2016) demonstrou que o licopeno é capaz de atuar sobre as células β pancreáticas, prevenindo sua destruição e consequentemente atenuando os prejuízos na secreção de insulina. O licopeno também foi capaz de diminuir a vacuolização das ilhotas de Langerhans, ou seja, reduziu a degeneração celular pancreática.

Estudo de nosso laboratório observou os diversos benefícios alcançados após os tratamentos de ratos diabéticos durante 50 dias com iogurte enriquecido com combinações de fitoquímicos: **curcumina** (extrato dos rizomas de *Curcuma longa*, contendo 65% de curcumina), **licopeno** (extrato de tomate, contendo 10,13% de licopeno) ou **bixina** (extrato das sementes de *Bixa orellana*, contendo 60% de bixina). Os tratamentos com as misturas **curcumina + bixina** ou **curcumina + licopeno** apresentaram efeitos combinados, que preservaram os benefícios alcançados com os tratamentos isolados: nos tratamentos combinados, houve redução em biomarcadores de distúrbios do metabolismo de carboidratos e lipídeos (efeitos da curcumina), aumento nos níveis de HDL (efeitos dos carotenoides, licopeno ou bixina) e redução no estresse oxidativo (efeitos da curcumina e dos carotenoides). Os efeitos combinados das misturas curcumina + licopeno ou curcumina + bixina também preveniram a oxidação de LDL, sugerindo que a suplementação com misturas de fitoquímicos tenha potencial para prevenir ou atenuar complicações cardiovasculares no DM (ASSIS et al., 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar as alterações em biomarcadores fisio-metabólicos, do estresse glicoxidativo e potencial antioxidante em ratos diabéticos tratados, durante 30 dias, com iogurte enriquecido com metformina ou licopeno, isolados ou co-administrados.

3.2 Objetivos específicos

Em ratos diabéticos induzidos com STZ (mimetizando as alterações observadas no DM tipo 1) e tratados com 4U/animal de insulina, 250 mg/kg de metformina, 45 mg/kg de licopeno ou com metformina + licopeno em iogurte, durante ou após 30 dias, avaliar:

- Parâmetros fisiológicos (peso corporal, ingestão alimentar, ingestão hídrica e volume urinário) bem como as massas dos tecidos corporais (músculos esqueléticos *soleus* e *extensor digitorum longus*, EDL, e tecidos adiposos brancos retroperitoneal e epididimal);
- Níveis de biomarcadores plasmáticos relacionados ao metabolismo de carboidratos e lipídeos (glicose, triglicerídeos, colesterol total e colesterol-HDL) e marcador de integridade hepática (ALT);
- Tolerância à glicose, via teste de tolerância à glicose oral (TTGO);
- Níveis de TBARS no plasma e sobrenadantes de fígado e rim;
- Níveis de PCO no plasma e sobrenadantes de fígado e rim;
- Atividade de PON 1 no plasma;
- Atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT nos sobrenadantes de fígado e rim, bem como componentes do sistema da glutatona [níveis de GSH (representada pela análise de grupos tiois não proteicos), atividades de GSH-Rd e GSH-Px];
- Níveis de AGEs fluorescentes no plasma e sobrenadantes de fígado e rim.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar, com peso de 150 ± 10 g, provenientes do Biotério Central do Câmpus de Botucatu, UNESP. Os animais permaneceram no Biotério do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara, UNESP. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP, Câmpus de Araraquara/SP (CEUA/FCF/CAr nº 23/2017, Anexo I).

4.2 Indução do diabetes mellitus experimental

O DM foi induzido via administração intravenosa (veia jugular) de 40 mg de estreptozotocina (STZ)/kg de peso corporal. Para realização deste procedimento, os animais foram submetidos à jejum prévio de 12 horas para administração de 40 mg de STZ) por kg de peso corporal, e após a administração do fármaco diabetogênico, os animais permaneceram em jejum por mais 90 minutos. Em paralelo aos animais que receberam STZ, foi conduzido um grupo de animais normais, não diabéticos, que foram submetidos aos mesmos procedimentos, porém, recebendo somente tampão citrato. Três dias após a administração de STZ, os animais foram distribuídos nos diferentes grupos experimentais realizando-se um pareamento, utilizando-se a glicemia e o peso corporal, cujos valores médios iniciais apresentaram a maior proximidade.

4.3 Desenho experimental

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais (10 animais/grupo):

- ✓ Ratos normais, não diabéticos, tratados com iogurte (NIOG);
- ✓ Ratos diabéticos tratados com iogurte (DIOG);
- ✓ Ratos diabéticos tratados com 4U/dia de insulina (DINS);
- ✓ Ratos diabéticos tratados com 250 mg/kg de metformina em iogurte (DMET);
- ✓ Ratos diabéticos tratados com 45 mg/kg de licopeno em iogurte (DLIC);
- ✓ Ratos diabéticos tratados com 250 mg/kg de metformina + 45 mg/kg de licopeno em iogurte (DLICMET).

Licopeno e/ou metformina foram incorporados ao iogurte natural (Nestle®) em ambiente termostatizado (25°C) durante 90 segundos, sob rotação de 27000 rpm em homogeneizador Metabo®. As doses utilizadas de metformina e licopeno foram selecionadas de acordo com estudos previamente realizados em nosso laboratório, sendo as doses que promoveram as respostas mais efetivas de melhoria nas alterações fisiológicas e bioquímicas no diabetes experimental (ROXO et al., 2019; ASSIS et al., 2017).

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais, em tempos determinados (0, 15 e 30 dias), recebendo água e ração “*ad libitum*”, onde permaneceram durante três dias, para adaptação. O biotério encontrava-se nas seguintes condições ambientais: ciclo de luz de 12 horas (luzes acessas às 6:00 e desligadas às 18:00 horas), temperatura constante de 23°C ± 1°C e umidade de 55 ± 5%. A leitura da gaiola metabólica de 24 horas foi realizada a cada 15 dias. Para tal procedimento, foram oferecidos aos animais, em cada gaiola, massa de ração (50 g) e volume de água (200 mL) conhecidos, foi colocado frasco coletor de urina limpo, seco e contendo tolueno para a coleta da urina, e posterior determinação do volume urinário. Os parâmetros analisados foram: peso corporal, ingestão alimentar, ingestão hídrica e volume urinário. Após a análise dos parâmetros referentes à gaiola metabólica, os animais eram colocados em caixas de polietileno, onde permaneciam durante os demais dias de experimento.

Os animais foram tratados, durante 30 dias, com os compostos incorporados em iogurte por via orogástrica duas vezes ao dia (8:00 e 18:00 horas), em volume de 0,5 mL de

iogurte/animal/administração; cada administração continha 50% da dose diária dos compostos.

Animais dos grupos NIOG e DIOG receberam somente iogurte duas vezes ao dia. Animais do grupo DINS receberam insulina (Humolin®) preparada em solução de NaCl 0,85% por via subcutânea, em duas doses diárias de 2U cada.

O sangue para determinação da glicemia foi coletado a cada 10 dias. A coleta foi realizada via caudal, após vasodilatação, em tubos *Eppendorf* contendo heparina sódica, após centrifugação a 664 g durante 10 minutos, o plasma foi obtido e a análise da glicemia foi realizada.

Após 28 dias de tratamento, os animais foram jejuados por 12 horas (com início às 21:00 horas) e submetidos ao teste tolerância à glicose oral (TTGO) às 09:00 horas da manhã do dia seguinte (2,5 g/kg glicose, via oral). A glicemia foi determinada antes (0 min) e depois (15, 30, 60, 90, 120 minutos) da sobrecarga de glicose, tal como descrito por Xu et al. (2009), com modificações, através do método da glicose oxidase (TRINDER, 1969).

Após 30 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados, via decapitação (guilhotina para roedores), para retirada do sangue total e obtenção do plasma para determinação dos níveis de glicose, triglicerídeos, colesterol total, colesterol-HDL, AGEs fluorescentes, proteínas carboniladas (PCO), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), enzima paraoxonase 1 (PON 1) e ALT. Também foram retirados os rins e fígado, armazenados à -80°C para posterior determinação de PCO, TBARS e AGEs, bem como enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GSH-Px, GSH-Rd) e também concentração de GSH (representados por tióis não proteicos). Tecidos adiposos brancos epididimal e retroperitoneal e os músculos *soleus* e *extensor digitorum longus* (EDL) foram retirados e pesados.

4.4 Determinações bioquímicas

4.4.1 Glicemia, método da glicose oxidase

A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose à ácido glucônico e H₂O₂. O H₂O₂ reage com 4-aminoantipirina, sob a ação de peroxidase, formando uma antipirilquinonimina, monitorada em 505 nm, e cuja intensidade de absorção é proporcional à concentração da glicose na amostra (TRINDER, 1969).

4.4.2 Colesterol total, método da colesterol oxidase

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

4.4.3 Triacilglicerol, método enzimático de reações acopladas

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

4.4.4 Colesterol-HDL, método indireto por inibição seletiva

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

4.4.5 Determinação dos níveis de alanina aminotransferase (ALT)

As concentrações plasmáticas de ALT foram realizadas utilizando kits comerciais da Vitros Chemistry Products (Ortho Clinical Diagnostics). A camada de difusão dos slides contém os substratos alanina e α -cetoglutarato de sódio. A ALT catalisa a transferência do grupo amino da alanina para o α -cetoglutarato, na presença do piridoxal-5-fosfato, produzindo

piruvato e oxaloacetato; o piruvato é oxidado à acetilfosfato e é gerado peróxido de hidrogênio via uma oxidase de piruvato. A reação final consiste na oxidação de corante leuco pelo peróxido de hidrogênio, na presença de uma peroxidase, com a formação de cromóforo. A alteração da densidade da reflectância é proporcional à atividade de ALT na amostra.

4.4.6 Avaliação da peroxidação lipídica

Amostras de rim (0,25 g) foram homogeneizadas em 1 mL de cloreto de potássio 1,15%. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g por 10 min a 4° e os sobrenadantes utilizados para as análises. As amostras (plasma e sobrenadantes de fígado e rim) foram desproteinizadas com ácido perclórico 10%, de acordo com Pilz et al. (2000). Os dienos, produtos finais de peroxidação lipídica, incluindo malondialdeído (MDA), foram determinados usando a reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (KOHN; LIVERSEDGE, 1944). Os níveis de TBARS foram medidos espectrofotometricamente a 535 nm (fígado e rim) ou fluorimetricamente (plasma) nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 510 nm e 553 nm, respectivamente. Foi realizada uma curva analítica e o 1,1',3,3'-tetrametoxipropano foi utilizado como padrão. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ (plasma) e em nmol/g de tecido (fígado e rim).

4.4.7 Quantificação de grupos carbonilas de proteínas

Os níveis PCO no plasma, fígado e rim foram determinados de acordo com o método descrito por Levine et al. (1994). As amostras de fígado e rim (0,2 g) foram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 6,7. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g por 10 min a 4° e os sobrenadantes utilizados para as análises. Os grupos carbonilas presentes nas proteínas reagem com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) formando 2,4-dinitrofenilhidrazona, que absorve luz em 370 nm. A concentração de PCO foi obtida utilizando o coeficiente de extinção molar da hidrazona ($22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e expressa em nmol de PCO/mg de proteína.

4.4.8 Atividade de paraoxonase 1

A atividade de PON 1 foi determinada no plasma via hidrólise de paraoxon e liberação de *p*-nitrofenol, de acordo com Costa et al. (1990) e modificações segundo Assis et al. (2017). O ensaio consiste de plasma em tampão Tris-HCl (15 mM), pH 8,5, contendo 0,15 mM de CaCl_2 , 0,3 M de NaCl e 1,2 mM de paraoxon. O ensaio foi realizado a 37°C e iniciado pela adição de paraoxon. A atividade foi monitorada medindo-se a absorbância a 405 nm por 5 min. Os resultados foram calculados assumindo o coeficiente de extinção molar de *p*-nitrofenol ($18.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (RICHTER et al, 2008). A atividade da PON 1 foi expressa em unidades/litro (unidade = μmol paraoxon hidrolisado/min).

4.4.9 Determinação da concentração de grupos tióis não proteicos

As concentrações de grupos tióis não proteicos são uma medida indireta dos níveis de GSH, e foram determinados de acordo com Sedlak e Lindsay (1968), em função da redução do ácido 5,5-ditio-2-nitrobenzoico (DTNB), medido espectrofotometricamente em 412 nm. Os resultados foram expressos em mmol de grupos tióis não proteicos/mg de tecido (fígado e rim).

4.4.10 Atividades de enzimas antioxidantes em fígado e rim

4.4.10.1 Preparo das amostras

Amostras de fígado e rim (0,1 g) foram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato de sódio (10 mmol /L; pH 7,4). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g por 10 min a 4° e os sobrenadantes utilizados para as análises descritas a seguir.

4.4.10.2 Atividade da enzima superóxido dismutase

A atividade de SOD foi determinada de acordo com Beauchamp e Fridovich (1971), onde a oxidação da xantina gera o $\text{O}_2^{\bullet-}$ pela ação catalítica da xantina oxidase, o qual reduz o *nitroblue tetrazolium* (NBT) a uma formazana. Na presença de SOD ocorre inibição da

redução do NBT, monitorada em 550 nm. Os resultados foram expressos como U/mg de proteína. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução do NBT em 50 %.

4.4.10.3 Atividade da enzima catalase

A atividade de CAT foi monitorada pelo consumo do H_2O_2 monitorado em 230 nm (BEERS; SIZER, 1952). Os resultados foram expressos como mmol de H_2O_2 consumido/min/mg de proteína.

4.4.10.4 Atividade da enzima glutathione peroxidase

Determinou-se a atividade da GSH-Px de acordo com o método descrito por Rush e Scandiford (2003). A GSH-Px catalisa a oxidação de GSH na presença de H_2O_2 . Na presença de glutathione reductase (GSH-Rd), a glutathione oxidada (GSSG) é reduzida à GSH com oxidação concomitante do NADPH à 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.

4.4.10.5 Atividade da enzima glutathione reductase

A atividade da GSH-Rd foi avaliada de acordo com Carlberg e Mannervik (1985) via mensuração da velocidade de oxidação do NADPH com a concomitante redução da glutathione oxidada (GSSG) a 25°C acompanhada por 3 minutos espectrofotometricamente a 340 nm. Os resultados foram expressos em mmol de NADPH consumido/min/mg de proteína.

4.4.11 Estimativa dos produtos finais de glicação avançada

Os AGEs totais foram estimados por fluorometria tal como descrito por Zilin et al. (2001) e Pokupiec et al. (2003), com modificações. Os homogenatos de fígado e rim foram preparados conforme item 4.4.10.1. No plasma e nos sobrenadantes dos homogenatos de

fígado foram adicionados 1,21 M (plasma) e 2,42 M (fígado) de clorofórmio, 0,12 M de ácido tricloracético e 0,1 M de hidróxido de sódio (NaOH); os tubos foram homogeneizados em vórtex e mantidos a 8-10°C durante 30 minutos e posteriormente centrifugados à 10.000 g durante 10 minutos a 10°C. Nos sobrenadantes dos homogenatos de rim foi adicionado 0,1 M de NaOH; os tubos foram homogeneizados em vórtex e centrifugados à 10.000 g durante 10 minutos a 10°C. Em seguida as amostras foram lidas em espectrofluorímetro (comprimentos de onda de excitação 370 nm e de emissão 440 nm). Os resultados foram expressos em Unidades Arbitrárias de fluorescência/mg de proteína (UA/mg proteína).

4.4.12 Dosagem de proteínas totais

As proteínas foram quantificadas no plasma e nos sobrenadantes dos homogenatos dos tecidos (fígado e rim) de acordo com o método de Lowry et al. (1951).

4.4.13 Análise dos resultados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados via avaliação da variância One way (ANOVA) seguida da análise de diferença pelo teste Student-Newman-Keuls, para comparações intergrupos. O teste t-Student's foi utilizado para comparações intragrupo nos parâmetros relativos ao dia 0. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,05$. As análises supracitadas, foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism® 6.0.

5.RESULTADOS

5.1 Parâmetros fisiológicos e bioquímicos de animais diabéticos não tratados e tratados com 4U/animal de insulina, 250 mg/kg de metformina e/ou 45 mg/kg de licopeno em iogurte

Animais do grupo DIOG apresentaram menor ganho de peso corporal quando comparado ao grupo NIOG, a partir do 15º dia de experimento. Também é possível observar que animais do grupo DINS apresentaram maior ganho de peso corporal em relação aos demais animais diabéticos (DIOG, DMET, DLIC e DLICMET) a partir do 15º dia de experimento, alcançando valores de peso corporal semelhantes aos animais normais (NIOG). Não foram observadas diferenças significativas no ganho de peso corporal de animais dos grupos DMET, DLIC e DLICMET, em relação aos animais DIOG, durante todo o período experimental, sugerindo que os tratamentos com metformina ou licopeno, isolados ou combinados, não influenciaram no ganho de peso corporal em animais diabéticos (Tabela 1).

Na Tabela 1, além dos valores de peso corporal, também estão apresentados os resultados referentes à ingestão alimentar, ingestão hídrica e volume urinário de ratos normais e diabéticos, tratados com iogurte ou tratados com insulina, metformina, licopeno ou metformina + licopeno em iogurte, após 0, 15 e 30 dias.

Animais DIOG apresentaram um aumento significativo na ingestão alimentar, quando comparados aos animais NIOG, desde o início do experimento (dia 0). Vale destacar que houve um aumento da ingestão alimentar nos animais pertencentes ao grupo diabético DIOG após 30 dias, quando em comparação com o início (dia 0) e meio (dia 15) do experimento. Os tratamentos dos ratos diabéticos com insulina, metformina ou licopeno foram capazes de promover redução na ingestão alimentar, quando comparados aos animais DIOG, a partir do 15º dia de tratamento (Tabela 1).

Todos os animais diabéticos apresentaram um aumento na ingestão hídrica no dia 0, isto é, antes dos inícios dos tratamentos, quando comparados aos animais NIOG. Os ratos diabéticos que receberam insulina (DINS), a partir do 15º dia de tratamento, apresentaram uma diminuição significativa de valores relacionados à ingestão hídrica quando comparados aos animais tratados somente com iogurte (DIOG). Animais tratados com metformina ou licopeno apresentaram um aumento na ingestão hídrica a partir do dia 0, quando comparados aos animais NIOG. No entanto, os animais diabéticos tratados com licopeno apresentaram

uma redução significativa da ingestão hídrica, após 30 dias de tratamento, quando comparados aos animais DIOG. Interessantemente, animais tratados com a associação metformina + licopeno apresentaram uma diminuição na ingestão hídrica a partir do 15º dia de tratamento, quando comparados aos animais DIOG (Tabela 1).

Todos os animais diabéticos também apresentaram um aumento significativo no volume urinário em relação aos animais NIOG, no dia 0 (antes do início dos tratamentos). Os ratos diabéticos que receberam insulina (DINS), a partir do 15º dia de tratamento, apresentaram menores valores de volume urinário em relação aos ratos diabéticos DIOG. Os animais tratados com metformina apresentaram um aumento do volume urinário quando comparado aos animais normais a partir do início do experimento (dia 0) e, ao longo do período experimental, não foram observadas diferenças estatísticas quando comparado aos animais diabéticos DIOG. Já animais tratados com licopeno, após 30 dias, apresentaram uma diminuição do volume urinário quando comparado aos animais DIOG. Animais diabéticos tratados com metformina + licopeno apresentaram redução significativa do volume urinário, quando comparados aos animais diabéticos DIOG, a partir do 15º dia de tratamento (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros fisiológicos (peso corporal, ingestão alimentar, ingestão hídrica e volume urinário) de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno incorporados em iogurte, no início (dia 0), meio (dia 15) e final (dia 30) do experimento.

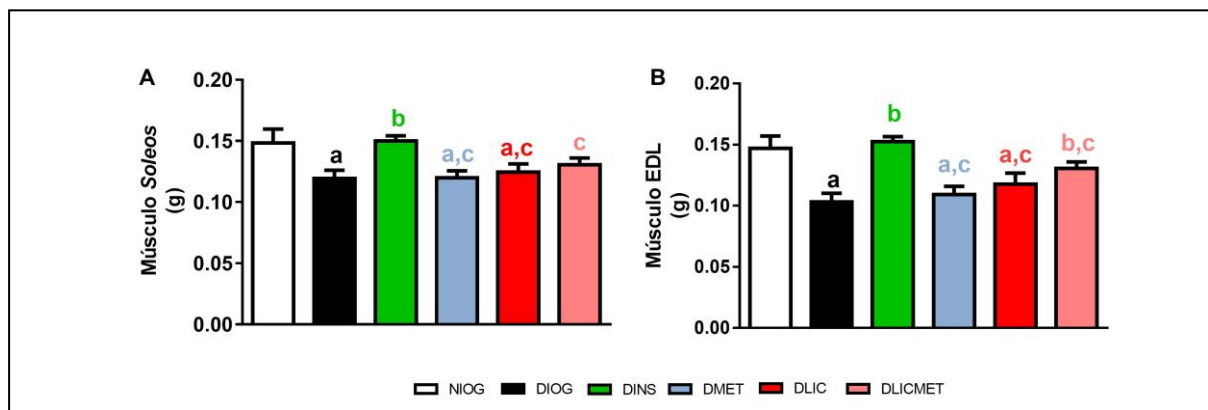
Dias de tratamento	Grupos																	
	NIOG			DIOG			DINS			DMET			DLIC			DLICMET		
	0	15	30	0	15	30	0	15	30	0	15	30	0	15	30	0	15	30
Peso corporal (g)	163,5± 3,28 (#)	240,1± 7,17 (#)	297,2± 8,77 (#)	176,4± 3,66	225,2± 6,70 (a,#)	240,0± 10,40 (a,#)	168,9± 2,70	255,1± 4,84 (b,#)	305,5± 4,84 (b,#)	172,8± 3,26	219,8± 6,45 (a,c,#)	240,8± 9,30 (a,c,#)	171,4± 3,94	234,5± 7,80 (c,#)	263,9± 11,70 (a,c,#)	170,1± 3,09	225,7± 2,98 (a,c,#)	258,6± 8,30 (a,c,#)
Ingestão alimentar (g/12h)	20,7± 0,63	26,4± 2,05 (#)	24,6± 1,13 (#)	27,6± 1,31 (a)	39,9± 2,40 (a,#)	39,9± 3,36 (a,#)	27,6± 1,31 (a)	26,6± 2,44 (b)	25,0± 1,62 (b)	26,6± 2,44 (a)	32,2± 2,95	25,4± 4,45 (b)	27,8± 1,30 (a)	31,4± 1,72 (b)	25,9± 3,28 (b)	26,0± 0,84 (a)	29,8± 3,15 (b)	26,1± 3,31 (b)
Ingestão hídrica (ml/24h)	38,0± 11,66	22,6± 2,64	30,9± 3,99	107,9± 6,08 (a)	145,2± 17,48 (a)	162,5± 19,82 (a,#)	102,4± 12,67 (a)	48,8± 17,59 (b)	45,3± 19,24 (b,#)	106,2± 16,48 (a)	97,0± 23,27 (a)	100,6± 29,95 (a)	106,3± 16,48 (a)	97,0± 19,64 (a)	88,3± 24,5 (b)	110,0± 14,07 (a)	50,4± 14,9 (b,#)	48,9± 18,13 (b,#)
Volume urinário (ml/24h)	8,2± 0,70	8,6± 0,68	9,1± 0,70	73,9± 8,27 (a)	115,0± 16,06 (a)	130,5± 16,61 (a,#)	75,4± 13,17 (a)	34,1± 13,18 (b)	40,0± 21,95 (b)	74,3± 15,88 (a)	81,4± 21,99 (a)	78,9± 24,49	77,4± 10,00 (a)	74,2± 16,20 (b)	74,3± 18,31 (b)	76,4± 9,12 (a)	37,0± 12,12 (b,#)	40,3± 19,4 (b)

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$.

- a, diferenças com NIOG;
- b, diferenças com DIOG;
- c, diferenças com DINS;
- d, diferenças com DMET;
- e, diferenças com DLIC;
- #, diferença com o dia 0.

Ratos diabéticos DIOG apresentaram uma redução significativa nas massas dos músculos esqueléticos, em relação às massas encontradas em músculos de animais NIOG (Figura 6A e 6B). Os tratamentos de animais diabéticos com metformina ou licopeno em iogurte não foram eficazes na promoção de ganho de massa muscular (ou prevenção de perda de massa muscular), quando comparados aos animais DIOG (Figura 6A). Em relação ao tratamento de animais diabéticos com metformina + licopeno em iogurte, pode-se notar que este foi eficaz na prevenção da perda de massa de músculos EDL, enquanto que em músculos *soleus* não foram observadas diferenças nas massas, quando comparados os animais DLICMET *versus* DIOG (Figura 6A e 6B).

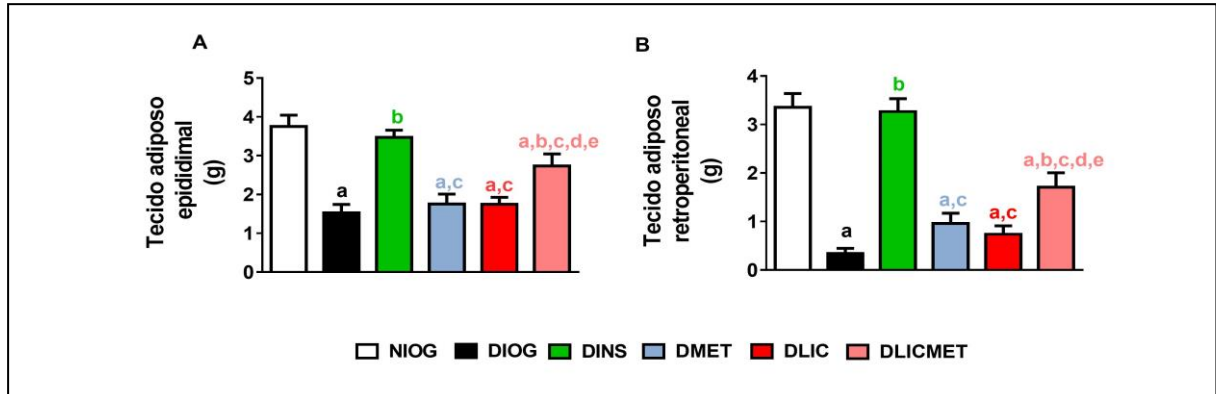
Figura 6: Massas dos músculos esqueléticos de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno incorporados em iogurte, após 30 dias.



(A) Músculos *soleus* (g) e (B) Músculos EDL (g). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. A, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DMET; e, diferenças com DLIC.

Em todos os grupos de animais diabéticos, exceto aqueles tratados com insulina (DINS), houve uma redução nas massas de tecidos adiposos. Animais diabéticos tratados com insulina (DINS) apresentaram valores de massas de tecidos adiposos próximos aos valores observados em animais do grupo normal (NIOG) (Figura 7A e 7B). Os animais diabéticos tratados com metformina ou licopeno em iogurte não apresentaram diferenças nas massas de tecidos adiposos quando comparados aos animais DIOG. Surpreendentemente, os animais diabéticos tratados com metformina + licopeno em iogurte apresentaram maiores massas de tecidos adiposos brancos, quando comparados com os animais diabéticos tratados com iogurte (DIOG) ou tratados com metformina ou licopeno isoladamente (DMET e DLIC) (Figura 7A e 7B).

