



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**AVALIAÇÃO DA TRIGONELINA E CURCUMINA,
ISOLADAS OU CO-ADMINISTRADAS EM IOGURTE, EM
MODELO EXPERIMENTAL DE OBESIDADE E
RESISTÊNCIA À INSULINA**

Mariana de Campos da Costa

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Araraquara, SP

2019

AVALIAÇÃO DA TRIGONELINA E CURCUMINA, ISOLADAS OU CO-ADMINISTRADAS EM IOGURTE, EM MODELO EXPERIMENTAL DE OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA

Mariana de Campos da Costa

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

Orientador(a): Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Araraquara- SP

2019

C837a

Costa, Mariana de Campos da.

Avaliação da trigonelina e curcumina, isoladas ou co-administradas em iogurte, em modelo experimental de obesidade e resistência à insulina / Mariana de Campos da Costa. – Araraquara: [S.n.], 2019.

148 f. : il.

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

Orientador: Amanda Martins Baviera.

1. Obesidade. 2. Trigonelina. 3. Curcumina. 4. Iogurte. 5. Estresse glicoxidativo. 6. Inflamação. I. Baviera, Amanda Martins, orient. II. Título.

Tese de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Araraquara como parte dos requisitos para o título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

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

Fomento: Bolsa CAPES - Doutorado

Agradecimentos

Aos meus pais, Paulo Inácio e Raquel, por todo apoio e incentivo ao longo desta jornada.

Aos meus irmãos, Ana Carolina, Gabriel e João Paulo, por todo carinho e participação em todos os momentos especiais da minha vida.

Ao meu marido Tiago e família, por toda paciência, amor, incentivo e carinho contribuindo de forma importante para a realização desse estudo.

A minha orientadora, prof. Dra Amanda Martins Baviera por toda dedicação, apoio e orientações para o desenvolvimento desse trabalho. Foi uma honra em tê-la como professora, uma pessoa extremamente competente pela qual tenho muito respeito e admiração. Agradeço de coração pela confiança e pelos seus ensinamentos durante todos esses anos.

Ao prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti por toda contribuição para o desenvolvimento desse estudo, por todos os momentos de descontração no laboratório. Agradeço por todos os ensinamentos e disponibilidade em me ajudar e compartilhar seus conhecimentos durante esses anos.

As grandes amigas, Tayra, Carlos, Renata e Maiara, na qual fizeram parte de todos os momentos de dificuldades e conquistas. Agradeço toda ajuda na realização desse trabalho e amizade que quero levar para o resto da vida.

Aos amigos Anderson, Ingrid, Marcel, Juliana, Bruno, Daniela e Camila, que tive o prazer em conhecer e que também contribuíram de forma importante para esse trabalho. Agradeço pelo companheirismo e convivência no laboratório. Agradeço a todos por todos os momentos que passamos juntos, sentirei saudades!

Ao apoio financeiro realizado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

RESUMO

Introdução: Ativos naturais têm sido estudados por suas ações antioxidantes, anti-inflamatórias e antiglicação, que podem ser interessantes para prevenir/atenuar as complicações da obesidade e do diabetes mellitus (DM). A curcumina (polifenol isolado de *Curcuma longa* L.) e a trigonelina (alcaloide isolado de *Trigonella foenum-graecum* L.) apresentam ações benéficas contra os sintomas e desordens da obesidade e do DM, e combatem as consequências deletérias relacionadas ao estresse glicoxidativo. **Objetivo:** Investigar, em camundongos submetidos ao modelo experimental de obesidade/resistência à insulina, os efeitos dos tratamentos com trigonelina e/ou curcumina em iogurte, avaliando alterações em parâmetros fisiológicos e bioquímicos, sinalização insulínica (AKT), programa termogênico e *status* energético [sirtuína 1 (SIRT 1), proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC-1 α), proteína desacopladora mitocondrial 1(UCP 1)], níveis de marcadores de estresse glicoxidativo [substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), produtos finais de glicação avançada (AGEs), receptor de AGEs (RAGE)], marcadores da inflamação [fator nuclear kappa B (NF- κ B), interleucinas (IL)-6 (IL-6) e 10 (IL-10), fator de necrose tumoral (TNF- α)], potencial antioxidante [atividades de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutational peroxidase (GSH-Px), *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like-2 factor* (NRF 2)], maquinaria de detoxificação de AGEs [glioxalase 1 (GLO 1), receptor 1 de AGEs (AGE-R1)]. **Metodologia:** Camundongos C57BL/6 machos foram alimentados durante 9 semanas com dieta padrão (P; 3,85 kcal/g; 4% de lipídeos) ou hiperlipídica (H; 5,40 kcal/g; 35% de lipídeos) e tratados por via oral com iogurte enriquecido com trigonelina ou curcumina, isoladas ou combinadas. Na 7ª semana, foi realizado o teste tolerância à glicose oral (TTGO), e na 8ª semana o teste de tolerância à insulina (ITT). Na 9ª semana, os animais foram eutanasiados e amostras de plasma, tecidos adiposos brancos e marrom, músculo esquelético *gastrocnemius*, fígado e rim foram utilizados para a determinação dos níveis de biomarcadores de estresse glicoxidativo, inflamação, programa termogênico e *status* energético. **Resultados:** Os tratamentos com trigonelina ou curcumina em iogurte, de forma isolada, exerceram ações antihiperlipidêmicas e antihiperlipidêmicas, melhoraram a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina. O tratamento com trigonelina desempenhou efeito importante na redução da ingestão alimentar e calórica, prevenção do ganho de massa corporal, atenuação da hipertrofia adipocítica; potencial anti-inflamatório no tecido adiposo epididimal (via redução nos níveis de NF- κ B, IL-6, TNF- α e aumento de IL-10), o que pode ter contribuído para o aumento nos níveis de fosforilação de AKT e maior sensibilidade à insulina. O tratamento com trigonelina também se destacou na prevenção do estresse glicoxidativo no rim (redução de TBARS, AGEs e RAGE), promoveu aumento de marcadores do *status* energético (SIRT 1, AMPK, PGC-1 α), e apresentou potencial antioxidante (aumento de NRF 2, SOD, CAT e GSH-Px) e anti-inflamatório (redução de NF- κ B, IL-6, TNF- α e aumento de IL-10). O

tratamento com curcumina destacou-se na promoção de aumento nos níveis de fosforilação de AKT em músculo *gastrocnemius*, aumento nos níveis de expressão de marcadores do *status* energético e programa termogênico no fígado e tecido adiposo marrom (SIRT 1, AMPK, PGC-1 α , NRF 2 e UCP 1), protegeu o fígado de danos glicoxidativos (redução de TBARS, AGEs, RAGE), apresentou potencial anti-inflamatório (redução de NF- κ B, IL-6 e TNF- α e aumento de IL-10) e antioxidante (aumento de NRF 2, SOD, CAT e GSH-Px). A combinação de trigonelina e curcumina em iogurte prejudicou os efeitos benéficos dos ativos naturais quando administrados isoladamente em animais obesos, aumentando a intolerância a glicose e resistência à insulina e diminuindo os níveis de fosforilação de AKT em tecido adiposo e músculo esquelético. A combinação dos ativos naturais também contribuiu para o aumento da inflamação (NF- κ B, IL-6 e TNF- α) no fígado e rim. **Conclusão:** Trigonelina e curcumina administradas isoladamente em iogurte promoveram melhorias nos distúrbios metabólicos causados pela dieta hiperlipídica. Os tratamentos com estes ativos naturais em iogurte, de forma isolada, podem contribuir para a prevenção ou atenuação das complicações observadas na obesidade.

Palavras-chave: obesidade, trigonelina, curcumina, iogurte, estresse glicoxidativo, inflamação

ABSTRACT

Introduction: Natural actives have been studied for their antioxidant, anti-inflammatory, and anti-glycation potentials, which may be interesting to prevent/attenuate the complications of obesity and diabetes mellitus (DM). Curcumin (polyphenol isolated from *Curcuma longa* L.) and trigonelline (alkaloid isolated from *Trigonella foenum-graecum* L.) have beneficial actions against the symptoms and disorders of obesity and DM, and act against the deleterious consequences related to glycoxidative stress. **Objectives:** To investigate the effects of treatments of mice submitted to the experimental model of obesity/insulin resistance with trigonellin and/or curcumin in yoghurt, evaluating the changes in physiological and biochemical parameters, insulin signaling (AKT), thermogenic program and energetic status [sirtuin 1 (SIRT 1), adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), peroxisome proliferator-activated gamma coactivator 1-alpha receptor (PGC-1 α), mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP 1), advanced glycation end products (AGEs), receptor for AGEs (RAGE)], markers of inflammation [nuclear factor kappa B (NF- κ B), interleukins (IL) IL-6 and IL-10, tumor necrosis factor (TNF- α)], antioxidant defenses [superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), nuclear factor (erythroid-derived 2)-like-2 factor (NRF2)], AGEs detoxification machinery [glyoxalase 1 (GLO 1), AGE receptor 1 (AGE-R1)]. **Methods:** Male C57BL/6 mice were fed a standard diet (P, 3.85 kcal/g, 4% lipid) or high-fat diet (H, 5.40 kcal/g, 35% lipid) for 9 weeks, and treated with yoghurt enriched with trigonellin or curcumin, alone or in combination. In the 7th week, the oral glucose tolerance test (TTGO) was performed, and in the 8th week the insulin tolerance test (ITT). At the 9th week, the animals were euthanized and samples of plasma, white and brown adipose tissues, skeletal muscles *gastrocnemius*, liver and kidney were used to determine biomarkers levels of glycoxidative stress, inflammation, thermogenic program and energy status. **Results:** Treatments with trigonelline or curcumin in yoghurt, alone, had antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects, improved both the glucose tolerance and insulin sensitivity. The treatment with trigonelline had an important effect in the reduction of the food and energy intake, prevention of the body mass gain, attenuation of adipocyte hypertrophy; anti-inflammatory potential in epididymal adipose tissues (reduced levels of NF- κ B, IL-6, TNF- α and increased levels of IL-10), which may be contributing to the increased AKT phosphorylation levels, and increased insulin sensitivity. The treatment with trigonellin also prevented glycoxidative stress in kidney (reduction of TBARS, AGEs and RAGE), increased the levels of markers related to energy status (SIRT 1, AMPK, PGC-1 α), and had antioxidant (SOD, CAT and GSH-Px) and anti-inflammatory (reduction of NF- κ B, IL-6, TNF- α , and increase of IL-10) potentials. The treatment with curcumin promoted increase in the phosphorylation levels of AKT in *gastrocnemius* muscles, increased the levels of biomarker related to energy status and thermogenic program in liver and brown adipose tissue (SIRT 1, AMPK, PGC-1 α , NRF-2 and UCP 1), protected the liver against glycoxidative damage (reduction of TBARS, AGEs, RAGE), and showed anti-inflammatory (reduction of NF- κ B,

IL-6 and TNF- α and increased IL-10) and antioxidant (increase of NRF 2, SOD, CAT and GSH-Px) potentials. The combination of trigonelin and curcumin in yoghurt impaired the beneficial effects of the natural actives when administered alone in obese animals, increasing the glucose intolerance and the insulin resistance, and decreasing the phosphorylation levels of AKT in adipose tissue and skeletal muscle. The combination of the natural actives also contributed to increased inflammation (NF- κ B, IL-6 and TNF- α) in the liver and kidney. **Conclusion:** Trigonellin and curcumin, administered alone in yoghurt, promoted many improvements in metabolic disorders caused by the high-fat diet. Treatments with these natural actives in yoghurt, alone, may contribute to the prevention or attenuation of the complications observed in obesity.

Key words: obesity, trigonelline, curcumin, yoghurt, glycoxidative stress, inflammation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais características dos adipócitos hiperplásicos e hipertróficos.....	20
Figura 2. Representação esquemática de processos ativados pela noradrenalina em adipócitos marrom, levando à termogênese do tecido adiposo marrom, biogênese mitocondrial e oxidação de ácidos graxos.....	22
Figura 3. A ativação de NRF 2 regula positivamente a transcrição de enzimas antioxidantes e protege a célula do estresse oxidativo.....	27
Figura 4. Formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs).....	30
Figura 5. Vias de sinalização ativadas pela interação de AGEs com receptor RAGE...	33
Figura 6. Interações de AGEs com RAGE e AGE-R1 sob condições de diferentes níveis de AGEs	35
Figura 7. Detoxificação do metilglioxal pelo sistema da glioxalase.....	36
Figura 8. Estrutura química da trigonelina.....	40
Figura 9. Estrutura química da curcumina.....	41
Figura 10. Curvas de calibração, 1,1'3,3'-tetrametoxipropano, espectrofotômetro (A) e fluorímetro (B).....	51
Figura 11. Curva de calibração de solução de albumina bovina sérica.....	52
Figura 12. Evolução da massa corporal (A), ingestão alimentar (B) e ingestão calórica (C) de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P e H e tratados com iogurte, curcumina (90 mg/kg) e/ou trigonelina (50 mg/kg) em iogurte.....	56
Figura 13. Massas de tecido adiposo epididimal (A), áreas (B) e diâmetros (C) de adipócitos de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P e H e tratados com iogurte, curcumina (90 mg/kg) e/ou trigonelina (50 mg/kg) em iogurte.....	58
Figura 14. Tolerância oral à glicose (A), AUC do TTGO (B), tolerância à insulina (D) e AUC do ITT (E) de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e	

tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.....64

Figura 15. Níveis de fosforilação de AKT em tecido adiposo branco epididimal de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.....66

Figura 16. Níveis de fosforilação de AKT em músculo *gastrocnemius* de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.....67

Figura 17. Níveis proteicos de NF- κ B (A), adipocinas pró-inflamatórias IL-6 (B) e TNF- α (C) e anti-inflamatória IL-10 (D) no tecido adiposo epididimal de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.....69

Figura 18. Níveis proteicos de SIRT 1 (A), níveis de fosforilação de AMPK (B), níveis proteicos de PGC-1 α (C), NRF 2 (D) e UCP 1 (E) no TAM de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.....71

Figura 19. Níveis de TBARS, AGEs fluorescentes e atividade PON 1 no plasma de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.....73

Figura 20. Níveis de TBARS (A) e AGEs fluorescentes (B), níveis proteicos de RAGE (C), Bax (D) e NF- κ B (E), níveis de citocinas inflamatórias IL-6 (F), TNF- α (G) e citocina anti-inflamatória IL-10 (H) no fígado de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.....75

Figura 21. Níveis proteicos de SIRT 1 (A), níveis de fosforilação de AMPK (B), níveis proteicos de PGC-1 α (C) e NRF 2 (D), atividades de enzimas antioxidantes SOD (E), CAT (F) e GSH-Px (G), níveis proteicos de GLO 1 (H) e AGE-R1 (I) no fígado de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.....78

Figura 22. Níveis de TBARS (A) e AGEs fluorescentes (B), níveis proteicos de RAGE

(C), Bax (D) e NF- κ B (E), níveis de citocinas inflamatórias IL-6 (F), TNF- α (G) e citocina anti-inflamatória IL-10 (H) no rim de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.....81

Figura 23. Níveis proteicos de SIRT 1 (A), níveis de fosforilação de AMPK (B), níveis proteicos de PGC-1 α (C) e NRF 2 (D), atividades de enzimas antioxidantes SOD (E), CAT (F) e GSH-Px (G), níveis proteicos de GLO 1 (H) e AGE-R1 (I) no rim camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.....84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas padrão (P) e hiperlipídica (H).....	47
Tabela 2. Anticorpos primários e secundários utilizados, diluições e condições de armazenamento.....	54
Tabela 3. Massas de tecidos adiposos branco retroperitoneal (TAB) e marrom interescapular (TAM), fígado e rim de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P e H e tratados iogurte, curcumina (90 mg/kg) e/ou trigonelina (50 mg/kg) em iogurte.....	59
Tabela 4. Parâmetros bioquímicos plasmáticos de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina Difosfato
AGE-R	<i>Advanced Glycation End Products Receptor</i>
AGEs	<i>Advanced Glycation End Products</i>
AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AGL	Ácidos Graxos Livres
AKT	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
ALE	<i>Advanced Lipoxidation End Products</i>
ALT	Alanina Aminotransferase
AMPc	Adenosina 3',5'-Monofosfato Cíclico
AMPK	proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
AUC	Área sob a Curva
Bax	<i>Bcl2 associated X protein</i>
CML	Carboximetilisina
CAT	Catalase
CPT	Carnitina Palmitoil Transferase
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons
DM	Diabetes Mellitus
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EP	Erro Padrão
ERK	Quinase Regulada por Sinal Extracelular
ERRO	Espécies Reativas de Oxigênio
GLO1	Glioxalase 1
GLP-1	Peptídeo Semelhante ao Glucagon-1
GLUT 4	Transportador de Glicose 4
GPR	Receptor Acoplado a Proteína G
GSH	Glutationa Reduzida
GSH-Px	Glutationa Peroxidase
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HMGB1	Grupo de Alta Mobilidade 1
HO-1	Heme Oxigenase-1
HSL	Lipase Hormônio Sensível
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IMC	Índice de Massa Corporal
IRS-1	<i>Insulin Receptor Substrate 1</i>
ITT	Teste de Tolerância à Insulina
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LHS	Lipase Hormônio Sensível

LPA	Ácido Lisofosfatídico
LPL	Lipase Liporopoteica
LPS	Lipopolissacarídeos
LXR	Receptores de Fígado X
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MDA	Malondialdeído
Myf5	Fator Miogênico 5
NAD ⁺	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH	Adenina Dinucleotídeo Fosfato na Forma Reduzida
NBT	Nitroblue Tetrazolium
NE	Norepinefrina
NRF 2	<i>Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2</i>
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
OAA	Oxaloacetato
PAMP	Padrão Molecular Associado ao Patógeno
PDH	Piruvato desidrogenase
PC	Piruvato Carboxilase
PGC-1α	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-alpha</i>
PI3K	Fosfatidilinositol-3-Quinase
PKA	Proteína Quinase A
PKC	Proteína Quinase C
PON 1	Paraoxonase 1
PPARγ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ</i>
PRDM16	<i>PR domain containing 16</i>
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End Products
SIRT1	Sirtuína 1
SOD	Superóxido Dismutase
SRC-3	Steroid Receptor Coactivator-3
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAG	Triacilgliceróis
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TAM	Tecido Adipos Marrom
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-α
TLR	<i>Toll-Like</i>
TTGO	Teste de Tolerância à Glicose Oral
UCP1	Proteína Desacopladora Mitocondrial 1
VLDL	Lipoproteína de Densidade Muito Baixa
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Justificativa.....	16
1.2 Revisão de Literatura.....	17
1.2.1 Obesidade.....	17
1.2.2 Tecido adiposo e inflamação crônica de baixo grau.....	18
1.2.3 Tecido adiposo e regulação do metabolismo energético na obesidade.....	21
1.2.4 Resistência à insulina.....	25
1.2.5 Estresse oxidativo.....	26
1.2.6 Produtos finais de glicação avançada (AGEs).....	28
1.2.7 Receptores de AGEs.....	31
1.2.8 Efeito de sensores metabólicos celular na obesidade.....	37
1.2.9 Trigonelia e Curcumina.....	40
2. OBJETIVOS.....	44
2.1 Objetivo geral.....	44
2.2 Objetivos específicos.....	44
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1 Reagentes.....	46
3.2 Animais, dietas e desenho experimental.....	46
3.3 Análise Histológica.....	49
3.4 Determinações analíticas.....	49
3.4.1 Biomarcadores do metabolismo de lipídeos e função hepática e renal.....	49
3.4.2 Biomarcadores de estresse glicoxidativo e atividades antioxidantes.....	50
3.4.3 Proteínas Totais.....	52
3.4.4 Western Blot.....	53
3.4.5 Análises de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória.....	54
3.5 Análise Estatística.....	54

4. RESULTADOS.....	55
4.1 Efeito dos tratamentos com iogurte, trigonelina e/ou curcumina nos parâmetros fisiológicos de animais obesos.....	55
4.2 Efeito dos tratamentos com iogurte, trigonelina e/ou curcumina nos parâmetros bioquímicos plasmáticos de animais obesos.....	60
4.3 Efeito dos tratamentos com iogurte, trigonelina e/ou curcumina na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina de animais obesos.....	61
4.4 Efeitos dos tratamentos com iogurte, trigonelina e/ou curcumina em iogurte em biomarcadores relacionados à inflamação de animais obesos.....	68
4.5 Efeito dos tratamentos com iogurte, trigonelina e/ou curcumina nos marcadores relacionados ao programa termogênico no tecido adiposo marrom interescapular de animais obesos.....	70
4.6 Efeito dos tratamentos com iogurte, trigonelina e/ou curcumina em biomarcadores do estresse glicoxidativo e atividade antioxidante no plasma de animais obesos.....	72
4.7 Efeito dos tratamentos com iogurte, trigonelina e/ou curcumina em biomarcadores do estresse glicoxidativo e de inflamação no fígado de animais obesos.....	73
4.8 Efeito dos tratamentos com iogurte, trigonelina e/ou curcumina em biomarcadores relacionados ao status energético, potencial antioxidante e detoxificação de AGEs no fígado de animais obesos.....	76
4.9 Efeito dos tratamentos com iogurte, trigonelina e/ou curcumina em biomarcadores do estresse glicoxidativo e da inflamação no rim de animais obesos.....	79
4.10 Efeito dos tratamentos com iogurte, trigonelina e/ou curcumina em biomarcadores relacionados ao status energético, potencial antioxidante e detoxificação de AGEs no rim de animais obesos.....	81
5. DISCUSSÃO.....	85
5.1 Caracterização do modelo experimental de obesidade e resistência à insulina.....	85
5.2 Tratamento com iogurte na atenuação dos distúrbios metabólicos em modelo animal de obesidade e resistência à insulina.....	92
5.3 Tratamento com trigonelina em iogurte na atenuação dos distúrbios metabólicos em modelo animal de obesidade e resistência à insulina.....	94
5.4 Tratamento com curcumina em iogurte na atenuação dos distúrbios metabólicos em modelo animal de obesidade e resistência à insulina.....	99
5.5 Tratamento com a combinação de trigonelina e curcumina em iogurte na prevenção dos distúrbios metabólicos em modelo animal de obesidade e resistência à	

insulina.....	103
6. CONCLUSÃO.....	107
7. REFERÊNCIAS.....	108
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa

Obesidade e sobrepeso estão entre os mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de diversas doenças crônicas, incluindo o diabetes mellitus (DM) tipo 2 (HENRY et al., 2013). A disponibilidade de produtos alimentares caracterizados por baixo custo, boa palatabilidade e alto conteúdo de lipídeos e carboidratos têm aumentado nas últimas décadas, justificando seu crescente consumo (CRINO et al., 2015). Assim, o aumento nos níveis circulantes de glicose e triacilgliceróis (promovido pelo excesso de nutrientes) e de ácidos graxos (advindos da lipólise de tecidos adiposos, especialmente dos estoques de gordura abdominal), está intimamente associado ao estabelecimento e manutenção da resistência insulínica. Portanto, a relação entre a ingestão de dietas hipercalóricas/hiperlipídicas por longos períodos, desenvolvimento de sobrepeso/obesidade e o surgimento de resistência à insulina, DM tipo 2 e outros distúrbios metabólicos envolve a participação concomitante de diversos mecanismos (STINKENS et al., 2015).