Figura 7: Massas dos tecidos adiposos brancos, epididimal e retroperitoneal de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno incorporados em iogurte, após 30 dias.



(A) Tecido adiposo branco epididimal (g) e **(B)** Tecido adiposo branco retroperitoneal (g). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DMET; e, diferenças com DLIC.

Animais diabéticos apresentaram valores de glicemia de aproximadamente 400 mg/dL no pareamento (tempo 0, antes do início dos tratamentos), o que nos permite confirmar a instalação do DM experimental (Figura 8A). No decorrer do período experimental, animais DIOG apresentaram níveis glicêmicos progressivamente maiores, alcançando valores médios de 550 mg/dL ao final dos 30 dias de experimento, culminando assim em um maior valor de AUC da glicemia, o que sugere a maior vulnerabilidade destes animais às complicações do DM relacionadas ao estresse glico-oxidativo (Figura 8B).

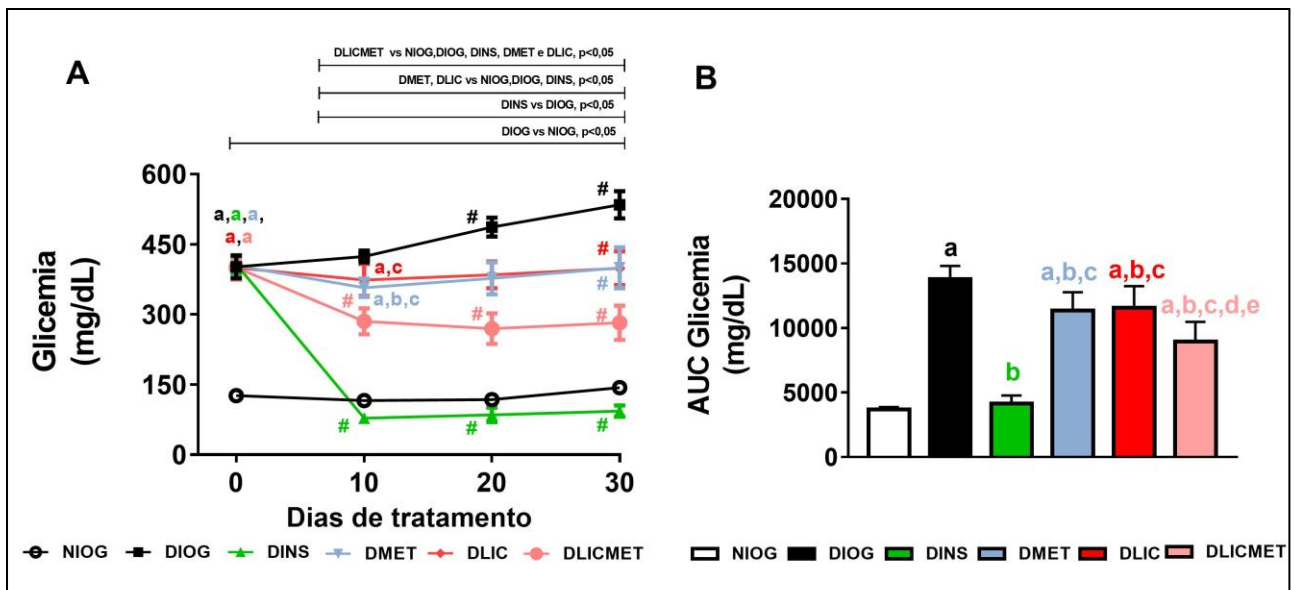
Pode ser observado na figura 8A e 8B que a glicemia dos animais do grupo NIOG manteve-se constante e em valores dentro da normalidade, desde o pareamento até o final do período experimental. Os ratos diabéticos que receberam insulina (DINS) apresentaram uma redução significativa da glicemia, bem como menor AUC da glicemia, apresentando valores médios de glicemia e de AUC da glicemia semelhantes aos encontrados em animais não diabéticos (NIOG).

Os animais diabéticos tratados com metformina em iogurte apresentaram uma melhora nos níveis glicêmicos quando comparados aos valores encontrados em animais DIOG, a partir do 10º dia de tratamento (Figura 8A). Também foi possível observar valores maiores da AUC da glicemia de animais DMET, quando comparados aos grupos NIOG e DINS, porém menores em relação aos valores do grupo DIOG (Figura 8B). O tratamento com licopeno em iogurte também foi capaz de melhorar os níveis glicêmicos de animais diabéticos, quando

comparados aos animais DIOG (Figura 8A). Analisando a AUC da glicemia do grupo DLIC, assim como a AUC do grupo DMET, é possível observar valores maiores quando comparados aos grupos NIOG e DINS, porém a AUC da glicemia do grupo DLIC também foi menor que aquela observada no grupo DIOG (Figura 8B).

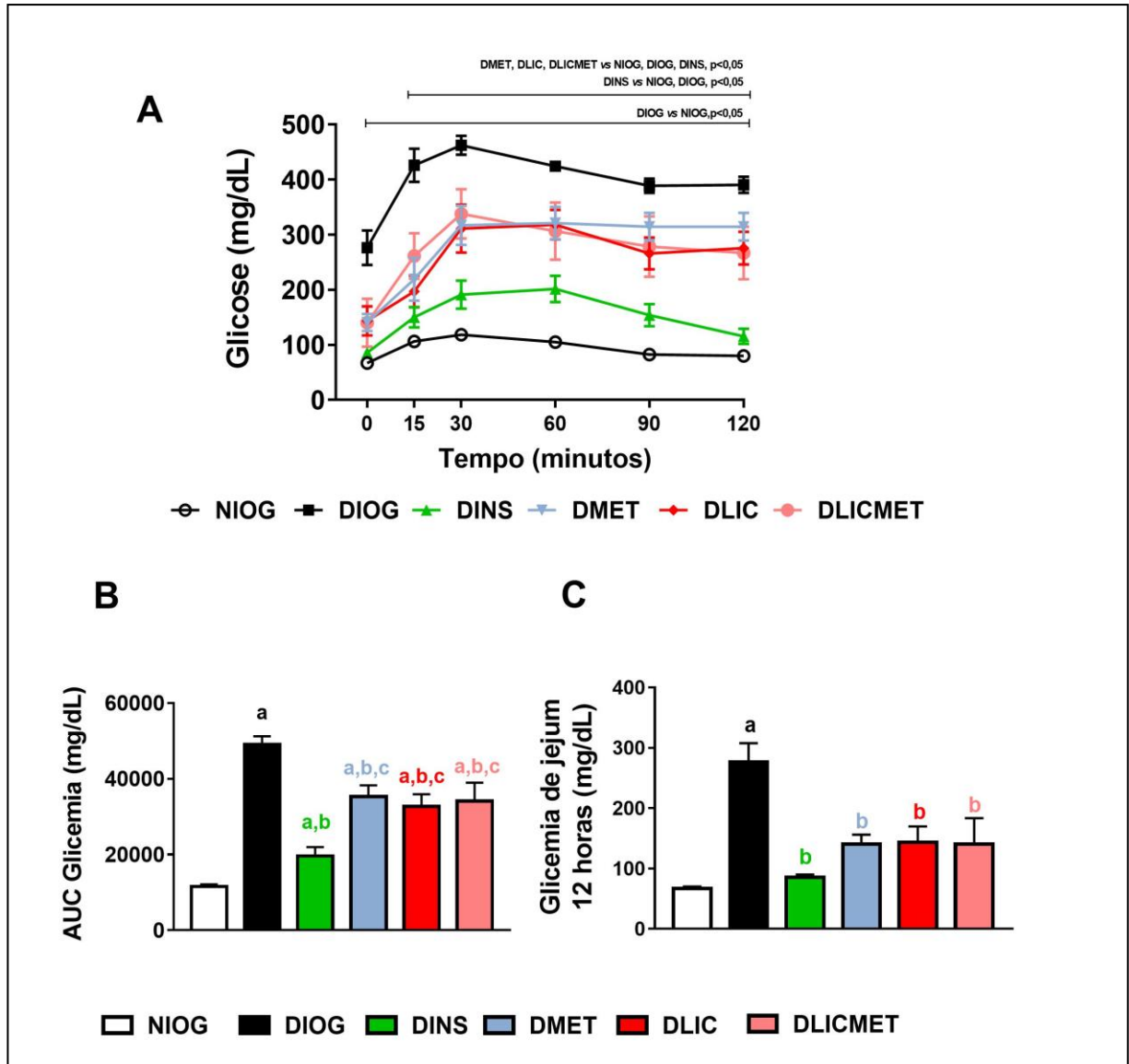
Animais DLICMET apresentaram uma redução significativa na glicemia, em comparação tanto aos animais DIOG quanto aos animais tratados com metformina ou licopeno isoladamente, demonstrando um efeito combinado/aditivo desta terapia combinada no controle glicêmico (Figura 8A). Em relação a AUC da glicemia, o grupo DLICMET apresentou valores menores quando comparados aos grupos DIOG, DMET e DLIC (Figura 8B).

Figura 8: Níveis plasmáticos de glicose e área sob a curva (AUC) da glicemia de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno incorporados em iogurte, após 30 dias.



(A) Níveis plasmáticos de glicose (mg/dL); **(B)** AUC da glicemia (mg/dL). Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. #, diferenças com o dia 0. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DMET; e, diferenças com DLIC.

Figura 9: Teste de tolerância oral à glicose, área sob a curva (AUC) da glicemia no TTGO e glicemia após 12 horas de jejum de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno incorporados em iogurte, após 28 dias.



(A) Teste de tolerância à glicose oral (mg/dL); **(B)** AUC da glicemia no TTGO (mg/dL); **(C)** Glicemia de jejum 12 horas (mg/dL). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DMET; e, diferenças com DLIC.

Como é possível observar na figura 9C, após 12 horas de jejum, os animais pertencentes ao grupo DIOG apresentaram um aumento de 312% na glicemia de jejum, quando comparados aos animais NIOG. Além disto, tal como esperado, animais DIOG apresentaram níveis glicêmicos maiores do que aqueles encontrados em animais submetidos aos tratamentos, durante todo o monitoramento do TTGO, ou seja, a correção da glicemia

após 120 minutos da sobrecarga de glicose não foi alcançada, caracterizando um quadro de intolerância à glicose em animais DIOG (Figura 9A). Todos os tratamentos realizados (insulina, metformina, licopeno, metformina + licopeno) foram eficazes na redução da glicemia de jejum, em 69%, 49%, 48% e 49%, respectivamente, quando comparados aos valores em animais diabéticos DIOG (Figura 9C).

Após 30 minutos da sobrecarga de glicose, observou-se o pico glicêmico no TTGO (figura 9A). Animais diabéticos tratados com insulina apresentaram menores valores de pico glicêmico bem como menores valores de glicemia durante todo teste, quando comparados aos animais diabéticos DIOG, DMET, DLIC e DLICMET, apresentando perfil temporal de glicemia semelhante aos animais NIOG (Figura 9A). Animais diabéticos tratados com metformina, licopeno ou metformina + licopeno apresentaram menores valores de pico glicêmico em relação aos animais diabéticos DIOG, no entanto superiores àqueles encontrados nos animais NIOG e DINS (Figura 9A).

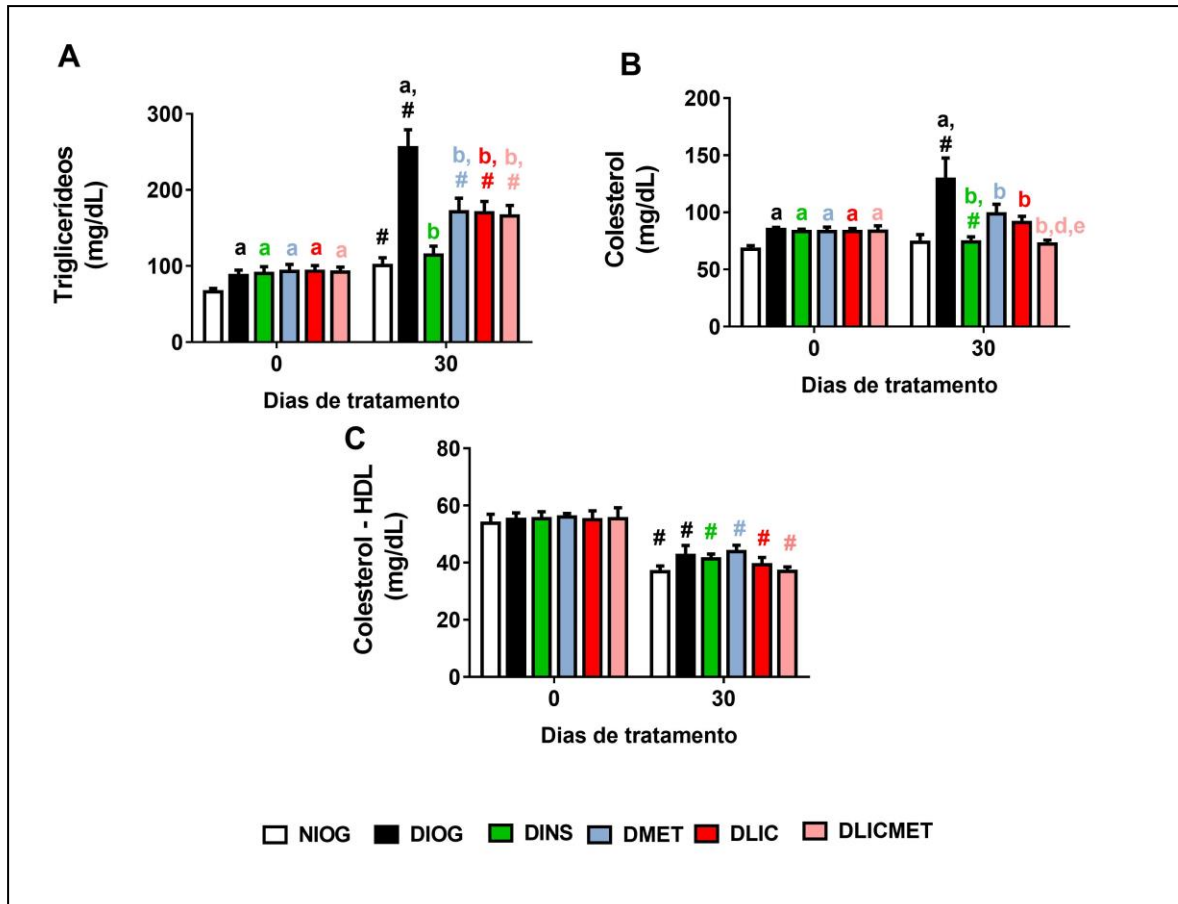
Assim, analisando o gráfico das alterações temporais da glicemia no TTGO (Figura 9A) e a AUC da glicemia no TTGO (Figura 9B), concluímos que os tratamentos com metformina, licopeno e metformina + licopeno melhoraram a tolerância à glicose de animais diabéticos, contudo ainda com menor eficácia em comparação ao tratamento com insulina.

Não foram observadas diferenças nos níveis circulantes de colesterol-HDL entre todos os grupos, antes do início dos tratamentos (dia 0) (Figura 10C). No entanto, em todos os grupos constituídos por animais diabéticos, foram observados aumentos nos níveis plasmáticos de triglicerídeos e de colesterol, em relação aos valores encontrados em animais não diabéticos, NIOG, antes do início dos tratamentos (Figura 10A e 10B).

Após 30 dias de experimento, pode-se notar que houve um aumento significativo e ainda maior em relação ao dia 0, nos níveis plasmáticos de triglicerídeos em animais do grupo DIOG, quando comparados aos valores em animais NIOG (Figura 10A). Também ocorreu um aumento nos níveis plasmáticos de triglicerídeos em quase todos os outros grupos constituídos por animais diabéticos, exceto aqueles pertencentes ao grupo DINS, mesmo após os tratamentos com licopeno ou metformina em iogurte, isolados ou combinados, porém os valores em animais DMET, DLIC e DLICMET encontram-se menores em relação aos encontrados em animais DIOG (Figura 10A). O tratamento de ratos diabéticos com insulina foi eficiente na promoção de redução nos níveis de triglicerídeos (ou preveniu o aumento), permanecendo 55% menor em relação aos valores em animais DIOG, enquanto que os

tratamentos com metformina, licopeno e com a combinação promoveram diminuições nos níveis de triglicerídeos de 32%, 33% e 35% respectivamente (Figura 10A).

Figura 10: Níveis plasmáticos de triglicerídeos (mg/dL), colesterol (mg/dL) e colesterol-HDL (mg/dL) de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno incorporados em iogurte, após 30 dias.



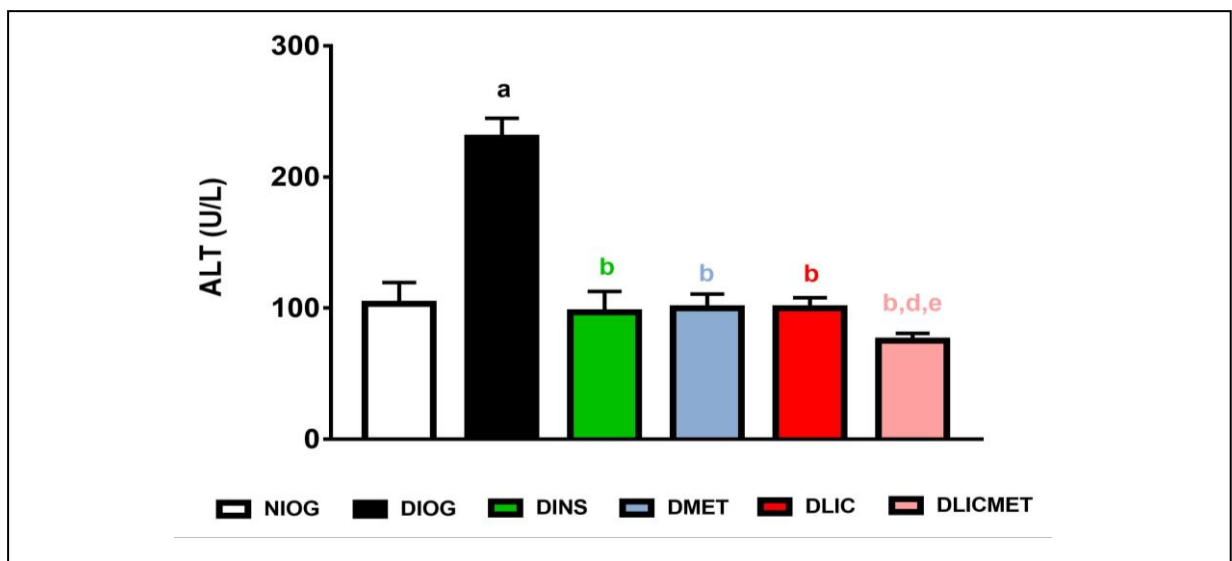
(A) Triglicerídeos (mg/dL); (B) Colesterol (mg/dL) e (C) Colesterol-HDL (mg/dL). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DMET; e, diferenças com DLIC; #, diferenças com o dia 0.

Na Figura 10B estão apresentados os resultados referentes aos níveis plasmáticos de colesterol de animais normais e diabéticos tratados com iogurte ou tratados com insulina, metformina e/ou licopeno em iogurte, no início (dia 0) e no fim do experimento (dia 30). Após 30 dias de tratamento, animais diabéticos DIOG apresentaram um aumento de 74% nos níveis de colesterol quando comparados aos animais NIOG (Figura 10B). Os tratamentos de ratos diabéticos com insulina, metformina, licopeno e a associação de metformina com licopeno foram eficazes na diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol, de 42%, 24%,

29% e 44%, respectivamente, quando comparados aos animais DIOG (Figura 10B). Vale destacar que o tratamento de animais diabéticos com a associação de metformina + licopeno em iogurte, após 30 dias, foi capaz de promover uma diminuição nos níveis plasmáticos de colesterol maior que aquela observada com os tratamentos isolados, sendo esta diminuição de 26% em relação ao grupo DMET e de 21% em relação ao grupo DLIC (Figura 10B).

Na Figura 10C estão apresentados os valores referentes aos níveis plasmáticos de colesterol-HDL de animais normais e diabéticos tratados com iogurte ou tratados com insulina, metformina e/ou licopeno em iogurte, no início (dia 0) e fim do experimento (dia 30). Todos os grupos estudados apresentaram valores semelhantes de colesterol-HDL no dia 0 e, ao final dos 30 dias de experimento, todos os grupos estudados apresentaram uma diminuição nos níveis plasmáticos de colesterol-HDL, em relação ao início dos tratamentos, sem diferença entre os grupos, no dia 30.

Figura 11: Níveis de alanina aminotransferase (ALT) em plasma de ratos não diabéticos e ratos diabéticos tratados com insulina, metformina e/ou licopeno, após 30 dias.



Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DMET; e, diferenças com DLIC.

Os animais diabéticos DIOG apresentaram aumento significativo nos níveis plasmáticos de ALT (123%), em relação aos valores encontrados em animais NIOG (Figura 11).

Os tratamentos com insulina, metformina ou licopeno foram capazes de reduzir (ou prevenir o aumento) os níveis plasmáticos de ALT de ratos diabéticos, em 58%, 55% e 56%, respectivamente, em relação aos valores observados em animais DIOG, alcançando valores próximos aos observados em animais NIOG (Figura 11).

Em relação ao tratamento de ratos diabéticos com a associação de metformina + licopeno em iogurte, foi possível observar uma diminuição de 67% dos níveis de ALT, quando comparados aos animais do grupo DIOG (figura 11). Também foi possível observar uma resposta combinada/aditiva do tratamento com a associação de metformina + licopeno na diminuição dos níveis de ALT em ratos diabéticos, em relação aos efeitos promovidos pelas terapias isoladas, sendo esta diminuição de 25% e 24%, respectivamente, em relação aos tratamentos com metformina ou licopeno, evidenciando que a associação metformina + licopeno tem maior potencial protetor contra as injúrias em hepatócitos observadas neste modelo experimental de DM.

5.2 Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo no plasma de animais diabéticos não tratados e tratados com 4U/animal de insulina, 250 mg/kg de metformina e/ou 45 mg/kg de licopeno em iogurte

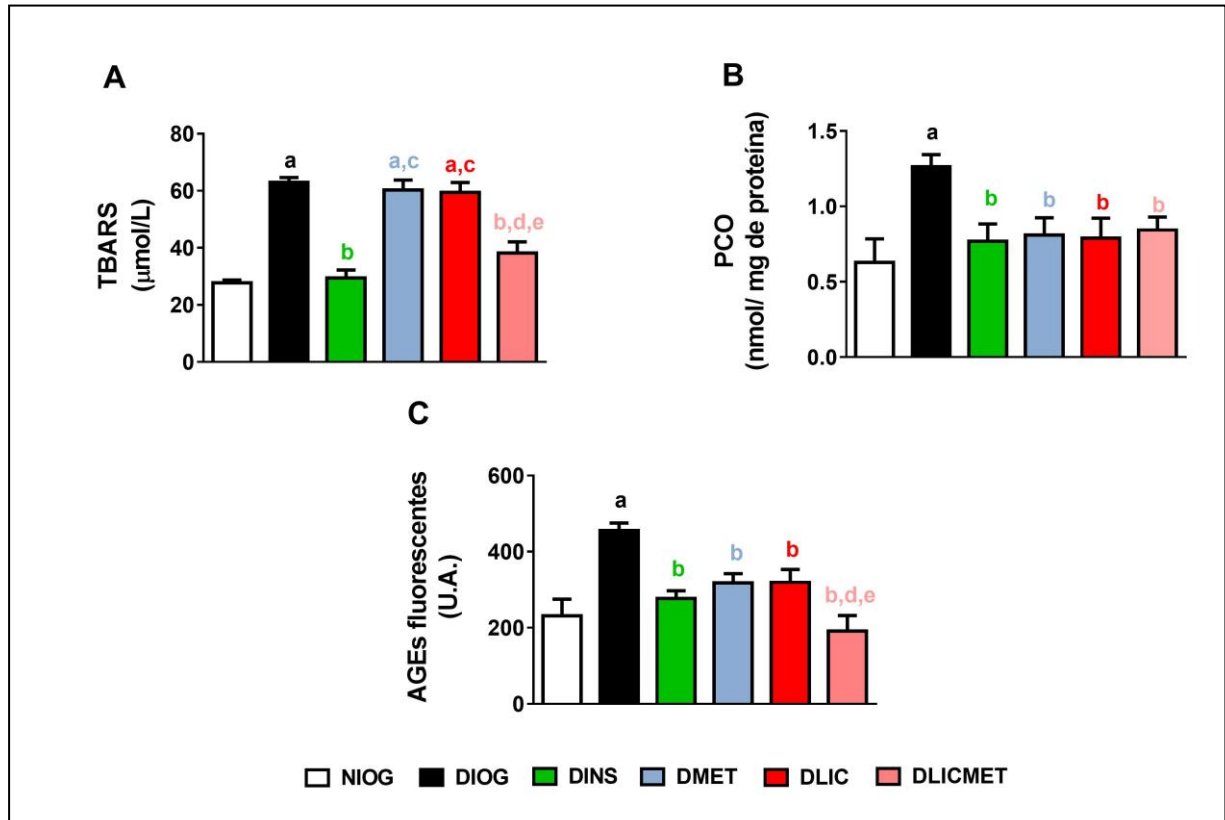
Animais do grupo DIOG apresentaram aumentos significativos nos níveis plasmáticos de TBARS (Figura 12A), PCO (Figura 12B) e AGEs fluorescentes (Figura 12C) quando comparados aos valores encontrados em animais NIOG. Animais do grupo DINS apresentaram redução nos níveis plasmáticos de TBARS, PCO e AGEs fluorescentes, de 53%, 40% e 39%, respectivamente, em relação aos valores encontrados em animais DIOG (Figura 12A, 12B e 12C). Os tratamentos com metformina ou licopeno em iogurte não foram eficazes na redução dos níveis de TBARS em ratos diabéticos (figura 12A), no entanto reduziram os níveis de PCO (figura 12B), em 35% (metformina) e 38% (licopeno), em relação aos animais DIOG. Todos os tratamentos foram eficazes na redução dos níveis plasmáticos de AGEs fluorescentes, quando comparados aos valores em animais DIOG (Figura 12C).

Em relação ao tratamento de animais diabéticos com a associação de metformina + licopeno, foi possível observar uma redução nos níveis plasmáticos de TBARS e AGEs fluorescentes em 39% e 58% respectivamente, quando comparado aos animais diabéticos tratados com iogurte (Figura 12A e 12C). Além disso, o tratamento de animais diabéticos com metformina + licopeno foi capaz de reduzir significativamente os níveis plasmáticos de TBARS quando comparados aos tratamentos isolados com metformina ou licopeno); vale lembrar que estes tratamentos isolados não tinham sido eficazes na redução dos níveis de TBARS, evidenciando no benefício da terapia combinada no combate ao estresse oxidativo em animais diabéticos (Figura 12A).

Analisando os resultados referentes aos níveis de AGEs fluorescentes no plasma, pode-se observar que o tratamento com metformina + licopeno promoveu uma redução ainda maior do que a observada com os tratamentos isolados com metformina ou licopeno, desta forma podemos sugerir que a terapia combinada também é eficaz na atenuação das alterações associadas aos eventos de glicação no DM (Figura 12C).

Já em relação aos níveis de PCO, a associação demonstrou uma magnitude de redução semelhante aos tratamentos isolados, não havendo diferenças entre os tratamentos realizados (insulina, metformina, licopeno e metformina + licopeno), porém todos apresentaram resultados semelhantes aos encontrados nos animais não diabéticos (Figura 12B).

Figura 12: Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, proteínas carboniladas e AGEs fluorescentes no plasma de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno, após 30 dias.



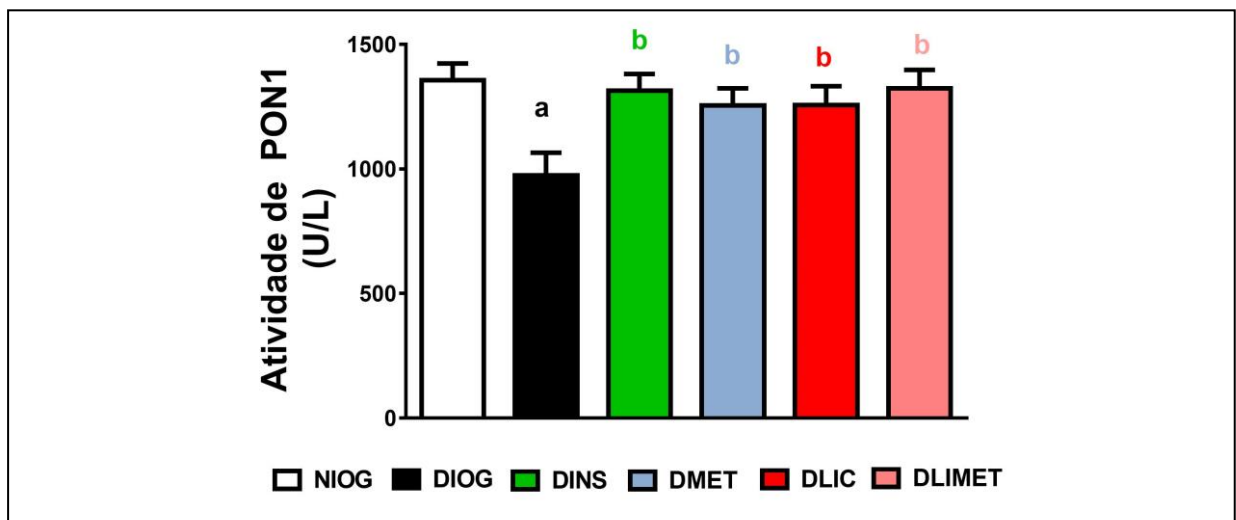
(A) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS; μmol/L) (B) Proteínas carboniladas (PCO; nmol/mg de tecido) e (C) AGEs fluorescentes (U.A.). Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM), n = 10. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DMET; e, diferenças com DLIC.

Como observado na figura 13, houve uma diminuição de 28% na atividade da PON 1 em plasma de animais diabéticos tratados com iogurte (DIOG), após 30 dias de experimento, quando comparados aos valores encontrados em animais normais tratados com iogurte (NIOG).

O tratamento de animais diabéticos com insulina promoveu um aumento de 34% na atividade de PON 1, em relação aos valores em animais diabéticos tratados com iogurte (DIOG). Os tratamentos de animais diabéticos com metformina em iogurte ou com licopeno em iogurte também promoveram aumentos na atividade de PON 1, de 28% e 29%, respectivamente, em comparação aos valores encontrados em animais diabéticos tratados com iogurte.

Em relação ao tratamento de animais diabéticos com metformina + licopeno, foi possível observar um aumento na atividade da PON 1 em 35%, em comparação aos valores encontrados em animais diabéticos DIOG. Vale destacar que não foram observadas diferenças nas atividades de PON 1 entre todos os tratamentos realizados em animais diabéticos (insulina, metformina, licopeno, metformina + licopeno), porém todos os tratamentos foram capazes de promoverem aumento significativo na atividade de PON 1, alcançando valores semelhantes aos encontrados nos animais não diabéticos.

Figura 13: Atividade de PON 1 em plasma de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno incorporados em iogurte, após 30 dias.

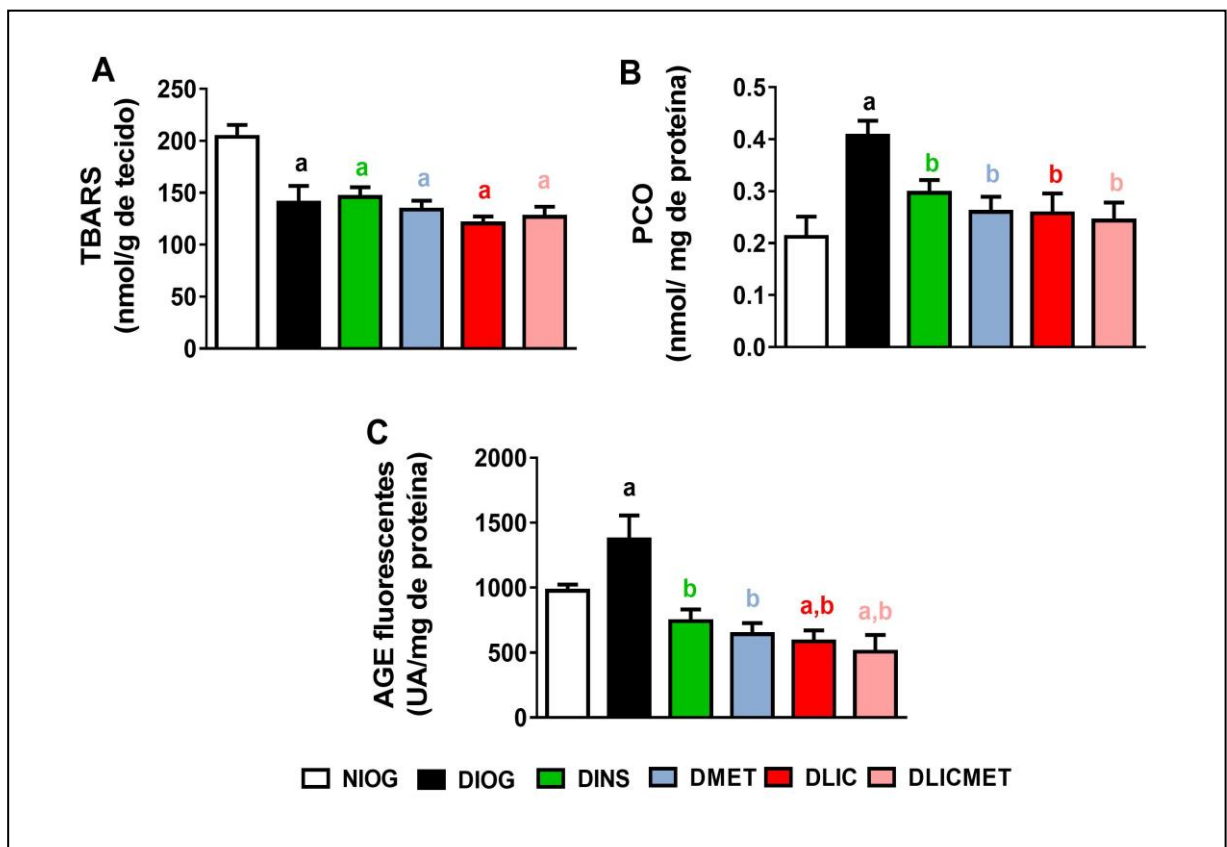


Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DMET; e, diferenças com DLIC.

5.3 Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo no fígado de animais diabéticos não tratados e tratados com 4U/animal de insulina, 250 mg/kg de metformina e/ou 45 mg/kg de licopeno em iogurte

Inesperadamente, observou-se que ratos diabéticos DIOG apresentaram uma diminuição de 29% dos níveis de TBARS no fígado, quando comparados aos valores em animais NIOG. Também foi possível observar que os tratamentos não mudaram os níveis de TBARS no fígado de animais diabéticos, isto é, eles permaneceram em valores baixos e semelhantes aos encontrados em animais DIOG (Figura 14A).

Figura 14: Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, proteínas carboniladas e de AGEs fluorescentes no fígado de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno, após 30 dias.



(A) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS; nmol/g de tecido) (B) Proteínas carboniladas (PCO; nmol/mg de tecido) e (C) AGEs fluorescentes (UA/mg de tecido). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DMET; e, diferenças com DLIC.

Animais DIOG apresentaram níveis aumentados de PCO (figura 14B) e de AGEs fluorescentes (figura 14C) no fígado, quando comparados aos valores obtidos em animais NIOG. Animais DINS apresentaram redução nos níveis hepáticos de PCO e de AGEs fluorescentes, de 27% e 45%, respectivamente, em relação aos animais DIOG.

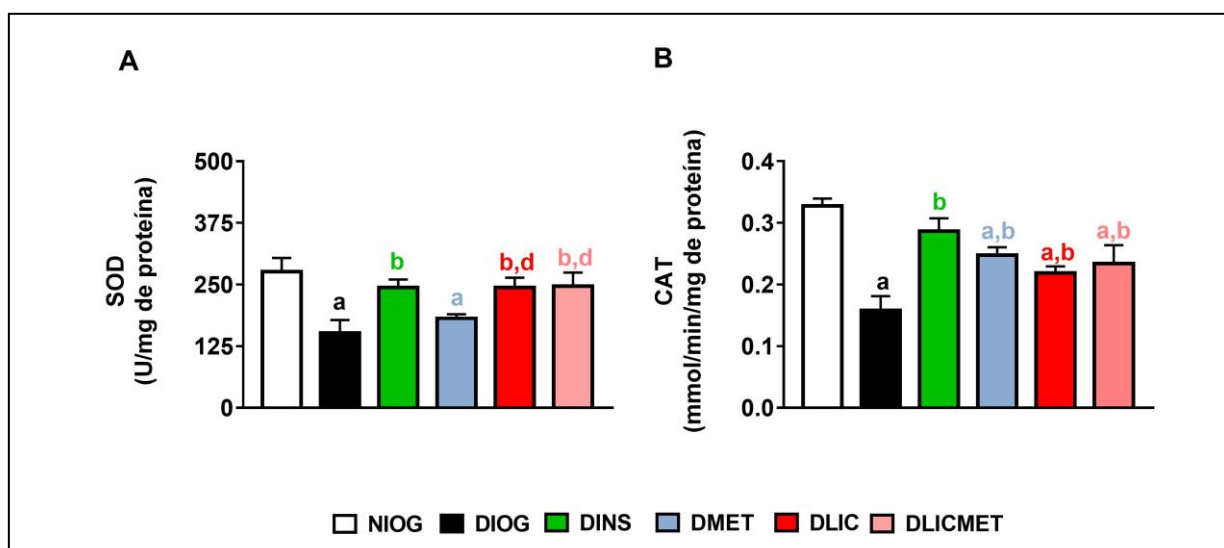
Animais DMET, DLIC e DLICMET apresentaram reduções nos níveis de PCO no fígado, de 35%, 37% e 40%, respectivamente quando comparados aos valores encontrados em animais DIOG (Figura 14B).

Os tratamentos de ratos diabéticos com metformina ou com licopeno, isoladamente, promoveram reduções de 53% e de 57%, respectivamente, nos níveis de AGEs fluorescentes, em relação aos valores encontrados em animais DIOG. Já em relação ao tratamento com metformina + licopeno, foi observada uma diminuição de 63% nos níveis de AGEs fluorescentes, em relação aos animais DIOG. Também foi possível observar que todos os tratamentos (insulina, metformina, licopeno e metformina + licopeno), mesmo não apresentando diferenças estatísticas entre si, estes foram eficazes na promoção de diminuição nos níveis de AGEs fluorescentes, os quais ficaram semelhantes aos níveis encontrados em animais NIOG (Figura 14C).

5.4 Biomarcadores dos sistemas antioxidantes no fígado de animais diabéticos não tratados e tratados com 4U/animal de insulina, 250 mg/kg de metformina e/ou 45 mg/kg de licopeno em iogurte

Animais DIOG apresentaram redução nas atividades de SOD (45%; figura 15A) e CAT (54%; figura 15B) no fígado, em comparação aos valores encontrados em animais NIOG. O tratamento de ratos diabéticos com insulina preservou as atividades de SOD e CAT no fígado: as atividades destas enzimas foram 61% e 81% maiores, respectivamente, em relação aos valores encontrados nos animais DIOG, alcançando valores próximos aos encontrados em animais NIOG.

Figura 15: Atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase no fígado de ratos não diabéticos e ratos diabéticos tratados com insulina, metformina e/ou licopeno, após 30 dias.



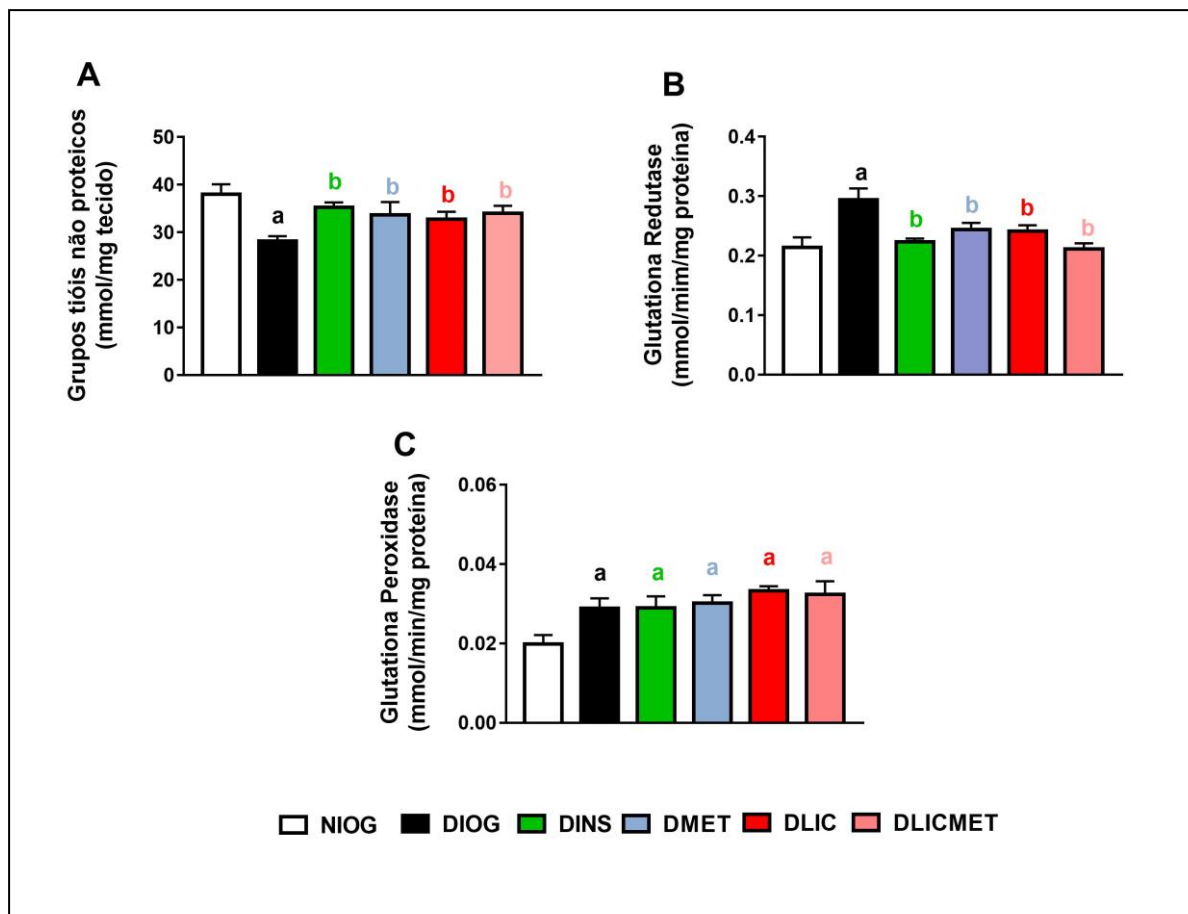
(A) Superóxido dismutase (SOD; U/mg de proteína) e (B) Catalase (CAT; mmol/min/mg de proteína). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; d, diferenças com DMET.

Animais diabéticos tratados com metformina apresentaram aumento na atividade de CAT (56%), em relação aos valores em animais DIOG (Figura 15 B). Em relação à atividade da SOD, o tratamento com metformina não foi capaz de promover benefícios, sendo a atividade de SOD semelhante quando comparados animais DMET e animais DIOG (Figura 15A). Animais diabéticos tratados com licopeno apresentaram aumentos nas atividades de

SOD (61%) e de CAT (37%) no fígado, quando comparados aos valores encontrados em animais DIOG (Figura 15A e 15B).

O tratamento de ratos diabéticos com metformina + licopeno em iogurte foi eficaz na promoção de aumentos nas atividades de SOD (62%) e de CAT (48%) no fígado, em comparação aos valores observados em animais DIOG (Figura 15A e 15B). Vale destacar que o tratamento com metformina + licopeno preservou os efeitos benéficos do licopeno na promoção de aumentos na atividade da SOD hepática em animais diabéticos (Figura 15A).

Figura 16: Níveis de grupos tióis não proteicos e atividades das enzimas glutathiona redutase e glutathiona peroxidase no fígado de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno, após 30 dias.



(A) Grupos tióis não proteicos (mmol/mg tecido), (B) Glutathiona redutase (GR; mmol/min/mg proteína) e (C) Glutathiona peroxidase (GSH-Px; mmol/min/mg proteína). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DMET; e, diferenças com DLIC.

Animais diabéticos DIOG apresentaram uma diminuição nos níveis hepáticos de grupos tióis não proteicos, quando comparados aos valores em animais NIOG. Todos os

tratamentos realizados (insulina, metformina, licopeno e metformina + licopeno) promoveram aumentos nos níveis hepáticos de grupos tióis não proteicos, em relação aos valores observados em animais DIOG (Figura 16A).

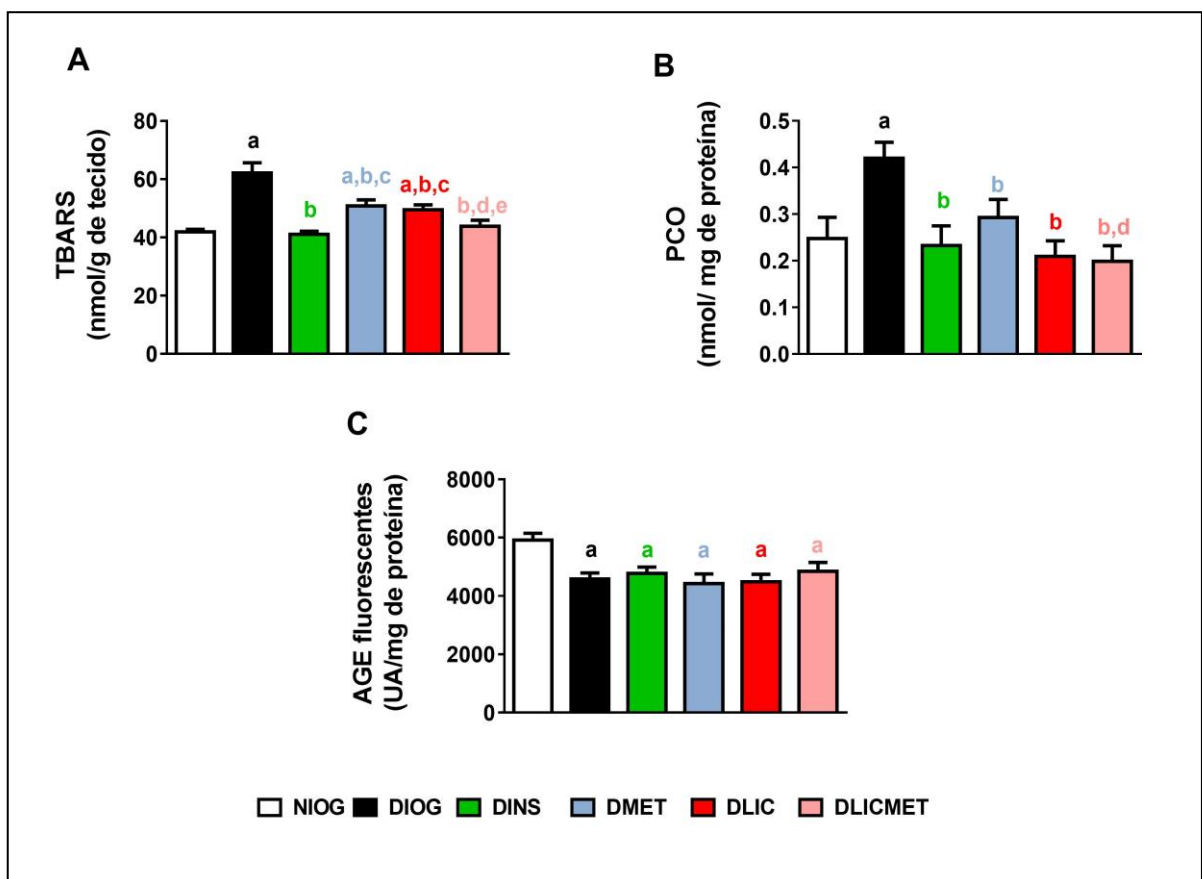
Animais DIOG apresentaram um aumento na atividade da enzima GSH-Rd no fígado, em relação aos valores observados em animais NIOG. Todos os tratamentos (insulina, metformina, licopeno, metformina + licopeno) promoveram uma diminuição na atividade da GSH-Rd em fígado de animais diabéticos (Figura 16B).

Todos os grupos constituídos de animais diabéticos (DIOG, DINS, DMET, DLIC, DLICMET) apresentaram aumentos nas atividades de GSH-Px no fígado, quando comparados aos valores observados em fígado de animais NIOG (Figura 16C).

5.5 Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo no rim de animais diabéticos não tratados e tratados com 4U/animal de insulina, 250 mg/kg de metformina e/ou 45 mg/kg de licopeno em iogurte

Animais DIOG apresentaram nos rins níveis aumentados de TBARS (Figura 17A) e PCO (Figura 17B), em 49% e 70%, respectivamente. Interessantemente, os níveis de AGEs fluorescentes encontram-se diminuídos (22%) em rins de animais DIOG, em relação aos valores de animais NIOG (Figura 17C).

Figura 17: Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, proteínas carboniladas e AGEs fluorescentes no rim de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno, após 30 dias.



(A) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS; mmol/g de tecido) **(B)** Proteínas carboniladas (PCO; nmol/mg de proteína) e **(C)** AGEs fluorescentes (UA/mg de proteína). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DMET; e, diferenças com DLIC.

Animais DINS apresentaram nos rins níveis reduzidos de TBARS (34%) e de PCO (45%), em relação aos animais DIOG. Em relação aos níveis de AGEs fluorescentes, não foram observadas diferenças na comparação entre DINS *versus* DIOG (Figura 17A).

O tratamento de ratos diabéticos com metformina promoveu redução nos níveis renais de TBARS (18%; figura 17A) e de PCO (30%; figura 17B), em relação aos animais DIOG, enquanto que os níveis de AGEs fluorescentes não foram diferentes daqueles encontrados em animais DIOG.

O tratamento com licopeno também reduziu os níveis renais de TBARS (19%) e de PCO (50%), em comparação aos valores encontrados em animais DIOG (Figuras 17 A e B, respectivamente). Vale destacar que ratos DLIC apresentaram níveis renais de PCO próximos aos encontrados em rins de animais NIOG (Figura 17B). Em relação aos níveis de AGEs fluorescentes, os níveis renais em animais DLIC não foram diferentes daqueles encontrados em animais DIOG (Figura 17C).

Em ratos diabéticos tratados com metformina + licopeno, houve redução nos níveis de TBARS (29%; figura 17A) e de PCO (53%; figura 17B) nos rins, em comparação aos valores encontrados em ratos DIOG. Destaca-se que o tratamento com metformina + licopeno promoveu uma maior redução nos níveis de TBARS nos rins, em comparação aos tratamentos isolados (Figura 17A). Já em relação aos níveis renais de PCO, o tratamento com metformina + licopeno foi melhor do que o tratamento com metformina sozinha, e preservou os efeitos benéficos do licopeno (Figura 17B). Os níveis de AGEs fluorescentes nos rins de animais diabéticos DLICMET foram baixos e semelhantes aos encontrados em animais DIOG, DINS, DMET e DLIC (Figura 17C).

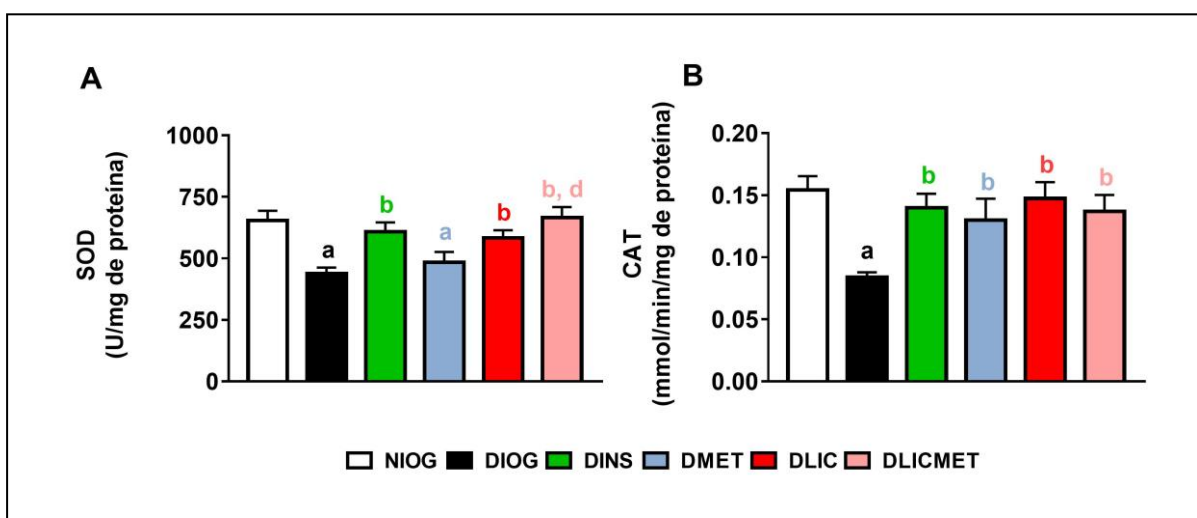
Animais DIOG apresentaram redução nas atividades de SOD e de CAT nos rins, de 33% e 48%, respectivamente, em comparação aos valores encontrados em animais NIOG. O tratamento de ratos diabéticos com insulina preservou as atividades de SOD e CAT no rim; as atividades destas enzimas foram 39% e 75% maiores, respectivamente, em relação aos valores encontrados nos animais DIOG, atingindo valores próximos aos encontrados em animais NIOG (Figura 18A e 18B).

Animais diabéticos tratados com metformina apresentaram aumento na atividade de CAT (62%) no rim, em relação aos valores em animais DIOG (Figura 18B). Em relação à atividade da SOD nos rins, o tratamento com metformina não foi capaz de promover benefícios, sendo esta semelhante àquela observada em animais DIOG (Figura 18A). Animais diabéticos tratados com licopeno apresentaram aumentos nas atividades de SOD (37%; figura

18A) e de CAT (37%; figura 18B) no rim, quando comparados aos valores encontrados em animais DIOG.