Mudanças no padrão nutricional são extremamente importantes e auxiliares no tratamento de doenças crônicas e na prevenção de suas complicações em longo prazo. Além disso, nos últimos anos houve aumento no interesse pelo uso de preparações e/ou compostos de origem natural, e este uso tem sido associado à promoção de diversos benefícios à saúde humana. Estes compostos bioativos possuem ações em nível celular e molecular, atuando como antioxidantes e/ou apresentando a capacidade de modular as atividades de diversos componentes celulares, incluindo enzimas-chave de processos metabólicos (ELLWOOD et al., 2014; GUNAWARDENA et al., 2015). Além disso, vários estudos têm sido realizados com preparações e/ou compostos de origem natural com o intuito de esclarecer seu potencial antiobesogênico e antihiperlipidêmico, permitindo assim que seu uso tenha papel importante na redução/prevenção da obesidade e do DM, bem como de suas complicações (KARTHIKESAN et al., 2010; GUTIERRES et al., 2019; ARCARO et al., 2014; ASSIS et al., 2017).

O iogurte é um dos alimentos lácteos fermentados mais consumidos em todo o mundo, e contribui para uma melhor qualidade na dieta fornecendo quantidades substanciais de macronutrientes e micronutrientes essenciais (cálcio, potássio, zinco, fósforo, magnésio, riboflavina, vitamina A, vitamina B5, vitamina B12). A palatabilidade e acessibilidade são fatores importantes a serem considerados para

otimizar o consumo do iogurte em diferentes países (WANG et al., 2013). O consumo de iogurte tem sido associado à diminuição na absorção intestinal e nos níveis circulantes de colesterol, redução da obesidade e outros fatores de risco cardiovascular e melhoria no sistema imune (ANDERSON; GILLIAND, 1999; ASHRAF; SHAH, 2014; ASTRUP, 2014). Além de todos estes benefícios, o enriquecimento/fortificação do iogurte tem sido considerado uma opção prática como veículo de compostos bioativos obtidos a partir de outros alimentos funcionais ou plantas medicinais (GAHRUIE et al., 2015).

A relação entre a ingestão de alimentos e o ganho de peso corporal com base na dieta é muito importante em estudos de intervenção nutricional e/ou farmacológica. Uma vez que o modelo experimental de obesidade e resistência à insulina promove alterações metabólicas associadas ao DM tipo 2 e estas possuem as mais diversas etiologias, seu estudo permite ampliar o campo de investigações relacionadas aos múltiplos benefícios que podem ser alcançados com o uso de compostos bioativos que tenham diversos mecanismos de ação.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Obesidade

A ocorrência de doenças crônico-degenerativas não transmissíveis na população mundial vem crescendo a cada ano, incluindo as complicações da obesidade, e estas têm relação direta com o aumento no consumo de dietas hipercalóricas e/ou hiperlipídicas, em associação ao sedentarismo e inadequado estilo de vida (LORDAN et al., 2018).

A obesidade está diretamente relacionada com os aumentos nos gastos em saúde pública em todo o mundo. Em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos com 18 anos ou mais apresentavam excesso de peso; destes, mais de 650 milhões eram obesos. Além disso, mais de 340 milhões de crianças e adolescentes com idade entre 5 e 19 anos estavam acima do peso ou obesas (WHO, 2018).

A obesidade é caracterizada pelo aumento desproporcional de peso corporal devido ao desequilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético, culminando no aumento da deposição de gorduras nos tecidos adiposos, e geralmente é acompanhada por um quadro de inflamação sistêmica crônica de baixo grau (MONTANARI et al., 2017). Também está associada ao aumento no índice de massa corporal (IMC), onde IMC acima de 25 kg/m^2 é um importante fator de risco para o desenvolvimento de DM tipo 2

e doenças cardiovasculares (SHARMA, 2015; IGEL et al., 2018). Estudos mostram que, quanto maior o grau de obesidade, maiores serão os gastos diretos com esta condição metabólica e suas complicações, incluindo diagnósticos e tratamentos. Estima-se que os custos com os cuidados com a saúde de indivíduos com excesso de peso sejam aproximadamente 10% maiores quando comparados aos custos de um indivíduo adulto com peso normal, e cerca de 23%, 45% e 81% maiores em indivíduos com obesidade grau I ($30 - 34,9 \text{ kg/m}^2$), grau II ($35 - 39,9 \text{ kg/m}^2$) e grau III ($\geq 40 \text{ kg/m}^2$), respectivamente. As despesas com saúde podem ser de 65% a 113% maiores em indivíduos com obesidade mórbida (LEHNERT et al., 2013).

Embora os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento do DM tipo 2 devido à obesidade sejam complexos e não completamente compreendidos, os níveis de ácidos graxos livres (AGL) elevados, decorrentes do aumento da lipólise, bem como um estado inflamatório de baixo grau e o aumento do estresse glicoxidativo são reconhecidos como os principais colaboradores neste processo (YATURO, 2011).

1.2.2 Tecido adiposo branco e inflamação crônica de baixo grau

A obesidade é um distúrbio metabólico caracterizado por um desequilíbrio entre a ingestão de energia e o gasto energético, culminando em acúmulo excessivo de gordura nos tecidos adiposos bem como em outros tecidos (AHIMA, 2011; WHO, 2017), sendo um importante fator de risco para o desenvolvimento de outras manifestações clínicas, tais como resistência à insulina, DM tipo 2 (XU et al., 2017), doença hepática não alcoólica (CUSI, 2012), doenças cardiovasculares (OKTAY, 2017) e certos tipos de câncer (SUN; KARIN, 2012).

Os adipócitos são células altamente especializadas no armazenamento de energia na forma de triacilgliceróis. Também são órgãos endócrinos que produzem e secretam uma ampla variedade de moléculas, tais como as adipocinas (GALIC et al., 2010). Evidências apoiam o conceito de que o tecido adiposo atue como um órgão imunomodulador (GRANT; DIXIT, 2015). A medida que o peso corporal aumenta, o tecido adiposo branco (TAB) expande devido ao aumento no tamanho (hipertrofia) e número de adipócitos (hiperplasia) (KIM et al., 2015).

Mudanças no *status* inflamatório também têm relação com o desenvolvimento de doenças metabólicas crônicas. Atualmente sabe-se que a obesidade é uma condição de inflamação sistêmica crônica de baixo grau, sendo o TAB o principal responsável por

este panorama. Na obesidade, a hipertrofia adipocítica leva à alteração na atividade de macrófagos infiltrados no TAB, que aumentam a produção e secreção de diversas adipocinas pró-inflamatórias, dentre elas interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1/CCL2), inibidor de ativação de plasminogênio-1 (PAI-1), entre outras. Níveis elevados de IL-6 e TNF- α inibem componentes da cascata de sinalização da insulina em tecidos alvo (tecido adiposo e musculatura esquelética) por ativação de proteínas quinases (IKK β e JNK) capazes de fosforilarem o substrato do receptor da insulina 1 (IRS-1) em resíduo de serina (fosforilação inibitória) (MATSUDA; SHIMOMURA, 2013; JUNG; CHOI, 2014).

Os macrófagos presentes em associação ao tecido adiposo foram às primeiras células imunes associadas com a resistência à insulina; no entanto, em termos de infiltração no TAB, eles são precedidos por outras células imunes, incluindo as células T. As células T regulatórias (T_{reg}) normalmente constituem de 5-20% da população de células T CD4⁺ e desempenham um papel crucial na manutenção da imunidade. As células T_{reg} secretam citocinas anti-inflamatórias, inibindo a migração de macrófagos e promovendo um fenótipo de macrófagos do tipo M2. Os macrófagos do tecido adiposo podem ser classificados com base na sua expressão de marcadores de superfície e/ou com base no seu perfil de secreção de quimiocinas e citocinas (MCARDLE et al., 2013). No estado obeso, há maiores proporções de macrófagos do tipo 1 (M1), classicamente ativados, e menos macrófagos M2. Os macrófagos M1 secretam citocinas as pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6, enquanto que os macrófagos M2 alternativamente ativados secretam citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-10 e antagonista do receptor IL-1 (RA). O grau de infiltração de macrófagos está associado à progressão da resistência à insulina (Figura 1). Uma alça de retroalimentação de citocinas pró-inflamatórias exacerba este estado patológico, impulsionando ainda mais a infiltração de células imunes e a secreção de citocinas, interrompendo a cascata de sinalização de insulina (KWON; PESSIN, 2013).

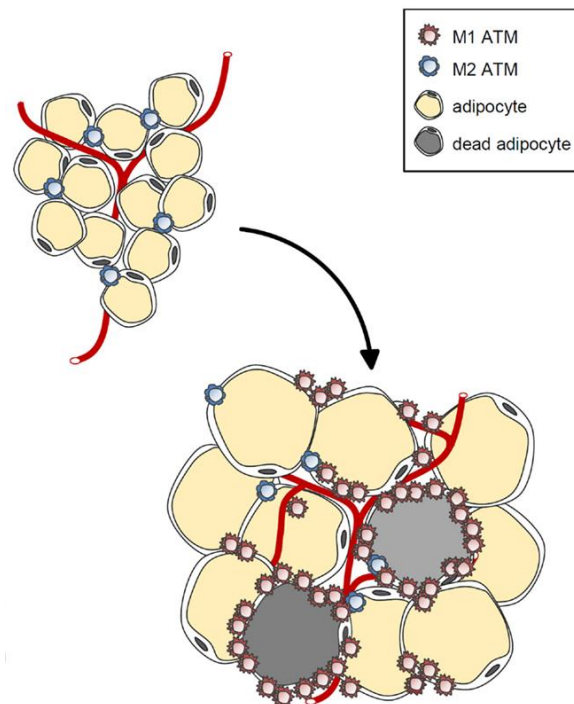


Figura 1. Principais características dos adipócitos hipertróficos. Na obesidade, a expansão adiposa hipertrófica ocorre via aumento do tamanho dos adipócitos e está associada a algumas consequências, incluindo liberação aumentada de ácidos graxos, citocinas pró-inflamatórias, recrutamento de células imunes, hipóxia, fibrose, diminuição de adiponectina e prejuízos na sensibilidade à insulina. Fonte: CHOE et al. (2016), modificado.

O desenvolvimento do estado de inflamação crônica de baixo grau também contribui para a formação de células espumosas e espécies reativas de oxigênio (ERO), via aumento na oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL-oxidada) (KAPLAN, 1999). A geração de ERO induz uma maior infiltração de macrófagos, exacerbando o estado inflamatório e resistência à insulina (AYALA et al., 2014).

O aumento nos níveis circulantes de lipídeos, tanto na forma de triacilgliceróis nas lipoproteínas quilomícron e VLDL, como também de AGL advindos da lipólise de TAB, especialmente dos estoques de gordura intra-abdominais, iniciam o processo de lipotoxicidade em diversos órgãos, incluindo fígado, coração, musculatura esquelética, pâncreas e rins (SCHAFER, 2003; BOBULESCU, 2010; TRAUNER et al., 2010; PRADA; SAAD, 2011). O aumento excessivo nos níveis intracelulares de AGL nestes tecidos leva ao acúmulo de metabólitos de AGL potencialmente tóxicos, tais como acil-CoA graxo, diacilglicerol e ceramidas (GARG, 2015). A disfunção celular lipotóxica ocorre por vários mecanismos, incluindo geração de ERO, ativação de quinases

(incluindo certas isoformas de PKC) que inibem componentes da sinalização da insulina, liberação de fatores pró-inflamatórios e pró-fibróticos, e apoptose induzida por lipídeos (lipoapoptose) (CHAVEZ; SUMMERS, 2010; SAVARY et al., 2012; MITTAL et al., 2014).

1.2.3 Tecido adiposo marrom e regulação do metabolismo energético na obesidade

Estudos têm indicado a importância de estratégias capazes de induzir a termogênese em tecidos adiposos como uma ferramenta promotora de redução no peso corporal e de prevenção dos distúrbios metabólicos observados na obesidade e no DM tipo 2. Um destes alvos promissores é o tecido adiposo marrom (KAZAK et al., 2017; MARINOVIC et al., 2018).

O tecido adiposo marrom (TAM), amplamente composto por adipócitos marrons, existe exclusivamente em mamíferos e apresenta função termogênica, isto é, promove dissipação da energia na forma de calor para manter a homeostase térmica corporal. O gasto energético total pode ser dividido em: (i) gasto energético obrigatório ou taxa metabólica de repouso, medido em condições de repouso e necessário para o funcionamento basal das células; (ii) gasto energético decorrente de atividade física (variável); (iii) gasto energético atribuído à capacidade adaptativa termogênica (variável, regulada pelo cérebro), definida como produção de calor sem tremores em resposta à temperatura ambiente ou dieta (BRONDANI et al., 2012).

Além da função termogênica, o TAM age como um regulador crucial do metabolismo energético devido a sua elevada capacidade oxidativa (CYPESS; KAHN, 2010). Recentemente, descobriu-se que os adipócitos brancos podem assumir fenótipo de adipócitos marrons, sendo estas células conhecidas como “brite” (marrom em branco) ou adipócitos beges (GIRALT; VILLARROYA 2013; POHER et al., 2015). Diferente do TAB, adipócitos marrons e beges possuem significativas quantidades de mitocôndrias que expressam a proteína desacopladora 1 (UCP 1). Esta proteína converte energia química em calor através do desacoplamento entre a fosforilação oxidativa e a síntese de adenosina trifosfato (ATP), e sua ativação ocorre via controle hipotalâmico, com estímulo à liberação de noradrenalina (NE) pelo sistema nervoso simpático (SNS), que se liga ao receptor β 3-adrenérgico e estimula a produção de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC). Ocorre ativação da proteína quinase dependente de AMPC (PKA), e esta fosforila e ativa a lipase hormônio sensível (HSL), que promove a

hidrólise dos trigacilgliceróis (TAG) armazenados na forma de gotículas lipídicas nos adipócitos do TAM, culminando em aumento nas concentrações de AGL. A ativação da via de sinalização AMPc/PKA também estimula a jusante MAPK p38, na qual fosforila PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) e sua translocação para o núcleo estimula a expressão de UCP 1 (Figura 2; CIOFFI et al., 2018). A combinação entre uma maior velocidade de oxidação de AG e geração de gradiente de prótons na mitocôndria, e a ativação de UCP 1 mitocondrial, o resultado final é o estímulo à termogênese (TOWNSEND; TSENG, 2012).

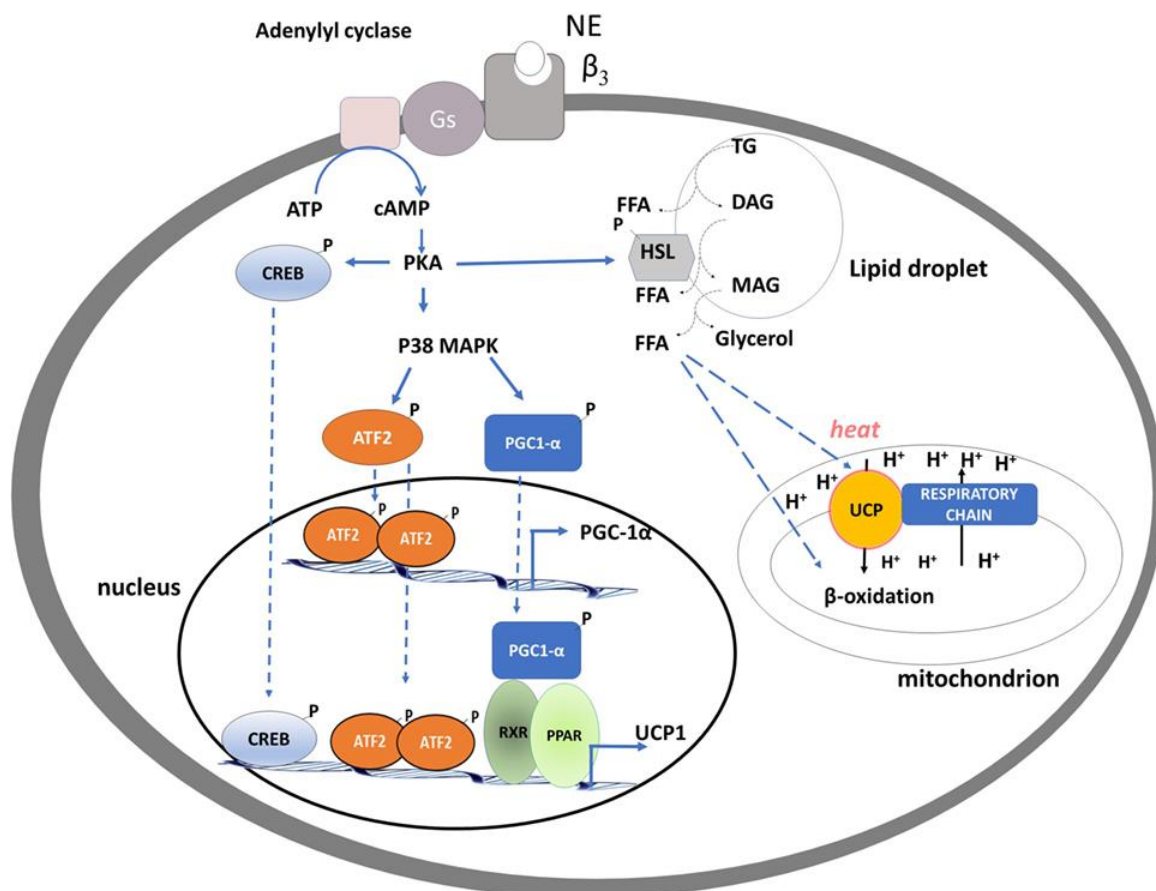


Figura 2. Representação esquemática de processos ativados pela noradrenalina em adipócito marrom, estimulando a termogênese, biogênese mitocondrial e oxidação de ácidos graxos no tecido adiposo marrom. A via de sinalização dependente de PKA, CREB e p38 MAPK estimula a expressão gênica de PGC-1 α e UCP 1. A PKA fosforila HSL, promovendo a hidrólise dos triacilgliceróis. Os ácidos graxos livres liberados são utilizados como substrato energético mitocondrial e como ativador de UCP 1. Fonte: CIOFFI et al. (2018)

Além da ativação da PKA, o frio e os aumentos nos níveis de noradrenalina também aumentam a atividade da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), altamente expressa no TAM. Curiosamente, a ativação de AMPK por agonistas β -adrenérgicos e pelo frio é dependente da indução de lipólise, mas não requer UCP 1. A AMPK é ativada por alterações na relação AMP/ATP, que desempenha um papel importante na manutenção do balanço energético intracelular. A AMPK regula a captação da glicose, o metabolismo dos ácidos graxos e a função mitocondrial. Também pode desempenhar um papel potencialmente importante na estimulação do programa termogênico, permitindo aos adipócitos marrons e beges captarem mais glicose e aumentarem as taxas de oxidação de lipídeos e glicose (KANG et al., 2018). As proteínas da cadeia transportadora de elétrons da membrana interna mitocondrial geram um gradiente eletroquímico de prótons entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranas, mas a presença de UCP 1 desacopla a cadeia transportadora de elétrons e a síntese de ATP via dissipação da energia como calor, e consequentemente, reduz a razão ADP/ATP (JIA et al., 2010).