O tratamento de ratos diabéticos com metformina + licopeno em iogurte foi eficaz na promoção de aumento nas atividades de SOD (62%; figura 18A) e de CAT (75%; figura 18B) nos rins, em comparação aos valores observados em animais DIOG. É possível observar que o tratamento com licopeno foi capaz de preservar a atividade de CAT no rim em níveis semelhantes àqueles encontrados nos animais DINS (Figura 18B). Vale destacar que o tratamento com metformina + licopeno preservou os efeitos benéficos do licopeno na promoção de aumentos na atividade da SOD nos rins de animais diabéticos, e também preservou os efeitos dos tratamentos isolados no que diz respeito à atividade de CAT nos rins (Figura 18A e 18B).

Figura 18: Atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase no rim de ratos não diabéticos e ratos diabéticos tratados com insulina, metformina e/ou licopeno, após 30 dias.



(A) Superóxido dismutase (SOD; U/mg de proteína) e (B) Catalase (CAT; mmol/min/mg de proteína). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; d, diferenças com DMET.

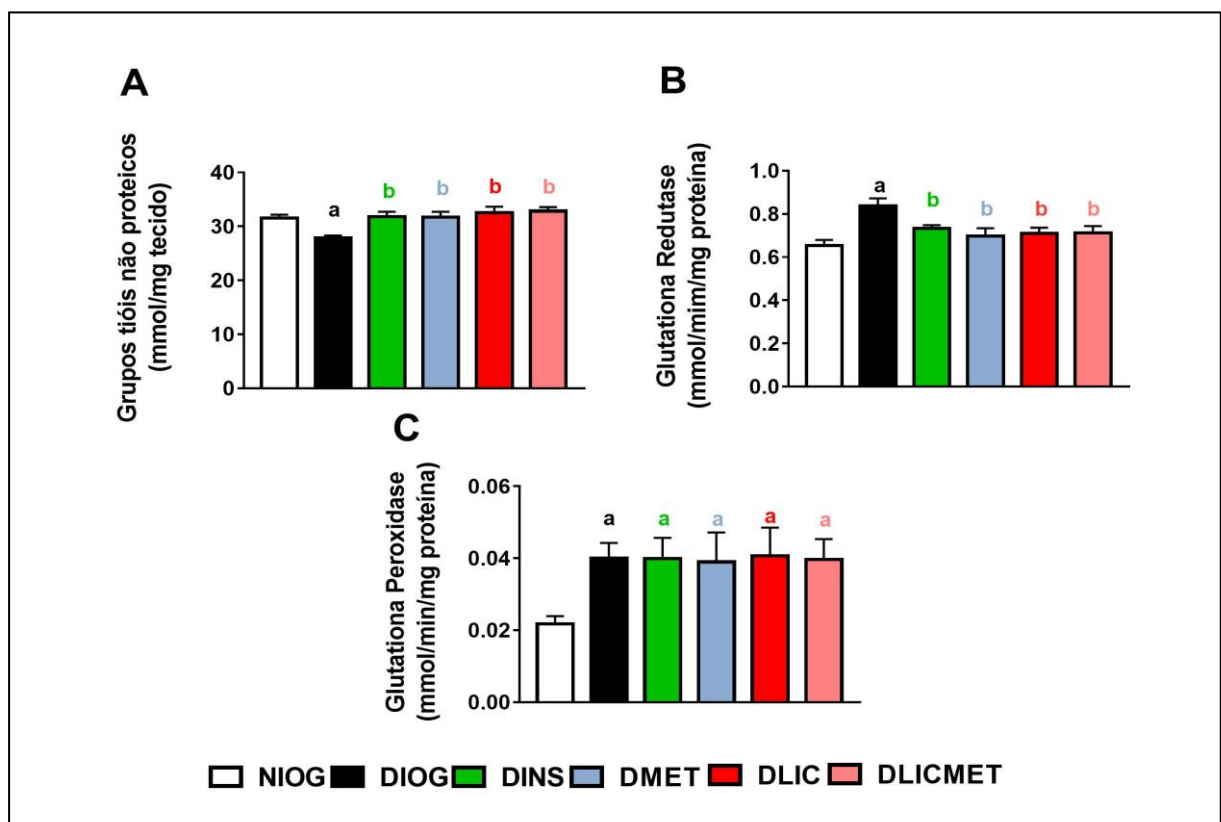
Animais DIOG apresentaram uma diminuição nos níveis renais de grupos tióis não proteicos, quando comparados aos animais NIOG (Figura 19A). Todos os tratamentos (insulina, metformina, licopeno e metformina + licopeno) promoveram aumento nos níveis renais de grupos tióis não proteicos, em relação aos valores observados em animais DIOG.

Animais DIOG apresentaram um aumento na atividade de GSH-Rd nos rins, em comparação com os valores observados em animais NIOG. Em contrapartida, todos os

tratamentos (insulina, metformina, licopeno, metformina + licopeno) promoveram diminuição na atividade de GSH-Rd no rim, quando comparados aos animais DIOG (Figura 19B).

Todos os grupos constituídos de animais diabéticos (DIOG, DINS, DMET, DLIC, DLICMET) apresentaram aumentos nas atividades de GSH-Px nos rins, quando comparados aos valores observados em rins de animais NIOG (Figura 19C).

Figura 19: Níveis de grupos tióis não proteicos e atividades das enzimas glutathiona redutase e glutathiona peroxidase no rim de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno, após 30 dias.



(A) Grupos tióis não proteicos (mmol/mg tecido), (B) Glutathiona redutase (GR; mmol/min/mg proteína) e (C) Glutathiona peroxidase (GSH-Px; mmol/min/mg proteína). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DMET; e, diferenças com DLIC.

Na tabela 2 estão sumarizados os resultados obtidos no presente trabalho, evidenciando os valores percentuais encontrados com os tratamentos de ratos diabéticos com insulina, metformina, licopeno e metformina + licopeno quando comparados aos animais diabéticos sem tratamento (DIOG).

Tabela 2: Alterações relativas (valores percentuais em relação ao DIOG) nos biomarcadores do metabolismo de carboidratos e lipídeos, estresse glico-oxidativo e defesas antioxidantes no plasma, fígado e rim de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou licopeno incorporados em iogurte, após 30 dias.

Parâmetros bioquímicos	DINS	DMET	DLIC	DLICMET
PLASMA				
Glicemia	↓ 83%	↓ 25%	↓ 25%	↓ 51%
Triglicerídeos	↓ 55%	↓ 32%	↓ 33%	↓ 35%
Colesterol	↓ 42%	↓ 24%	↓ 29%	↓ 44%
Colesterol-HDL	sem efeito	sem efeito	sem efeito	sem efeito
ALT	↓ 58%	↓ 55%	↓ 56%	↓ 67%
TBARS	↓ 53%	sem efeito	sem efeito	↓ 39%
PCO	↓ 40%	↓ 35%	↓ 38%	↓ 33%
AGEs fluorescentes	↓ 39%	↓ 30%	↓ 30%	↓ 58%
PON1	↑ 34%	↑ 28%	↑ 29%	↑ 35%

Continuação Tabela 2:

Parâmetros bioquímicos	DINS	DMET	DLIC	DLICMET
FÍGADO				
PCO	↓ 27%	↓ 35%	↓ 37%	↓ 40%
AGEs fluorescentes	↓ 45%	↓ 53%	↓ 57%	↓ 63%
SOD	↑ 61%	sem efeito	↑ 61%	↑ 62%
CAT	↑ 81%	↑ 56%	↑ 37%	↑ 48%
Grupos tióis não proteicos	↑ 25%	↑ 19%	↑ 16%	↑ 21%
GSH-Rd	↓ 24%	↓ 17%	↓ 18%	↓ 28%
RIM				
TBARS	↓ 34%	↓ 18%	↓ 19%	↓ 29%
PCO	↓ 45%	↓ 30%	↓ 50%	↓ 53%
SOD	↑ 39%	sem efeito	↑ 37%	↑ 62%
CAT	↑ 75%	↑ 62%	↑ 37%	↑ 75%
Grupos tióis não proteicos	↑ 11%	↑ 15%	↑ 17%	↑ 19%
GSH-Rd	↓ 12%	↓ 17%	↓ 16%	↓ 15%

Os valores em negrito e rosa: indicam que o tratamento com a associação foi melhor do que os respectivos compostos administrados isoladamente. Os valores em negrito e vermelho: indicam que o tratamento com a associação foi melhor do que um dos respectivos compostos administrados isoladamente. DIOG: ratos diabéticos tratados com iogurte; DINS: ratos diabéticos tratados com 4U de insulina; DMET: ratos diabéticos tratados com 250 mg/kg de metformina; DLIC: ratos diabéticos tratados com 90 mg/kg de licopeno e DLICMET: ratos diabéticos tratados com 250 mg/kg de metformina + 90 mg/kg de licopeno. ALT: níveis de alaninaaminotransferase; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; PCO: proteínas carboniladas; AGEs fluorescentes: produtos finais de glicação avançada; PON1: paraoxonase 1; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GSH-Rd: glutathiona redutase.

6. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, podemos observar que houve a instalação de um quadro de estresse glico-oxidativo em animais diabéticos (indução com STZ), uma vez que animais do grupo DIOG apresentaram aumentos nos níveis plasmáticos e hepáticos de AGEs fluorescentes, PCO, bem como diminuições nas atividades das enzimas antioxidantes PON 1, SOD e CAT. Nestes animais também houve o aumento dos níveis de TBARS no plasma. Também em animais DIOG foram observadas outras alterações, incluindo aumento da ingestão alimentar, ingestão hídrica e volume urinário; diminuição no ganho de peso corporal e nas massas de tecidos musculares (*soleus* e EDL) e adiposos (epididimal e retroperitoneal). Animais DIOG apresentaram dislipidemia, com aumento nos níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol total. Houve também a instalação de um quadro de intolerância à glicose oral nestes animais, observada na análise do TTGO. Além disto, animais DIOG apresentaram um aumento nos níveis plasmáticos de ALT, sugestivo de prejuízos ou perturbações na integridade de hepatócitos, os quais podem ter relação com o quadro de estresse oxidativo observado no fígado.

Animais DLICMET apresentaram uma significativa redução da glicemia, que foi maior que aquela observada em animais DMET e DLIC, e esta redução na glicemia impactou positivamente na promoção de redução nos níveis plasmáticos de AGEs fluorescentes e TBARS, cujas quedas foram mais significativas que aquelas de animais tratados com metformina ou licopeno isoladamente. A terapia combinada de metformina + licopeno também promoveu significativa redução nos níveis de colesterol total, sendo maior do que aquelas encontradas nos tratamentos isolados; além disto, o tratamento de ratos diabéticos com metformina + licopeno promoveu diminuição nos níveis plasmáticos de triglicerídeos e PCO, e aumento na atividade de PON 1, de forma semelhante aos tratamentos isolados, indicando que o tratamento com a associação preservou seus efeitos benéficos.

Além dos efeitos promissores da associação metformina + licopeno em biomarcadores plasmáticos de animais diabéticos, foram também observados seus efeitos benéficos no fígado e rins.

No fígado, animais DLICMET apresentaram diminuição nos níveis de PCO e AGEs fluorescentes, semelhantes as respostas encontradas nos animais DMET e DLIC, indicando que o tratamento com a associação preservou os efeitos benéficos do licopeno e da

metformina. Também houve aumento nas defesas antioxidantes (atividades de SOD e CAT), destacando o efeito promovido pela associação de metformina + licopeno no aumento da atividade de SOD quando comparado ao tratamento com metformina sozinha, indicando que o tratamento com a associação preservou o efeito do antioxidante (licopeno). Tais efeitos benéficos no combate ao estresse oxidativo no fígado podem ter contribuído para a diminuição nos níveis circulantes de ALT, demonstrando que a terapia combinada foi eficaz na proteção do tecido hepático contra as agressões glico-oxidativas do diabetes. Vale destacar que o tratamento com a associação de metformina + licopeno promoveu respostas mais efetivas de diminuição nos níveis de ALT em relação aos isolados, indicando que a associação preservou os efeitos tanto do fármaco (metformina) quanto do antioxidante (licopeno).

Nos rins, destaca-se a promoção de diminuição nos níveis de TBARS pelo tratamento com a associação de metformina + licopeno, que foi maior em relação aos efeitos dos tratamentos isolados. Em relação aos níveis de PCO no rim, a associação de metformina + licopeno promoveu maiores reduções, em relação ao tratamento com metformina, indicando que a associação preservou os efeitos do antioxidante (licopeno).

O menor ganho de peso corporal observado nos animais diabéticos que receberam veículo, iogurte (animais DIOG) ocorreu devido à provável redução nos níveis circulantes de insulina, uma vez que a administração do fármaco diabetogênico STZ promove significativa destruição das células beta pancreáticas; conseqüentemente, ocorrem prejuízos nas respostas anabólicas teciduais dependentes deste hormônio. Sabe-se que a insulina aumenta a velocidade de processos bioquímicos responsáveis pela síntese de glicogênio, proteínas e lipídeos, bem como estimula o armazenamento de triglicerídeos nos tecidos adiposos via ativação da lipase lipoproteica (LpL), aumentando assim a captação de triglicerídeos de lipoproteínas plasmáticas. Além disso, com a drástica redução nos níveis de insulina, diversos outros eventos podem ser observados: não ocorre inibição na atividade da lipase hormônio sensível (LHS), responsável pela hidrólise dos triglicerídeos, e assim ocorre uma diminuição nas massas de tecidos adiposos; ocorre inibição na captação de glicose pelos tecidos adiposos, reduzindo assim o substrato para a síntese de triglicerídeos; ocorre aumento na velocidade de degradação proteica juntamente com diminuição da síntese proteica, culminando especialmente em perda (ou menor ganho) de massa muscular esquelética (FELIG; BERGMAN, 1995; STUMP et al. 2005). Portanto, todos os fatores acima descritos combinados podem contribuir para o perfil observado de menor ganho de peso corporal nos

animais diabéticos DIOG, quando comparados aos animais não diabéticos (NIOG) ou animais diabéticos tratados com insulina (DINS).

Não foram observadas diferenças nos valores médios de peso corporal de animais diabéticos dos grupos DMET, DLIC e DLICMET, em relação aos animais DIOG, durante todo o período experimental, sugerindo que os tratamentos com metformina ou licopeno, isolados ou combinados, não influenciaram no ganho de peso corporal. Porém, em estudo realizado por Meng (2017), observou-se que ratos diabéticos tratados com 500 mg/kg de metformina, por 30 dias, apresentaram um maior ganho de peso corporal em relação aos animais diabéticos sem tratamento. Corroborando nossos achados, Assis et al. (2017) observaram que o tratamento de ratos diabéticos com 45 mg/kg de licopeno por 50 dias não foi capaz de promover aumento no ganho de peso corporal, em comparação aos animais diabéticos DIOG. Portanto, mesmo que o licopeno tenha sido eficaz na redução da glicemia de animais diabéticos, este tratamento parece não ter sido capaz de atuar sobre o menor ganho de peso corporal nestes animais. Animais diabéticos tratados com metformina + licopeno em iogurte apresentaram o mesmo perfil daqueles animais submetidos aos tratamentos isolados, ou seja, a terapia combinada não foi capaz de atuar sobre o menor ganho de peso dos animais diabéticos, mesmo sendo eficaz na redução da glicemia. Comparando os resultados deste estudo com o estudo realizado por Meng (2017), podemos sugerir que maiores doses de metformina, em associação ao licopeno, talvez possam ser mais eficazes na promoção de ganho (ou prevenção de perda) de peso corporal no DM experimental, o qual mimetiza as alterações observadas no DM tipo 1.

Ratos diabéticos DIOG apresentaram uma redução significativa nas massas dos músculos esqueléticos em relação aos animais NIOG, caracterizando o estado catabólico típico da deficiência insulínica (STUMP et al., 2005). Animais diabéticos tratados com insulina (DINS) apresentaram valores de massas musculares semelhantes aos animais normais (NIOG). Tal fato demonstra a importante ação da insulina no metabolismo de proteínas, inibindo a degradação de proteínas e aumentando a velocidade de síntese proteica (PEPATO et al., 1996; RAUGHT et al., 2001).

Os tratamentos com metformina e/ou licopeno em iogurte não foram eficazes na promoção de ganho de massa muscular em animais diabéticos, quando comparados aos animais DIOG. Contrariamente aos nossos achados, em estudo realizado por Hasan et al. (2019), ao analisarem as massas dos músculos *soleus* de camundongos em modelo de obesidade (dieta hiperlipídica) e tratados com 320 mg/kg de metformina durante 4 semanas,

os autores demonstraram que a metformina preveniu a perda da massa muscular. A diferença entre os resultados do nosso trabalho com os resultados obtidos por Hasan et al. (2019) pode ser explicada pelas diferenças entre os modelos experimentais utilizados, bem como as diferentes doses de metformina e tempos de tratamento. Em relação ao licopeno e seus impactos na massa muscular esquelética, dados semelhantes foram encontrados em estudo realizado por Assis et al. (2017), onde o tratamento de ratos diabéticos com licopeno em iogurte durante 50 dias não promoveu aumento na massa muscular, em comparação aos animais DIOG.

Em todos os grupos de animais diabéticos, ocorreu uma redução nas massas de tecidos adiposos brancos. O menor ganho de peso corporal observado no DM tipo 1 pode ter relação com as menores massas de tecidos adiposos, o que pode ser uma consequência da falta das ações anabólicas/anticatabólicas da insulina, culminando em ativação da LHS, levando à lipólise; inibição da captação de glicose pelos tecidos adiposos, reduzindo substratos para a lipogênese; redução na velocidade de lipogênese; diminuição na captação de triglicerídeos das lipoproteínas séricas pelos tecidos adiposos, uma vez que a enzima LpL é ativada por insulina. Em conjunto, há uma redução nos estoques de triglicerídeos nos tecidos adiposos (FELIG; BERGMAN, 1995), o que pode estar contribuindo para a diminuição nas massas dos tecidos adiposos em animais DIOG. Animais tratados com insulina (DINS) apresentaram massas de tecidos adiposos em valores próximos aos animais NIOG. Animais diabéticos tratados com metformina (DMET) ou com licopeno (DLIC) em iogurte não apresentaram diferenças nas massas de tecidos adiposos, quando comparados aos animais DIOG. Diversos estudos vêm demonstrando a capacidade da metformina em diminuir as massas dos tecidos adiposos. Este efeito está relacionado com sua ação anorexígena, via inibição da secreção de leptina no tecido adiposo marrom, demonstrada em modelos animais experimentais (KLEIN et al., 2004). Promovendo ativação da enzima AMPK, a metformina é capaz de aumentar a expressão de proteínas desacopladoras (UCP, do inglês *uncoupling protein*), relacionadas com a termogênese, acelerando, portanto, a oxidação dos ácidos graxos e consequentemente pode assim contribuir para diminuir as massas dos tecidos adiposos (TOKUBUSHI et al., 2017). Corroborando nossos resultados relacionados às massas de tecidos adiposos, Assis et al. (2017) observaram que animais diabéticos tratados com licopeno em iogurte durante 50 dias não apresentaram aumento nas massas de tecidos adiposos, quando comparados aos animais DIOG.

Surpreendentemente, os animais diabéticos tratados com metformina + licopeno em iogurte (DLICMET) apresentaram maiores massas de tecidos adiposos, quando comparados com os animais diabéticos que receberam somente iogurte (DIOG) e com animais diabéticos submetidos aos tratamentos isolados (DMET e DLIC). A maior eficácia do tratamento combinado pode ser explicada por uma provável combinação entre (i) preservação da função de células beta pancreáticas não destruídas pela STZ, bem como (ii) aumento na sensibilidade periférica à insulina. Em conjunto, estes benefícios podem permitir que os tecidos adiposos sejam responsivos às ações anabólicas da insulina. Tal hipótese é corroborada pelos menores níveis plasmáticos de glicose em animais DLICMET; a glicose é um dos principais substratos para a lipogênese nos tecidos adiposos.

Animais DIOG apresentaram um aumento significativo na ingestão alimentar, o qual pode ser atribuído aos prejuízos no controle da sensação de fome no centro da saciedade, localizada no núcleo hipotalâmico ventro-medial, esta é regulada (inibida) pela ação da insulina em seus receptores específicos (JACOBSON, 1996; FIGLEWICZ; SIPOLS, 2010). Os tratamentos dos ratos diabéticos com insulina (DINS), metformina (DMET) ou licopeno (DLIC) foram capazes de promover redução na ingestão alimentar de ratos diabéticos, em relação aos animais DIOG, após 30 dias. Sugere-se que todos os tratamentos possam ser eficazes na recuperação dos efeitos da insulina nos seus receptores específicos no hipotálamo, reguladores da saciedade, ou talvez os tratamentos estejam preservando a função pancreática e assim a secreção de insulina, e consequentemente suas ações.

Todos os grupos de animais diabéticos apresentaram um aumento da ingestão hídrica no dia 0, quando comparados aos animais NIOG. No diabetes, é observada uma elevada ingestão de líquidos, como uma consequência da poliúria, bem como devido ao aumento da osmolaridade plasmática devido à hiperglicemia e da elevação na concentração plasmática de outros metabólitos. O aumento da osmolaridade promove desidratação celular, pois a água passa do meio intracelular para o extracelular, a fim de manter a homeostase. Assim, ocorre estímulo à sede intensa (FELIG; BERGMAN, 1995; GUYTON; HALL, 1996). Os ratos diabéticos que receberam insulina ou que foram tratados com metformina + licopeno apresentaram, após 30 dias, menores valores de ingestão hídrica, em relação aos animais DIOG, provavelmente explicado pela redução na glicemia, mas também pela redução no volume urinário. O tratamento de ratos diabéticos com metformina não promoveu redução da ingestão hídrica, já o tratamento com licopeno diminuiu a ingestão hídrica, em relação aos animais DIOG.

Em relação ao volume urinário, todos os animais diabéticos apresentaram aumentos no volume urinário, em relação aos animais NIOG, durante todo período experimental. A poliúria é comumente observada no DM; é provocada pelo aumento nos níveis circulantes de glicose, ureia, amônia, aminoácidos, corpos cetônicos, dentre outros metabólitos, aumentando consequentemente as massas filtradas destes solutos pelos rins e consequentemente a excreção de água aumenta, condição esta que pode levar à desidratação (FELIG; BRUGMAN, 1995). Os tratamentos de animais diabéticos com insulina ou com metformina + licopeno promoveram redução do volume urinário, em relação aos animais diabéticos DIOG, corroborando a redução da ingestão hídrica observada nos animais submetidos a estes tratamentos.

Os tratamentos com metformina ou licopeno, isoladamente, promoveram discretas diminuições do volume urinário em animais diabéticos, estas não sendo tão evidentes quanto àquelas promovidas pelos tratamentos com insulina ou com a associação de metformina + licopeno. Vale destacar que o tratamento com licopeno promoveu esta discreta diminuição no volume urinário a partir do 15º dia de tratamento. Estudo prévio realizado por Assis et al. (2017) demonstrou que o tratamento de animais diabéticos com licopeno foi capaz de promover uma discreta melhoria (redução) na ingestão alimentar e na ingestão hídrica de ratos diabéticos, acompanhada de uma melhoria (redução) no volume urinário. Bayramoglu et al. (2013), ao tratar ratos diabéticos com licopeno, também observou que ocorre uma tendência de melhoria na ingestão alimentar, ingestão hídrica e volume urinário, quando comparados aos animais diabéticos sem tratamento. Cheng et al. (2006), estudando animais com DM estreptozotocínico, observou uma diminuição da ingestão alimentar em animais tratados com metformina, corroborando os achados deste estudo.

A instalação do DM experimental foi comprovada com o aumento da glicemia dos animais no pareamento (tempo 0 de tratamento; 3 dias pós-STZ). A administração de STZ é responsável pela destruição maciça das células beta pancreáticas, reduzindo drasticamente a produção/secreção de insulina. Com uma drástica redução nos níveis de insulina, a hiperglicemia observada em animais diabéticos pode ser uma consequência da combinação de diversas alterações: (i) redução na velocidade de captação de glicose pelos tecidos que possuem maiores quantidades do transportador de glicose GLUT 4 (em especial músculos esqueléticos, tecidos adiposos); (ii) diminuição nas velocidades de glicogênese e lipogênese; (iii) aumento na produção hepática de glicose, em especial devido ao aumento nas velocidades dos processos de glicogenólise e gliconeogênese. Com a cronicidade da

hiperglicemia, as complicações do DM relacionadas à hiperglicemia, denominadas de microvasculares (retinopatia, nefropatia, neuropatia diabéticas) e macrovasculares (cardiovasculares, isquemias vasculares periféricas ou centrais) podem ser observadas (NIEDOWICZ; DALEKE, 2005). No decorrer do período experimental, animais DIOG apresentaram níveis glicêmicos progressivamente maiores, bem como um quadro de intolerância à glicose, o qual pode ser atribuído à resistência dos tecidos periféricos às ações da insulina, ou até mesmo à insuficiência do hormônio (menores níveis de insulina para estimular a captação de glicose). Sabe-se que a STZ é responsável pela destruição de grande parte das células β pancreáticas; no entanto, aquelas que não foram destruídas e continuam a secretar insulina podem sofrer as consequências do estresse glico-oxidativo, justificando assim o aumento progressivo da glicemia nos animais DIOG. Além disso, animais DIOG, além de produzirem menos insulina, também podem ter desenvolvido resistência à insulina nos tecidos periféricos, condição esta que também pode contribuir com a piora da glicemia em animais DIOG. No modelo de DM experimental (indução com STZ) utilizado neste estudo, ocorre a destruição de grande parte das células β pancreáticas, caracterizando então um modelo insulinopênico, no qual a produção de insulina é drasticamente reduzida. No entanto, estudos desmonstram que resistência à insulina também pode ser observada em animais diabéticos induzidos com STZ, e isto ocorre, principalmente, por uma redução na atividade da tirosina quinase do receptor de insulina, e diminuição na ativação da AKT (fosforilação no resíduo serina-473) (GIORGINO et al., 1992; GUTIERRES et al., 2015). Consequentemente, animais diabéticos DIOG apresentaram um aumento progressivo na glicemia, bem como alterações indicativas de estabelecimento de estresse glico-oxidativo.

Os valores de glicemia de animais do grupo NIOG se mantiveram constantes e dentro da normalidade, desde o pareamento até o final do período experimental. Ratos diabéticos que receberam insulina (DINS) apresentaram uma redução significativa da glicemia, em relação ao dia 0, apresentando no decorrer do tratamento valores médios de glicemia semelhantes aos valores encontrados em animais NIOG. No TTGO, após a sobrecarga de glicose, animais diabéticos DINS apresentaram menor pico glicêmico em comparação aos animais diabéticos nos demais tratamentos (metformina, licopeno, metformina + licopeno), bem como normalização da glicemia após 120 minutos da administração de glicose. Assim, pode-se concluir que o tratamento com insulina previne o estabelecimento de intolerância à glicose em animais diabéticos, resposta esta que pode estar associada à melhoria na sensibilidade dos tecidos periféricos às ações da insulina e/ou preservação da função pancreática.

Animais diabéticos tratados com metformina (DMET) não apresentaram o perfil de aumento progressivo na glicemia, tal como observado em animais DIOG, reiterando o potencial da metformina na promoção de efetivo controle glicêmico, mesmo que este fármaco tenha sido utilizado em animais sob modelo experimental de DM tipo 1. O mesmo foi observado em animais DMET em relação à curva glicêmica monitorada após a sobrecarga de glicose: após 120 minutos da administração de glicose, os valores de glicemia de animais DMET foram menores em relação ao observado em animais DIOG.

O tratamento de animais diabéticos com licopeno em iogurte (DLIC) também foi capaz de melhorar os níveis glicêmicos, bem como a tolerância à glicose, quando comparados aos animais DIOG, corroborando os achados de Assis et al. (2017), que também observaram níveis glicêmicos reduzidos em animais diabéticos tratados com licopeno em iogurte durante 50 dias. Estudo realizado por Sarhat e Saeed (2017) observou que o tratamento de animais diabéticos com licopeno foi capaz de promover redução nos níveis plasmáticos de glicose, leptina e marcadores inflamatórios, incluindo o TNF- α (fator de necrose tumoral), bem como houve um aumento nos níveis de adiponectina. A adiponectina é um hormônio secretado pelas células adiposas; é capaz de modular diversos processos metabólicos. Os seus níveis plasmáticos são inversamente proporcionais ao percentual de gordura corporal; portanto, em um quadro de DM do tipo 1, os níveis de adiponectina estão reduzidos, causando prejuízos no controle glicêmico, e assim pode contribuir para a resistência à insulina (KUSAKABE et al., 2009). Portanto, sugere-se que a ação do licopeno em diminuir os níveis glicêmicos dos animais diabéticos pode ser uma consequência, pelo menos em parte, de suas ações promotoras de aumento na síntese/secreção adiponectina, hipótese esta que merece futuras investigações.

Em estudo realizado por Fan et al. (2019), no qual ratos em modelo de DM 2 (dieta hiperlipídica + administração de STZ) foram tratados com licopeno (10 mg/kg) durante 16 semanas, observou-se que houve uma redução da glicemia nos animais tratados com licopeno, em relação aos não tratados. Saracoğlu et al. (2018), ao tratar ratos diabéticos (indução com STZ) com licopeno (10 e 20 mg/kg) durante 28 dias, observaram que houve aumento nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px, bem como diminuição nos níveis de MDA, no coração. Sabe-se que a hiperglicemia, como dito anteriormente, é uma das causas de aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, bem como participa de processos que culminam em diminuição das defesas antioxidantes endógenas.

Sabe-se que o estresse oxidativo é responsável, pelo menos em parte, pelo estabelecimento e manutenção das complicações do DM, incluindo promoção de prejuízos na secreção de insulina pelas células β pancreáticas e também participa do estabelecimento da resistência à insulina nos tecidos alvo, como por exemplo, nos músculos esqueléticos (WILLIAMS; THOMPSON, 2013). Assim, com o aumento da resistência insulínica nos músculos esqueléticos, ocorre uma diminuição da translocação dos transportadores GLUT 4 para a membrana plasmática e, conseqüentemente, ocorre uma menor captação da glicose, culminando em hiperglicemia. Portanto, podemos sugerir que a capacidade antioxidante do licopeno pode exercer ações protetoras benéficas no combate ao estresse oxidativo em células β do pâncreas, protegendo sua função, e assim preservando a capacidade de produzir e secretar insulina, permitindo que respostas antihiperglicêmicas sejam alcançadas nos tratamentos com licopeno. O licopeno também pode proteger os tecidos responsivos à insulina dos efeitos deletérios das ERO e, conseqüentemente, preservando a sensibilidade à insulina e a capacidade de captar glicose.

Animais tratados com metformina + licopeno em iogurte (DLICMET) apresentaram uma redução significativa nos níveis plasmáticos de glicose, tanto em relação aos animais DIOG quanto em relação aos animais diabéticos tratados com licopeno ou metformina isoladamente, demonstrando uma ação combinada ou aditiva deste tratamento no controle glicêmico. Podemos sugerir que, quando se associa a metformina ao licopeno, provavelmente ocorra uma ação conjunta entre as ações antihiperglicêmicas da metformina e a atuação do licopeno na melhoria dos níveis de adiponectina, demonstrando uma maior eficácia na diminuição dos níveis glicêmicos. Além disso, é conhecida a relação existente entre o estresse oxidativo e os prejuízos observados no DM que podem contribuir para a hiperglicemia. O estresse oxidativo é potencialmente prejudicial às células beta do pâncreas, estas são especialmente vulneráveis ao estresse oxidativo devido aos baixos níveis de enzimas antioxidantes e elevados requerimentos energéticos (SHAH et al., 2007). Assim, o aumento de ERO nestas células encontra-se associado aos prejuízos na secreção de insulina estimulada por glicose, diminuição na expressão de genes chave para o funcionamento da célula beta, e indução de morte celular (SIMMONS, 2006; PARK et al., 2009). Também crescem as evidências do envolvimento do estresse oxidativo no estabelecimento de resistência à insulina, em especial na musculatura esquelética (HERIKSEN, 2013), culminando em redução na captação de glicose. Portanto, a associação entre (i) um antioxidante (licopeno), que poderá atuar na atenuação do estresse oxidativo e também na preservação de ambos da

função pancreática e da capacidade responsiva dos tecidos periféricos em captar glicose de maneira dependente de insulina, e (ii) a metformina, atuando na redução da produção hepática de glicose, faz desta terapia combinada uma estratégia eficaz na redução da glicemia e das complicações do diabetes.

Apesar de ter apresentado uma ação aditiva na diminuição da glicemia de animais diabéticos em relação aos tratamentos isolados, o tratamento com metformina + licopeno não foi capaz de promover a mesma resposta aditiva em relação à tolerância à glicose, quando analisado o perfil glicêmico de animais DLICMET no TTGO: as melhorias observadas nos valores de glicemia no TTGO em animais DLICMET foram semelhantes àsquelas encontradas em animais DMET ou DLIC.

Na tentativa de explicar a não observação de efeito aditivo no TTGO em animais tratados com metformina + licopeno, seguimos o seguinte raciocínio: quando é realizado o monitoramento dos impactos dos tratamentos na glicemia, a coleta de sangue dos animais é realizada logo no início da manhã, em animais não jejuados, então entendemos que eles estão em uma condição que se assemelha ao estado pós-prandial, isto é, provavelmente duas horas após a ingestão da dieta (ração comercial), uma vez que estes animais comem durante a noite. Considerando que a dieta comercial é balanceada em relação aos macronutrientes, a quantidade de carboidratos que estes animais ingeriram em razão do tempo certamente é menor em comparação à quantidade de glicose recebida no TTGO, com monitoramento da glicemia imediatamente após esta sobrecarga. Assim, respostas aditivas na redução da glicemia nos animais tratados com metformina + licopeno, podem ser mais facilmente observadas quando estes estão no estado pós-prandial, em comparação às respostas antihiperlipemicas pós-sobrecarga de glicose nestes mesmos animais.

Após 30 dias de experimento, houve um aumento significativo nos níveis plasmáticos de triglicerídeos em animais DIOG, quando comparados aos valores em animais NIOG. No DM, é comum um aumento nos níveis séricos de triglicerídeos, que pode ser uma consequência da diminuição na atividade da lipase lipoproteica (LpL), responsável pela retirada dos triglicerídeos das lipoproteínas quilomícron e VLDL (RIFAI; WARNICK, 2006). A hipertrigliceridemia no DM também pode ser exacerbada pelo aumento observado na ingestão alimentar (hiperfagia), culminando em aumento na produção de quilomícrons.

Também ocorreu um discreto aumento nos níveis plasmáticos de triglicerídeos em todos os grupos diabéticos tratados com licopeno ou com metformina em iogurte, administrados de forma isolada ou combinada, porém com valores menores em relação aos

encontrados em animais DIOG. Assim, podemos dizer que os tratamentos com insulina, metformina ou licopeno foram eficientes na promoção de redução nos níveis de triglicerídeos em ratos diabéticos. A diminuição na glicemia promovida pelos tratamentos com licopeno, metformina, ou licopeno + metformina pode explicar, pelo menos em parte, a redução observada nos níveis de triglicerídeos, bem como um possível aumento na atividade da LpL, ou até mesmo diminuição na ingestão alimentar.

A metformina é capaz de diminuir a dislipidemia via alguns mecanismos: (i) diminuição na velocidade de síntese de lipoproteínas; (ii) inibição da produção hepática de glicose, principal substrato da lipogênese hepática; (iii) aumento na produção de GLP-1 e consequentemente diminuição da atividade da lipase gástrica (culminando em menor absorção de lipídeos), diminuição das apolipoproteínas apo B-48 e apo A-IV (culminando em diminuição na síntese e exportação de triglicerídeos) e por fim, reduzindo o fluxo linfático e o transporte dos lipídeos. Sabe-se que a expressão de genes envolvidos na lipogênese é regulada pela proteína reguladora do esterol-1c (SREBP-1c, do inglês *sterol regulatory element-binding protein-1c*). A atividade desta proteína é regulada positivamente pela ação da insulina e negativamente pela ação da AMPK e esta, por sua vez, é capaz de modular negativamente as atividades de enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos. Assim, as ações da metformina em promover a ativação da AMPK podem explicar suas ações antihiperlipidêmicas. Além disto, a ativação de AMPK é responsável por modular negativamente a síntese de colesterol e de triglicerídeos, por sua ação inibitória nas enzimas chave destes processos (VAN STEE et al., 2018).

Corroborando os achados encontrados neste trabalho, Roxo et al. (2019), ao tratarem ratos diabéticos (indução com STZ) com 250 mg/kg de metformina em iogurte durante 30 dias observou diminuição nos níveis plasmáticos de triglicerídeos e de colesterol, em comparação aos valores em animais diabéticos tratados somente com iogurte.

Antes do início dos tratamentos (dia 0), animais DIOG apresentaram um aumento nos níveis plasmáticos de colesterol em relação aos animais NIOG, os quais foram ainda maiores após 30 dias de experimento. Alguns fatores afetam negativamente o metabolismo das lipoproteínas, no diabetes: aumento na produção da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), culminando em subsequente aumento nos níveis da lipoproteína de baixa densidade (LDL), rica em colesterol; diminuição na atividade dos receptores de LDL, consequência da redução nos níveis de insulina (RIFAI; WARNICK, 2006).

Os tratamentos de ratos diabéticos com insulina (DINS), metformina (DMET), licopeno (DLIC) ou com a associação metformina + licopeno (DLICMET) foram eficazes na promoção de diminuição nos níveis plasmáticos de colesterol. Além da ação do licopeno na diminuição dos níveis glicêmicos, este carotenoide é capaz de promover inibição da HMG-CoA redutase, enzima chave no processo de síntese do colesterol (PALOZZA et al., 2012). O fato de a metformina ser capaz de reduzir os níveis plasmáticos de colesterol pode ter relação com a promoção de aumento na sensibilidade à insulina, permitindo que a insulina atue, principalmente, diminuindo os níveis circulantes de LDL (UKPDS, 1998).

Vale destacar que o tratamento de animais diabéticos com metformina + licopeno em iogurte, após 30 dias, foi capaz de promover uma diminuição nos níveis plasmáticos de colesterol maior que aquela observada com os tratamentos isolados. Podemos sugerir que as ações desta terapia combinada em promover redução nos níveis glicêmicos (disponibilizando menos substrato para a síntese hepática de colesterol) bem como as ações inibitórias sobre o processo de síntese do colesterol, em conjunto possam explicar a redução significativa nos níveis plasmáticos deste lipídeo em animais DLICMET.

Todos os grupos estudados apresentaram valores semelhantes de colesterol-HDL no dia 0. Ao final dos 30 dias de experimento, todos os grupos estudados, incluindo o NIOG, apresentaram uma diminuição nos níveis plasmáticos de colesterol-HDL, em relação ao início do tratamento. Redução nos níveis séricos de HDL pode ser observada no DM, devido a uma menor velocidade de síntese desta lipoproteína e aumento na atividade da lipase hepática, assim ocorre um aumento na degradação de HDL (LUDKE et al, 1999). Em estudo prévio realizado em nosso laboratório por Assis et al. (2017), observou-se que animais diabéticos tratados com licopeno, após 50 dias, apresentaram um aumento significativo nos níveis de colesterol-HDL, quando comparados aos animais diabéticos DIOG. No presente estudo, os resultados encontrados não estão de acordo com aqueles obtidos por Assis e colaboradores. Tais diferenças podem ser explicadas principalmente pelo fato de as análises realizadas por Assis e colaboradores terem sido conduzidas em plasma obtido de animais jejuados, e no presente estudo as coletas de sangue para obtenção do plasma foram feitas em animais alimentados. Outra diferença extremamente importante é o tempo de tratamento: Assis e colaboradores conduziram os tratamentos durante 50 dias, e no presente estudo foram realizados tratamentos durante 30 dias. O tratamento de ratos diabéticos com metformina normalmente encontra-se associado com promoção de benefícios ao perfil lipídico, com diminuição nos níveis de triglicerídeos e colesterol e aumento nos níveis de colesterol-HDL

(GIUGLIANO et al., 1993), embora no presente estudo não tenhamos encontrado os benefícios deste fármaco no aumento de HDL, certamente pelo curto tempo de tratamento e/ou impacto do estado alimentado.

O fígado exerce importante papel em uma série de processos vitais, incluindo regulação do metabolismo energético, armazenamento de glicose na forma de glicogênio, síntese de lipídeos, síntese de proteínas séricas, além de desempenhar papel fundamental na regulação dos níveis glicêmicos. Danos hepatocelulares causam a liberação, para a circulação, das enzimas alanina e aspartato aminotransferases (ALT e AST, respectivamente); por isso, as atividades destas enzimas são utilizadas como indicadoras de dano nos hepatócitos. Além disso, a progressão da lesão hepática é caracterizada por acúmulo de MDA, PCO e AGEs, quando esta lesão é associada ao estresse glico-oxidativo; diminuição nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px e diminuição nos níveis de GSH; infiltração de leucócitos e aumento na produção de citocinas; entre outros eventos (WELT et al., 2004; NANNIPIERI et al., 2005; MOHAMED et al., 2016; LI et al., 2015).

A ALT tem sido considerada um dos marcadores mais utilizados para o monitoramento de danos em hepatócitos devido a diversos eventos: patologias hepáticas ou hepatobiliares, inflamação, necrose ou fibrose na esteatose hepática, cirrose, carcinoma hepatocelular, hepatites virais e insuficiência hepática aguda (RAFTER et al., 2012; SOOKOIAN et al., 2015).

A enzima ALT catalisa a transaminação reversível entre a alanina e o alfa-cetoglutarato, gerando piruvato e glutamato, portanto desempenha papel fundamental no metabolismo da glicose e dos aminoácidos. Existem duas isoformas da enzima, ALT 1 e ALT 2. A ALT 1 é expressa em músculos, tecidos adiposos, rins, cérebro, fígado e mama; enquanto que a ALT 2 é expressa em altos níveis nos tecidos adiposos, rins, músculos e cérebro e em pequenos níveis no fígado (YANG et al., 2002; LINDBLOOM et al., 2007). No fígado, a ALT 1 está localizada apenas no citoplasma e retículo endoplasmático; por outro lado, a ALT 2 é preferencialmente localizada na matriz mitocondrial. Assim, tanto ALT 1 quanto ALT 2 podem refletir ruptura dos hepatócitos, bem como disfunção mitocondrial (RAFTER et al., 2012; SOOKOIAN et al., 2015).

O estabelecimento do DM é acompanhado, principalmente, pelo desenvolvimento de anormalidades bioquímicas e funcionais no fígado, incluindo prejuízos associados ao estresse oxidativo (SEIFALIAN et al., 2001; ZUWAŁA-JAGIEŁŁO et al., 2011). O desequilíbrio na relação entre as defesas antioxidantes e a geração de espécies reativas de oxigênio caracteriza

o estresse oxidativo. A hiperglicemia crônica é uma das principais causas relacionadas ao estabelecimento do estresse oxidativo no DM, e participa da promoção de danos em vários tecidos, incluindo o fígado (ZUWAŁA-JAGIEŁŁO et al., 2011). Além disto, a formação exacerbada e o acúmulo de AGEs em diversos tecidos ocorre de forma extremamente acelerada no DM (ARAKI et al., 1992; KUME et al., 1995; HYOGO; YAMAGISHI., 2008). O aumento na geração de AGEs contribui para o estímulo de vias inflamatórias, prejuízos na sinalização da insulina e disfunção do metabolismo hepático (KAUL et al., 2015). O fígado, bem como os rins, exerce um papel importante na eliminação dos AGEs, portanto em condições que causam danos hepáticos pode ocorrer o acúmulo de AGEs, favorecendo as consequências deletérias destes produtos avançados da glicação (SEBEKOVÁ et al., 2002; ZUWAŁA-JAGIEŁŁO et al., 2009).

Além das agressões ao fígado promovidas pelo estresse glico-oxidativo, a resistência insulínica, característica do DM tipo 2, pode contribuir para o desenvolvimento de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA); pode haver progressão para esteatohepatite não alcoólica, cirrose e carcinoma hepatocelular (MOHAMED et al, 2016). Já no DM tipo 1, a deficiência de insulina acarreta em aumento na atividade da LHS nos tecidos adiposos, e consequentemente ocorre um aumento na velocidade de lipólise e subsequente aumento nos níveis circulantes de ácidos graxos livres, que se acumulam no fígado; ocorre aumento na velocidade de síntese hepática de triglicerídeos (REGNELL; LERNMARK, 2011). Um aumento na velocidade de síntese de ácidos graxos e triglicerídeos também contribui com o acúmulo de triglicerídeos no tecido hepático (DONNELLY et al., 2005). Assim, em situação de excesso de glicose, esta pode ser convertida em ácidos graxos e estes são utilizados para sintetizar os triglicerídeos, que devem ser armazenados nos tecidos adiposos após exportação mediada por VLDL (BROWNING; HORTON, 2004). A montagem e a secreção hepática de VLDL é um processo complexo que envolve muitos genes e proteínas, incluindo ApoB (apolipoproteína B) e MTP (proteína microsomal de transferência de triglicerídeos). A proteína MTP é responsável pela transferência de triglicerídeos para ApoB, proteína estrutural do quilomícron, bem como das lipoproteínas VLDL, IDL e LDL (SPARKS; DONG, 2009). Portanto, o acúmulo de lipídeos no fígado pode ser uma consequência de desequilíbrios nos processos de captação, síntese, exportação e oxidação de lipídeos no fígado, culminando em injúria nos hepatócitos, com aumento na liberação de ALT para circulação (MOHAMED et al., 2016).

Animais diabéticos DIOG apresentaram um aumento nos níveis plasmáticos de ALT, em relação aos animais NIOG, sugerindo que a instalação do estresse glico-oxidativo pode ter sido responsável por danificar a integridade dos hepatócitos em animais diabéticos (KORUK et al., 2004). Todos os tratamentos (insulina, metformina, licopeno ou metformina + licopeno) foram eficazes na promoção de diminuição nos níveis plasmáticos de ALT, demonstrando os efeitos benéficos destes tratamentos na proteção da integridade dos hepatócitos.

Já são conhecidos os efeitos da metformina no DM, tanto por diminuir os níveis glicêmicos quanto por atenuar o estresse glico-oxidativo, portanto o fato da metformina promover uma diminuição nos níveis plasmáticos de ALT em animais DMET pode ser explicado pelas suas próprias ações relacionadas à redução da glicemia e assim diminuição dos impactos deletérios da glicação avançada e do estresse oxidativo no fígado, associados à hiperglicemia crônica, eventos estes que podem impactar negativamente na integridade de células hepáticas. Assim, o tratamento dos animais diabéticos com metformina, ao diminuir os níveis plasmáticos de glicose, contribui para a redução do estresse glico-oxidativo no fígado, contribuindo para a diminuição das agressões em hepatócitos e assim diminuição nos níveis de ALT no plasma. Em estudo realizado por Yanardag et al. (2005), ratos diabéticos (indução por STZ) tratados com 25 mg/kg de metformina por 28 dias apresentaram uma diminuição nos níveis de ALT, em relação aos ratos diabéticos não tratados, bem como melhorias na histologia do tecido hepático, corroborando os achados do presente trabalho.

O tratamento de ratos diabéticos com licopeno também promoveu diminuição nos níveis plasmáticos de ALT, quando comparados aos valores obtidos em animais DIOG. Este fato pode ser explicado por duas hipóteses: i) ação direta do licopeno sobre as espécies reativas de oxigênio formadas durante o estresse oxidativo, no fígado, ii) ação indireta do licopeno, promovendo aumento nos sistemas antioxidantes endógenos, via diminuição na glicemia ou do estresse oxidativo, atenuando processos de glicação e/ou de oxidação sobre as enzimas antioxidantes, eventos estes que podem prejudicar as suas atividades nos tecidos, dentre eles o fígado. Os achados do presente trabalho são corroborados parcialmente por estudo de Eze et al. (2016), onde ratos diabéticos (indução por STZ) foram tratados com 10, 20 e 40 mg/kg de licopeno, durante 30 dias, e foi observada redução nos níveis plasmáticos de ALT.

O tratamento de ratos diabéticos com metformina + licopeno em iogurte foi eficaz na redução dos níveis plasmáticos de ALT, em comparação aos animais diabéticos DIOG. Esta diminuição nos níveis plasmáticos de ALT em animais DLICMET também foi maior que

aquela promovida pelos tratamentos isolados, sugerindo a ocorrência de efeitos combinados e/ou aditivos na associação metformina + licopeno quanto ao potencial em proteger o fígado de agressões devido ao DM. Tal achado pode ser explicado pela associação dos benefícios de um antihiperglicemiante (metformina) com um composto natural com alto poder antioxidante (licopeno) de elevada capacidade de proteção hepática.

Com o estabelecimento do DM e sem o efetivo controle desta síndrome, elevados níveis glicêmicos são mantidos, favorecendo o estabelecimento do estresse oxidativo, especialmente via aumento na produção de ERO (NIEDOWICZ; DALEKE, 2005). Estas, por sua vez, são responsáveis por oxidar proteínas em resíduos de aminoácidos específicos (lisina, prolina, arginina e treonina, principalmente), podendo torná-las biomoléculas com prejuízos em suas funções na dependência do grau de oxidação. Assim, grupos carbonilas em proteínas são biomarcadores importantes para o monitoramento do estresse oxidativo em diversas condições, incluindo o DM (DALLE-DONE et al., 2003).

Sabe-se que a interação AGE-RAGE regula diversos eventos, via ativação de várias cascatas de sinalização, resultando em disfunção celular. Receptores RAGE, quando ativados, estimulam uma cascata sinalizatória dependente de PI3K-Akt-IKK, com ativação de NF- κ B, com sua subsequente translocação para o núcleo, aumentando a expressão de citocinas inflamatórias. A ativação de RAGE também promove aumento na produção de ERO, apoptose e a autofagia (OTT et al., 2014; PASUPULATI et al., 2016; EMEL'YANOV, 2017). Assim, com o aumento na produção de AGEs, condição típica do DM, pode ocorrer um aumento concomitante na produção de ERO que, por sua vez, oxidam proteínas, gerando PCO.

Em concordância com a explicação anterior, animais diabéticos DIOG apresentaram valores significativamente maiores de PCO no plasma, em comparação aos valores observados em ratos normais NIOG ou em ratos diabéticos tratados com insulina, metformina, licopeno, ou metformina + licopeno. Todos os tratamentos de animais diabéticos com insulina, metformina e/ou licopeno em iogurte foram eficazes na promoção de diminuição nos níveis de PCO no plasma.

Assis et al. (2017) observaram que animais diabéticos tratados por 50 dias com licopeno em iogurte apresentaram uma diminuição nos níveis de PCO, corroborando os resultados obtidos no presente estudo. A elevada capacidade do licopeno em reduzir as complicações oxidativas observadas em doenças, incluindo o DM, pode ser explicada principalmente pela sua estrutura química; as onze ligações duplas conjugadas conferem à

molécula do licopeno uma alta capacidade de anular os efeitos deletérios de ERO, atuando, principalmente, na diminuição do estresse oxidativo e seus prejuízos sobre macromoléculas, tais como proteínas, lipídeos e DNA (RAO et al., 2007; GRABOWSKA et al., 2019).

No presente estudo, a metformina foi escolhida para a realização dos tratamentos de animais diabéticos, sejam os animais do grupo DMET ou do grupo DLICMET, mesmo sendo o nosso modelo experimental de DM aquele que mimetiza as alterações observadas no DM tipo 1. A razão que nos motivou a escolher a metformina está relacionada não somente a sua ação antihiperlipidêmica, mas também devido a sua capacidade em diminuir os níveis de AGEs, o que pode ter contribuído para a promoção de redução nos níveis de PCO (BEISSWENGER; RUGGIERO, 2000).

O tratamento de animais diabéticos com metformina + licopeno foi capaz de diminuir os níveis plasmáticos de PCO, mas não foram observadas diferenças quando comparados com os tratamentos isolados, mesmo o tratamento combinado sendo mais eficaz na redução dos níveis plasmáticos de glicose e de AGEs, em relação aos tratamentos isolados. Assim, mesmo que a associação metformina + licopeno não tenha se mostrado melhor do que os tratamentos isolados na atenuação dos processos oxidativos sobre proteínas, não foram observadas perdas das ações antioxidantes dos compostos isolados, ou seja, as ações da metformina e do licopeno foram preservadas quando administrados de forma combinada aos ratos diabéticos.

Todos os animais diabéticos, exceto animais DINS e DLICMET, apresentaram um aumento nos níveis plasmáticos de TBARS, quando comparados aos valores observados em animais NIOG, os quais, em conjunto com os elevados níveis plasmáticos de PCO, refletem o estabelecimento do estresse oxidativo em animais diabéticos.

Os fármacos escolhidos para a realização do presente trabalho têm mostrado resultados promissores quanto à capacidade em atenuar a peroxidação lipídica em animais diabéticos. Peixoto et al. (2017), ao tratarem ratos diabéticos com 500 mg/kg de metformina, observaram que houve redução nos níveis de TBARS em músculos *gastrocnemius*, quando comparados aos animais diabéticos sem tratamento. Assis et al. (2017) também observaram que o tratamento de ratos diabéticos com licopeno em iogurte foi eficaz na diminuição dos níveis de TBARS no plasma, em comparação aos animais diabéticos DIOG, após 50 dias de tratamento. Os resultados encontrados no presente trabalho referentes a não diminuição do TBARS plasmático após os tratamentos de animais diabéticos com licopeno ou com metformina isoladamente, especialmente em relação ao licopeno, pode estar relacionado ao menor tempo de tratamento realizado no presente trabalho (30 dias), quando comparado ao

estudo de Assis et al. (2017), que realizaram o tratamento por 50 dias. No entanto, vale a pena destacar que, mesmo que os tratamentos de ratos diabéticos com metformina ou licopeno de forma isolada não tenham sido eficazes na diminuição dos níveis de TBARS plasmáticos, estas terapias isoladas foram eficazes na promoção de diminuição nos níveis glicêmicos, PCO, AGEs fluorescentes, bem como promoveram aumentos na atividade de PON 1, ou seja, metformina ou licopeno isoladamente são eficazes na atenuação do estresse glico-oxidativo no diabetes.

Diferente dos tratamentos isolados, o tratamento de ratos diabéticos com a combinação de metformina + licopeno em iogurte foi eficaz na redução dos níveis plasmáticos de TBARS, quando comparados aos tratamentos isolados e aos valores encontrados em animais DIOG. Tal fato evidencia o potencial benéfico da associação metformina + licopeno em ratos diabéticos no combate à peroxidação lipídica. A associação entre (i) um potente antioxidante, neste caso o licopeno, capaz de promover uma diminuição no estresse oxidativo, sequestrando as espécies reativas formadas durante o estresse oxidativo bem como aumentando as defesas antioxidantes SOD e CAT (JACOB et al., 2008; YIN et al., 2019), e (ii) o fármaco metformina, responsável pela diminuição nos níveis glicêmicos, mas também sendo capaz de promover um aumento nas defesas antioxidantes (BLOCH-DAMTI; BASHAN, 2005), tais efeitos combinados se mostraram eficazes no combate à lipoperoxidação, culminando em redução de TBARS plasmático.