Ao contrário dos adipócitos brancos, os adipócitos encontrados no TAM são derivados da linhagem Myf5 (fator miogênico 5) e, portanto, compartilham um precursor comum com o músculo esquelético (SHAN et al., 2013). O PRDM16 (PR domain containing 16) é um fator de transcrição determinante para o controle do desenvolvimento do TAM, e a superexpressão desta proteína resulta em “*browning*” (desenvolvimento de adipócitos marrom ou bege em tecido adiposo branco) de pré-adipócitos viscerais primários. O PRDM16 promove estímulo à expressão genica no TAM via PGC-1 α e β (SEALE et al., 2008; HARMS et al., 2014). O principal regulador da biogênese mitocondrial, o PGC-1 α , é essencial na adipogênese marrom, pois estimula a expressão da UCP 1. A termogênese do TAM requer o consumo de reservas energéticas, inicialmente aquelas presentes nas gotículas lipídicas e, com a ativação da termogênese no TAM, aquelas derivadas do catabolismo do TAB, fornecem AGL para ativar a UCP 1 e servir como substratos para a oxidação no TAM (GILL; MERRILL, 2017).

A sirtuína 1 (SIRT 1) é outro importante regulador da termogênese no TAM e uma de suas principais ações é promover a desacetilação de PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*). A desacetilação de PPAR γ é necessária para recrutar PRDM16, promovendo assim indução da expressão de genes no TAM (PGC-1 α e UCP 1) e repressão da transcrição de genes no TAB (C/EBP α e CtBP 1/2). A associação

entre estes importantes componentes leva ao desenvolvimento e regulação da função do TAM. Existem sete isoformas de SIRT, e todas são expressas em tecidos adiposos (FAVERO et al., 2018). A SIRT 1 uma desacetilase proteica nuclear dependente de NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e ortóloga à proteína Sir 2 (reguladora de informação silenciosa). As sirtuínas têm sido cada vez mais reconhecidas como reguladores cruciais de uma variedade de processos celulares, incluindo regulação de processos metabólicos, resposta ao estresse, tumorigênese e envelhecimento. O NAD^+ participa de reações redox via transporte de elétrons, alternando entre as formas aceptor de elétrons (oxidada; NAD^+) e doador de elétrons (reduzida; NADH), e atua assim como um importante indicador do estado energético celular. Um estado de alta energia promove diminuição nos níveis de NAD^+ celular, incluindo ingestão de dietas com alto teor de gordura e respostas inflamatórias agudas, culminando em redução na atividade da SIRT 1 (RAHMAN; ISLAM, 2011). A redução na atividade de SIRT 1 nos tecidos adiposos leva ao aumento da adiposidade e resistência à insulina. A SIRT 1 é um regulador essencial da homeostase energética sistêmica e a modulação farmacológica da SIRT 1 pode ser de interesse para o controle de doenças associadas à obesidade (JOKINEN et al, 2017).

Situações de esgotamento de energia ativam AMPK e SIRT 1, culminando em aumento na transcrição gênica dependente de $\text{PGC-1}\alpha$. Em condições de ingestão de dietas ricas em calorias ou quando a oferta de energia não é limitada, a atividade da AMPK é interrompida pelos altos níveis de ATP intracelular. Da mesma forma, dietas ricas em gordura aumentam o SRC-3 (steroid receptor coactivator-3), que regula positivamente os níveis da histona acetil-transferase (GCN5) que, por sua vez, desempenha o papel oposto da ação da SIRT 1 na acetilação de $\text{PGC-1}\alpha$, diminuindo assim a atividade transcricional da $\text{PGC-1}\alpha$. Perturbações nesta rede metabólica que controla a atividade da $\text{PGC-1}\alpha$ podem contribuir de forma importante para o estabelecimento das complicações metabólicas observadas na obesidade (CANTÓ; AUWERX, 2013).

$\text{PGC-1}\alpha$ foi inicialmente caracterizado como um coativador induzido pelo frio por $\text{PPAR}\gamma$ (PUIGSERVER et al., 1998). O $\text{PPAR}\gamma$ é um regulador chave da biogênese mitocondrial e termogênese adaptativa (ALCALÁ et al., 2019). O $\text{PGC-1}\alpha$ também aumenta a expressão de muitos fatores de transcrição e pode se ligar a membros da família de receptores nucleares, incluindo o NRF 2 (*nuclear erythroid 2-related factor 2*). A ativação de $\text{PGC-1}\alpha$ aumenta a expressão de NRF 2, e esta regula a expressão de

proteínas da cadeia transportadora de elétrons, incluindo a proteína citocromo c oxidase do complexo IV. O PGC-1 α desempenha papel crítico na manutenção da função mitocondrial e metabolismo energético celular, e sua indução regula o metabolismo oxidativo mitocondrial, bem como a biogênese mitocondrial e o recrutamento de enzimas modificadoras da cromatina (DOMINY; PUIGSERVER, 2013). A importância de PGC-1 α no tecido adiposo foi estabelecida em camundongos *knockout* para PGC-1 α especificamente nos adipócitos, e estes animais desenvolveram resistência à insulina e apresentaram níveis aumentados de lipídeos circulantes quando alimentados com dieta hiperlipídica (KLEINER et al., 2012). Assim, o papel de PGC-1 α na regulação da homeostase energética indicam este fator como um alvo importante para o desenvolvimento de terapias para o combate da obesidade e do DM (SINGH et al., 2017).

1.2.4 Resistência à insulina

A obesidade encontra-se frequentemente relacionada com níveis anormalmente elevados de glicose e lipídeos no sangue, com aumento nos níveis de colesterol (em especial a lipoproteína de baixa densidade, LDL) e triacilgliceróis, bem como diminuição do colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (HDL). A hiperinsulinemia compensatória, por sua vez, estimula a síntese de triacilgliceróis e de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), contribuindo ainda mais para a hipertrigliceridemia (VAN GAAL et al., 2006).

A resistência à insulina é principalmente caracterizada por uma resposta diminuída da insulina nos tecidos-alvo, normalmente associada à redução na capacidade de ativar IRS-1 via fosforilação em resíduos de tirosina, culminando em diminuição na atividade de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e de eventos subsequentes, incluindo menor ativação da proteína quinase AKT, efetora das ações intracelulares da insulina (PRADA; SAAD, 2011). A resistência à insulina na obesidade tem relação com as altas concentrações de AGL, contribuindo para um aumento na síntese de metabólitos tóxicos no músculo esquelético, como por exemplo o diacilglicerol. O diacilglicerol ativa a proteína quinase C- θ (PKC- θ), que promove fosforilação de IRS-1 em resíduos de serina (inibitória) e redução na fosforilação em resíduos de tirosina (estimulatória), e assim ocorre inibição na captação de glicose dependente do transportador de glicose 4 (GLUT 4) (HOLLAND et al., 2007). A ativação destas isoformas da PKC também é

responsável pela ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B); ativação de NF- κ B causa superprodução de TNF- α e IL-6 nos adipócitos. Ceramida é outro metabólito lipídico que tem relação com inibição na atividade de AKT (SCHMITZ-PEIFFER, 2000; SCHRAUWEN-HINDERLING et al., 2006; CHOW et al., 2010; RITTER et al., 2015). A subsequente hiperglicemia impactará tecidos onde a captação de glicose ocorre de forma independente da insulina, tais como pâncreas, endotélio vascular, retina, rins e fígado, culminando em aumento nas concentrações intracelulares de glicose, culminando no estresse glicoxidativo (BROWNLEE, 2005; JUNG; CHOI, 2014).

1.2.5 Estresse oxidativo

O desequilíbrio no metabolismo de lipídeos e carboidratos na obesidade contribui para a suscetibilidade do organismo às lesões oxidativas. Na obesidade, ocorre aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), e estas são capazes de promover danos a diversas biomoléculas e perda de funcionalidade, culminando em injúrias celulares e teciduais (DALLE-DONNE et al., 2006; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011). É inevitável a formação de ERO como um subproduto do metabolismo oxidativo, principalmente na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (BROWNLEE, 2005).

Ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) são considerados as principais ERO “primárias”, no entanto outras espécies também se encontram aumentadas em condições de estresse oxidativo, como por exemplo o radical hidroxil ($\bullet OH$) e oxigênio singlete (1O_2) (SINDHU et al., 2004). Além disso, elevados níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α na obesidade aumentam a produção de $NO^{\bullet}$; o aumento de $NO^{\bullet}$ estabelece prejuízos no metabolismo mitocondrial e contribui para o aumento dos processos de lipoperoxidação (GOVINDARAJ; PILLAI, 2015).

As atividades diminuídas de enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px), bem como uma redução nos níveis de glutathiona reduzida (GSH), têm sido também relacionadas ao estabelecimento do estresse oxidativo. Além disso, um dos principais mecanismos de defesa celular contra o estresse oxidativo é a ativação do fator NRF 2 (nuclear erythroid 2-related factor 2), um fator de transcrição que regula a expressão de enzimas detoxificantes de fase II, NAD(P)H desidrogenase, glutathiona peroxidase, ferritina, heme oxigenase-1

(HO-1), bem como enzimas antioxidantes. Tais componentes protegem as células contra várias lesões via seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. Assim, a ativação de NRF 2 influencia a expressão de genes cujos produtos estão envolvidos na detoxificação e eliminação de oxidantes reativos e agentes eletrofílicos, aumentando assim a capacidade antioxidante celular (AHMED et al., 2017). Sob condições basais, o NRF 2 em seu estado inativo é mantido no citoplasma ligado à Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), com uma meia-vida de apenas 20 minutos, o NRF 2 é constantemente alvo de ubiquitinação pelo Keap1 com conseqüente degradação via proteassomal. Em condições de estresse oxidativo os resíduos de cisteína do sítio ativo de Keap1, impedem que interaja com NRF 2. Com o acúmulo de NRF 2 no citoplasma é translocado para o núcleo onde se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE). A ativação de ARE aumenta a transcrição de várias enzimas e proteínas antioxidantes, reduzindo assim citotoxicidade das ERO (Figura3; LIU et al., 2015).

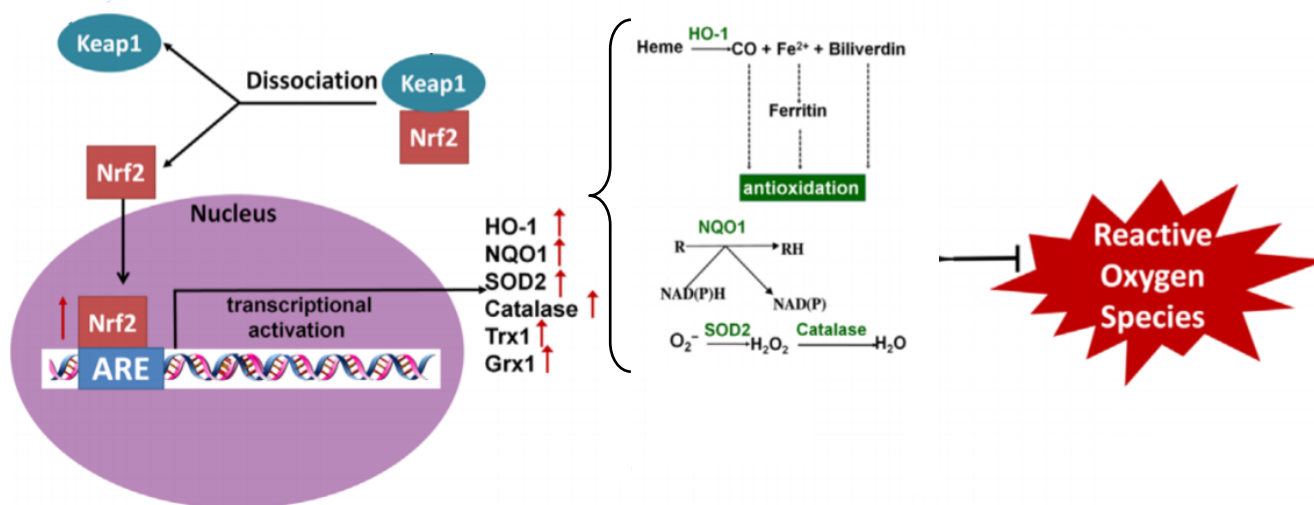


Figura 3. A ativação de NRF 2 aumenta a expressão de enzimas antioxidantes e protege a célula contra as agressões associadas ao estresse oxidativo. A dissociação entre Keap1 e NRF 2 promove a translocação de NRF 2 para o núcleo, onde se liga a ARE. Com a ativação da ARE, ocorre a ativação transcricional das enzimas antioxidantes heme oxigenase-1 (HO-1), NADPH desidrogenase (NQO1), superóxido dismutase 2 (SOD2), catalase, tioredoxina 1 (Trx1) e glutaredoxina 1 (Grx1). A HO-1 converte o heme em monóxido de carbono, ferro (II) e biliverdina, estes indiretamente

removem ERO. NQO1 converte enzimas e outras proteínas (R) a sua forma reduzida (RH) via utilização de poder redutor de NADPH. O O_2^- é convertido em H_2O_2 por SOD2 e em seguida convertida em H_2O pela catalase. Em geral, a ativação de NRF 2 promove a sobrevivência das células durante o estresse oxidativo. Fonte: LIU et al. (2015), modificado.

Outro mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo ocorre via ação da enzima antioxidante paraoxonase 1 (PON 1), uma esterase dependente de cálcio conhecida por catalisar a hidrólise de compostos organofosforados (paraoxon e diazoxon). Amplamente distribuída nos tecidos (fígado, rim, intestino e também no plasma sanguíneo), a PON 1 é sintetizada no fígado, e no soro encontra-se associada à lipoproteína HDL. Alterações no tamanho e na forma da HDL afetam a afinidade e a estabilidade da interação PON 1, resultando em redução na capacidade antioxidante. PON 1 inibe a oxidação da LDL, resultando em proteção contra os estágios iniciais e tardios da aterogênese. A superexpressão de PON 1 também inibe a formação de hidroperóxidos lipídicos em HDL, protegendo sua integridade e função, estimulando também o efluxo celular de colesterol e aumenta a capacidade do transporte reverso do colesterol (LI et al., 2003; MARTINELLI et al., 2013; RUPÉREZ et al., 2014).

Níveis elevados de marcadores de estresse oxidativo são observados na obesidade e no DM, como por exemplo o malondialdeído (marcador de lipoperoxidação) e grupos carbonil em proteínas (TELCI et al., 2000; ARCARO et al., 2014; ASSIS et al., 2017; KIM et al., 2018). Por fim, o aumento de ERO participa no estabelecimento de diversas complicações observadas no DM (MADONNA; DE CATERINA, 2011), tais como retinopatias, nefropatias e neuropatias autonômicas e periféricas, as quais estão correlacionadas com índices elevados de morbidade e mortalidade observadas no DM (NICKERSON; DUTTA, 2012).

1.2.6 Produtos finais de glicação avançada (AGEs)

A manutenção da hiperglicemia por longos períodos também é responsável pelo aumento na formação de produtos final de glicação avançada, os AGEs (*advanced glycation end products*), que também estão envolvidos na patogênese do DM tipo 2 e suas complicações. A produção de AGEs ocorre principalmente com o processo de glicação de proteínas, via reação de Maillard, quando grupos carbonil de monossacarídeos reagem com grupos amino de proteínas, gerando bases de Schiff, que

se rearranjam em produtos de Amadori. Além dos estágios que levam à formação de produtos de Amadori, intermediários ou subprodutos de auto-oxidação da glicose, lipoperoxidação ou da via dos polióis também levam à geração de dicarbonilas altamente reativas (NOWOTNY et al., 2015; BIERHAUS et al., 1998).

A formação de AGEs resulta em alterações nas estruturas das proteínas devido à formação de ligações cruzadas (*cross-linking*). Os AGEs são frequentemente encontrados na matriz extracelular, e também podem estar associados à promoção de morte celular ou redução da adesão e migração celular. Os AGEs formados na matriz extracelular resultam em diminuição da elasticidade da parede vascular e suprimem a produção de óxido nítrico, causando prejuízos na vasodilação dependente do endotélio, um passo inicial para a aterosclerose (YAMAGISHI et al., 2008). O colágeno é uma das proteínas extracelulares mais prejudicadas pelos efeitos diretos de AGEs, contribuindo assim nos processos de envelhecimento. Proteínas intracelulares também são alvos de modificações por AGEs, prejudicando suas funções. A formação de AGEs é predominantemente endógena, mas esses produtos podem ser introduzidos no organismo por fontes exógenas, incluindo a dieta (OTT et al., 2014).

Intermediários glicolíticos produzidos em reações do tipo Maillard ou em processos de auto-oxidação da glicose também contribuem para a produção exacerbada de AGEs; dentre estes intermediários, destacam-se os compostos dicarbonílicos (glioxal, metilglioxal, 3-desoxiglucosona), considerados potentes indutores da formação de AGEs. Os compostos dicarbonílicos levam à produção de AGEs específicos. Glioxal leva a formação de N ϵ -(carboximetil) lisina (CML), dímero de lisina derivado de glioxal (GOLD), N ω -(carboximetil) arginina (CMA) e S-carboximetilcisteína. Metilglioxal gera os produtos N ϵ -(carboxietil) lisina (CEL), dímero de lisina derivado de metilglioxal (MLOD), arg-pirimidina e hidroimizalona MG-H1. Já 3-deoxiglucosona leva à formação de pirralina, pentosidina, imidazolona e também CML. Quando metilglioxal reage com resíduos de lisina de proteínas, pode ser produzido um homólogo de CML-AGE, conhecido como N ϵ -(carboxietil) lisina. (NOWOTNY et al., 2015; Figura 4).

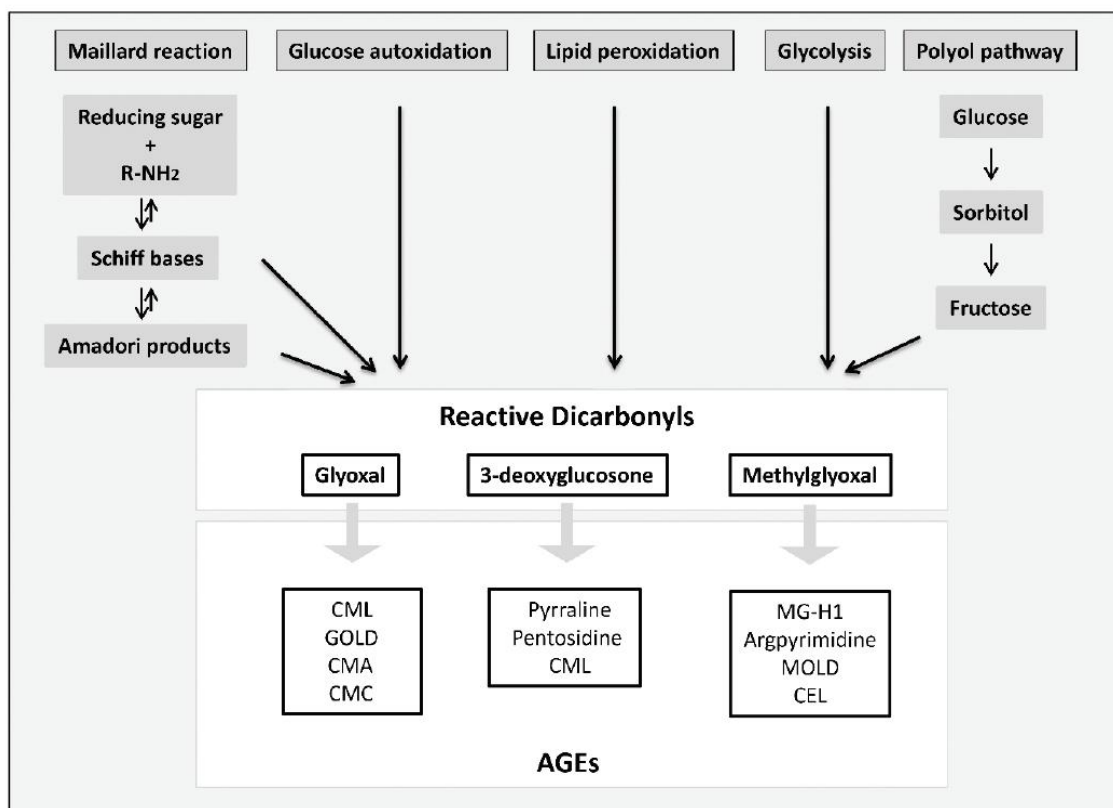


Figura 4. Formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs). A formação de AGEs ocorre via diversos mecanismos, incluindo glicação proteica (reação de Maillard) com formação de produtos de Amadori, via produtos da auto-oxidação da glicose e da peroxidação lipídica, via intermediários da glicólise e da via dos polióis. Todos estes processos geram compostos dicarbonílicos altamente reativos, que culminam na formação de AGEs. Fonte: NOWOTNY et al. (2015).

Assim como os intermediários da glicoxidação, produtos da lipoperoxidação de ácidos graxos poli-insaturados também conduzem à formação de compostos de lipoxidação (ALEs, *advanced lipoxidation end products*), resultante da formação de compostos carbonílicos e produtos mais estáveis como cetonas. Os compostos carbonílicos reativos formados neste processo são aldeídos e dicarbonilas, incluindo hidroxiacetal, acroleína, malondialdeído, glioxal e metilglioxal, que reagem com proteínas formando adutos (ALEs), que induzem disfunções proteicas e alteram as respostas celulares. A carboximetilisina (CML) é um dos produtos avançados comumente encontrado em eventos de glicoxidação e lipoxidação. O envelhecimento e a insuficiência renal, na ausência de outros fatores de risco, incluindo o diabetes mellitus, também estão associados ao aumento na formação, menor eliminação renal e acúmulo de AGEs (INOGUCHI et al., 2000; MATSUDA; SHIMOMURA, 2013).

1.2.7 Receptores de AGEs

Existem duas categorias de receptores de AGEs: aqueles que participam da degradação de moléculas modificadas por AGEs e aqueles que participam de processos de transdução de sinal celular quando ligados aos AGEs. Ambos são expressos em vários tipos de células. Os receptores que medeiam a endocitose e a degradação de moléculas modificadas por AGEs incluem o CD36 (*cluster of differentiation 36*), os receptores *scavenger* de macrófagos I e II e os receptores específicos para AGEs dos tipos 1, 2 e 3 (AGER 1, AGER 2 e AGER 3). Já o receptor de AGEs (RAGE) é um membro da superfamília de imunoglobulinas, e também atua como um receptor sinalizador para peptídeo beta-amilóide (β), fibrilas de folha β , fosfatidilserina, ácido lisofosfatídico (LPA), membros da família S100/calgranulina e grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1), e encontra-se envolvido na promoção de inflamação e estresse oxidativo (PASUPULATI et al. 2016).

A alimentação com alto teor de lipídeos desencadeia a produção e acumulação de ligantes (como CML, S100/calgranulina e HMGB1) de RAGE que ativam a sinalização inflamatória levando à obesidade e à resistência à insulina e, portanto, um fator de risco para o desenvolvimento de DM2 e complicações da obesidade, como a esteatose hepática não alcoólica, doença coronariana, câncer hepatocelular e doença renal crônica (SONG et al., 2014; LÓPEZ- DÍEZ et al., 2016).

Além do potencial lesivo direto dos AGEs, estes também promovem prejuízos dependentes da ativação dos receptores RAGE. A interação AGE/RAGE ativa a NADPH oxidase, a qual leva ao aumento na geração de ERO. O aumento na geração de ERO ativa NF- κ B, que induz a transcrição de genes inflamatórios da parede vascular (BASTA et al., 2004). A proteína quinase C (PKC) também pode ativar a NADPH oxidase, favorecendo assim a exacerbação do estresse oxidativo (RAINS; JAIN, 2011). A ativação de RAGE também induz a apoptose celular por aumento na expressão de p53-Bax e promovendo a ativação da cascata de caspases dependente de cálcio. O estresse oxidativo induzido pela obesidade e a hiperglicemia tem participação no estabelecimento de diversas complicações, especialmente aterosclerose e danos microvasculares em retina, rim e nervos (TANGVARASITTICHA, 2015).

Os RAGE podem contribuir para a patogênese da obesidade e resistência à insulina induzida por uma dieta rica em gordura. Amplamente distribuído em muitos tecidos e tipos de células, os RAGE são expressos em baixos níveis na maioria das células saudáveis. O RAGE é um receptor multiligante de superfície celular pertencente à

família das imunoglobulinas, e reconhece, além dos AGEs, alguns sinais inflamatórios e de estresse oxidativo, grupo de alta mobilidade grupo 1 (HMGB1), S100/calgranulinas, peptídeos β -amilóides, entre outros (KOYAMA; YAMAMOTO, 2012). A interação entre ligante e RAGE induz vários tipos de cascatas de sinalização, dependendo do tipo de célula e da condição fisiopatológica; dentre os componentes que participam da cascata de transdução de sinal dos RAGE podem ser citados os membros das seguintes famílias: proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), janus quinase/transdutor de sinal e ativador de transcrição (JAK/STAT), NF- κ B, quinase regulada por sinal extracelular (ERK), proteína quinase C (PKC) e proteína de resposta de crescimento inicial 1 (Egr-1). Estas vias de sinalização associadas ao receptor RAGE culminam em estímulos para a transcrição de genes pró-inflamatórios e causam alterações fenotípicas celulares, incluindo estímulo à migração, invasão, proliferação e apoptose (OTT et al., 2014). A ativação de RAGE também estimula a cascata PI3K/PKB/IKK e a translocação de NF- κ B para o núcleo. O NF- κ B também pode se associar à região promotora de RAGE, aumentando sua expressão (XIE et al., 2013).

Várias isoformas de RAGE já foram descritas, incluindo a sua forma solúvel (sRAGE). A isoforma sRAGE se origina do processamento alternativo do mRNA RAGE e/ou de sua clivagem proteolítica. Existem dois tipos de sRAGE: esRAGE, também conhecidos como sRAGE_v1 e cRAGE. Uma variante de *splicing* codifica a forma esRAGE secretada, e a clivagem de RAGE na membrana através de metaloproteases produz cRAGE. As principais formas solúveis de RAGE (cRAGE e esRAGE) têm função de ligação de AGEs e outros ligantes, impedindo a interação com o receptor RAGE de membranas. O aumento nas concentrações de sRAGE facilita a degradação de AGEs e previne a ativação de cascatas de sinalização pró-inflamatórias mediadas por RAGE. Como as concentrações séricas de sRAGE se correlacionam inversamente com patologias induzidas por AGEs, a neutralização de AGEs por receptores sRAGE poderia ser uma abordagem para prevenir a toxicidade por AGEs (BONGARZONE et al., 2017).

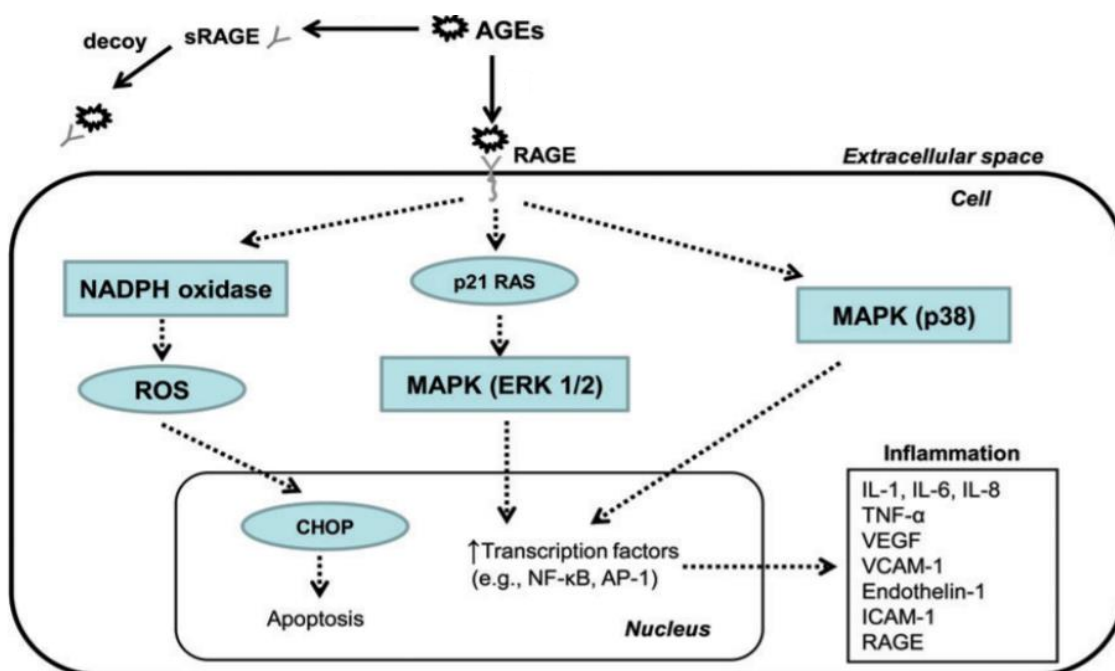


Figura 5. Vias de sinalização ativadas pela interação de AGEs com receptor RAGE. A ativação de RAGE aumenta o estresse oxidativo e aumenta a transcrição de genes relacionados a processos inflamatórios e apoptose. O receptor circulante de AGEs (sRAGE) liga-se aos AGEs circulantes, apresentando assim um potencial papel protetor. Fonte: MERHI (2013), modificado.

Além dos sRAGE, o organismo também possui sistemas endógenos para a detoxificação dos AGEs e assim minimização de seus efeitos deletérios.

Existem vários receptores de AGEs, como a família de receptores de produtos finais de glicação avançada (AGER) e a família de receptores de eliminação (SC), que medeiam a endocitose, levando à captação e degradação intracelular de AGEs por sua fusão com lisossomos (CHEN et al., 2018). O receptor AGE-R1 consiste de uma proteína com único domínio transmembrana, um grande domínio glicosiltransferase N-terminal e uma cauda C-terminal curta. O domínio N-terminal do AGE-R1 está localizado no lúmen do retículo endoplasmático, uma vez que a enzima faz parte do complexo oligossacariltransferase, e também existe na membrana plasmática com o seu domínio N-terminal voltado para o espaço extracelular. O receptor AGE-R1 (também conhecido como DDOST ou OST-48) se opõe ou intercepta os efeitos pró-inflamatórios dos receptores RAGE. O AGE-R1 inibe a atividade da NADPH oxidase e enfraquece geração de estresse oxidativo, bem como a sinalização mediada por ERO. Tem sido

sugerido que AGE-R1 facilita a captação de AGEs e impede a ativação da sinalização pró-inflamatória do eixo AGE-RAGE. Os receptores AGE-R1, AGE-R2 e AGE-R3 são expressos em muitos tipos diferentes de células, incluindo células renais, células musculares lisas, células neuronais, linfócitos T, macrófagos e células endoteliais (ABATE et al., 2015).

O mecanismo proposto para AGE-R1 na inibição da sinalização da inflamação e estresse oxidativo, se deve ao exercer suas funções através de SIRT 1, na qual inibe NF- κ B por desacetilação, resultando em menor inflamação e estresse oxidativo. A transcrição de genes relacionados ao estresse oxidativo e à inflamação é inibida por AGE-R1 e SIRT 1. O suprimento prolongado de AGEs externos, regulam negativamente a expressão de AGE-R1 e SIRT 1 reduzindo os efeitos inibitórios na sinalização de RAGE (Figura 5; POULSEN et al, 2013). Os AGEs agindo via ERO, são potentes supressores de NAD⁺, parcialmente reduzindo os níveis de SIRT 1. A diminuição dos níveis de SIRT 1 promove acetilação de NF- κ B p65 aumentando a transcrição de genes inflamatórios. O AGE-R1, bloqueando AGEs, controla muitos desses efeitos. Os efeitos protetores do AGE-R1 podem se originar de sua longa cauda extracelular com alta aderência a AGE, que interfere competitivamente com as interações AGE-RAGE. Esta propriedade pode constituir a essência do sinergismo positivo entre AGE-R1 e SIRT 1 (Figura 6; VLASSARA; STRIKER, 2011).

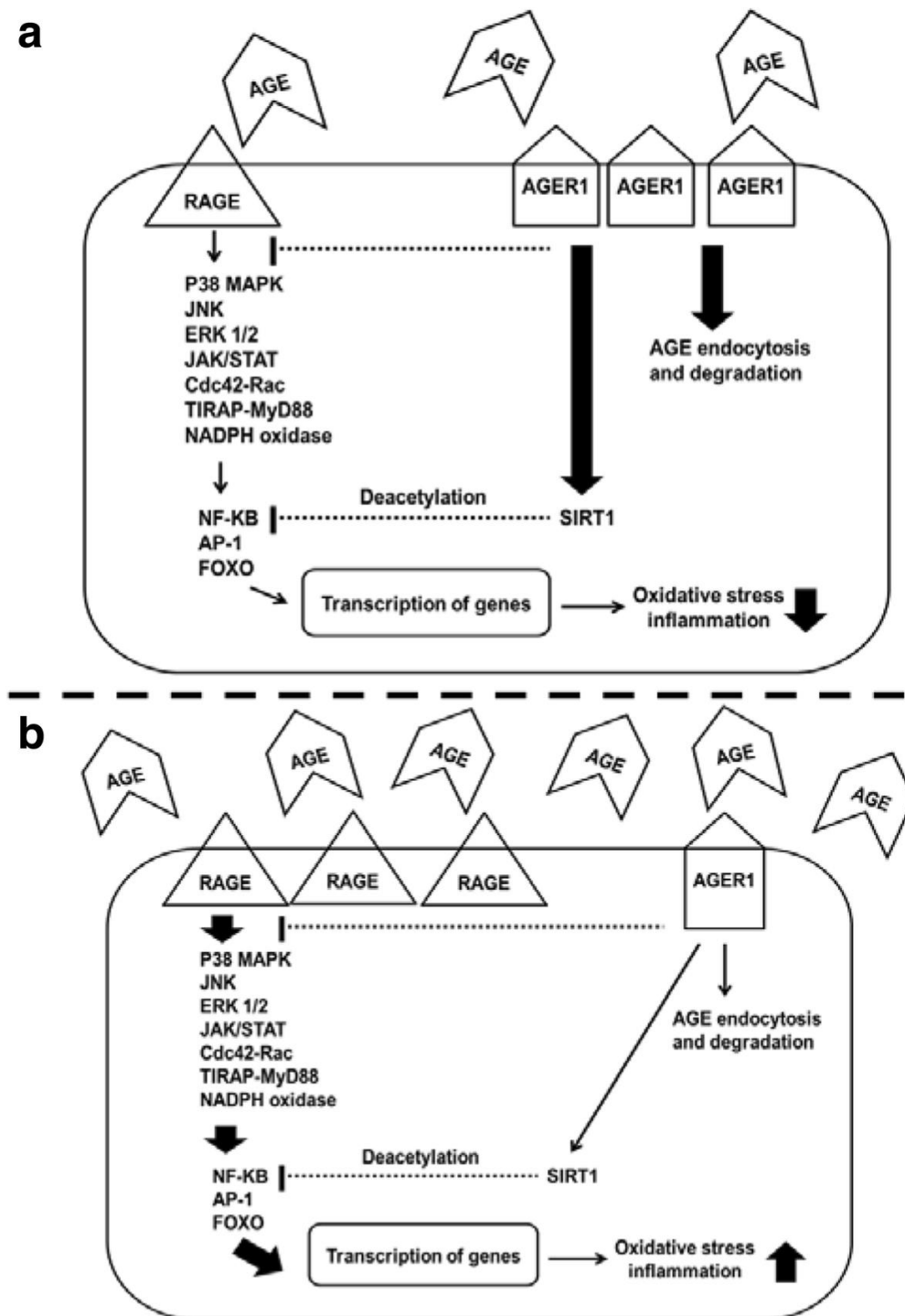


Figura 6. Interações de AGEs com RAGE e AGE-R1 sob condições de diferentes níveis de AGEs. (a) baixos níveis de AGEs e (b) sobrecarga de AGEs. Fonte: CHEN et al. (2018).

A captação de AGEs por seus receptores e receptores *scavenger* promovem a endocitose e dentro dos endossomas recém-formados, os AGEs são dissociados do receptor, devido ao maior pH no interior dos endossomas. Após a separação, o receptor pode ser reciclado e transferido de volta para a superfície das células. Os endossomas

com AGEs fundem-se com os lisossomas, seguindo para o processamento de AGEs por proteases lisossomais. Pequenos peptídeos modificados por AGEs são liberados das células, por mecanismos desconhecidos, e em seguida transportados para filtração pelos rins; prejuízos na função renal resultam em acúmulos de AGEs (OTT et al., 2014).

Estes mecanismos de detoxificação dependentes de receptores de AGEs encontram-se prejudicados no DM, em especial com redução na atividade de AGE-R1, o que contribui para o acúmulo de AGEs e portanto, lesão tecidual (PINKAS; ASCHNER, 2016).

O sistema da glioxalase consiste de duas enzimas, GLO 1 e GLO 2, que catalisam reações sucessivas e dependentes de glutathiona reduzida (GSH). Estas enzimas catalisam a conversão de compostos carbonílicos, como o metilglioxal, em ácido láctico. A GLO 1 catalisa a isomerização do hemitioacetal (formado não enzimaticamente a partir do metilglioxal e GSH) para S-D-lactoilglutathione, e a GLO 2 catalisa a hidrólise de S-D-lactoilglutathione em D lactato, regenerando GSH utilizada na reação catalisada por GLO 1 (Figura 7; RABBANI et al., 2017).

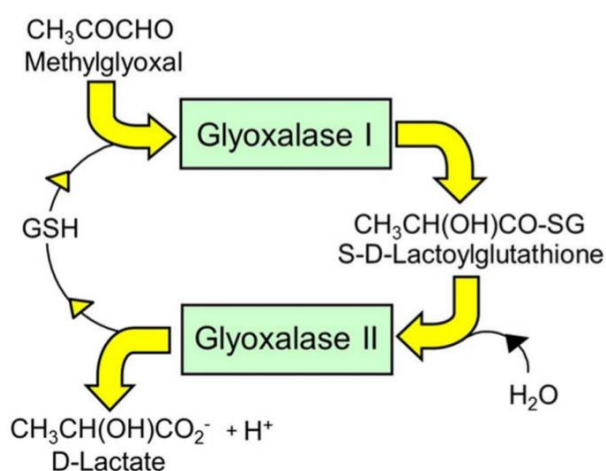


Figura 7. Detoxificação do metilglioxal pelo sistema da glioxalase. Fonte: RABBANI et al. (2017).

Baixos níveis de GLO 1 na obesidade culminam em níveis aumentados de metilglioxal e em estresse dicarbonílico, o qual contribui para a resistência à insulina e inflamação (RABBANI et al., 2018). Em resposta aos níveis elevados de dicarbonilas a regulação positiva da GLO 1 ocorre por meio do fator de transcrição NRF 2 (XUE et al., 2014). A expressão elevada de glioxalase reduz a formação intracelular de AGEs, que por sua vez reduz o estresse oxidativo e apoptose celular. A indução de mecanismos de

detoxificação de AGEs, incluindo o sistema da glioxalase e o receptor AGE-R1, conferem proteção contra a glicação, impedindo o acúmulo de intermediários altamente reativos (HOLLENBACH, 2017)

1.2.8 Efeitos de sensores metabólicos celular na obesidade

A proteína SIRT 1 é conhecida como uma histona desacetilase dependente de nicotinamida-adenina-dinucleído (NAD^+) e atua como um fator de transcrição e um cofator, além de ser um alvo para as proteínas histonas e não histonas. Estados de baixa energia aumentam os níveis de NAD^+ , incluindo o jejum, a restrição calórica e o exercício físico, e portanto estimulam a atividade de SIRT 1. Por outro lado, estados de alta energia que diminuem os níveis de NAD^+ , incluindo a ingestão de dietas com alto teor de lipídeos e respostas inflamatórias agudas, reduzem a atividade de SIRT 1 (YOSHINO et al., 2011). A SIRT 1 protege as células contra o estresse oxidativo, regula o metabolismo da glicose e lipídeos e promove a estabilidade do DNA por meio da ligação e desacetilação de vários substratos (LI, 2013). A SIRT 1 também exerce efeitos anti-inflamatórios via inibição de NF- κ B. Foi demonstrado que a duração da ação nuclear do NF- κ B é altamente regulada por acetilação, e SIRT 1 inibe a via de sinalização do NF- κ B através da desacetilação de p65 (YANG et al., 2010).

A SIRT 1 regula vários processos, incluindo autofagia, homeostase energética, biogênese mitocondrial e apoptose (ZHONG et al., 2018). Evidências sugerem que SIRT 1 desempenha um papel importante em várias doenças renais, fornecendo proteção contra condição de estresse celular associado à lesão renal (HASEGAWA et al., 2010; HUANG et al., 2015). Já no fígado, a SIRT 1 regula positivamente PPAR α . A deleção específica de SIRT 1 em hepatócitos prejudica a sinalização de PPAR α e diminui a β -oxidação de ácidos graxos. A SIRT 1 regula a expressão da proteína desacopladora 2 (UCP 2) em células beta pancreáticas; tal regulação encontra-se prejudicada pelo excesso de ácidos graxos, contribuindo para as complicações da obesidade e do DM no fígado. A SIRT 1 também regula positivamente as proteínas do receptor de fígado X (LXR) e do receptor farnesóide X (FXR), receptores nucleares que funcionam como sensores de colesterol e ácidos biliares, regulando metabolismo do colesterol (RAHMAN; ISLAM, 2011). Durante o jejum de curto prazo, a SIRT 1 inibe TORC 2 (também conhecido como CRTC2), um coativador de transcrição regulado por CREB, um fator de transcrição dependente da sinalização do AMPc envolvido na ativação de genes da gliconeogênese, culminando em redução da gliconeogênese. No

entanto, o jejum prolongado, há aumento na desacetilação mediada por SIRT 1 e ativação de PGC-1 α , um co-ativador essencial para vários fatores de transcrição, resultando no aumento da oxidação de ácidos graxos (LI, 2013).

No músculo esquelético, SIRT 1 estimula a expressão de genes de componentes que participam da oxidação dos ácidos graxos através do PGC-1 α , promovendo assim sensibilização à insulina (WILLIAMS; GURD, 2012). Além disso, a SIRT 1 pode melhorar a sensibilidade à insulina através da interação com AMPK, por aumento da fosforilação e atividade desta quinase. O resultado combinado é o aumento da biogênese mitocondrial e da oxidação de ácidos graxos (BANERJEE et al., 2016). Por outro lado, evidências sugerem que a ativação da AMPK leva ao aumento dos níveis de NAD⁺ celular por aumento da nicotinamida fosforibosiltransferase (NAMPT), que subsequentemente modula a sinalização de SIRT 1 e a desacetilação dos seus alvos, tais como PGC-1 α (CHAU et al., 2010; KIM et al., 2013), FOXO1 (CANTO et al., 2009), FXR (GARCIA-RODRIGUEZ et al., 2014) e PPAR α (KANG et al., 2016).