Houve um aumento nos níveis de AGEs fluorescentes em plasma ratos diabéticos DIOG, em comparação aos valores encontrados em animais normais NIOG; tal resultado sugere que houve a instalação do estresse glicativo em ratos diabéticos. Com a cronicidade da hiperglicemia, ocorre um aumento nos processos de glicação não enzimática de biomoléculas, culminando em aumento na formação dos AGEs, além de levar a um aumento no fluxo de substratos para serem oxidados por processos mitocondriais, acarretando em um aumento na produção de ERO, que por sua vez, podem exacerbar a produção de AGEs. Assim, a hiperglicemia persistente no DM é responsável pelo aumento na produção de AGEs (ROLO; PALMEIRA, 2006). Corroborando nossos achados, Jing et al. (2010) e Sohn et al. (2010) também encontraram aumento nos níveis de AGEs em aorta de ratos diabéticos (indução com STZ), em comparação a ratos normais, não diabéticos. Também em concordância com os nossos achados, estudo prévio de nosso laboratório de Roxo e colaboradores (2019) encontraram um aumento nos níveis de AGEs fluorescentes plasmáticos em ratos diabéticos (indução com STZ), após 30 dias de experimento.

Ao final dos 30 dias de tratamento, animais diabéticos tratados com insulina, metformina ou licopeno em iogurte apresentaram diminuição nos níveis plasmáticos de AGEs fluorescentes, quando comparados aos valores encontrados em ratos DIOG. A diminuição nos níveis plasmáticos de AGEs fluorescentes em animais diabéticos tratados com metformina pode ser explicada pela sua ação antihiperlipidêmica. Além disso, existem evidências das ações diretas do fármaco sobre compostos intermediários dicarbonílicos, incluindo o metilglioxal. A reação entre metformina e metilglioxal forma um composto condensado e identificado como triazepinona (TZP); quanto maior a produção de TZP, maior a ação da metformina em diminuir os níveis de AGEs plasmáticos (BEISSWENGER; RUGGIERO, 2003).

Podemos sugerir que a ação do licopeno em diminuir os níveis plasmáticos de AGEs em ratos diabéticos esteja relacionada, pelo menos em parte, com sua ação na diminuição dos níveis glicêmicos. Tabrez et al. (2015), ao estudarem os efeitos do tratamento de animais em modelo de estresse glicativo (administração de D-ribose por 35 dias) com 10 mg/kg de licopeno, os autores observaram que houve uma diminuição em diversos marcadores do estresse glico-oxidativo nos rins, incluindo AGEs, RAGE, MDA, PCO, bem como redução de fatores de transcrição pró-inflamatórios (NF- κ B e metaloproteinase de matriz 2; MMP 2). Em relação às defesas antioxidantes, os autores observaram nos rins um aumento nas enzimas antioxidantes SOD, CAT, GSH-Px e nos níveis do metabólito GSH.

Vale destacar que a diminuição nos níveis plasmáticos de AGEs fluorescentes em animais diabéticos tratados com metformina + licopeno (DLICMET) foi maior que a diminuição promovida pelos tratamentos isolados, mostrando um efeito benéfico aditivo na diminuição dos AGEs, o que pode ser uma consequência da combinação dos distintos mecanismos de ação que o licopeno e a metformina apresentam na promoção de redução de AGEs, tal como previamente descrito.

Houve uma diminuição na atividade da PON 1 em plasma de animais DIOG, após 30 dias, quando comparados aos valores em animais NIOG. A PON 1 é uma enzima associada à HDL e possui propriedades antioxidantes (AVIRAM e ROSENBLAT, 2005), sendo capaz de proteger os lipídeos carregados em LDL e HDL, bem como os macrófagos, contra eventos oxidativos (SAMPSON et al., 2005; MASTORIKOU et al., 2006).

Uma das hipóteses que podem explicar a diminuição na atividade da PON 1 em plasma de animais diabéticos pode ter relação com uma redução nos níveis de HDL (AVIRAM; ROSENBLAT, 2005). Em nosso estudo, foi observada diminuição nos níveis de

HDL em plasma de animais diabéticos após 30 dias de experimento, o que poderia explicar a redução na atividade de PON 1. Porém, animais normais também apresentaram diminuição nos níveis de HDL em plasma, portanto esta hipótese pode ser descartada. Assim, podemos sugerir que, no presente estudo, a redução na atividade da PON 1 não tenha relação com mudanças nos níveis circulantes de HDL, e sim talvez seja uma consequência de modificações pós-traducionais na enzima, em especial um aumento na glicação desta enzima, bem como uma diminuição na síntese desta enzima antioxidante e, portanto, redução de sua presença na lipoproteína HDL. A glicação de componentes proteicos de HDL, incluindo a PON 1, pode resultar em dissociação da PON 1 da lipoproteína HDL, ou em inativação da PON 1 na HDL, ambas as condições associadas à perda de sua função (FERRETTI et al., 2001; KARABINA et al., 2005). Em estudo de nosso laboratório realizado por Roxo et al. (2019), ratos diabéticos (induzidos com STZ), após 30 dias de experimento, também apresentaram uma diminuição na atividade de PON 1, quando comparados aos animais não diabéticos.

Todos os tratamentos de animais diabéticos com fármacos e/ou ativos naturais (insulina, metformina, licopeno, metformina + licopeno) promoveram aumento na atividade de PON 1, em relação aos animais diabéticos DIOG. Assis et al. (2017) demonstraram que o tratamento de animais diabéticos com licopeno em iogurte por 50 dias foi eficaz na prevenção da redução da atividade da PON 1. Parte das ações protetoras da atividade da PON 1 no tratamento combinado se deve às ações benéficas do licopeno em atenuar o estresse oxidativo, explicado pelo seu alto poder antioxidante. Sabe-se que o estresse oxidativo é relacionado com um aumento em processos de peroxidação lipídica tanto de lipídeos de membrana quanto em componentes de lipoproteínas (STEINBERG, 1997). Portanto, o ataque das ERO em componentes de lipoproteínas, tal como a HDL, acarreta diretamente em uma menor atividade de PON 1. Evidências indicam que PON 1 é vulnerável às ações deletérias de agentes que promovem sua oxidação (WEI et al., 2017; ROXO et al., 2019).

Wójcicka et al. (2016) realizaram o tratamento de animais diabéticos com metformina e, ao avaliarem a atividade de PON 1, observaram que o tratamento foi eficaz na prevenção da perda da atividade de PON 1, quando comparados aos animais diabéticos sem tratamento. Os mecanismos pelos quais a metformina foi capaz de realizar estes efeitos ainda não são totalmente esclarecidos. Uma hipótese que pode explicar os efeitos da metformina em aumentar atividade de PON 1 tem relação com a redução nos níveis glicêmicos e consequentemente nos níveis de AGEs; animais tratados com metformina apresentaram

redução na glicemia bem como nos AGEs plasmáticos, o que representa uma diminuição nos processos glicativos, e isso inclui a glicação da PON 1.

Embora no presente estudo não tenham sido encontradas alterações nos níveis de HDL, a atividade de PON 1 encontra-se elevada em animais DLICMET. Ao unir um ativo natural com uma potente ação antioxidante (JACOB et al., 2008) com um fármaco antihiperglicemiante que possui ações diretas no combate aos processos de formação de AGEs (CHENG et al., 2006), podemos assim favorecer uma diminuição em processos glicativos, além de contribuir para a redução em danos oxidativos em lipídeos e proteínas na HDL, mesmo sem aumento nos níveis circulantes desta lipoproteína; podemos dizer que o tratamento combinado melhorou a “qualidade” da lipoproteína. Desta forma, a associação entre metformina e licopeno torna-se interessante não somente visando a diminuição da hiperglicemia, mas também possuindo como objetivo a atenuação do estresse glico-oxidativo e a dislipidemia. Assim, este estudo fornece evidências iniciais de uma estratégia terapêutica promissora para as complicações do DM, bem como de eventos cardiovasculares.

Em muitas doenças, incluindo o DM, biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo estão aumentados no fígado já em estágios iniciais, e tais alterações podem contribuir para o início e progressão de lesões hepáticas, as quais são caracterizadas pelo aumento nas taxas de liberação das enzimas hepáticas, incluindo ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), ALP (fosfatase alcalina) e γ -GT (γ -glutamil transpeptidase ou γ -glutamil transferase). Outras consequências que podem ser observadas no fígado durante processos patológicos, especialmente aquelas relacionadas às disfunções metabólicas, e que incluem acúmulo de TBARS, PCO e AGEs, e diminuição nas atividades de enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px (SEVEN et al., 2004; DIAS et al., 2005; WELT et al., 2004; NANNIPIERI et al., 2005; MOHAMED et al., 2016; LI et al., 2015).

O metabólito GSH (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) está presente na maioria das células e é o tiol não proteico mais abundante no meio intracelular. Sua potente capacidade antioxidante é proveniente do grupamento tiol presente no resíduo de cisteína (MEISTER; ANDERSON, 1983; FERREIRA et al., 1997). Deste modo, quando analisamos os níveis de grupos tióis não proteicos nos tecidos (incluindo fígado e rim), podemos sugerir que estes tenham relação direta com os níveis de GSH nestes tecidos. Ainda, a molécula de GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes dos sistemas de defesas antioxidantes da célula, além de diminuir a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia. Também atua

no transporte de cisteína e é considerado um reservatório deste aminoácido, participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de peróxidos, estes sendo produtos da peroxidação lipídica (DENEKE; FANBURG, 1989; FERREIRA et al., 1997).

Diferente dos resultados encontrados no plasma, animais diabéticos DIOG apresentaram, no fígado, níveis de TBARS inferiores aos encontrados em fígado de animais NIOG. Tal fato pode ter relação com as respostas observadas, no fígado, com os componentes do sistema da glutathione. Sabe-se que a enzima GSH-Px é capaz de exercer sua atividade mesmo com baixas concentrações de GSH, um de seus co-substratos. Além disso, existem afinidades diferenciais de certas isoformas de GSH-Px por diversos peróxidos, dentre eles, os peróxidos lipídicos ou produtos secundários da lipoperoxidação, como o malondialdeído, formando como principais produtos água e álcoois (ESWORTHY et al., 1993). Com a instalação do estresse oxidativo no DM, há um aumento na produção de peróxidos lipídicos nesta ambiência de estresse oxidativo, o qual pode ser o responsável por estimular mecanismos compensatórios que culminam em aumento na atividade de GSH-Px com o intuito de aumentar a detoxificação de peróxidos lipídicos (BROWNLEE, 2001; JAGDALE et al., 2016). Tal possível mecanismo compensatório foi evidenciado em nosso estudo, uma vez que a atividade de GSH-Px em fígado de animais DIOG mostrou-se elevada, em comparação aos animais NIOG.

A enzima glutathione-S-transferase (GST) pertence a uma família de isoenzimas (metabólicas de fase II); é uma das principais enzimas no fígado envolvidas na detoxificação de produtos de peroxidação lipídica, catalisando a conjugação dos lipoperóxidos com a molécula de GSH, aumentando a hidrossolubilidade destes lipoperóxidos, facilitando sua excreção; assim, sua ação detoxificante é importante na proteção contra o estresse oxidativo (KAUSHIK; KAUR, 2003; TORRES et al., 2006). Algumas isoenzimas da GST estão envolvidas na conjugação do 4-HNE ao GSH, atuando como uma importante via de eliminação deste aldeído altamente reativo (SCHAUR et al., 2015).

Desta maneira, uma outra hipótese a ser aventada é que os peróxidos lipídicos estejam sendo produzidos de forma exacerbada em fígado de animais DIOG, devido ao estresse oxidativo típico do DM, porém estão sendo eliminados em uma taxa ainda mais eficiente, devido à combinação entre as atividades aumentadas de GSH-Px e de GST. Os menores níveis de grupos tiois não proteicos, os quais incluem GSH, em fígado de animais DIOG sugerem as maiores taxas de oxidação deste metabólito, provavelmente pelas atividades aumentadas de GSH-Px e de GST. Kaushik e Kaur (2003), ao analisarem a modulação das

atividades de diversas enzimas antioxidantes após estresse ocasionado pelo frio crônico em ratos, observaram que, após 21 dias, houve um aumento nas atividades de GST (cérebro, fígado, rim e intestino) e GSH-Px (cérebro e intestino), bem como redução dos níveis de GSH em cérebro, intestino, rim, fígado e coração de animais submetidos ao frio, em comparação àqueles que não foram submetidos a nenhum tipo de estresse. Além disto, observaram que a magnitude de aumento na atividade de GST no fígado destes animais foi muito maior que os aumentos observados em outros tecidos analisados, tais como cérebro, rim, coração e intestino, dando suporte à hipótese descrita no presente trabalho. Assim, torna-se necessária a investigação da atividade de GST no fígado e rim, para comprovar esta hipótese.

Ao contrário dos nossos achados, em estudo recente de nosso laboratório observou-se que ratos diabéticos DIOG (indução via administração de STZ), após 35 dias de experimento, apresentavam diminuição na atividade de GSH-Px, no fígado, em comparação aos animais NIOG (GUTTIERRES et al., 2019). O fato que pode explicar as diferenças encontradas no presente trabalho *versus* o trabalho de Gutierrez e colaboradores em relação à atividade de GSH-Px pode ser devido às diferenças nos níveis glicêmicos dos animais diabéticos, e portanto, diferenças na severidade do modelo experimental. Os animais DIOG no trabalho de Gutierrez e colaboradores apresentaram valores de glicemia maiores desde o início do tratamento: no dia 0, animais DIOG apresentaram valores médios de glicemia de aproximadamente 525 mg/dL e, no dia 35, valores de glicemia de aproximadamente 650 mg/dL. No presente estudo, animais DIOG apresentaram valores médios de glicemia menores, tanto no início (aproximadamente 400 mg/dL) quanto ao final (aproximadamente 550 mg/dL) dos 30 dias de experimento. Assim, considerando estas diferenças nos níveis glicêmicos encontrados em Gutierrez et al. (2019) *versus* presente estudo, mesmo utilizando o mesmo modelo experimental de DM e o mesmo tempo de experimento, os maiores valores de glicemia dos ratos DIOG no estudo de Gutierrez e colaboradores podem ser os responsáveis pela maior promoção de estresse glico-oxidativo, superando os mecanismos de compensação antioxidante, ou até mesmo criando uma ambiência de modificação pós-traducional sobre a GSH-Px (como por exemplo, maior chance de glicação), o que poderia impactar negativamente em sua atividade.

Normalmente intervenções benéficas ao combate do estresse oxidativo, em modelos experimentais de patologias, tendem a aumentar as atividades das enzimas antioxidantes, especialmente quando esta intervenção é um ativo antioxidante de origem natural (ARCARO et al, 2014; ASSIS et al., 2017; GUTIERRES et al., 2019), assim como aconteceu para as

enzimas SOD e CAT no fígado e rins de animais diabéticos tratados com licopeno e metformina + licopeno. Contudo, no presente estudo e em relação ao sistema da glutatona no fígado, este aumento não foi observado. Animais diabéticos submetidos a todos os tratamentos apresentaram, no fígado e rim: (i) redução na atividade de GSH-Rd em relação aos animais DIOG; (ii) praticamente a mesma atividade de GSH-Px (isto é, alta) que aquela encontrada em animais DIOG. Este último achado com animais diabéticos, tratados ou não, reiteram o fato de que o aumento nos componentes do sistema da glutatona em fígado de animais DIOG (atividades de GSH-Px e GSH-Rd), mas também em rim, seja uma resposta compensatória ao possível aumento na geração de espécies oxidantes, algo que provavelmente foi atenuado ou evitado pelos tratamentos.

Animais diabéticos DIOG apresentaram um aumento nos níveis de AGEs fluorescentes e de PCO hepáticos, quando comparados aos animais NIOG, o que pode ser atribuído à hiperglicemia culminando em estresse glico-oxidativo (PHAM-HUY et al., 2008; ULLAH et al., 2015). Sabe-se que o aumento na formação de AGEs bem como o aumento na oxidação de proteínas são responsáveis pelo estabelecimento das complicações diabéticas no tecido hepático, em longo prazo (GUGLIUCCI, 2000). Desta forma, os tratamentos de ratos diabéticos com compostos capazes de controlarem a glicemia, assim como capazes de reduzirem o estresse glico-oxidativo, podem contribuir para evitar as anormalidades estruturais e funcionais do fígado, consequentemente prevenindo o aparecimento de complicações nesse órgão.

Ao tratarmos ratos diabéticos com 250 mg/kg de metformina, observamos diminuição na glicemia e atenuação das complicações associadas à hiperglicemia. Assim, tal resposta antihiperglicêmica pode ter contribuído para a diminuição observada na oxidação de proteínas (PCO) no fígado. Tal como anteriormente descrito, a redução nos níveis de AGEs hepáticos também pode ser atribuída ao potencial da metformina em reagir com o metilglioal, formando triazepinona (LIN et al., 2016). Porém, as ações da metformina em reduzir a glicemia também devem ser consideradas.

Diversas evidências demonstram o papel benéfico dos alimentos ricos em licopeno na prevenção de alguns tipos de câncer e de diversas doenças crônicas (SIES e STAHL, 1995; KHACHIK et al., 2002; VITAGLIONE; FOGLIANE, 2004); isto acontece devido a sua alta capacidade antioxidante, eliminando ERO e diminuindo seus efeitos deletérios, dentre eles, a formação exacerbada dos AGEs. Sabe-se que AGEs e ERO são formados concomitantemente com o aumento do estresse glico-oxidativo decorrente do DM, gerando um “ciclo vicioso”.

Estudos demonstram que o licopeno *per se* não possui propriedade anti-AGE, ou seja, diferente da metformina, o licopeno não é capaz de atuar diretamente nos AGEs formados durante o estresse glico-oxidativo, mas por atuar diretamente sobre as ERO, eliminando-as, diminuindo de forma indireta, a formação de AGEs (AHMAD et al., 2014; TRABEZ et al., 2019).

Corroborando parcialmente nossos achados, Trabez et al. (2015) observaram que ratos tratados com 3,2 g/kg de ribose + 10 mg/kg de licopeno durante 5 semanas apresentaram diminuição na expressão de receptores RAGE, NF- κ B e nos níveis de CML-AGE, bem como aumento nas atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT nos rins, em comparação aos animais tratados apenas com ribose, evidenciando as ações benéficas do licopeno em promover atenuação do estresse glico-oxidativo.

De acordo com os resultados do presente estudo, ratos diabéticos tratados com a associação de metformina + licopeno apresentaram diminuição dos níveis hepáticos de PCO e AGEs fluorescentes, semelhante aos efeitos promovidos pelos tratamentos isolados com metformina ou licopeno, sugerindo assim que a associação não anulou os benefícios encontrados com os tratamentos isolados.

A neutralização das ações deletérias de ERO pode ocorrer via atividade das enzimas SOD e CAT. As ERO podem ter sua produção exacerbada no DM via alguns mecanismos: aumento nos processos de auto-oxidação da glicose, aumento na formação de AGEs, ativação da proteína quinase C, aumento do fluxo de substratos pela via dos polióis e da hexosamina, durante o processo de respiração celular (na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial), e através da atividade de enzimas NADPH oxidases (BARBOSA et al., 2010). Além disso, no DM, pode-se observar que, além de uma exacerbada produção de ERO, ocorre um aumento nos processos glicativos das enzimas antioxidantes SOD e CAT, consequentemente diminuição de suas atividades no combate às ERO (VINCENT et al., 2004). Assis et al. (2017) observaram que o tratamento de ratos diabéticos com licopeno em iogurte atenuou o estresse oxidativo no fígado de ratos diabéticos, caracterizado tanto por níveis reduzidos de PCO quanto pelo aumento nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px.

Nossos resultados mostram que ratos diabéticos DIOG apresentaram diminuição nas atividades de SOD e CAT no fígado e no rim, em comparação aos valores observados em animais NIOG, o que pode ser uma consequência do aumento nos processos de glicação destas enzimas, em animais diabéticos (JAGTAP; PATIL, 2010). Animais diabéticos tratados com insulina apresentaram aumentos nas atividades de SOD e CAT em fígado e rim, em

paralelo às potentes ações antihiperlipidêmicas da insulina que, ao manter os níveis glicêmicos próximos à normalidade, certamente contribui para a menor ocorrência de glicação de proteínas (incluindo a glicação das enzimas antioxidantes supracitadas).

O tratamento de animais diabéticos com metformina aumentou (ou preveniu a diminuição) a atividade da CAT no fígado e no rim, por outro lado não aumentou a atividade de SOD, em relação aos animais diabéticos DIOG. Em estudo realizado por Dai et al. (2014), ao utilizarem um modelo experimental de camundongos com hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono, e estes animais sendo tratados com 500 mg/kg de metformina, os autores demonstraram que a metformina foi capaz de prevenir a diminuição na atividade da CAT, enquanto que não apresentou efeito sobre a atividade da SOD no fígado, a qual permaneceu baixa, corroborando os achados do presente trabalho. Os autores sugerem que a metformina é capaz de aumentar a atividade da CAT via mecanismos independentes da ativação da AMPK, fato comprovado pela diminuição dos níveis de H_2O_2 no tecido hepático, já que a CAT é responsável por converter o H_2O_2 em água. Além disto, os autores realizaram a análise da expressão de CAT, e observaram que a metformina não foi capaz de aumentar a expressão desta proteína. Provavelmente as ações da metformina em aumentar a atividade de CAT estejam relacionadas à proteção da cadeia polipeptídica da enzima contra eventos pós-traducionais, e não por estímulo à expressão gênica.

O licopeno tem uma função importante na atenuação do estresse oxidativo, atuando diretamente na eliminação das ERO (*scavenger*), peróxidos lipídicos e óxido nítrico, que são produzidos exacerbadamente no DM (FORNI et al., 2019). Assim, o licopeno pode contribuir para a diminuição dos efeitos deletérios que ocorrem com o excesso na geração de radicais livres no organismo, e ainda pode aumentar a capacidade das defesas antioxidantes endógenas, via aumento das enzimas como SOD e CAT (TOGASHI et al., 1990; SINCLAIR et al., 1993; ALI; AGHA., 2009). Ali e Acha (2009) observaram, ao tratarem ratos diabéticos com diferentes doses de licopeno (20, 40, 60, 80 e 100 mg/kg), que houve aumento nas defesas antioxidantes, tais como SOD e CAT nos eritrócitos, quando comparados aos animais diabéticos não tratados, corroborando, pelo menos em parte, os resultados obtidos neste trabalho. Assis et al. (2017), ao tratarem animais diabéticos com 45 mg/kg de licopeno, também observaram aumento nas atividades das enzimas SOD e CAT, no fígado, quando comparados aos animais diabéticos DIOG.

O tratamento de animais diabéticos com a associação licopeno + metformina foi capaz de aumentar as atividades de SOD e CAT, tanto no fígado quanto no rim, quando comparados

aos animais diabéticos DIOG, porém este efeito foi semelhante aos tratamentos isolados, exceto o tratamento com a metformina, que não preveniu a diminuição na atividade de SOD.

Tal como observado no fígado, o aumento nos níveis de PCO observado nos rins de animais DIOG caracteriza a instalação do quadro de estresse oxidativo. A doença renal diabética é uma das complicações prevalentes no DM tipos 1 e 2, e é a principal causa de insuficiência renal crônica e doença renal terminal (KOYE et al., 2017). A hiperglicemia crônica leva à ativação de vários processos patológicos que afetam negativamente numerosas células nos rins, incluindo células endoteliais glomerulares, musculares lisas, mesangiais, podócitos e células dos dutos tubulares e coletores (FORBES et al., 2013). O estresse glico-oxidativo desempenha um papel importante na iniciação e progressão da nefropatia diabética, caracterizada por anormalidades funcionais e estruturais (FORBES et al., 2008).

O aumento das ERO juntamente com deficiências nos sistemas antioxidantes causa danos significativos nos rins, contribuindo para o estabelecimento de inflamação e fibrose renal. Dentre os muitos sistemas responsáveis pela geração de ERO nos rins, a NADPH oxidase é um dos contribuintes mais importantes (JHA et al., 2016). Além disso, a geração de AGEs *per se* e a sua interação com o receptor RAGE desencadeiam mecanismos celulares e moleculares que promovem eventos patológicos relacionados à nefropatia diabética, tais como: alteração da homeostase da função renal, espessamento da membrana basal e mesangial, indução da inflamação e fibrose, podocitopatia e mesangiopatia, entre outros (PASUPULATI al., 2016).

O tratamento de ratos diabéticos com insulina promoveu diminuição nos níveis de TBARS e PCO nos rins; ao manter os níveis glicêmicos próximos à normalidade, a insulina pode assim atenuar os efeitos deletérios dos AGEs gerados durante o estresse glico-oxidativo no organismo, incluindo os rins.

O tratamento de ratos diabéticos com metformina também diminuiu os níveis de TBARS e PCO nos rins. Tal como a insulina, uma vez que foi observada melhoria na homeostase glicêmica, a metformina também é capaz de diminuir os efeitos deletérios gerados pelo aumento do estresse glico-oxidativo, atenuando as ações prejudiciais que o DM ocasiona ao tecido renal. Estes achados corroboraram os resultados obtidos por Erejuwa et al. (2011), ao tratarem ratos diabéticos com 100 mg/kg de metformina, observando que os animais apresentaram um aumento da capacidade antioxidante via aumento nas concentrações de GSH e GSSG, bem como a diminuição dos níveis de TBARS nos rins.

Ratos diabéticos tratados com licopeno também apresentaram níveis glicêmicos reduzidos quando comparados aos animais diabéticos DIOG, e com isto houve uma diminuição do estresse glico-oxidativo nos rins desses animais. Sabe-se que o licopeno atua diretamente sob as ERO e também, é capaz de aumentar as defesas antioxidantes do organismo, ações estas já descritas no presente trabalho. Assim, o licopeno, ao exercer todos esses benefícios sobre o desequilíbrio que ocorre entre a produção de espécies reativas e a diminuição de defesas antioxidantes em um quadro de DM, pode contribuir na diminuição dos níveis de TBARS e PCO no tecido renal (RAO et al., 1999).

Em relação aos tratamentos isolados, o tratamento com a associação de metformina + licopeno foi capaz de promover uma redução adicional nos níveis de TBARS nos rins, enquanto que em relação aos níveis de PCO, prevaleceram os efeitos do tratamento com licopeno. A resposta aditiva sobre os níveis renais de TBARS pode ser consequência da somatória das ações dos compostos isolados, onde a metformina contribui promovendo uma redução nos níveis glicêmicos e diminuição na produção de AGEs, e o licopeno contribui com sua ação antioxidante *per se*, atenuando o estresse oxidativo.

Em relação aos níveis de PCO, o tratamento de ratos diabéticos com metformina + licopeno demonstrou a prevalência das ações benéficas do licopeno, um antioxidante natural, atenuando o dano oxidativo em proteínas no tecido renal.