A SIRT 1 promove a biogênese mitocondrial através da desacetilação e ativação de PGC-1 α . O PGC-1 α coativa a transcrição do NRF 2, que, por sua vez, regula o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM). O TFAM pertence ao grupo de proteínas de alta mobilidade e transloca para a matriz mitocondrial, onde estimula a replicação do DNA e a expressão gênica mitocondrial. Um grande número de substratos de desacetilação de SIRT 1 tem sido identificado, e vários deles estão relacionados à manutenção da homeostase redox mitocondrial, incluindo p53, MnSOD e glutathione peroxidase 1 (TANG, 2016).

O PGC-1 α sofre várias modificações pós-transducionais, incluindo acetilação e fosforilação. A acetilação de PGC-1 α ocorre em resíduos de lisina e é catalisada pela histona acetil transferase GCN5 (DOMINY et al., 2010). A acetilação altera a localização celular de PGC-1 α e inibe sua atividade transcricional. Por outro lado, a desacetilação de PGC-1 α dependente de SIRT 1 aumenta sua atividade transcricional. A PGC-1 α é fosforilada tanto pela proteína quinase p38 ativada por mitógeno quanto pela AMPK, aumentando sua atividade. Por outro lado, a fosforilação da PGC-1 α pela AKT diminui a sua atividade transcricional (PRICE et al., 2012; TANG, 2016).

A obesidade está associada à redução da ativação da AMPK, concomitante com alterações na glicólise, sensibilidade à insulina, metabolismo lipídico hepático e inflamação. Como um sensor de energia celular, a AMPK é ativada em resposta a uma variedade de condições de baixos níveis de energia celular, e que levar ao

aumento na razão AMP/ADP, tal como a privação de nutrientes (especialmente glicose), hipóxia e exposição a toxinas que inibem a cadeia respiratória mitocondrial. Além disso, a AMPK pode ser ativada em resposta a vários agentes farmacológicos. A AMPK é um complexo de proteína serina/treonina-quinase, uma enzima trimérica composta por subunidades α catalítica e não catalíticas β e γ . O AMP encontra-se ligado às subunidades γ ; três resíduos de arginina são o local de ligação para o AMP. Isoformas de AMPK variam entre os tecidos, sendo uma consequência de diversas combinações de subunidades em diferentes tipos de células (MIHAYLOVA; SHAW, 2011).

A AMPK tem um papel fundamental na manutenção do equilíbrio entre os programas anabólicos e catabólicos para a homeostase celular. A ativação fisiológica da AMPK envolve a fosforilação do resíduo de Thr-172 na região N-terminal na subunidade catalítica α . A AMPK torna-se totalmente ativada através do seguinte mecanismo: a ligação de AMP ou ADP a subunidade γ induz uma alteração conformacional que favorece a fosforilação de Thr-172, e ao mesmo tempo protege contra a defosforilação por fosfatases (KIM et al., 2016). Duas quinases são responsáveis pela fosforilação de Thr-172 em AMPK, a LKB1 (liver-kinase-B1) e a CaMKK β (proteína quinase dependente de Ca²⁺/calmodulina β). A ligação do AMP, mas não do ADP, resulta em ativação alostérica da AMPK de até 10 vezes (GOWANS et al., 2013). A AMPK pode ser inativada por PKA, em especial durante situações de ativação de gliconeogênese, e também pode ser inibida pela insulina via AKT, que fosforila a AMPK em Ser-491 na subunidade $\alpha 2$ (KIM et al., 2016).

A AMPK foi originalmente descoberta como uma quinase que tem como substrato as enzimas acetil-CoA carboxilase (ACC1 e ACC2) e HMG-CoA redutase, enzimas-chave nas vias de síntese de ácidos graxos e de esteróis, respectivamente. Em tecidos como músculo esquelético e tecido adiposo, a AMPK regula a captação de glicose, por meio de estímulo à translocação de GLUT 4. A AMPK também estimula HSL (lipase hormônio sensível) e ATGL (*adipose triglyceride lipase*). Além disso, a AMPK fosforila e inibe fatores de transcrição que ativam programas transcricionais glicolíticos e lipogênicos, mais notadamente SREBP1 (proteína reguladora do elemento esterol 1, regulador da transcrição de genes que codificam para proteínas lipogênicas), HNF-4 α (fator nuclear hepatócito-4 α) e ChREBP (proteína de ligação a elemento responsivo a carboidratos). Assim, a ativação aguda de AMPK favorece a captação de glicose para promover a restauração dos níveis de ATP, enquanto que a ativação sustentada de

AMPK reprograma as células para redução na velocidade de síntese de glicose e lipídeos e favorecer a oxidação de ácidos graxos como fonte de energia. A AMPK é considerada um dos principais alvos terapêuticos para o tratamento de doenças metabólicas, incluindo DM tipo 2 e obesidade (GARCIA; SHAW, 2017). Portanto, a ativação farmacológica dos sensores metabólicos SIRT 1/AMPK podem ser importantes para a prevenção de doenças metabólicas associadas à obesidade.

1.2.9 Trigonelina e Curcumina

Diversos ativos naturais têm chamado à atenção por seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios na prevenção/atenuação de complicações relacionadas à obesidade e DM. A trigonelina é um alcaloide (ácido N-metilnicotínico, $C_7H_7NO_2$, Figura 8), isolado inicialmente das sementes da planta *Trigonella-foenum-graecum* L. (feno-grego) (ZHOU et al., 2012; ILAVENIL et al., 2014). Outros alimentos também contêm trigonelina, incluindo o melão, milho, cebola, ervilha, soja e café (ZHOU et al., 2012; ILAVENIL et al., 2014).

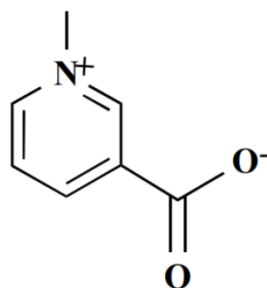


Figura 8. Estrutura química da trigonelina. Fonte: ZHOU et al. (2012).

A trigonelina possui também atividades anticarcinogênica (LIAO et al., 2015), antioxidante e antimicrobiana (KADAIKUNNAN et al., 2015); promove proteção hepática e renal (HAMDEN et al., 2014); causa inibição da adipogênese (ILAVENIL et al., 2014); possui propriedades antitrombóticas (KALASKA et al., 2014). A trigonelina também apresenta propriedades benéficas ao sistema nervoso central, melhorando alterações associadas à doença de Alzheimer, demência (ZAMEER et al., 2017) entre outros. Recentemente, um estudo realizado Chowdhury et al. (2018) atribuiu o papel neuroprotetor da trigonelina às propriedades antioxidantes, antiglicativas e anticolinesterásicas; o tratamento impediu a formação precoce e tardia de AGEs

promovendo a reversão de danos oxidativos e melhorando o desempenho cognitivo de camundongos com amnésia.

Estudos em modelo experimental de DM demonstraram que o tratamento com trigonelina reduz a hiperglicemia e os níveis circulantes de triacilglicerol e colesterol, protege as células β pancreáticas contra o estresse oxidativo e aumenta a sensibilidade periférica à insulina (ZHOU et al., 2013; ADALKINAH et al., 2017). Os efeitos benéficos da trigonelina é muito estudado nas alterações metabólicas do DM, porém ainda faltam estudos sobre seu mecanismo de ação e seus efeitos na obesidade.

A curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$, Figura 9) é um pigmento extraído dos rizomas da planta *Curcuma longa*, pertencente à família Zingiberaceae, sendo encontrado em temperos como o açafrão (AGGARWAL et al., 2003); tem sido usada há anos como pigmento dietético em condimentos e medicina tradicional. Um grande número de estudos demonstra que a curcumina tem ações pleiotrópicas, ou seja, tem uma vasta gama de atividades biológicas (GUPTA et al., 2013; GHOSH et al., 2015). A curcumina é um polifenol (diferuloilmetano) muito estudado pelas suas propriedades anti-inflamatórias, antiobesogênicas, anti-hiperglicemiante, antioxidante, entre outras (GUPTA et al., 2011).

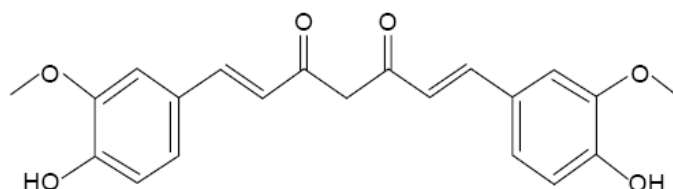


Figura 9. Estrutura química da curcumina. Fonte: CHIN (2016).

Os efeitos da curcumina no peso corporal, metabolismo lipídico e função de células β do pâncreas têm despertado o interesse como um potencial tratamento para a obesidade e o DM. Tem sido demonstrado que a curcumina previne a obesidade via inibição da diferenciação de pré-adipócitos, supressão da lipogênese, regulação da termogênese, promoção da oxidação de ácidos graxos e redução da resposta inflamatória no tecido adiposo (ZHAO et al., 2011; XIE et al., 2012; SONG et al., 2018). A atividade antidiabética da curcumina tem sido atribuída às suas diversas ações em distúrbios observados no metabolismo de carboidratos, lipídeos e combate ao estresse oxidativo (ARCARO et al., 2014; CHUENG SAMARN et al., 2014; ASSIS et

al., 2017; GUTIERRES et al., 2019). Estudos também demonstram os efeitos benéficos da curcumina no combate às diversas complicações relacionadas ao DM, tais como disfunção hepática (ARCARO et al., 2014; JIMÉNEZ-FLORES et al., 2014), neuropatia (ATTIA et al., 2012), nefropatia (PAN et al., 2014), disfunção das células β pancreáticas (ZHANG et al., 2013), entre outras.

Alguns estudos têm sugerido a associação de curcumina com outros bioativos para o tratamento da obesidade e DM, no entanto a principal motivação destes estudos está centrada no potencial antioxidante, e portanto, na eficácia da prevenção das complicações da doença relacionada ao estresse oxidativo (CHOUGALA et al., 2012; MEHTA et al., 2012).

Recentemente, estudos realizados em nosso laboratório mostraram que os efeitos combinados da curcumina com carotenoides ou agentes antidiabéticos (metformina ou insulina) potencializam os efeitos antioxidantes e contribuem significativamente para a redução das agressões oxidativas em ratos diabéticos (ASSIS et al, 2017; GUTIERRES et al., 2019; ROXO et al., 2019). Assis et al. (2017) mostraram que a combinação de carotenoides (bixina ou licopeno) com curcumina em iogurte, além de prevenir a oxidação da LDL em ratos diabéticos, também apresentou efeitos benéficos no aumento dos níveis de HDL e atividade de PON 1, destacando o potencial antiaterogênico dessa combinação, podendo prevenir complicações cardiovasculares no DM. Gutierres et al. (2019) também mostraram efeitos benéficos da administração da curcumina em iogurte (administração via oral) e baixa dose de insulina (administrada via subcutânea) na tentativa de melhorar o status antioxidante de animais diabéticos, bem como controlar os níveis glicêmicos durante 35 dias de tratamento. Vários benefícios foram obtidos com o uso dessa terapia combinada, incluindo aumento do peso corporal e massa muscular esquelética; controle dos níveis glicêmicos, redução da dislipidemia, marcadores de dano tecidual hepático (ALT, AST e ALP), níveis de TBARS plasmático; e aumento nas atividades de enzimas antioxidantes hepática (SOD, CAT e GSH-Px). Portanto, este estudo fornece uma opção terapêutica interessante no tratamento de DM e redução de efeitos indesejáveis da insulinização crônica através da combinação de curcumina e dose reduzida de insulina. Roxo et al. (2019), estudaram o efeito combinado da curcumina com metformina no tratamento de ratos diabéticos. Os principais benefícios alcançados por essa combinação foram a diminuição da dislipidemia e do estresse glicoxidativo; observando redução dos níveis de glicosúria e

AGEs plasmáticos, aumento na atividade de PON 1; e efeitos aditivos na redução dos níveis de triacilgliceróis, colesterol e TBARS plasmático.

Muitos avanços ocorreram na identificação de alvos moleculares da curcumina no DM e obesidade, enquanto que para a trigonelina existem poucos estudos. Por esta razão, além de avançar nos mecanismos de ação da curcumina e trigonelina isoladas enfatizando os efeitos desses fitoquímicos nas atividades antioxidantes e antiglicantes, este estudo também explorou os efeitos da terapia combinada de curcumina com trigonelina, ainda não estudada, na tentativa de abordar uma nova estratégia terapêutica na atenuação de vários distúrbios observados na obesidade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos dos tratamentos de camundongos submetidos ao modelo experimental de obesidade e resistência à insulina com trigonelina e curcumina em iogurte, isoladas e combinadas, sobre alterações em parâmetros fisio-metabólicos e biomarcadores da inflamação e do estresse glicoxidativo.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos da trigonelina e curcumina incorporadas ao iogurte, isoladas ou combinadas, em camundongos C57B1/6J submetidos ao modelo experimental de obesidade e resistência insulínica (indução via oferta de dieta hiperlipídica), monitorando:

- Parâmetros fisiológicos: massa corporal, ingestão alimentar, ingestão calórica, massas de tecidos adiposos brancos (epididimal e retroperitoneal) e marrom (interescapular), músculos esqueléticos *gastrocnemius*, fígado e rim;
- Análise histológica do tecido adiposo branco epididimal para avaliação da hipertrofia adipocítica via determinação dos parâmetros área e diâmetro de adipócitos;
- Parâmetros bioquímicos plasmáticos: glicose (glicemia de jejum e curvas glicêmicas via TTGO e ITT), triacilgliceróis, colesterol total, colesterol-HDL, creatinina, ureia, ALT (alanina aminotransferase), TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), AGEs (*advanced glycation end products*) e atividade de PON 1 (paraoxonase 1);
- Biomarcadores de inflamação nos seguintes tecidos: tecido adiposo branco epididimal, fígado e rim, sendo monitorados NF- κ B (fator nuclear kappa B), IL-6 e IL-10 (interleucinas 6 e 10), TNF- α (fator de necrose tumoral α);
- Biomarcadores da sinalização insulínica no tecido adiposo branco epididimal e músculos *gastrocnemius*: níveis proteicos totais e de fosforilação da proteína quinase AKT (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*).
- Biomarcadores do programa termogênico no tecido adiposo marrom e ao *status* energético nos tecidos fígado e rim: SIRT 1 (sirtuína 1), AMPK (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato), PGC-1 α (coativador do receptor γ

ativado por proliferador de peroxissoma 1 α), NRF 2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) e UCP 1 (proteína desacopladora mitocondrial 1);

- Biomarcadores de estresse glicoxidativo em fígado e rim: TBARS, AGEs, RAGE (*receptor for advanced glycation end products*), Bax (*Bcl-2-associated X protein*);
- Biomarcadores relacionados ao potencial antioxidante e componentes da detoxificação de AGEs no fígado e rim: atividades das enzimas antioxidantes SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase), GSH-Px (glutathione peroxidase), e níveis proteicos de GLO 1 (glioxalase 1) e AGE-R1 (*advanced glycation end products receptor 1*).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Curcumina obtida a partir dos rizomas de *Curcuma longa* (cúrcuma), pó com grau de pureza de 76% (código do produto C1386; número do lote, SLBH2403V) foi adquirida da Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Trigonelina (padrão analítico) com pureza de 100,4% (código do produto, T5509; número do lote, BCBP6003V) foi adquirida da Sigma Aldrich-Fluka (St. Louis, Missouri, EUA). As dietas padrão e hiperlipídica foram obtidas da PragSoluções Comércio e Serviços Ltda (Jaú/SP, Brasil). Os demais reagentes foram de grau analítico.

3.2. Animais, dietas e desenho experimental

Camundongos C57BL/6 machos, adultos, com 4 semanas de idade, peso corporal de 21 g $\pm$ 0,10 g e padrão sanitário do tipo “SPF” (*Specific Pathogen Free*) fornecidos pelo Serviço de Biotério da USP-RP (Universidade de São Paulo, Câmpus de Ribeirão Preto), foram mantidos sob condições de ciclo luz-escuro de 12 horas, temperatura de 23°C, recebendo dieta e água *ad libitum*. Após período de adaptação (2 semanas), os animais foram alimentados durante 9 semanas com dietas preparadas: dieta padrão (P; 3,85 kcal/g; 4% de lipídeos) (REEVES et al., 1993) ou dieta hiperlipídica (H; 5,40 kcal/g; 35% de lipídeos) (Tabela 1).

Todos os procedimentos experimentais adotados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Câmpus de Araraquara, Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 03/2016 (ANEXO 1).

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

Ingredientes	Dieta Padrão (P) (g / 100 g)	Dieta Hiperlipídica (H) (g / 100 g)
Amido	42,75	14,95
Caseína	20	20
Dextrina	13,2	10
Sacarose	10	10
Óleo de soja	4	4
Banha*	--	31
Celulose	5	5
Mix de minerais**	3,5	3,5
Mix de vitaminas***	1	1
L-cistina	0,30	0,30
Bitartarato de colina	0,25	0,25
Total	100	100
Valor energético (kcal/100 g)	385	540

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

Os animais receberam foram distribuídos nos seguintes grupos (n = 12 animais/grupo):

- Grupo P: animais alimentados com dieta padrão e que receberam água por gavagem;
- Grupo H: animais alimentados com dieta hiperlipídica e que receberam água por gavagem;
- Grupo HI: animais alimentados com dieta H e tratados com iogurte por gavagem;
- Grupo HT: animais alimentados com dieta H e tratados por gavagem com 50 mg/kg de trigonelina em iogurte;
- Grupo HC: animais alimentados com dieta H e tratados por gavagem com 90 mg/kg de curcumina em iogurte;
- Grupo HTC: animais alimentados com dieta H e tratados por gavagem com 50 mg/kg de trigonelina e 90 mg/kg de curcumina em iogurte.

Foi realizado um experimento piloto para definição das doses de curcumina (45 e 90 mg/kg de peso corporal) (GUTIERRES et al., 2012; ARCARO et al., 2014; GUTIERRES et al., 2015; ASSIS et al. 2017) ou trigonelina (50 e 100 mg/kg de peso corporal) (ZHOU et al., 2012; HAMDEN et al., 2014; THARAHESWARI et al., 2014; ZHANG et al., 2015) e que fossem efetivas na prevenção/atenuação dos distúrbios metabólicos relacionados à ingestão da dieta H pelos camundongos. Após a realização deste experimento piloto, foram selecionadas as doses 50 mg/kg de peso corporal de trigonelina em iogurte e 90 mg/kg de peso corporal de curcumina em iogurte, uma vez que elas foram efetivas na atenuação dos distúrbios metabólicos promovidos pela ingestão de dieta H, com destaque para a redução dos níveis de TBARS e AGEs.

No experimento definitivo, os animais alimentados com dieta hiperlipídica foram tratados com 50 mg/kg de peso corporal de trigonelina ou 90 mg/kg de peso corporal de curcumina, isoladas ou co-administradas, e incorporadas ao iogurte natural integral (Nestle®, 0,741 kcal/g contendo: *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* e *Streptococcus* sp) em ambiente termostatzado (25°C), durante 90 segundos a 27000 rpm em homogeneizador (modelo Metabo). Os tratamentos foram realizados diariamente, entre 8:00 - 9:00 horas, durante 9 semanas, sendo este o mesmo período de oferta das dietas P ou H aos animais.

Peso corporal e ingestão alimentar foram monitorados duas vezes por semana.

Após 7 semanas de tratamento, os animais foram jejuados por 12 horas (com início às 23:00 horas) e submetidos ao teste tolerância à glicose oral (TTGO; 1 g/kg glicose, via oral) tal como descrito por Xu et al. (2009), com modificações. Uma gota de sangue caudal foi utilizada para a determinação da glicemia com auxílio de glicosímetro (Abbott Diabetes Care Ltd, Brasil) antes (0 min) e depois (15, 30, 60, 90, 120 min) da sobrecarga de glicose.

Após 8 semanas de tratamento, os animais foram jejuados por 6 horas (com início às 7:00 horas) e submetidos ao teste de tolerância à insulina (ITT) de acordo com Protzek et al. (2010), com adaptações. Uma gota de sangue caudal foi utilizada para a determinação da glicemia com auxílio de glicosímetro. A glicemia foi determinada antes (0 min) e após (5, 10, 15, 20, 30 e 60 min) a administração de insulina (insulina regular; 0,65 UI/kg de peso corporal), por via intraperitoneal.

Após 9 semanas de tratamento, os animais foram mantidos em jejum por 6 horas (com início às 6:00 horas), anestesiados (16 mg/kg de xilazina; 90 mg/kg de quetamina). Em seguida administrou-se 3,8 UI/kg de insulina (8 animais/grupo) ou

solução salina (6 animais/grupo), para o estudo das alterações na ativação de componentes da sinalização da insulina (fosforilação de AKT, basal ou estimulada por insulina). Após 10 minutos da administração da insulina ou salina, os animais foram eutanasiados por exsanguinação via punção cardíaca, onde foram obtidas amostras de sangue. O sangue foi coletado em tubos heparinizados e imediatamente centrifugados à 2500 rpm por 10 minutos a 25°C para obtenção do plasma. Também foram removidos os tecidos músculos *gastrocnemius*, tecidos adiposos brancos epididimal e retroperitoneal, tecido adiposo marrom interescapular, fígado e rins. O tecido adiposo branco epididimal foi rapidamente pesado e em seguida amostras deste tecido (lado esquerdo) foram destinadas para as análises histológicas. Os músculos foram removidos, pesados e congelados em nitrogênio até posterior armazenamento à -80°C para as análises das alterações na ativação de componentes da sinalização da insulina. Os demais tecidos também foram retirados, pesados e armazenados (-80°C) para as análises posteriores.

3.3 Análise histológica

As análises histológicas de tecido adiposo branco epididimal foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio, do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia, Câmpus de Araraquara, UNESP.

O tecido adiposo branco epididimal foi fixado por imersão em formaldeído a 10% por 24 horas. No dia seguinte, os tecidos foram lavados com tampão fosfato salina (PBS), desidratados com álcool e xilol e embebidos em parafina. As secções embebidas com 5 µm de espessura foram montadas em lâminas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). As células adiposas foram observadas em microscópio óptico (Olympus BX51 – Olympus Optical, Tokyo Japan) acoplado a câmera CCD-Iris (Tokyo Japan – Olympus). A determinação da área e diâmetro dos adipócitos das imagens obtidas das células adiposas foram analisadas no software Image J. Foram avaliadas 500 células adiposas/grupo (n=5).

3.4 Determinações analíticas

3.4.1 Biomarcadores relacionados ao metabolismo de lipídeos, função renal e integridade hepática

As concentrações plasmáticas dos biomarcadores foram realizadas utilizando kits comerciais da Labtest Diagnóstica S.A.

- Colesterol total: método enzimático de ação sequencial de colesterol esterase e colesterol oxidase (MROZ, 2003);
- Colesterol-HDL: método indireto por inibição seletiva com polioxietileno laurel éter (RIFAI; WARNICK, 2006);
- Triacilgliceróis: método enzimático de ação sequencial de lipase e gliceroquinase (RIFAI; WARNICK, 2006);
- Creatinina: método enzimático de ação das enzimas creatininase, creatinase, sarcosina oxidase e peroxidase (JUNGE et al., 2004);
- Ureia: hidrólise da ureia pela urease produzindo amônia e dióxido de carbono (BERGMEYER; GAWEHN, 1974);
- ALT: método cinético, acoplado a lactato desidrogenase (WRÓBLENSKI; LADUE, 1956).

3.4.2 Biomarcadores de estresse glicoxidativo e atividades antioxidantes

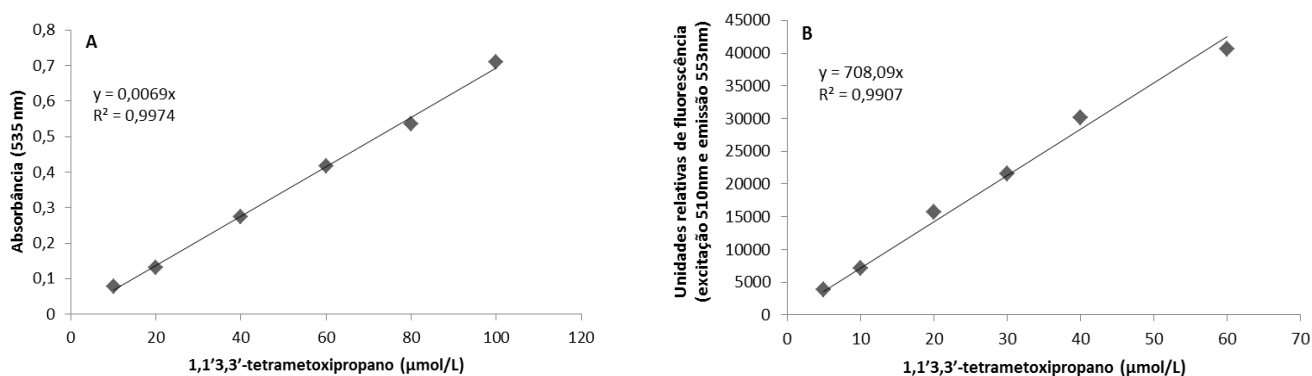
Preparo das amostras: amostras de fígado e rim foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) na proporção de 100 mg de tecido para 1 mL de tampão e centrifugadas à 10000 g durante 20 minutos à 4°C. Sobrenadantes foram utilizados para as determinações dos níveis de TBARS e atividades das enzimas antioxidantes de SOD, CAT e GSH-Px. Sobrenadantes de rim também foram utilizados para a estimativa de AGEs fluorescentes. Amostras de plasma foram utilizadas para determinação da atividade de PON 1 e níveis de AGEs fluorescentes.

Atividade de paraoxonase (PON 1): foi determinada no plasma, de acordo com Costa et al. (1990) e modificações segundo Assis et al. (2017). A atividade da PON 1 foi determinada via hidrólise de paraoxon e liberação de *p*-nitrofenol. A mistura de ensaio consistia de 10 µL de plasma em tampão Tris-HCl 15 mM (pH 8,5) contendo 0,15 mM de CaCl₂, 0,3 M de NaCl e 1,2 mM de paraoxon. O paraoxon foi preparado em acetona e mantido em gelo; antes da utilização, a solução-mãe (120 mM) foi diluída 1:40 em água e sua concentração foi monitorada a 274 nm, usando o coeficiente de extinção molar de paraoxon (8900 M⁻¹·cm⁻¹). O ensaio foi realizado a 37°C e iniciado pela adição de paraoxon. A atividade foi monitorada medindo a absorbância a 405 nm

por 5 min. Os resultados foram calculados assumindo o coeficiente de extinção molar de *p*-nitrofenol ($18.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Smith e Adams, 2011). A atividade da PON 1 foi expressa em unidades/litro (unidade = μmol paraoxon hidrolisado/min).

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS): amostras de plasma e de sobrenadantes de fígado e rim foram submetidas à desproteinização (PILZ et al., 2000) e utilizadas na análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (KOHN; LIVERSEDGE, 1944), com formação de complexo monitorado espectrofotometricamente a 535 nm (fígado, rim) ou fluorimetricamente nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 510 e 553 nm, respectivamente (plasma). Foi realizada uma curva de calibração com 1,1'3,3'-tetrametoxipropano (Figura 10) para a quantificação de TBARS nas amostras. Os resultados foram expressos em μmol de TBARS/L (plasma) ou μmol de TBARS/g de tecido (fígado).

Figura 10. Curvas de calibração, 1,1'3,3'-tetrametoxipropano, espectrofotômetro (A) e fluorímetro (B).



Atividade da superóxido dismutase (SOD): A oxidação da xantina gera o ânion superóxido em reação catalisada pela xantina oxidase, o qual reduz o *nitro blue tetrazolium* (NBT) a uma formazana. Na presença de SOD ocorre inibição na redução do NBT, monitorada em 550 nm (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971). Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução do NBT em 50%.

Atividade da catalase (CAT): foi determinada através do monitoramento do desaparecimento do H_2O_2 a 230 nm (BEERS; SIZER, 1952) e os resultados serão expressos em mmol de H_2O_2 consumido/min/mg proteína.

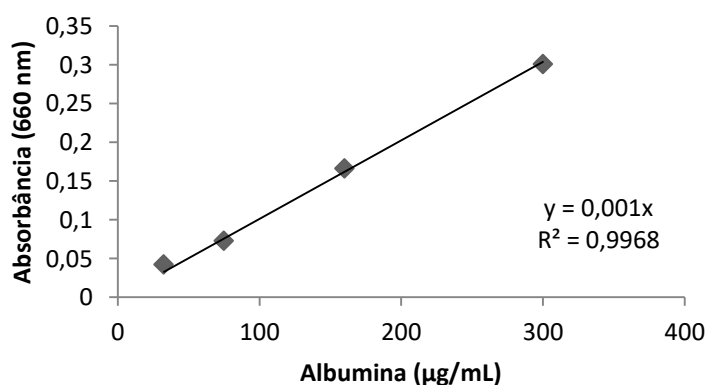
Glutathione peroxidase (GSH-Px): determinou-se a atividade da GSH-Px de acordo com Rush e Scandiford (2003). A GSH-Px catalisa a oxidação de GSH na presença de H_2O_2 . Na presença de glutathione redutase, a glutathione oxidada é reduzida à GSH com oxidação concomitante do NADPH à NADP^+ . A oxidação do NADPH é monitorada pela diminuição da absorbância em 340 nm. Os resultados foram expressos em mmol de NADPH consumido/min/mg de proteína (fígado).

Estimativa dos produtos finais de glicação avançada (AGEs): Amostras de plasma e fígado foram tratadas com clorofórmio, ácido tricloroacético e NaOH, segundo Zilin et al. (2001). As concentrações finais dos reagentes utilizados foram 0,12 M de TCA; 1,2 M de clorofórmio para plasma, sendo que para o fígado a concentração de clorofórmio foi de 2,42 M; e 0,1 M de NaOH. Em sobrenadantes de rim, adicionou-se 0,1 M de NaOH seguido de homogeneização e centrifugação à 10.000 g por 10 minutos à 10°C. Nas amostras de plasma, fígado e rim, os AGEs fluorescentes foram estimados pela medida da fluorescência com comprimentos de onda de excitação de 370 nm e emissão de 440 nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (PENNACCHI et al., 2015).

3.4.3 Proteínas totais

A concentração de proteínas no plasma e sobrenadantes de fígado e rim foram determinadas segundo Lowry et al. (1951). Os resultados foram expressos utilizando uma curva de calibração com albumina bovina sérica (Figura 11).

Figura 11. Curva de calibração de solução de albumina bovina sérica.



3.4.4 Western Blot

Tecidos adiposos branco epididimal e marrom interescapular, músculos esqueléticos *gastrocnemius*, fígado e rim foram homogeneizados (Polytron Omni TH01, Kennesaw, GA) em tampão gelado contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 24,1 mM de deoxicolato de sódio, 0,01% de SDS, 10 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10,3 mM de ortovanadato de sódio, 1,5 µM de aprotinina, 1 mM de fluoreto de fenilmetanossulfonil (PMSF) e 2,1 µM de leupeptina. Os homogenatos foram centrifugados a 11.900 g a 4°C durante 30 min, e os sobrenadantes foram utilizados para a determinação dos níveis de proteína (LOWRY et al., 1951). Tampão de amostra (62,5 mM de Tris-HCl, 10% de glicerol, 2% de SDS, 33,3 mM de DTT e 0,01% de azul de bromofenol; pH 6,8) foi adicionado aos sobrenadantes.

Amostras contendo de 20 - 100 µg de proteína foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida/bisacrilamida de 8% a 12% (tempo de corrida de 30 min. no gel de empilhamento, 60V e 1:30 horas no gel de separação, 120V em temperatura ambiente). Em seguida, as proteínas foram eletrotransferidas do gel para membranas de nitrocelulose (tempo de transferência de 3 horas, 0,35mA a 4°C). As membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos primários específicos descritos na Tabela 2. A ligação dos anticorpos primários foi detectada por anticorpos secundários conjugados com HRP peroxidase (1:1000; Cell Signaling) e visualizada com substrato quimiluminescente (1,1 mM de sal sódico de luminol, 1,98 mM de ácido 4-iodofenilborónico e 5,3 mM de peróxido de hidrogénio, 0,1 M Tris-HCl, pH 8.8). As bandas quimiluminescentes foram capturadas C-Digit Blot Scanner (LI-COR, Lincoln, NE) e as intensidades das bandas foram analisadas utilizando o LI-COR Image Studio 4.0.

Tabela 2. Anticorpos primários e secundários, diluições e condições de armazenamento.

Anticorpos primários	Empresa	Código	Diluição	Condições de armazenamento
AGE-R1 (DDOST)	Abcam	ab151978	1:500	-20°C
AKT	Cell Signaling	#4691	1:1000	-20°C
Fosfo-[Ser-473]-AKT	Cell Signaling	#4060	1:1000	-20°C
AMPK	Cell Signaling	#2532	1:1000	-20°C
Fosfo-[Thr-172]-AMPK	Cell Signaling	#2535	1:1000	-20°C
Bax	Cell Signaling	#2772	1:500	-20°C
GLO 1	Abcam	ab137098	1:1000	-20°C
NF- κ B p65	Abcam	ab16502	1:500	-20°C
NRF 2	Abcam	ab31163	1:500	-20°C
PGC-1 α	Abcam	ab72230	1:500	-20°C
RAGE	Abcam	ab3611	1:500	-20°C
SIRT 1	Abcam	ab110304	1:500	4°C
UCP 1	Abcam	ab23841	1:1000	-20°C
Anti- β -actina (controle interno)	Cell Signaling	#5057	1:1000	-20°C
Anticorpos secundários				
Anti-rabbit conjugado-HRP	Cell Signaling	#7074	1:1000	-20°C
Anti-mouse conjugado-HRP	Cell Signaling	#7076	1:1000	-20°C

3.4.5 Análises de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória

Amostras de tecido adiposo branco epididimal, fígado e rim (sobrenadantes da análise de Western Blot) foram usadas para a análise de citocinas. Os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α e da citocina anti-inflamatória IL-10 foram realizados utilizando kits ELISA ultrasensível (Affymetrix, San Diego, CA).

3.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. A análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student-Newman-Keuls foi usada para comparar as diferenças entre as médias dos grupos. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes com $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos dos tratamentos com iogurte, trigonelina e/ou curcumina nos parâmetros fisiológicos de animais obesos

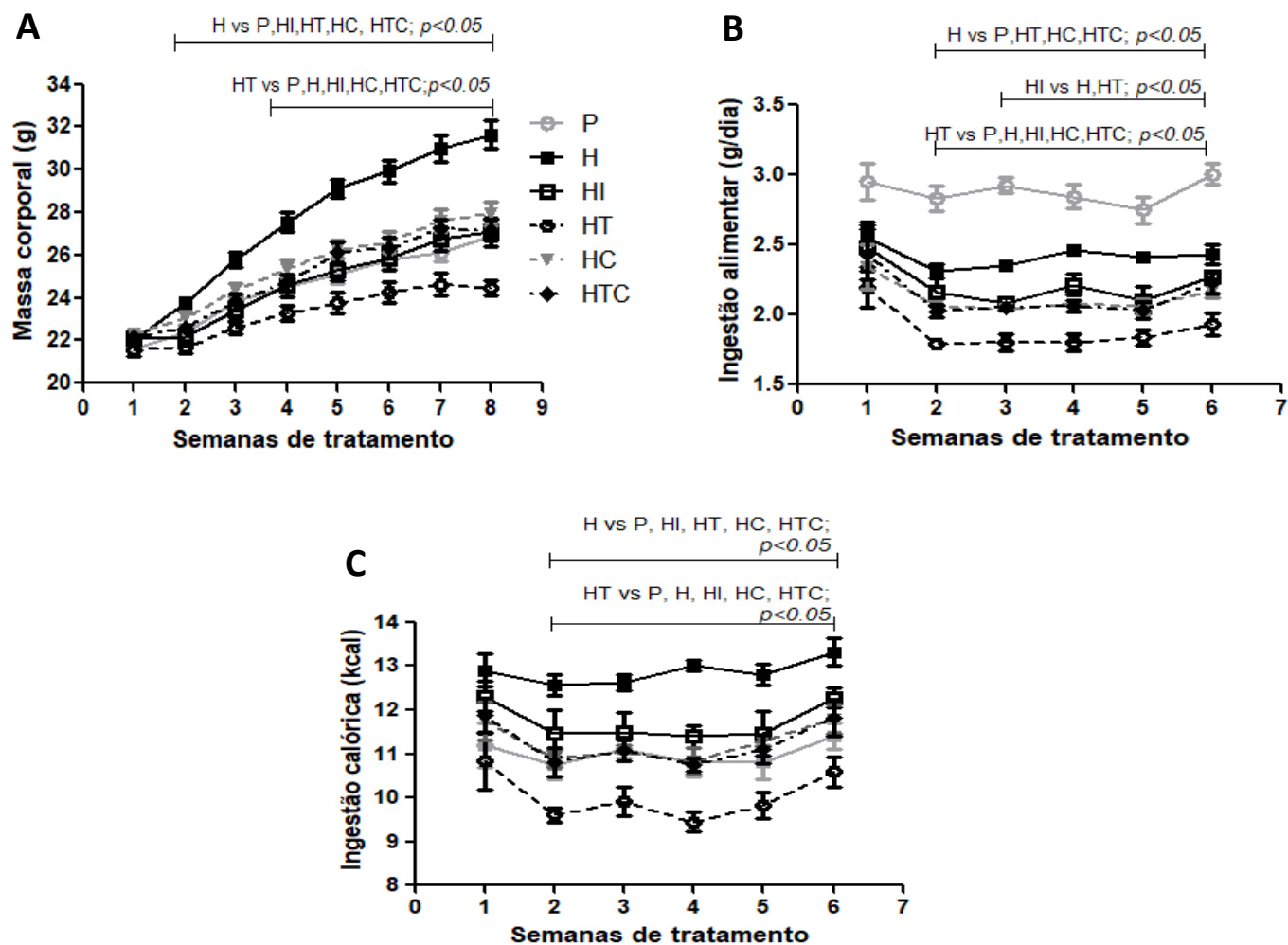
Animais do grupo H, a partir da 2ª semana, apresentaram maiores valores de massa corporal em relação aos animais do grupo P (Figura 12A); este aumento no ganho de massa corporal foi mantido até o final do experimento, evidenciando a instalação da obesidade. Todos os animais alimentados com dieta H apresentaram redução na ingestão alimentar (g/dia) quando comparados aos animais do grupo P (Figura 12B), no entanto houve uma maior ingestão calórica (kcal) pelos animais H (Figura 12C), favorecendo o ganho de massa corporal.

Animais em dieta H que receberam iogurte (HI) apresentaram uma redução significativa na massa corporal (Figura 12A) a partir da segunda semana de tratamento, bem como uma redução na ingestão alimentar (Figura 12B) e calórica (Figura 12C), em relação ao grupo H. Animais em dieta H e tratados com 90 mg/kg de curcumina em iogurte (HC) e animais tratados com curcumina+trigonelina em iogurte (HTC) apresentaram menor ganho de massa corporal (Figura 12A) e redução na ingestão alimentar (Figura 12B) e calórica (Figura 12C), em relação aos animais H. Os animais HI, HC e HTC apresentaram evolução de massa corporal semelhante aos animais P (Figura 12A).

Destaca-se que os melhores resultados observados nos parâmetros de massa corporal, ingestão calórica e ingestão alimentar foram alcançados no tratamento com 50 mg/kg trigonelina em iogurte. Animais em dieta H e tratados com trigonelina em iogurte (HT), a partir da 4ª semana de tratamento, apresentaram menor ganho de massa corporal (Figura 12A), menor ingestão alimentar (Figura 12B) e calórica (Figura 12C), quando comparados aos animais dos grupos P, H, HI, HC e HTC. Destaca-se que o perfil de ingestão alimentar e calórica de animais HT foi até menor que aquele observado em animais do grupo P.

Em conjunto, podemos observar que tanto o iogurte quanto os tratamentos com ativos naturais em iogurte, combinados ou isolados, preveniram ou atenuaram o aumento de ganho de massa corporal devido à ingestão de dieta H, sugerindo então serem eficazes no combate à obesidade.

Figura 12. Massa corporal (A), ingestão alimentar (B) e ingestão calórica (C) de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P e H e tratados com iogurte, curcumina (90 mg/kg) e/ou trigonelina (50 mg/kg) em iogurte.



Os valores representam média $\pm$ erro padrão. As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$.