Interessantemente, os resultados obtidos em nosso estudo indicam que os animais diabéticos DIOG apresentaram uma diminuição nos níveis de AGEs fluorescentes nos rins, em relação aos animais não diabéticos, NIOG. O aumento na geração de AGEs no curso do DM é um dos mecanismos através dos quais a hiperglicemia causa danos ao organismo, e um acúmulo de AGEs comumente acontece em diversos tecidos, dentre eles o rim (BROWNLEE, 2001; BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2002; SPITALER; GRAIER, 2002).

Uma hipótese associada a esta diminuição nos níveis de AGEs nos rins de animais diabéticos DIOG pode ser a seguinte: pode ter ocorrido um mecanismo compensatório em rins de ratos DIOG, devido a um aumento nos níveis de AGEs no curso do diabetes, com subsequente estímulo ao aumento na expressão e/ou atividade de componentes que participam dos mecanismos de detoxificação de AGEs, incluindo os receptores AGE-R e o sistema da glioxalase. O sistema da glioxalase consiste na atividade de duas enzimas, glioxalase 1 e glioxalase 2; este sistema é responsável por eliminar α -oxaldeídos, tais como glioxal e metilglioxal (precursores de AGEs), utilizando o poder redutor de GSH, com a formação de

α -hidroxiácidos (ABORDO et al., 1999; OTT et al., 2014). Mais estudos são necessários para que se comprove esta hipótese.

Os tratamentos de ratos diabéticos com insulina, metformina ou licopeno, isolados ou co-administrados, não promoveram alterações nos níveis de AGEs fluorescentes renais, em relação aos animais DIOG. Diferentemente do resultado obtido no presente trabalho, estudo realizado por Trabez et al. (2015), no qual ratos foram tratados com 3,2 g/kg de ribose + 10 mg/kg de licopeno, demonstrou-se que houve diminuição na expressão de receptores de AGEs (RAGE), NF- κ B e nos níveis de CML-AGEs, bem como das interleucinas inflamatórias IL-1 e IL-6 nos rins. Em paralelo, houve atenuação dos marcadores séricos de função renal (albuminúria, proteinúria e creatinina) e aumento nas atividades das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) nos rins em relação aos animais tratados apenas com ribose.

Assim como no fígado, animais DIOG apresentaram nos rins aumentos nas atividades de GSH-Px e GSH-Rd, em relação aos valores encontrados em rins de animais NIOG. No entanto, ao contrário do observado no fígado, os níveis de TBARS nos rins de animais DIOG estão aumentados em relação aos valores encontrados em rins de animais NIOG. Sugere-se que tal resposta possa ser atribuída à menor atividade da GST nos rins, em relação à atividade desta enzima no fígado, prejudicando assim a eliminação dos produtos de peroxidação lipídica, tal como descrito anteriormente (KAUSHIK; KAUR, 2003).

Haza e colaboradores (2004) investigaram as mudanças na produção de EROs, marcadores de lipoperoxidação e nas defesas antioxidantes em diferentes tecidos de ratos diabéticos (indução com STZ; 30 dias de DM). Quando comparamos alguns achados entre fígado e rim, encontramos os seguintes perfis: (i) fígado: diminuição dos níveis de TBARS (mitocôndria), aumento de GSH e atividade de GST (citoplasma) e aumento de 4-HNE (mitocôndria e citoplasma); (ii) rim: aumento dos níveis de TBARS (mitocôndria), diminuição de GSH e atividade de GST (citoplasma) e aumento de 4-HNE (mitocôndria e citoplasma). Os autores explicam que o acúmulo de 4-HNE nos tecidos é importante para a indução do aumento na atividade de GST. No entanto, os baixos níveis de GSH de citoplasma de células renais podem comprometer a atividade da GST em detoxificar lipoperoxídeos. Assim, os resultados deste estudo, pelo menos em relação ao TBARS, corroboram nossos achados em fígado e rim de animais DIOG, o que reiteram a necessidade de avanços na investigação da atividade de GST nestes tecidos.

Erejuwa et al. (2011) observaram que animais diabéticos (indução com STZ) apresentaram um aumento nos níveis de TBARS e nas atividades de GSH-Px e GSH-Rd, bem

como diminuição da atividade de CAT nos rins, após 8 semanas de experimento, tal como os animais DIOG de nosso estudo. Neste mesmo trabalho, ao tratarem ratos diabéticos com mel, metformina e glibenclamida, isolados ou co-administrados, demonstraram que houve a diminuição da atividade de SOD, aumento das atividades de GSH-Px, GSH-Rd e CAT, bem como diminuição dos níveis de TBARS em relação aos animais diabéticos tratados apenas com água destilada.

Interessantemente, todos os tratamentos realizados (insulina, metformina, licopeno, metformina + licopeno) promoveram aumentos nos níveis de grupos tióis não proteicos renais, quando comparados aos animais DIOG, o que indica que todos os tratamentos beneficiam o funcionamento do sistema da glutatona e assim, promovem benefícios nos sistemas de defesa antioxidante, assim como discutido anteriormente.

7. CONCLUSÕES

O presente estudo fornece evidências sobre as ações benéficas da metformina e do licopeno, administrados de forma isolada e combinada, a ratos diabéticos (indução com STZ). Isoladamente, podemos observar que os tratamentos com metformina ou com licopeno promoveram efeitos benéficos na maioria dos parâmetros analisados. O tratamento com a associação metformina + licopeno, além de preservar os efeitos dos compostos isolados sobre alguns parâmetros, esta terapia combinada também promoveu respostas aditivas, isto é, alguns de seus efeitos benéficos foram melhores do que aqueles observados com os tratamentos isolados. Desta forma, podemos considerar que a terapia combinada de metformina + licopeno no iogurte promove uma diversidade de efeitos benéficos em biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo em animais diabéticos, surgindo como uma opção promissora não somente no controle da glicemia, mas também na atenuação ou até mesmo prevenção das complicações do DM, especialmente aquelas que impactam fígado e rins.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, G.; AL-HARRASI, A. S.; HUSSAIN, H.; HUSSAIN, J.; RASHID, R.; CHOUDHARY, M. I. Antiglycation therapy: Discovery of promising antiglycation agents for the management of diabetic complications. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, p. 198-206, 2016. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1028080>.

ABORDO, E. A.; MINHAS, H. S.; THORNALLEY, P. J. Accumulation of α -oxoaldehydes during oxidative stress: a role in cytotoxicity. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, n. 4, p. 641-648, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(99\)00132-x](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(99)00132-x).

AHMAD, S.; UDDIN, M.; HABIB, S.; SHAHAB, U.; ALAM, K.; ALI, A. Autoimmune response to AGE modified human DNA: Implications in type 1 Diabetes mellitus. **Journal of Clinical & Translational Endocrinology**, v. 1, n. 3, p. 66-72, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jcte.2014.05.002>.

ALDINI, G.; DALLE-DONNE, I.; FACINO, R. M.; MILZANI, A.; CARINI, M. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. **Medicinal Research Reviews**, v. 27, n. 6, p. 817-868, 2007. <https://doi.org/10.1002/med.20073>.

ALDRIDGE, W. N. Serum esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. **Biochemical Journal**, v. 53, n. 1, p. 110-117, 1953. <https://doi.org/10.1042/bj0530110>.

ALI, M. M.; AGHA, F. G. Amelioration of streptozotocin-induced diabetes mellitus, oxidative stress and dyslipidemia in rats by tomato extract lycopene. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 69, n. 3, p. 371-379, 2009. <https://doi.org/10.1080/00365510802658473>.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION CHILELLI. Glycemic targets: standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v. 41, n. 1, p. 55-64, 2018.

ARAKI, N.; UENO, N.; CHAKRABARTI, B.; MORINO, Y.; HORIUCHI, S. Immunochemical evidence for the presence of advanced glycation end products in human lens proteins and its positive correlation with aging. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 15, p. 10211-10214, 1992.

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, n. 12, e-113993, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113993>.

ASSIS, R.P.; ARCARO, C.; GUTIERRES, V.; OLIVEIRA, J.; COSTA, P.; BAVIERA, A.; BRUNETTI, I. Combined Effects of Curcumin and Lycopene or Bixin in Yoghurt on Inhibition of LDL Oxidation and Increases in HDL and Paraoxonase Levels in

Streptozotocin-Diabetic Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, ID 332, 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18040332>.

AVIRAM, M.; HARDAK, E.; VAYA, J.; MAHMOOD, S.; MILO, S.; HOFFMAN, A.; ROSENBLAT, M. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. **Circulation**, v. 101, n. 21, p. 2510-2517, 2000. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.21.2510>.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M. Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences. **Current Opinion in Lipidology**, v. 16, n. 4, p. 393-399, 2005. <https://doi.org/10.1097/01.mol.0000174398.84185.0f>.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, Article ID 360438, p. 31, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>.

BAYRAMOGLU, A.; BAYRAMOGLU, G.; SENTURK, H. Lycopene partially reverses symptoms of diabetes in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 2, p. 128-132, 2013. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.2277>.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8).

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

BEISSWENGER, P. J.; HOWELL, S. K.; O'DELL, R. M.; WOOD, M. E.; TOUCHETTE, A. D.; SZWERGOLD, B. S. α -Dicarbonyls increase in the postprandial period and reflect the degree of hyperglycemia. **Diabetes Care**, v. 4, n. 4, p. 726-732, 2001. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.156786>.

BEISSWENGER, P.; RUGGIERO-LOPEZ, D. Metformin inhibition of glycation processes. **Diabetes & Metabolism**, v. 29, n. 4, p. 6S95-6S103, 2003. [https://doi.org/10.1016/s1262-3636\(03\)72793-1](https://doi.org/10.1016/s1262-3636(03)72793-1).

BERNAL, C.; MARTÍN-POZUELO, G.; LOZANO, A. B.; SEVILLA, Á.; GARCÍA-ALONSO, J.; CANOVAS, M.; PERIAGO, M. J. Lipid biomarkers and metabolic effects of lycopene from tomato juice on liver of rats with induced hepatic steatosis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 11, p. 1870-1881, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.003>.

BHABAK, K. P.; MUGESH, G. Govindasamy. Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants. **Accounts of Chemical Research**, v. 43, n. 11, p. 1408-1419, 2010. <https://doi.org/10.1021/ar100059g>.

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. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(97\)00233-2](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(97)00233-2).

BLOCH-DAMTI, A.; BASHAN, N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 11-12, p. 1553-1567, 2005. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1553>.

BOLIGNANO, D.; CERNARO, V.; GEMBILLO, G.; BAGGETTA, R.; BUEMI, M.; D'ARRIGO, G et al. Antioxidant agents for delaying diabetic kidney disease progression: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 12, n. 6, e-0178699, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178699>.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; RAJI, B.; WALRAND, S.; GARDES-ALBERT, M.; JORE, D.; LEGRAND, A.; VASSON, M. P. An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. **Metabolism**, v. 52, n. 5, p. 586-589, 2003. <https://doi.org/10.1053/meta.2003.50093>.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; THEROND, P.; BEAUDEUX, J. L.; PEYNET, J.; LEGRAND, A.; DELATTRE, J. Aging and oxidative stress. Which potential markers? **Annales de Biologie Clinique**, v. 59, n. 4, p.453-459, 2001

BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 147-152, 2004. <https://doi.org/10.1172/JCI22422>.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-820, 2001. <https://doi.org/10.1038/414813a>.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, p. 1615-1625, 2005. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1615>.

BUTSCHEID, M.; HAUPTVOGEL, P.; FRITZ, P.; KLOTZ, U.; ALSCHER, D. M. Hepatic expression of galectin-3 and receptor for advanced glycation end products in patients with liver disease. **Journal of Clinical Pathology**, v. 60, n. 4, p. 415-418, 2007. <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.032391>.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484-490, 1985. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(85\)13062-4](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(85)13062-4).

CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n.2, p. 575-595, 2017.

CEFALI, L. C.; RINALDO, D.; BARBOSA, V. D. F.; SALGADO, H. R.; VILEGAS, W.; OLIVEIRA, O. M. D. F.; ISAAC, V. L. Uma Alternativa como Fonte de Antioxidante para Uso Tópico. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 4, p. 589-593, 2009.

CERIELLO, A.; NOVIALS, A.; ORTEGA, E.; LA SALA, L.; PUJADAS, G.; TESTA, R.; GIUGLIANO, D. Evidence that hyperglycemia after recovery from hypoglycemia worsens endothelial function and increases oxidative stress and inflammation in healthy control subjects and subjects with type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 61, n. 11, p. 2993-2997, 2012. <https://doi.org/10.2337/db12-0224>.

CHAKRA, A. R. Efeito fisiológico das incretinas. **Johns Hopkins Advanced Studies in Medicine**, v. 6, n. 7B, p. 613-617, 2006.

CHENG, J. T.; HUANG, C. C.; LIU, I. M.; TZENG, T. F.; CHANG, C. J. Novel Mechanism for plasma glucose-lowering action of metformin in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes**, v. 55, n. 3, p. 819-825, 2006. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.03.06.db05-0934>.

CHILELLI, N.C.; BURLINA, S.; LAPOLLA, A. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: A “glycooxidation-centric” point of view. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 23, p. 913-919, 2013. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.183480>.

CHISTIYAKOV, D. A.; MELNICHENKO, A. A.; OREKHOV, A. N. BOBRYSHV, Y. V. Paraonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. **Biochimie**, v. 132, p. 19-27, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.10.010>.

CHUKWUNONSO OBI, B.; CHINWUBA OKOYE, T.; OKPASHI, V. E.; NONYE IGWE, C.; OLISAH ALUMANAH, E. Comparative study of the antioxidant effects of metformin, glibenclamide, and repaglinide in alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1635361>.

CHUNG, S. S.; HO, E. C.; LAM, K. S.; CHUNG, S. K. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 3, p. 233-236, 2003. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000077408.15865.06>.

COSTA, L. G.; MCDONALD, B. E.; MURPHY, S. D.; OMENN, G. S.; RICHTER, R. J.; MOTULSKY, A. G.; FURLONG, C. E. Serum paraonase and its influence on paraon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 103, n. 1, p. 66-76, 1990. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(90\)90263-t](https://doi.org/10.1016/0041-008x(90)90263-t).

COSTANTINO, S.; PANENI, F.; BATTISTA, R.; CASTELLO, L.; CAPRETTI, G.; CHIANDOTTO, S.; VOLPE, M. Impact of glycemic variability on chromatin remodeling, oxidative stress, and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes and with target HbA1c levels. **Diabetes**, v. 66, n. 9, p. 2472-2482, 2017. <https://doi.org/10.2337/db17-0294>.

DAI, J.; LIU, M.; AI, Q.; LIN, L.; WU, K.; DENG, X.; ZHANG, L. Involvement of catalase in the protective benefits of metformin in mice with oxidative liver injury. **Chemico-Biological Interactions**, v. 216, p. 34-42, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.03.013>.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 601-623, 2006. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.061408>.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 23-38, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(03)00003-2).

DENEKE, S. M.; FANBURG, B. L. Regulation of cellular glutathione. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 257, n. 4, p. 163-173, 1989.

DIAS, A.S.; PORAWSKI, M.; ALONSO, M.; MARRONI, N.; COLLADO, P. S.; GONZALEZ-GALLEGU, J. Quercetin decreases oxidative stress, NF- κ B activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 10, p. 2299-2304, 2005. <https://doi.org/10.1093/jn/135.10.2299>.

DONNELLY, K. L.; SMITH, C. I.; SCHWARZENBERG, S. J.; JESSURUN, J.; BOLDT, M. D.; PARKS, E. J. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1343-1351, 2005. <https://doi.org/10.1172/JCI23621>.

EMEL'YANOV, M. O.; KIM, Y. A.; KORYSTOVA, A. F.; KUBLIK, L. N.; SHAPOSHNIKOVA, V. V.; KORYSTOV, Y. N. Rapid suppression of multidrug resistance of leukemic cells by oxidative stress. **Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology**, v. 4, n. 2, p. 212-219, 2010.

EMEL'YANOV, V. V. Glycation, antiglycation, and deglycation: their role in aging mechanisms and geroprotective effects (literature review). **Advances in Gerontology**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017. <https://doi.org/10.1134/S2079057017010064>.

EREJUWA, O. O.; SULAIMAN, S. A.; AB WAHAB, M. S.; SIRAJUDEEN, K. N. S.; SALLEH, M. S. M.; GURTU, S. Glibenclamide or metformin combined with honey improves glycemic control in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 2, p. 244, 2011. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.244>.

ESWORTHY, R. S.; CHU, F. F.; GEIGER, P.; GIROTTI, A. W.; DOROSHOW, J. H. Reactivity of plasma glutathione peroxidase with hydroperoxide substrates and glutathione. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 307, n. 1, p. 29-34, 1993. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1555>.

EZE, E.D.; TANKO, Y.; TENDE, J. A.; EHINOMHEN, U. A. Effects of lycopene on liver markers and glucokinase activity in experimentally-induced diabetes mellitus rat model. **Journal of Basic and Applied Research**, v. 2, n. 3, p. 353-362, 2016.

FAN, J.; LIU, Y.; YIN, S.; CHEN, N.; BAI, X.; KE, Q.; XIA, M. Small dense LDL cholesterol is associated with metabolic syndrome traits independently of obesity and inflammation. **Nutrition & Metabolism**, v. 16, n. 1, p. 7, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12986-019-0334-y>.

FELIG, P.; BERGMAN, M. The endocrine Pancreas: diabetes mellitus. **Endocrinology and Metabolism**, v. 19, p. 1107-1250, 1995.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014>.

FERRETTI, G.; BACCHETTI, T.; MARCHIONNI, C.; CALDARELLI, L.; CURATOLA, G. Effect of glycation of high-density lipoproteins on their physicochemical properties and on paraoxonase activity. **Acta Diabetologica**, v. 38, n. 4, p. 163-169, 2001. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.10.013>.

FIGLEWICZ, D. P.; SIPOLS, A. J. Energy regulatory signals and food reward. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 97, n. 1, p. 15-24, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.03.002>.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 137-188, 2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2011>

FORBES, J. M.; COUGHLAN, M. T.; COOPER, M. E. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1446-1454, 2008. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2011>.

FORNI, C.; FACCHIANO, F.; BARTOLI, M.; PIERETTI, S.; FACCHIANO, A.; D'ARCANGELO, D.; TABOLACCI, C. Beneficial Role of Phytochemicals on Oxidative Stress and Age-Related Diseases. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8748253>.

GAHRUIE, H. H.; ESKANDARI, M. H.; MESBAHI, G.; HANIFPOUR, M. A. Scientific and technical aspects of yogurt fortification: A review. **Food Science and Human Wellness**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.03.002>.

GHAVIPOUR, M.; SOTOUDEH, G.; GHORBANI, M. Tomato juice consumption improves blood antioxidative biomarkers in overweight and obese females. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 5, p. 805-809, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2014.10.012>.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, v. 107, n. 9, p. 1058-1070, 2010. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>.

GIORGINO, F.; CHEN, J.H.; SMITH, R. J. Changes in tyrosine phosphorylation of insulin receptors and a 170,000 molecular weight nonreceptor protein in vivo in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats: effects of insulin and glucose. **Endocrinology**, v. 130, n. 3, p. 1433-1444, 1992. <https://doi.org/10.1172/JCI117909>.

GIUGLIANO, D.; DE ROSA, N.; DI MARO, G.; MARFELLA, R.; ACAMPORA, R.; BUONINCONTI, R.; D'ONOFRIO, F. Metformin improves glucose, lipid metabolism, and reduces blood pressure in hypertensive, obese women. **Diabetes Care**, v. 16, n. 10, p. 1387-1390, 1993. <https://doi.org/10.2337/diacare.16.10.1387>.

GRABOWSKA, M.; WAWRZYNIAK, D.; ROLLE, K.; CHOMCZYŃSKI, P.; OZIEWICZ, S.; JURGA, S.; BARCISZEWSKI, J. Let food be your medicine: nutraceutical properties of lycopene. **Food & Function**, v. 10, p. 3090-3102, 2019. <https://doi.org/10.1039/C9FO00580C>.

GUGLIUCCI, A. How Are AGEs Handled by the Kidney? **Dietary AGEs and Their Role in Health and Disease**, v. 2017, p. 67-76. 2017. <https://doi.org/10.3945/an.115.008433>.

GUNTON, J. E.; DELHANTY, P. J.; TAKAHASHI, S. I.; BAXTER, R. C. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 3, p. 1323-1332, 2003. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021394>.

GUO, Y.; LIU, Y.; WANG, Y. Beneficial effect of lycopene on anti-diabetic nephropathy through diminishing inflammatory response and oxidative stress. **Food & Function**, v. 6, n. 4, p. 1150-6, 2015. <https://doi.org/10.1039/c5fo00004a>.

GUTIERRES, V. O.; ASSIS, R. P.; ARCARO, C. A.; OLIVEIRA, J. O.; LIMA, T. F. O.; BERETTA, A. L. R. Z.; BAVIERA, A. M.; BRUNETTI, I. L. Curcumin improves the effect of a reduced insulin dose on glycemic control and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 4, p. 976-988, 2019. <https://doi.org/10.1002/ptr.6291>.

GUTIERRES, V. O.; CAMPOS, M. L.; ARCARO, C. A.; ASSIS, R. P.; BALDAN-CIMATTI, H. M.; PECCININI, R. G.; GOMES, S.P.; KETTELHUT, 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 and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/678218>.

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. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 3, p. 440-448, 2012. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005769>.

GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, n. 1, p. 136-147, 2000. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06182.x>.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Elsevier Brasil, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M C. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. **The Lancet**, v. 323, n. 8391, p. 1396-1397, 1984. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(84\)91886-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)91886-5).

HASAN, M. M.; SHALABY, S. M.; EL-GENDY, J.; ABDELGHANY, E. M. Beneficial effects of metformin on muscle atrophy induced by obesity in rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 4, p. 5677-5686, 2019. <https://doi.org/10.1002/jcb.27852>.

HAZA, H.; PRABU, S. K.; ROBIN, M. A.; AVADHANI, N. G. Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic

rats: tissue-specific variations and roles in oxidative stress. **Diabetes**, v. 53, n. 1, p. 185-194, 2004. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.1.185>.

HENRIKSEN, E. J. Effects of H₂O₂ on insulin signaling the glucose transport system in mammalian skeletal muscle. **Academic Press**, v. 528, p. 269-278, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405881-1.00016-1>.

HO, S.; CHANG, P. W.; TONG, H. T.; YU, P. Y. Inhibition of fluorescent advanced glycation end-products and N-carboxymethyllysine formation by several floral herbal infusions. **International Journal of Food Properties**, v. 17, n. 3, p. 617-628, 2014. <https://doi.org/10.3126/ajms.v6i2.10584>.

HOWLETT, H.C.; BAILEY, C.J. A risk-benefit assessment of metformin in type 2 diabetes mellitus. **Drug Safety**, v. 20, p. 489-503, 1999. <https://doi.org/10.2165/00002018-199920060-00003>.

HYOGO, H.; YAMAGISHI, S. Advanced glycation end products (AGEs) and their involvement in liver disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 10, p. 969-972, 2008. <https://doi.org/10.2174/138161208784139701>.

KUMAR, P.A.; CHITRA P. S.; REDDY, G. B. Advanced glycation end products mediated cellular and molecular events in the pathology of diabetic nephropathy. **Biomolecular Concepts**, v. 7, n. 5-6, p. 293-309, 2016. <https://doi.org/10.1515/bmc-2016-0021>.

INOUCHI, T.; BATTAN, R.; HANDLER, E.; SPORTSMAN, J. R.; HEATH, W.; KING, G. L. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 22, p. 11059-11063, 1992. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.11059>.

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**, v. 99, n. 1, p. 137-146, 2008. <https://doi.org/10.1017/S0007114507791894>.

JACOBSON, A. M. The psychological care of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 19, p. 1249-1253, 1996. <https://doi.org/10.1056/NEJM199605093341907>.

JAGDALE, A. D.; BAVKAR, L. N.; MORE, T. A.; JOGLEKAR, M. M.; ARVINDEKAR, A.U. Strong inhibition of the polyol pathway diverts glucose flux to protein glycation leading to rapid establishment of secondary complications in diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 30, n. 3, p. 398-405, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.01.001>.

JAGTAP, A. G.; PATIL, P. B. Antihyperglycemic activity and inhibition of advanced glycation end product formation by Cuminum cyminum in streptozotocin induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8-90, p. 2030-2036, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.04.048>.

JHA, J. C.; BANAL, C.; CHOW, B. S.; COOPER, M. E.; JANDELEIT-DAHM, K. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 25, n. 12, p. 657-684, 2016. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6664>.

JING, Y. H.; CHEN, K. H.; YANG, S. H.; KUO, P. C.; CHEN, J. K. Resveratrol ameliorates vasculopathy in STZ-induced diabetic rats: role of AGE–RAGE signalling. **Diabetes/metabolism Research and Reviews**, v. 26, n. 3, p. 212-222, 2010. <https://doi.org/10.1002/dmrr.1076>.

JOHN, J. H.; ZIEBLAND, S. Reported barriers to eating more fruit and vegetables before and after participation in a randomized controlled trial: a qualitative study. **Health Education Research**, v. 19, n. 2, p. 165-174, 2004. <https://doi.org/10.1093/her/cyg016>.

KAHN, C. R.; SALTIEL, A. R. The molecular mechanism of insulin action and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Joslin's Diabetes Mellitus**, p. 145-168, 2005. <https://doi.org/10.1038/414799a>.

KARABINA, S. P.; LEHNER, A. N.; FRANK, E.; PARTHASARATHY, S.; SANTANAM, N. Oxidative inactivation of paraoxonase—implications in diabetes mellitus and atherosclerosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1725, n. 2, p. 213-221, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.07.005>.

KARTHIKESAN, K.; P., L.; MENON, V.P. Combined treatment of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid exerts potential antihyperglycemic effect on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. **General Physiology and Biophysics**, v. 29, p. 23-30, 2010. https://doi.org/10.4149/gpb_2010_01_23.

KAUL, K.; APOSTOLOPOULOU, M.; RODEN, M. Insulin resistance in type 1 diabetes mellitus. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 4, p. 1629-1639, 2015.

KAUSHIK, S.; KAUR, J. Chronic cold exposure affects the antioxidant defense system in various rat tissues. **Clinica Chimica Acta**, v. 333, p. 69-77, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(03\)00171-2](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(03)00171-2).

KHACHIK, F.; CARVALHO, L.; BERNSTEIN, P. S.; MUIR, G. J.; ZHAO, D. Y.; KATZ, N. B. Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. **Experimental Biology and Medicine**, v. 227, n. 10, p. 845-851, 2002. <https://doi.org/10.1177/153537020222701002>.

KLEIN, J.; WESTPHAL, S.; KRAUS, D.; MEIER, B.; PERWITZ, N.; OTT, V.; KLEIN, H. H. Metformin inhibits leptin secretion via a mitogen-activated protein kinase signalling pathway in brown adipocytes. **Journal of Endocrinology**, v. 183, n. 2, p. 299-307, 2004. <https://doi.org/10.1677/joe.1.05646>.

KOHN, H.I.; LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, p. 92–300. 1944.

KOLM-LITTY, V.; SAUER, U.; NERLICH, A.; LEHMANN, R.; SCHLEICHER, E. D. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine

pathway in porcine glomerular mesangial cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 1, p. 160-169, 1998. <https://doi.org/10.1172/JCI119875>.