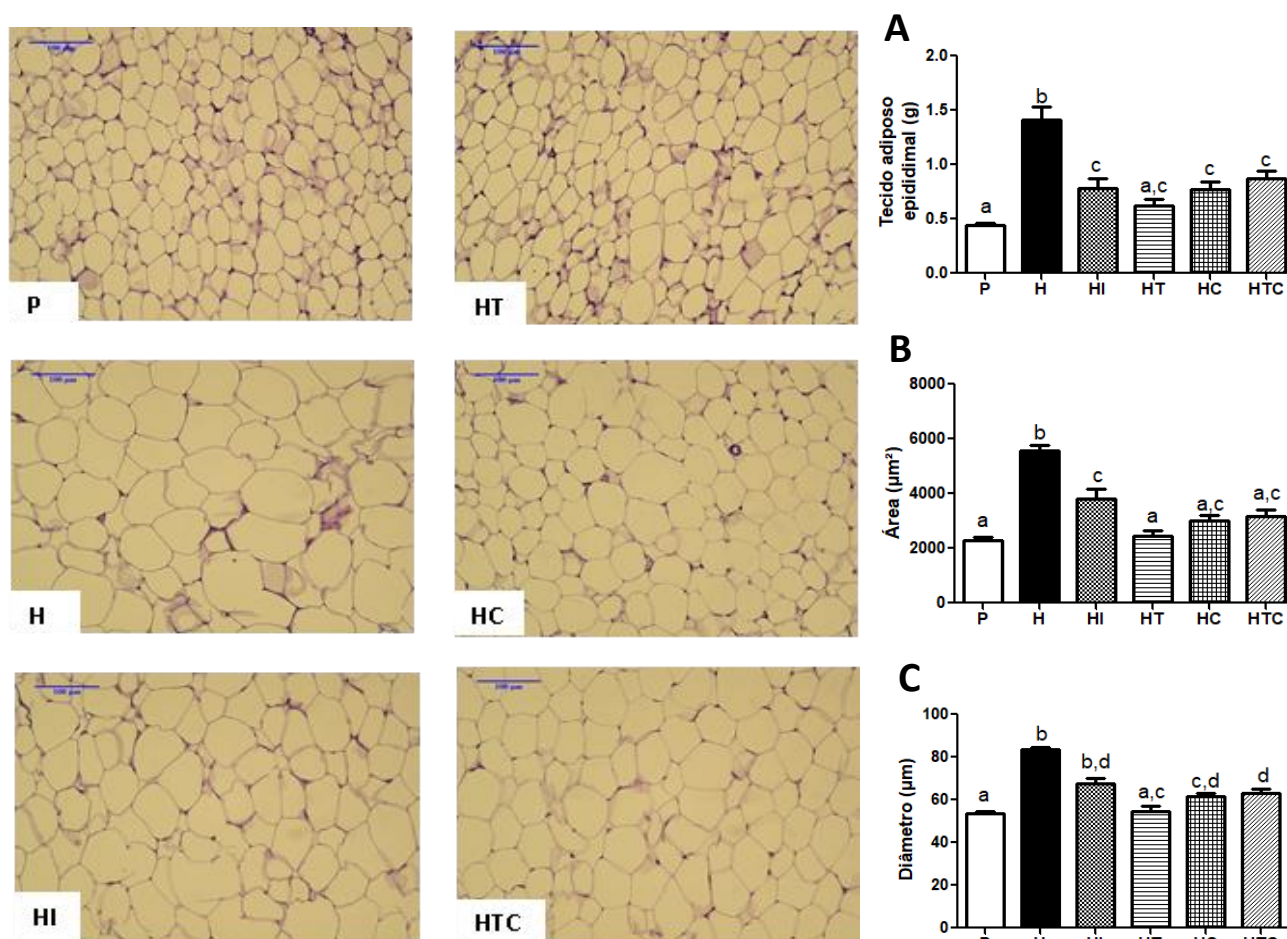
A ingestão de dieta H durante 9 semanas promoveu aumento de 3,2 vezes na massa de TAB epididimal (Figura 13A), bem como hipertrofia de células adiposas, tal como indicado pela análise histológica; foram observados aumentos de 2,4 vezes na área (Figura 13B) e 1,6 vezes no diâmetro (Figura 13C) de adipócitos do TAB epididimal, em relação aos mesmos parâmetros em adipócitos de TAB de animais alimentados com dieta P.

O tratamento de animais em dieta H com iogurte preveniu o aumento na massa de TAB epididimal, bem como levou a uma menor hipertrofia adipocítica, observada com redução na área (76%) e diâmetro (29%) de adipócitos brancos, corroborando o menor ganho de massa corporal em animais HI, em relação aos animais do grupo H (Figura 13).

Os grupos HC e HTC também apresentaram redução na área e no diâmetro das células adiposas, indicando menor hipertrofia adipocítica, corroborando a redução das massas de TAB epididimal (147 e 124%, respectivamente) em relação ao grupo H (Figura 13).

Vale destacar que o tratamento com trigonelina em iogurte desempenhou os melhores efeitos na redução das massas de TAB epididimal (Figura 13A), bem como redução na área e diâmetro de adipócitos brancos deste tecido (Figura 4), em relação aos mesmos parâmetros monitorados nos grupos H e HI, explicando em parte o menor ganho de massa corporal de animais HT (Figura 12A).

Figura 13. Massas de tecido adiposo branco epididimal (A), áreas (B) e diâmetros (C) de adipócitos de TAB epididimal de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P e H e tratados com iogurte, curcumina (90 mg/kg) e/ou trigonelina (50 mg/kg) em iogurte.



Os valores representam média $\pm$ erro padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente. As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$.

Observou-se um aumento significativo nas massas dos TAB retroperitoneal e TAM interescapular de animais do grupo H em relação aos animais do grupo P (Tabela 3), o qual em conjunto com a hipertrofia do TAB epididimal (Figura 13A), corroboram o maior ganho de massa corporal de animais H (Figura 12A). A dieta H também promoveu aumentos nas massas de fígado e rim de camundongos, em comparação aos animais do grupo P (Tabela 3). O aumento nas massas de fígado e rim de animais em

dieta H pode estar relacionado à excessiva ingestão de energia, acentuando a oferta e acúmulo ectópico de ácidos graxos (na forma de triacilglicerol) nestes tecidos.

Todos os tratamentos com iogurte, trigonelina em iogurte e/ou curcumina em iogurte reduziram as massas dos TAM e TAB retroperitoneal (Tabela 3). Os animais HI, HT, HC e HTC também apresentaram menores massas de fígado e rim, quando comparados ao grupo H (Tabela 3). Destaca-se mais uma vez o tratamento com trigonelina em iogurte, o qual desempenhou os melhores efeitos na redução das massas de TAB retroperitoneal, em relação aos grupos H, HI, HC e HTC (Tabela 3), também corroborando o menor ganho de massa corporal de animais HT (Figura 12A).

Assim como os resultados de peso corporal, ingestão calórica e massas de tecidos adiposos, a trigonelina administrada em iogurte e de forma isolada (não combinada com curcumina) foi o tratamento que mais se destacou na atenuação da instalação do modelo de obesidade, provavelmente devido a uma redução na ingestão de dieta H, consequentemente houve redução significativa nas massas de tecidos adiposos e no tamanho de adipócitos brancos.

Tabela 3. Massas de tecidos adiposos branco retroperitoneal (TAB) e marrom interescapular (TAM), fígado e rim de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P e H e tratados iogurte, curcumina (90 mg/kg) e/ou trigonelina (50 mg/kg) em iogurte.

Tecidos	Massas (g)					
	P	H	HI	HT	HC	HTC
TAB retroperitoneal	0,103 ± 0,006 ^a	0,509 ± 0,035 ^b	0,301 ± 0,045 ^c	0,187 ± 0,020 ^a	0,256 ± 0,030 ^c	0,283 ± 0,032 ^c
TAM interescapular	0,075 ± 0,005 ^a	0,100 ± 0,007 ^b	0,067 ± 0,004 ^a	0,068 ± 0,003 ^a	0,06 ± 0,003 ^a	0,072 ± 0,005 ^a
Fígado	1,066 ± 0,030 ^a	1,225 ± 0,023 ^b	0,996 ± 0,032 ^{a,c}	0,899 ± 0,035 ^d	0,977 ± 0,037 ^{a,c}	1,017 ± 0,044 ^{a,c}
Rim	0,143 ± 0,007 ^a	0,183 ± 0,006 ^b	0,144 ± 0,006 ^a	0,146 ± 0,006 ^a	0,155 ± 0,007 ^a	0,152 ± 0,004 ^a

Os valores representam média ± erro padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente. As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$.

4.2 Efeitos dos tratamentos com iogurte, trigonelina e/ou curcumina nos parâmetros bioquímicos plasmáticos de animais obesos

A dieta H promoveu aumento nos níveis plasmáticos de glicose de jejum (30%), triacilgliceróis (21%), colesterol (46%) e HDL-colesterol (44%), em relação aos valores em animais P (Tabela 4). O aumento dos níveis de HDL de camundongos em dieta H, em parte pode ser explicado pelas diferenças intrínsecas em relação ao metabolismo de lipoproteínas em camundongos e humanos. Ao contrário dos seres humanos, cujo transporte sanguíneo de colesterol ocorre preferencialmente na lipoproteína LDL (65-85%), no camundongo o transporte sanguíneo de colesterol ocorre de forma preferencial (85%) na lipoproteína HDL (FAZIO e LINTON, 2001; PODRINI et al., 2013).

Não foram observadas diferenças nos níveis plasmáticos dos marcadores relacionados à função renal (creatinina e ureia) (Tabela 4).

Animais do grupo H apresentaram aumento de 33% nos níveis plasmáticos de ALT (marcador de integridade de hepatócitos), quando comparados aos animais do grupo P (Tabela 4), o que pode indicar lesão tecidual hepática de animais alimentados durante 9 semanas com dieta H.

Os tratamentos de animais em dieta H com iogurte, trigonelina e/ou curcumina em iogurte preveniram o aumento de triacilgliceróis, colesterol e níveis plasmáticos de HDL-colesterol, quando comparado aos valores em animais H (Tabela 4). Os tratamentos com iogurte, trigonelina em iogurte ou curcumina em iogurte também reduziram os níveis de glicose, em relação aos animais do grupo H, os quais ficaram semelhantes aos valores em animais P (Tabela 4). Diferente dos tratamentos com os fitoquímicos isolados, o tratamento de animais H com a combinação de trigonelina e curcumina em iogurte não promoveu melhorias na glicemia (Tabela 4).

Os animais dos grupos HI, HT, HC e HTC apresentaram redução nos níveis de ALT, e não apresentaram diferenças em relação aos níveis de creatinina e ureia em relação ao grupo H, sugerindo manutenção da função/integridade hepática e renal (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos plasmáticos de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.

Parâmetros plasmáticos	P	H	HI	HT	HC	HTC
Glicose (mg/dL)	94 ± 5,8 ^a	122 ± 4,9 ^b	100 ± 3,9 ^a	104 ± 3,7 ^a	101 ± 5,2 ^a	114 ± 7,5 ^b
Triacilgliceróis (mg/dL)	47 ± 2,9 ^a	57 ± 2,5 ^b	49 ± 3,7 ^a	46 ± 2,3 ^a	45 ± 5,9 ^a	47 ± 5,1 ^a
Colesterol (mg/dL)	90 ± 1,5 ^a	132 ± 7,8 ^b	106 ± 6,6 ^c	116 ± 4,6 ^c	113 ± 4,0 ^c	115 ± 3,1 ^c
HDL-colesterol (mg/dL)	82 ± 1,0 ^a	118 ± 5,1 ^b	98 ± 5,8 ^c	95 ± 5,2 ^c	105 ± 2,2 ^c	104 ± 1,2 ^c
ALT (U/L)	70 ± 6,4 ^a	93 ± 14,2 ^b	72 ± 2,2 ^a	66 ± 4,0 ^a	71 ± 3,9 ^a	68 ± 2,5 ^a
Creatinina (mg/dL)	0,09 ± 0,01 ^a	0,08 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,05 ^a	0,08 ± 0,05 ^a	0,09 ± 0,01 ^a	0,1 ± 0,06 ^a
Ureia (mg/dL)	48 ± 1,7 ^a	49 ± 0,9 ^a	47 ± 2,2 ^a	49 ± 1,5 ^a	51 ± 1,9 ^a	48 ± 2,1 ^a

Os valores representam média ± erro padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente. As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$.

4.3 Efeitos dos tratamentos com iogurte, trigonelina e/ou curcumina na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina de animais obesos

Foram realizados os testes funcionais para verificar a resposta dos animais frente a desafios que permitem o monitoramento temporal dos níveis glicêmicos e assim a responsividade à insulina e sua capacidade de regular os níveis de glicose, o teste de tolerância oral à glicose (TTGO) e o teste de tolerância à insulina (ITT), bem como a glicemia de jejum (12 horas de jejum), a fim de estudar as ações dos ativos naturais na capacidade de regular a homeostase da glicose e a sensibilidade à insulina (Figura 14). Também foram estudadas as alterações nos níveis de fosforilação de AKT, tanto os níveis basais quanto os níveis estimulados por insulina, em tecido adiposo branco epididimal (Figura 15) e músculos *gastrocnemius* (Figura 16), os quais indicam alterações na sensibilidade tecidual à insulina.

Foi observada a instalação de um quadro de intolerância à glicose em camundongos alimentados com dieta H: após 15 minutos da sobrecarga de glicose, o pico glicêmico em animais H foi 34% maior em relação ao pico glicêmico observado nos animais P (Figura 14A), e valores elevados de glicemia foram observados em animais H durante os demais tempos pós-sobrecarga de glicose (Figura 14A). Após 120 minutos da sobrecarga de glicose, os animais H não apresentaram a mesma eficiência na redução da glicemia, tal como os animais do grupo P (Figura 14A). Consequentemente, podemos observar que a tolerância oral à glicose foi significativamente prejudicada em animais H quando comparados aos animais P (Figura 14B). Animais em dieta H também apresentaram maiores níveis glicêmicos durante o teste de tolerância à insulina, quando comparados aos animais em dieta P, desde a glicemia de jejum até o tempo de 60 minutos após a administração de insulina, sugerindo que animais H tenham uma diminuição da sensibilidade à insulina (Figuras 14C e D).

Após 30 minutos da sobrecarga de glicose, animais HI apresentaram menores valores de glicemia em relação aos valores em animais H (Figura 14A). Animais HI também apresentaram redução na glicemia no ITT, com valores de glicemia de jejum menores e maiores quedas na glicemia após a administração de insulina, em relação ao perfil do grupo H (Figuras 14C e D), sugerindo que o tratamento com iogurte foi capaz de promover um aumento da sensibilidade à insulina e melhorar a tolerância à glicose.

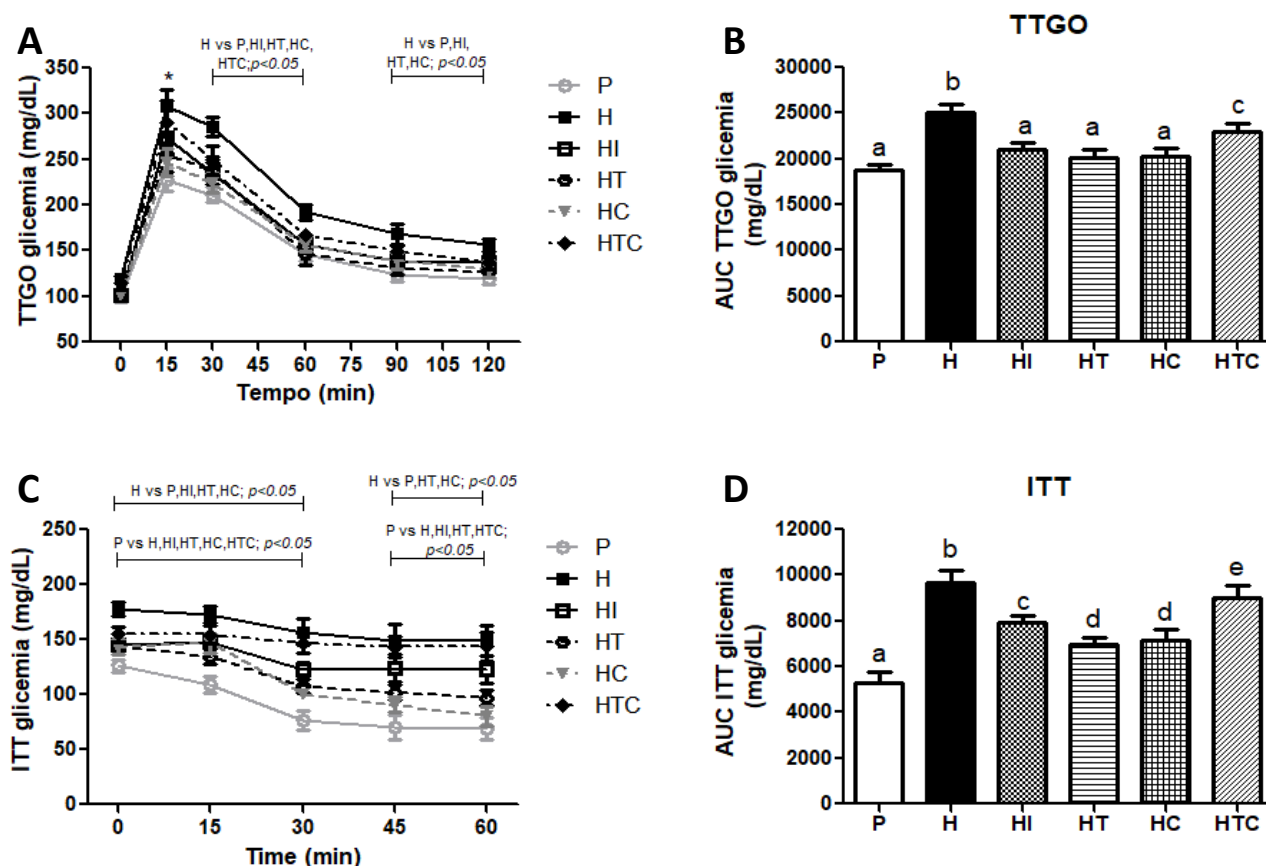
Após 30 minutos da sobrecarga com glicose, animais tratados com trigonelina em iogurte apresentaram redução de 17% nos níveis glicêmicos, em relação aos animais H, e após 120 minutos, a glicemia do grupo HT continuou menor em relação aos valores no grupo H (Figura 14A). Como resultado, houve uma redução de 20% na AUC do TTGO em animais HT em relação aos animais H (Figura 14B). O tratamento com trigonelina também reduziu em 28% a AUC da glicemia no ITT, em relação aos animais H (Figura 14D).

Após 15 minutos da sobrecarga com glicose, animais tratados com curcumina em iogurte apresentaram redução de 20% nos valores de glicemia, em relação aos animais H (Figura 14A). No entanto, após 120 minutos, os valores de glicemia de animais HC não foram diferentes dos valores em animais H (Figuras 14A e B). Como resultado, houve uma redução de 20% na AUC do TTGO em animais HC em relação aos animais H (Figura 14B). O tratamento com curcumina também reduziu em 26% os níveis glicêmicos na AUC do ITT em relação aos animais H (Figura 14D).

Animais em dieta H e tratados com curcumina e trigonelina em iogurte apresentaram redução de 13% na glicemia após 30 minutos da sobrecarga de glicose, em relação aos animais do grupo H (Figura 14A). No entanto, 90 minutos após a sobrecarga de glicose, os valores de glicemia de animais HTC não foram diferentes daqueles em animais H (Figura 14A). A combinação dos ativos naturais em iogurte também não melhorou a sensibilidade à insulina, tal como observado no ITT, desde a glicemia de jejum e após a administração de insulina (Figura 14C), sugerindo, portanto, que a combinação curcumina+trigonelina seja menos efetiva na redução da glicemia em comparação aos tratamentos com os ativos naturais de forma isolada.

Podemos concluir que tratamentos de animais em dieta H com iogurte, trigonelina ou curcumina, de forma isolada, promoveram um aumento na tolerância à glicose e na sensibilidade à insulina. Já a combinação destes dois antioxidantes naturais em iogurte parece prejudicar os efeitos observados com os tratamentos isolados, uma vez que não foram observados os aumentos na tolerância à glicose ou na sensibilidade à insulina em animais HTC, em comparação aos perfis observados em animais HI, HT ou HC.

Figura 14. Tolerância oral à glicose (A), AUC do TTGO (B), tolerância à insulina (D) e AUC do ITT (E) de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.



Os valores representam média $\pm$ erro padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente. As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$. *diferenças de H vs P e HC.

A instalação de resistência à insulina foi comprovada no TAB epididimal. Houve redução nos níveis de fosforilação de AKT (Figura 15) no TAB epididimal de animais H, em relação aos valores em animais P, tanto em relação à fosforilação basal (55%) quanto em relação à fosforilação estimulada por insulina (66%). Tal redução nos níveis de fosforilação de AKT pode explicar, pelo menos em parte, os quadros de resistência à insulina (Figuras 15C e D) e de intolerância à glicose (Figuras 14A e B) em animais H, bem como pode explicar os maiores valores de glicemia de jejum (Tabela 4) em animais H.

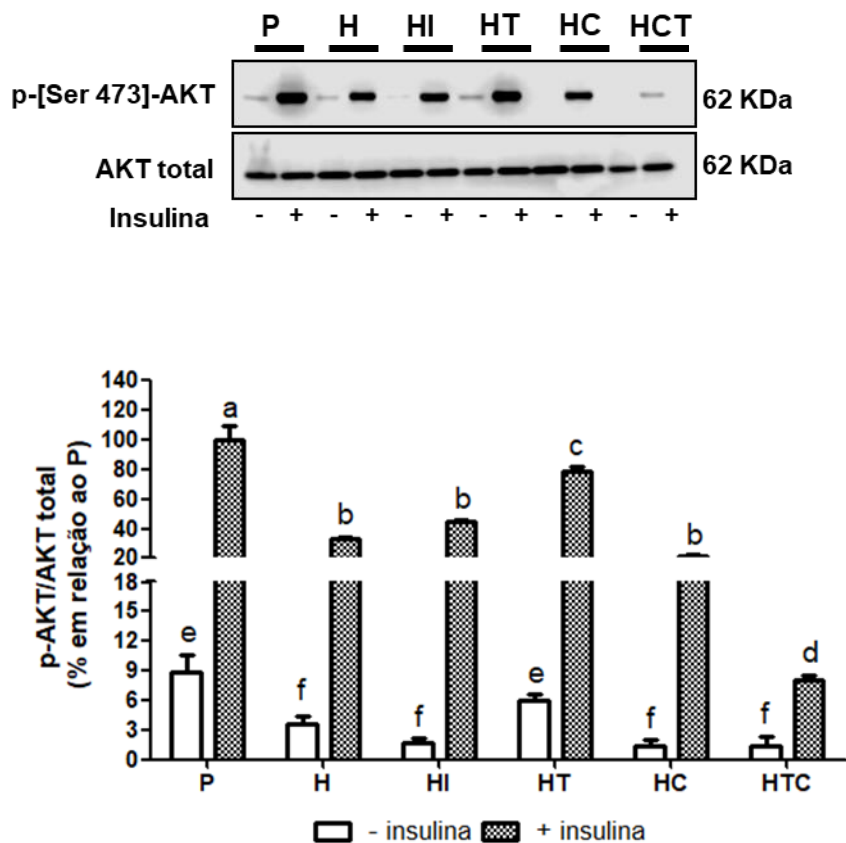
O tratamento de animais em diets H com iogurte foi não capaz de promover alterações nos níveis de fosforilação de AKT no TAB epididimal, tanto os níveis basais quanto os níveis estimulados por insulina, em relação aos animais H (Figura 15).