KORUK, M.; TAYSI, S.; SAVAS, M. C.; YILMAZ, O.; AKCAY, F.; KARAKOK, M. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 34, n. 1, p. 57-62, 2004.

KOYA, D; KING, G. L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. **Diabetes**, v. 47, n. 6, p. 859-866, 1998. <https://doi.org/10.2337/diabetes.47.6.859>.

KOYE, D. N.; SHAW, J. E.; REID, C. M.; ATKINS, R. C.; REUTENS, A. T.; MAGLIANO, D. J. Incidence of chronic kidney disease among people with diabetes: a systematic review of observational studies. **Diabetic Medicine**, v. 34, n. 7, p. 887-901, 2017. <https://doi.org/10.1111/dme.13324>.

KUME, S.; TAKEYA, M.; MORI, T.; ARAKI, N.; SUZUKI, H.; HORIUCHI, S.; TAKAHASHI, K. Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. **The American Journal of Pathology**, v. 147, n. 3, p. 654, 1995.

KUSAKABE, T.; TANIOKA, H.; EBIHARA, K.; HIRATA, M.; MIYAMOTO, L.; MIYANAGA, F.; HOSODA, K. Beneficial effects of leptin on glycaemic and lipid control in a mouse model of type 2 diabetes with increased adiposity induced by streptozotocin and a high-fat diet. **Diabetologia**, v. 52, n. 4, p. 675-683, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1258-2>.

LAAKSO, M.; KUUSISTO, J. Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, p. 293–302, 2014. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.29>.

LAPOLLA, A.; TRALDI, P.; FEDELE, D. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 103-115, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.09.007>.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymology**, v. 233, p. 346-57, 1994. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(94)33040-9).

LEVY, J.; BOSIN, E.; FELDMAN, B.; GIAT, Y.; MIINSTER, A.; DANILENKO, M.; SHARONI, Y. Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either α -carotene or β -carotene. **Nutrition and Cancer**, v. 24, n. 3, p. 257-266, 1995. <https://doi.org/10.1080/01635589509514415>.

LI, S.; TAN, H. Y.; WANG, N.; ZHANG, Z. J.; LAO, L.; WONG, C. W.; FENG, Y. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 26087–26124, 2015. <https://doi.org/10.3390/ijms161125942>.

LIN, JER-AN.; WU, C. H.; LU, C. C.; HSIA, S. M.; YEN, G. C. Glycative stress from advanced glycation end products (AGEs) and dicarbonyls: An emerging biological factor in

cancer onset and progression. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, n. 8, p. 1850-1864, 2016. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500759>.

LINDBLOM, P.; RAFTER, I.; COPLEY, C.; ANDERSSON, U.; HEDBERG, J. J.; BERG, A. L.; GLINGHAMMAR, B. Isoforms of alanine aminotransferases in human tissues and serum—differential tissue expression using novel antibodies. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 466, n. 1, p. 66-77, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.07.023>.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUDKE, M.C.; MOHAUPT M.; LOPEZ, J. Colesterol e composição dos ácidos graxos nas dietas para humanos e na carcaça suína. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 181-187, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0103-84781999000100033>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2011.03.005>.

MAIDA, A.; LAMONT, B. J.; CAO, X.; DRUCKER, D. J. Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- α in mice. **Diabetologia**, v. 54, n. 2, p. 339-349, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1937-z>.

MAMPUTU, J. C.; WIERNSPERGER, N. F.; RENIER, G. Antiatherogenic properties of metformin: the experimental evidence. **Diabetes & Metabolism**, v. 29, n. 4, p. 6S71-6S76, 2003. [https://doi.org/10.1016/s1262-3636\(03\)72790-6](https://doi.org/10.1016/s1262-3636(03)72790-6).

MARNETT, L. J. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 424, n. 1-2, p. 83-95, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(99\)00010-x](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(99)00010-x).

MASTORIKOU, M.; MACKNESS, M.; MACKNESS, B. Defective metabolism of oxidized phospholipid by HDL from people with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 55, n. 11, p. 3099-3103, 2006. <https://doi.org/10.2337/db06-0723>,

MAZUR, A. An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 164, n. 1, p. 271-289, 1946.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, n. 1, p. 711-760, 1983. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.003431>.

MENG, X. M. Metformin improves the glucose and lipid metabolism via influencing the level of serum total bile acids in rats with streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 21, n. 9, p. 2232-2237, 2017.

MOHAMED, O. I.; EL-NAHAS, A. F.; EL-SAYED, Y. S.; ASHRY, K. M. Ginger extract modulates Pb-induced hepatic oxidative stress and expression of antioxidant gene transcripts

in rat liver. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 7, p. 1164-1172, 2016. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1057651>.

MROZ, J. R. Clinical Enzimology. In: Anderson SC, Cockayne S. **Clinical Chemistry Concepts & Applications**, v. 11, p. 179-202, 2003.

NANNIPIERI, M.; GONZALES, C.; BALDI, S.; POSADAS, R.; WILLIAMS, K.; HAFFNER, S. M.; FERRANNINI, E. Liver enzymes, the metabolic syndrome, and incident diabetes: the Mexico City diabetes study. **Diabetes Care**, v. 28, n. 7, p. 1757-1762, 2005. <https://doi.org/10.2337/diacare.28.7.1757>.

NATHAN, D. M.; BUSE, J. B.; DAVIDSON, M. B.; FERRANNINI, E.; HOLMAN, R. R.; SHERWIN, R.; ZINMAN, B. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n. 1, p. 193-203, 2009. <https://doi.org/10.2337/dc08-9025>.

NIEDOWICZ, D. M.; DALEKE, D. L. The role of oxidative stress in diabetic complications. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 43, n. 2, p. 289-330, 2005. <https://doi.org/10.1385/CBB:43:2:289>.

NOWOTNY, K.; JUNG, T.; HÖHN, A.; WEBER, D.; GRUNE, T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. **Biomolecules**, v. 5, p. 194-222, 2015. <https://doi.org/10.3390/biom5010194>.

OKAYASU, S.; KITAICHI, K.; HORI, A.; SUWA, T.; HORIKAWA, Y.; YAMAMOTO, M.; ITOH, Y. The evaluation of risk factors associated with adverse drug reactions by metformin in type 2 diabetes mellitus. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 6, p. 933-7, 2012. <https://doi.org/10.1248/bpb.35.933>.

OTT, C.; JACOBS, K.; HAUCKE, E.; SANTOS, A. N.; GRUNE, T.; SIMM, A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biology**, v. 2, p. 411-429, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.016>.

OU, J.; HUANG, J.; WANG, M.; OU, S. Effect of rosmarinic acid and carnosic acid on AGEs formation in vitro. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1057-1061, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.056>.

OZMEN, O.; TOPSAKAL, S.; HALIGUR, M.; AYDOGAN, A.; DINCOGLU, D. Effects of caffeine and lycopene in experimentally induced diabetes mellitus. **Pancreas**, v. 45, n. 4, p. 579-583, 2016. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000489>.

PALOZZA, P.; CATALANO, A.; SIMONE, R.; CITTADINI, A. Lycopene as a guardian of redox signalling. **Acta Biochimica Polonica**, v. 59, n. 1, 2012.

PARK, K.; GROSS, M.; LEE, D. H.; HOLVOET, P.; HIMES, J. H.; SHIKANY, J. M.; JACOBS, D. R. Oxidative stress and insulin resistance: The cardia study. **Diabetes Care**, v. 32, n. 7, p. 1302-1307, 2009. <https://doi.org/10.2337/dc09-0259>.

PASUPULATI, A. K.; CHITRA, P. S.; REDDY, G. B. Advanced glycation end products mediated cellular and molecular events in the pathology of diabetic nephropathy. **Biomolecular Concepts**, v. 7, n. 5-6, p. 293-309, 2016. <https://doi.org/10.1515/bmc-2016-0021>.

PAZ, M.; GÚLLON, P.; BARROSO, M. F.; CARVALHO, A. P.; DOMINGUES, V. F.; GOMES, A. M.; DELERUE-MATOS, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 172, p. 462-468, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.102>.

PEIXOTO, L. G.; TEIXEIRA, R. R.; VILELA, D. D.; BARBOSA, L. N.; CAIXETA, D. C.; DECONTE, S. R.; ESPINDOLA, F. S. Metformin attenuates the TLR4 inflammatory pathway in skeletal muscle of diabetic rats. **Acta Diabetologica**, v. 54, n. 10, p. 943-951, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00592-017-1027-5>.

PENNACCHI, P.C.; DE ALMEIDA, M. E. S.; GOMES, O. L. A.; FAIAO-FLORES, F.; DE ARAÚJO CREPALDI, M. C.; DOS SANTOS, M. F.; 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. 2417-2425, 2015. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2015.0009>.

PEPATO, M. T.; MIGLIORINI, R. H.; GOLDBERG, A. L.; KETTELHUT, I. C. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 271, n. 2, p. 340-347, 1996. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1996.271.2.E340>

PERERA, P.K.; LI, Y. Functional herbal food ingredients used in type 2 diabetes mellitus. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, p. 37-45, 2012. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.95863>.

PERNICOVA, I.; KORBONITS, M. Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 3, p. 143, 2014. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.256>.

PHAM-HUY, L A.; HE, H; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedical Science**, v. 4, n. 2, p. 89, 2008.

PILZ, J.; MEINEKE, I.; GLEITER, C. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. J. Chromatogr. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 742, p. 315–325. 2000. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)00174-2](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)00174-2).

POKUPEC, R.; KALAUZ, M.; TURK, N.; TURK, Z. Advanced glycation endproducts in human diabetic and non-diabetic cataractous lenses. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 241, n. 5, p. 378-384, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00417-002-0616-2>.

PRABHAKAR, P.K.; KUMAR, A.; DOBLE, M. Combination therapy: a new strategy to manage diabetes and its complications. **Phytomedicine**, v. 21, n. 2, p. 123-30, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.08.020>.

RAFTER, I.; GRÅBERG, T.; KOTRONEN, A.; STRÖMMER, L.; MATTSON, C. M.; KIM, R. W.; EKBLÖM, B. Isoform-specific alanine aminotransferase measurement can distinguish hepatic from extrahepatic injury in humans. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 30, n. 5, p. 1241-1249, 2012. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1106>.

RAHBAR, S.; NATARAJAN, R.; YERNENI, K.; SCOTT, S.; GONZALES, N.; NADLER, J. L. Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. **Clinica Chimica Acta**, v. 301, n. 1-2, p. 65-77, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(00\)00327-2](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(00)00327-2).

RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 50, p. 567-575, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.006>.

RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; RENGARAJAN, T.; PALANISWAMI, R.; GNANADHAS, E. N.; LAKSHMINARASIAH, U.; NISHIGAKI, I. Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 332-347, 2014.

RAO, A. V.; WASEEM, Z.; AGARWAL, S. Lycopene content of tomatoes and tomato products and their contribution to dietary lycopene. **Food Research International**, v. 31, n. 10, p. 737-741, 1998. <https://doi.org/10.1080/87559120600864753>.

RAO, L. G.; KRISHNADEV, N.; BANASIKOWSKA, K.; RAO, A. V. Lycopene effect on osteoclasts: lycopene inhibits basal and parathyroid hormone-stimulated osteoclast formation and mineral resorption mediated by reactive oxygen species in rat bone marrow cultures. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, n. 2, p. 69-78, 2003. <https://doi.org/10.1089/109662003322233459>.

RAUGHT, B.; GINGRAS, A.C.; SONENBERG, N. The target of rapamycin (TOR) proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 13, p. 7037-7044, 2001. <https://doi.org/10.1073/pnas.121145898>.

RENA, G; HARDIE, D. G; PEARSON, E. R. The mechanisms of action of metformin. **Diabetologia**, v. 60, n. 9, p. 1577-1585, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>.

REGNELL, S. E.; LERNMARK, A. Hepatic steatosis in type 1 diabetes. **The Review of Diabetic Studies**, v. 8, n. 4, p. 454, 2011. <https://doi.org/10.1900/RDS.2011.8.454>.

REES, D. A.; ALCOLADO, J. C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**, v. 22, n. 4, p. 359-370, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2005.01499.x>.

RICHTER, R. J.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. Circulation: **Genomic and Precision Medicine**, v. 1, n. 2, p. 147-152, 2008. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.108.811638>.

RIFAI, N.; WARNICK, G. R. Lipids, lipoproteins, Apolipoproteins, and other cardiovascular risk factors. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**, v. 4, p. 903-81, 2006. <https://doi.org/10.18535/jmscr/v5i6.94>.

ROCHETTE, L.; ZELLER, M.; COTTIN, Y.; VERGELY, C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. **Biochimica et Biophysica ACTA**, v. 1840, p. 2709-2729, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.05.017>.

ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 212, n. 2, p. 167-178, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.01.003>.

ROXO, D. F.; ARCARO, C. A.; GUTIERRES, V. O.; COSTA, M. C.; OLIVEIRA, J. O.; LIMA, T. F. O.; BAVIERA, A. M.; BRUNETTI, I.L. Curcumin combined with metformin decreases glycemia and dyslipidemia, and increases paraoxonase activity in diabetic rats. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 11, n. 1, p. 33, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13098-019-0431-0>.

ROZENBERG, O.; ROSENBLAT, M.; COLEMAN, R.; SHIH, D. M.; AVIRAM, M. Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 6, p. 774-784, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)01429-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)01429-6).

RUSH, J. W. E; SANDIFORD, S. D. Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. **Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 5, p. 345-351, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(03\)00039-0](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(03)00039-0).

SALTIEL, A. R. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 517-529, 2001. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00239-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00239-2).

SAMPSON, M. J.; BRASCHI, S.; WILLIS, G.; ASTLEY, S. B. Paraoxonase-1 (PON-1) genotype and activity and in vivo oxidized plasma low-density lipoprotein in Type II diabetes. **Clinical Science**, v. 109, n. 2, p. 189-197, 2005. <https://doi.org/10.1042/CS20050089>.

SANAJOU, D.; HAGHJO, A. G.; ARGANI, H.; ASLANI, S. Age-rage axis blockade in diabetic nephropathy: Current status and future directions. **European Journal of Pharmacology**, v. 833, p. 158-164, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.06.001>.

SARACOĞLU, G.; BAŞ, H.; PANDIR, D. Furan-induced cardiotoxicity in diabetic rats and protective role of lycopene. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 3, e-12738, 2019. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12738>.

SARHAT, E. R.; SAEED, H. S. M. Effects of Lycopene on Paraoxonase and Adipokines Parameters in Streptozotocin-Induced Diabetic Rabbits. **Journal of Natural and Medical Sciences**, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2017. <http://repository.sustech.edu/handle/123456789/19753>.

SCHAUR, R. J.; SIEMS, W.; BRESGEN, N.; ECKL, P. M. 4-Hydroxy-nonanal—A Bioactive Lipid Peroxidation Product. **Biomolecules**, v. 5, p. 247-2337, 2015. <http://repository.sustech.edu/handle/10.3390/biom5042247>.

ŠEBEKOVÁ, K.; KUPČOVÁ, V.; SCHINZEL, R.; HEIDLAND, A. Markedly elevated levels of plasma advanced glycation end products in patients with liver cirrhosis—amelioration

by liver transplantation. **Journal of Hepatology**, v. 36, n. 1, p. 66-71, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(01\)00232-x](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(01)00232-x)

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4).

SEIFALIAN, A. M.; EL-DESOKY, E. H.; DELPY, D. T.; DAVIDSON, B. R. Effect of graded hypoxia on the rat hepatic tissue oxygenation and energy metabolism monitored by near-infrared and ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 14, p. 2642-2648, 2001. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0308>.

SEVEN, A.; GAZEL, S.; SEYMEN, O.; CIVELEK, S.; UNCU, M. Effects of vitamin E supplementation on oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats: investigation of liver and plasma. **Yonsei Medical Journal**, v. 45, n. 4, p. 703-710, 2004. <https://doi.org/10.3349/ymj.2004.45.4.703>.

SHAH, S.; IQBAL, M.; KARAM, J.; SALIFU, M.; MCFARLANE, S. I. Oxidative stress, glucose metabolism, and the prevention of type 2 diabetes: pathophysiological insights. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 7, p. 911-929, 2007. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1629>.

SHUNMOOGAM, N.; NAIDOO, P.; CHILTON, R. Paraoxonase (PON)-1: a brief overview on genetics, structure, polymorphisms and clinical relevance. **Vascular Health and Risk Management**, v. 14, p. 137, 2018. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S165173>.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995. <https://doi.org/10.1093/ajcn/62.6.1315S>.

SIMMONS, R. A. Developmental origins of diabetes: the role of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 6, p. 917-922, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.018>.

SINCLAIR, A. J.; BAYER, A. J.; JOHNSTON, J. O.; WARNER, C.; MAXWELL, S. R. Altered plasma antioxidant status in subjects with Alzheimer's disease and vascular dementia. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 13, n. 12, p. 840-845, 1998. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1166\(1998120\)13:12<840:AID-GPS877>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1166(1998120)13:12<840:AID-GPS877>3.0.CO;2-R).

SINDHU, R. K.; KOO, J. R.; ROBERTS, C. K.; VAZIRI, N. D. Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapies. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 26, p. 43-53, 2004. <https://doi.org/10.1081/ceh-120027330>.

SINGH, V.; SINGH, S. P.; SINGH, M.; GUPTA, A. K.; KUMAR, A. Combined potentiating action of phytochemical(s) from *Cinnamomum tamala* and *Aloe vera* for their anti-diabetic and insulinomimetic effect using in vivo rat and in vitro NIH/3T3 cell culture system. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 5, p. 2542-2563, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1448-3>.

SOHN, E.; KIM, J.; KIM, C. S.; KIM, Y. S.; JANG, D. S.; KIM, J. S. Extract of the aerial parts of *Aster koraiensis* reduced development of diabetic nephropathy via anti-apoptosis of podocytes in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 391, n. 1, p. 733-738, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.129>.

SOMPONG, W.; MEEPROM, A.; CHENG, H.; ADISAKWATTANA, S. A comparative study of ferulic acid on different monosaccharide-mediated protein glycation and oxidative damage in bovine serum albumin. **Molecules**, v. 18, n. 11, p. 13886-13903, 2013. <https://doi.org/10.3390/molecules181113886>.

SOOKOIAN, S.; CASTAÑO, G. O.; SCIAN, R.; MALLARDI, P.; FERNANDEZ GIANOTTI, T.; BURGUEÑO, A. L.; PIROLA, C. J. Genetic variation in transmembrane 6 superfamily member 2 and the risk of nonalcoholic fatty liver disease and histological disease severity. **Hepatology**, v. 61, n. 2, p. 515-525, 2015. <https://doi.org/10.1002/hep.27556>.

SPARKS, J. D.; DONG, H. H. FoxO1 and hepatic lipid metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, v. 20, n. 3, p. 217, 2009. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32832b3f4c>

SPITALER, M. M.; GRAIER, W. F. Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 45, n. 4, p. 476-494, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00125-002-0782-0>.

STEINBERG, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 34, p. 20963-20966, 1997. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.34.20963>.

STUMP, C. S.; NAIR, K. S. **Alterations in protein metabolism in Diabetes Mellitus**. In Principles of Diabetes Mellitus. Editor Leonid Poretsky, Springer, 2ª edição, 2010.

STUMP, C. S.; CLARK, S. E.; SOWERS, J. R. Oxidative Stress in Insulin-Resistant Conditions. **Treatments in Endocrinology**, v. 4, n. 6, p. 343-351, 2005. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00402.2004>.

SUZUKI, Y. J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Protein Carbonylation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 3, p. 323-325, 2010. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2887>.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, v. 50, n. 6, p. 537-546, 2001.

TABREZ, S.; AL-SHALI, K. Z.; AHMAD, S. Lycopene powers the inhibition of glycation-induced diabetic nephropathy: A novel approach to halt the AGE-RAGE axis menace. **Biofactors**, v. 41, n. 5, p. 372-381, 2015. <https://doi.org/10.1002/biof.1238>

TANAKA, K.; WATASE, K.; MANABE, T.; YAMADA, K.; WATANABE, M.; TAKAHASHI, K.; OKUYAMA, S. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. **Science**, v. 276, n. 5319, p. 1699-1702, 1997. <https://doi.org/10.1126/science.276.5319.1699>.

TITOV, V.N.; KHOKHLOVA, N.V.; SHIRYAEVA, YU.K., Glucose, glycotoxins, and protein glycation products: role in the pathogenesis. **Medizinische Klinik**, v. 3, p. 15-24, 2013. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0306-7>

TOGASHI, H.; SHINZAWA, H.; WAKABAYASHI, H.; NAKAMURA, T.; YAMADA, N.; TAKAHASHI, T.; ISHIKAWA, M. Activities of free oxygen radical scavenger enzymes in human liver. **Journal of Hepatology**, v. 11, n. 2, p. 200-205, 1990. [https://doi.org/10.1016/0168-8278\(90\)90114-7](https://doi.org/10.1016/0168-8278(90)90114-7).

TOKUBUCHI, I.; TAJIRI, Y.; IWATA, S.; HARA, K.; WADA, N.; HASHINAGA, T.; YAMADA, K. Beneficial effects of metformin on energy metabolism and visceral fat volume through a possible mechanism of fatty acid oxidation in human subjects and rats. **PloS One**, v. 12, n. 2, e-0171293, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171293>.

TORRES, M. C. L.; SOARES, N. F. F.; PEREIRA, J. A. M. Extração, purificação e avaliação da atividade da glutathione S-transferase de fígado bovino. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 2, p. 302-307, 2006. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542006000200016>.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. **Journal of Clinical Pathology**, v. 22, p. 158-61, 1969. <https://doi.org/10.1136/jcp.22.2.246-b>.

UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). **The Lancet**, v. 352, n. 9131, p. 854-865, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)07037-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)07037-8).

ULLAH, F.; AFRIDI, A. K.; RAHIM, F.; ASHFAQ, M.; KHAN, S.; SHABBIER, G.; RAHMAN, S. Knowledge of diabetic complications in patients with diabetes mellitus. **Journal of Ayub Medical College Abbottabad**, v. 27, n. 2, p. 360-363, 2015.

VAN BUREN, P.; LEWINTER, M. M. Heart failure as a consequence of diabetic cardiomyopathy. In: Heart Failure: A Companion to Braunwald's Heart Disease. **WB Saunders**, p. 408-418, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2012.03.008>.

VAN STEE, M. F.; DE GRAAF, A. A.; GROEN, A. K. Actions of metformin and statins on lipid and glucose metabolism and possible benefit of combination therapy. **Cardiovascular Diabetology**, v. 17, n. 1, p. 94, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0738-4>.

VINCENT, A. M.; RUSSELL, J. W.; LOW, P.; FELDMAN, E. L. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 612-628, 2004. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0019>.

VIOLLET, B.; GUIGAS, B.; GARCIA, N. S.; LECLERC, J.; FORETZ, M.; ANDREELLI, F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. **Clinical Science**, v. 122, n. 6, p. 253-270, 2012. <https://doi.org/10.1042/CS20110386>.

VITAGLIONE, P.; FOGLIANO, V. Use of antioxidants to minimize the human health risk associated to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food. **Journal of**

Chromatography **B**, v. 802, n. 1, p. 189-199, 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.09.029>.

WEI, L. K.; AU, A.; MENON, S.; GRIFFITHS, L. R.; KOOI, C. W.; IRENE, L.; AZIZ, Z. A. Polymorphisms of MTHFR, eNOS, ACE, AGT, ApoE, PON1, PDE4D, and ischemic stroke: meta-analysis. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 26, n. 11, p. 2482-2493, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017>.

WELT, K.; WEISS, J.; MARTIN, R.; DETTMER, D.; HERMSDORF, T.; ASAYAMA, K.; FITZL, G. Ultrastructural, immunohistochemical and biochemical investigations of the rat liver exposed to experimental diabetes und acute hypoxia with and without application of Ginkgo extract. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 55, n. 5, p. 331-345, 2004. <https://doi.org/10.1078/0940-2993-00337>.

WILLIAMS, P. T.; THOMPSON, P. D. Walking versus running for hypertension, cholesterol, and diabetes mellitus risk reduction. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 33, n. 5, p. 1085-1091, 2013. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300878>.

WÓJCICKA, G.; JAMROZ-WIŚNIEWSKA, A.; CZECHOWSKA, G.; KOROLCZUK, A.; MARCINIAK, S.; BELTOWSKI, J. The paraoxonase 1 (PON1), platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) and dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) activity in the metformin treated normal and diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 789, p. 187-194, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.07.034>.

XU, A.; WANG, H.; HOO, R. L.; SWEENEY, G.; VANHOUTTE, P. M.; WANG, Y.; LAM, K. S. Selective elevation of adiponectin production by the natural compounds derived from a medicinal herb alleviates insulin resistance and glucose intolerance in obese mice. **Endocrinology**, v. 150, n. 2, p. 625-633, 2009. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0999>.

YAMAGISHI, S.; MATSUI, T. Role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in liver disease. **European Journal of Medical Research**, v. 20, n. 1, p. 15, 2015. <https://doi.org/10.1186/s40001-015-0090-z>.

YANARDAG, R.; OZSOY-SACAN, O.; BOLKENT, S.; ORAK, H.; KARABULUT-BULAN, O. Protective effects of metformin treatment on the liver injury of streptozotocin-diabetic rats. **Human & Experimental Toxicology**, v. 24, n. 3, p. 129-135, 2005. <https://doi.org/10.1191/0960327104ht507oa>.

YANG, C. M.; LU, I. H.; CHEN, H. Y.; HU, M. L. Lycopene inhibits the proliferation of androgen-dependent human prostate tumor cells through activation of PPAR γ -LXR α -ABCA1 pathway. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 1, p. 8-17, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.10.006>.

YANG, R. Z.; BLAILEANU, G.; HANSEN, B. C.; SHULDINER, A. R.; GONG, D. W. cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping, and functional expression of a novel human alanine aminotransferase. **Genomics**, v. 79, n. 3, p. 445-450, 2002. <https://doi.org/10.1002/hep.22657>.

YIN, Y.; ZHENG, Z.; JIANG, Z. Effects of lycopene on metabolism of glycolipid in type 2 diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 2070-2077, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.100>.

ZHANG, P.; ZHANG, X.; BROWN, J.; VISTISEN, D.; SICREE, R.; SHAW, J.; NICHOLS, G. Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 87, n. 3, p. 293-301, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2010.01.026>.

ZHU, J.; WANG, C.; XU, Y. Lycopene attenuates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats by reducing oxidative stress. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 11, p. 1144-1149, 2011. <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.574707>.

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, n. 1-2, p. 69-75, 2001. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(01\)00651-9](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(01)00651-9).

ZUWAŁA-JAGIEŁŁO, J.; PAZGAN-SIMON, M.; SIMON, K.; WARWAS, M. Elevated advanced oxidation protein products levels in patients with liver cirrhosis. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, p. 679-685, 2009.

ANEXO 1: CEUA/FCF/CAr nº 23/2017

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da co-administração de ativos naturais e metformina no iogurte em biomarcadores fisiometabólicos e de estresse oxidativo e glicativo em ratos diabéticos", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAr: 23/2017, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Amanda Martins Baviera – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado ad referendum pela Coordenadora da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em 07 de novembro de 2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Fevereiro de 2019
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/Wistar
Nº de animais	116
Peso/Idade	3 a 4 semanas/ 150 g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – UNESP Botucatu

Araraquara, 07 de novembro de 2017.



Profa Dra Carla Raquel Fontana Mendonça
Coordenadora da CEUA