Os melhores resultados relacionados à capacidade de preservar a sinalização da insulina em TAB epididimal de animais mantidos em dieta obesogênica foram encontrados nos tratamentos com trigonelina em iogurte, sozinha. O tratamento com trigonelina foi o único que melhorou tanto a fosforilação basal quanto a fosforilação estimulada por insulina de AKT, no TAB epididimal de animais em dieta H, em relação aos animais do grupo H, bem como em relação aos demais tratamentos (iogurte, iogurte com curcumina, iogurte com trigonelina + curcumina) (Figura 15).

Tal como o tratamento com iogurte, o tratamento de animais em dieta H com iogurte enriquecido com curcumina também não promoveu benefícios na fosforilação de AKT (basal ou após a administração de insulina) no TAB epididimal (Figura 15), quando comparados aos animais H.

O tratamento de animais em dieta H com a combinação de trigonelina e curcumina em iogurte promoveu prejuízos adicionais na fosforilação de AKT (Figura 15), em relação aos próprios impactos promovidos pela dieta H, com redução drástica na capacidade de fosforilar e assim ativar a AKT; tal achado corrobora os resultados de TTGO e ITT (Figura 14), que evidenciou redução da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina quando comparado aos tratamentos com trigonelina e curcumina em iogurte, de forma isolada.

Figura 15. Níveis de fosforilação de AKT em tecido adiposo branco epididimal de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.



Os valores representam média $\pm$ erro padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente. As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$.

A instalação de resistência à insulina também foi verificada em músculos *gastrocnemius* de animais H, uma vez que a fosforilação de AKT estimulada por insulina foi 6 vezes menor do que aquela observada em músculos de animais P (Figura 16).

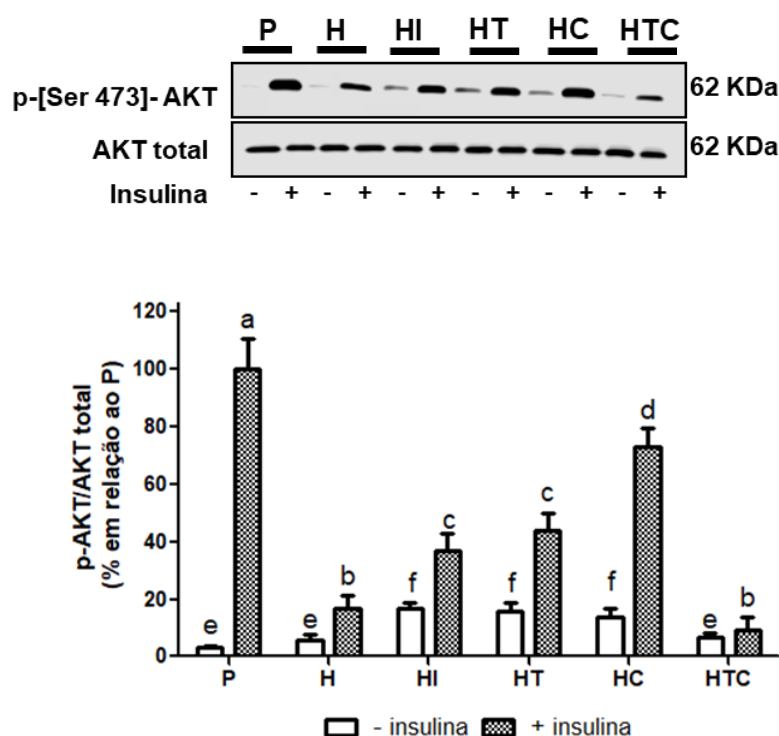
Os tratamentos de animais em dieta H com iogurte ou com trigonelina em iogurte promoveram efeitos semelhantes e benéficos, levando a aumentos tanto nos níveis basais quanto nos níveis estimulados por insulina de fosforilação de AKT, em relação aos valores no grupo H (Figura 16).

A curcumina em iogurte foi o tratamento que mais se destacou na promoção do aumento na fosforilação de AKT estimulada por insulina em músculos *gastrocnemius*,

tanto em relação ao tratamento com iogurte quanto ao tratamento com trigonelina em iogurte, sugerindo um aumento na sensibilidade à insulina em músculos esqueléticos de animais em dieta H.

Assim como observado nos resultados de TTGO e ITT (Figura 14) e da fosforilação de AKT no TAB epididimal (Figura 15), a combinação de trigonelina e curcumina em iogurte mais uma vez prejudicou os efeitos dos compostos quando administrados isoladamente, agora com anulação de respostas em músculos *gastrocnemius*, onde foram observadas níveis de fosforilação de AKT semelhante aos animais do grupo H (Figura 16).

Figura 16. Níveis de fosforilação de AKT em músculo *gastrocnemius* de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.



Os valores representam média $\pm$ erro padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente. As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$.

4.4 Efeitos dos tratamentos com iogurte, trigonelina e/ou curcumina em iogurte em biomarcadores relacionados à inflamação de animais obesos

Observou-se um aumento de 2,5 vezes nos níveis de NF- κ B (Figura 17A) no TAB epididimal de animais H em relação aos animais P. Também foram observados aumentos nos níveis das adipocinas pró-inflamatórias, IL-6 (3 vezes; Figura 17B) e TNF- α (3,5 vezes; Figura 17C) e redução de 1,5 vezes nos níveis da adipocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 17D) em TAB epididimal de animais obesos, caracterizando a instalação de um quadro de inflamação no tecido adiposo branco visceral. O aumento nos níveis de TNF- α é indicado como um dos principais eventos que participam do desenvolvimento da resistência à insulina na obesidade (KANG et al., 2016), o que pode corroborar os resultados encontrados na fosforilação de AKT (Figura 15) e no ITT (Figuras 14C e D) de animais H.

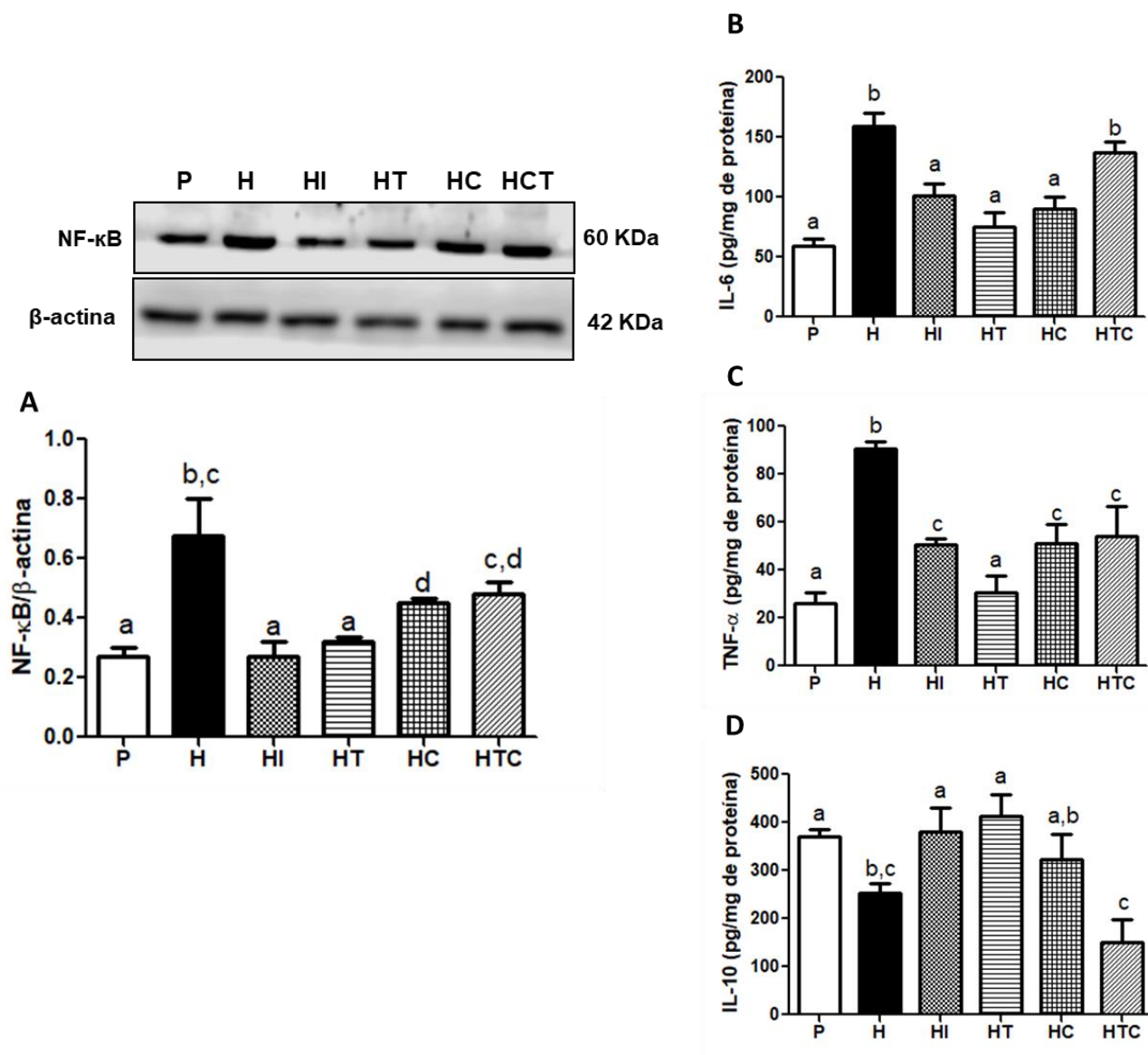
Todos os tratamentos isolados promoveram benefícios em relação ao quadro de inflamação observado no TAB epididimal. Animais em dieta H e tratados com iogurte apresentaram menores níveis de NF- κ B (60%) e de adipocinas pró-inflamatórias (IL-6, 37%; TNF- α , 44%), bem como aumento de 50% nos níveis de IL-10 (Figura 17).

O tratamento de animais em dieta H com trigonelina em iogurte reduziu os níveis de NF- κ B (53%) e os níveis das adipocinas pró-inflamatórias IL-6 (60%) e TNF- α (66%), bem como promoveu aumento de 62% nos níveis da adipocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 17).

O tratamento de animais em dieta H com curcumina em iogurte reduziu os níveis de NF- κ B (33%) e das adipocinas pró-inflamatórias IL-6 (43%) e TNF- α (44%), bem como aumento de 27% nos níveis de IL-10 (Figura 17).

Interessantemente, o tratamento de animais em dieta H com a combinação de trigonelina e curcumina em iogurte não reduziu os níveis proteicos de NF- κ B (Figura 17A) bem como os níveis de IL-6 (Figura 17B). Também foi observada redução nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 17D). Apesar destes efeitos indesejados, observou-se que animais HTC apresentaram redução de 40% nos níveis de TNF- α (Figura 17C) em relação ao grupo H.

Figura 17. Níveis proteicos de NF- κ B (A), adipocinas pró-inflamatórias IL-6 (B) e TNF- α (C) e anti-inflamatória IL-10 (D) no tecido adiposo epididimal de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.



Os valores representam média $\pm$ erro padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente. As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$.

4.5 Efeitos dos tratamentos com iogurte, trigonelina e/ou curcumina nos marcadores relacionados ao programa termogênico no tecido adiposo marrom interescapular de animais obesos

Foram analisados os níveis proteicos de SIRT 1, PGC-1 α , NRF 2 e UCP 1 e os níveis de fosforilação de AMPK no TAM interescapular de camundongos alimentados com dieta P e H durante 9 semanas e submetidos aos diferentes tratamentos (Figura 18). Não foram observadas diferenças nos conteúdos proteicos de SIRT 1, PGC-1 α e NRF 2 em TAM de animais H ou P. Entretanto animais obesos (grupo H) apresentaram redução de 2 vezes na fosforilação de AMPK (Figura 18B) e aumento de 2,3 vezes nos níveis proteicos de UCP 1 (Figura 18E), em relação aos animais do grupo P.

O tratamento de animais alimentados com dieta H com iogurte não promoveu mudanças nos níveis proteicos de PGC-1 α e NRF 2 em TAM (Figuras 18C e D), no entanto foi capaz de promover uma redução de 28% no conteúdo de SIRT 1 (Figura 18A) e um aumento de 24% na fosforilação de AMPK (Figura 18B), em relação aos valores observados em TAM de animais do grupo H. Animais HI também não apresentaram mudanças nos níveis de UCP 1 quando comparado ao grupo H (Figura 18E).

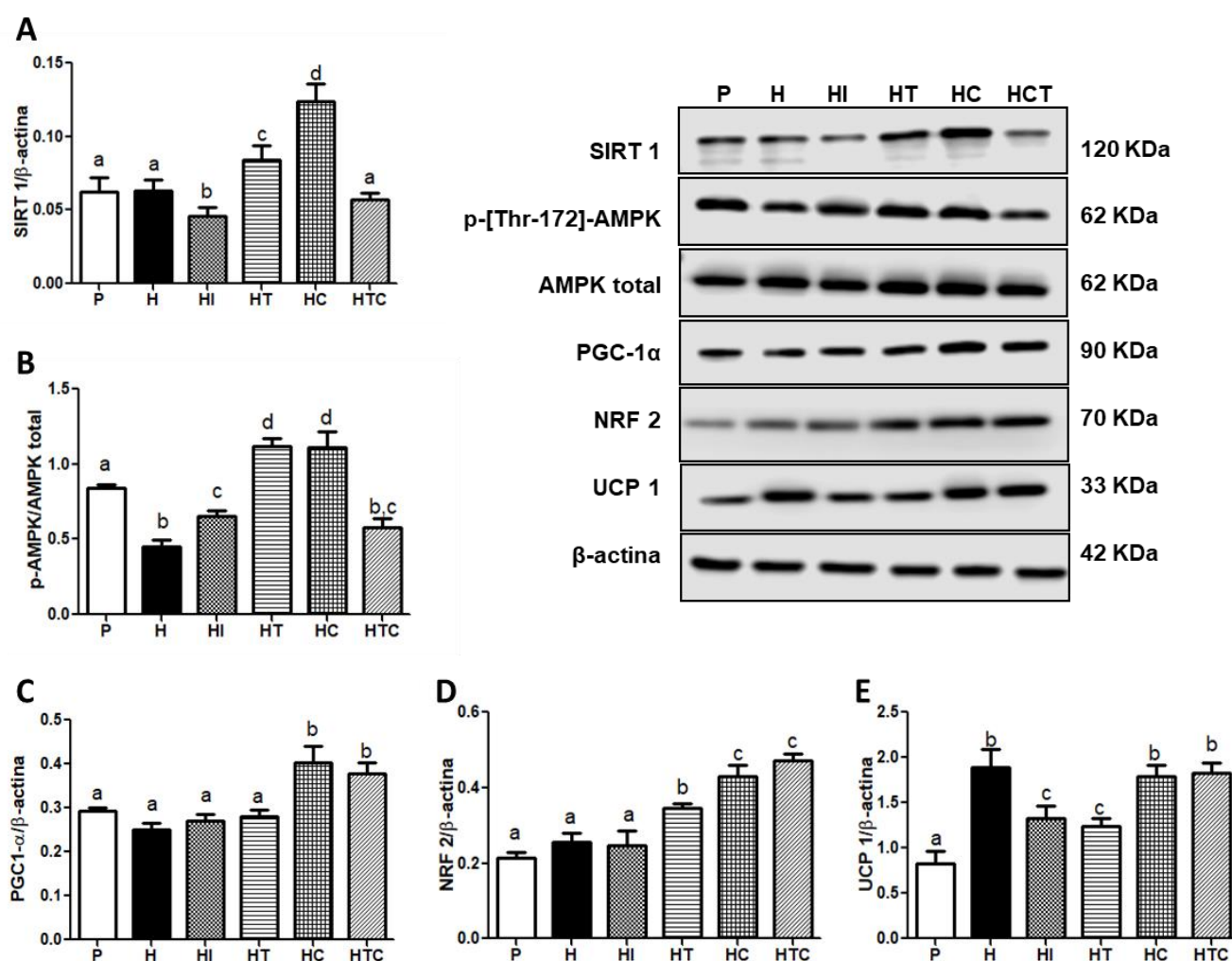
Animais HT apresentaram um aumento de 33% nos níveis proteicos de SIRT 1 (Figura 18A), aumento de 80% na fosforilação de AMPK (Figura 18B) e aumento de 41% no conteúdo de NRF 2 no TAM (Figura 18D), em relação ao grupo H. O tratamento com trigonelina não promoveu mudanças nos níveis de PGC-1 α em relação ao grupo H (Figura 18C). Interessantemente, o tratamento com trigonelina reduziu em 78% os níveis de UCP 1 em relação aos valores em TAM de animais H (Figura 18E).

Os melhores efeitos relacionados à estimulação do programa termogênico no TAM interescapular foram alcançados nos tratamentos de animais em dieta H com iogurte enriquecido com curcumina. O tratamento com curcumina em iogurte promoveu aumento de 96% os níveis proteicos de SIRT 1 (Figura 18A), aumento de 79% na fosforilação de AMPK (Figura 18B), aumento de 53% no conteúdo de PGC-1 α (Figura 18C) e aumento de 81% no conteúdo de NRF 2 (Figura 18D), em relação aos resultados observados no grupo H. O grupo HC apresentou níveis proteicos de UCP 1 semelhantes aos observados em TAM de animais do grupo H (Figura 18E).

A combinação de trigonelina e curcumina em iogurte não melhorou os níveis de SIRT 1 (Figura 18A) ou a fosforilação de AMPK (Figura 18B) no TAM, em relação ao

grupo H. No entanto, o grupo HTC apresentou aumento de 1,5 vezes nos níveis proteicos de PGC-1 α aumento de 2 vezes nos níveis de NRF 2, em relação ao grupo H (Figuras 18C e D). Animais HTC também apresentaram níveis proteicos de UCP 1 semelhantes ao grupo H (Figura 18E).

Figura 18. Níveis proteicos de SIRT 1 (A), níveis de fosforilação de AMPK (B), níveis proteicos de PGC-1 α (C), NRF 2 (D) e UCP 1 (E) no TAM de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.



Os valores representam média $\pm$ erro padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente. As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$.

4.6 Efeitos dos tratamentos com iogurte, trigonelina e/ou curcumina em biomarcadores do estresse glicoxidativo e atividade antioxidante no plasma de animais obesos

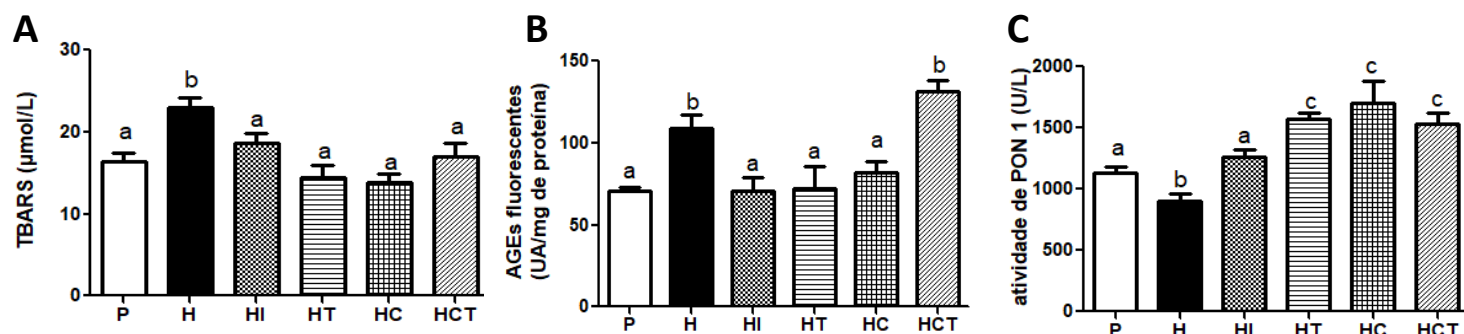
Após 9 semanas de ingestão de dieta H, observou-se um aumento nos níveis plasmáticos de TBARS (40%) e nos valores relativos de AGEs fluorescentes (55%), bem como queda (21%) na atividade da PON 1, quando comparados aos valores em animais P (Figura 19) evidenciando o estabelecimento do estresse glicoxidativo em animais H.

Os tratamentos de animais em dieta H com iogurte, trigonelina ou curcumina promoveram reduções nos níveis de TBARS e de AGEs fluorescentes, em relação aos valores em animais H (Figura 19).

O tratamento de animais em dieta H com a combinação de curcumina e trigonelina e iogurte promoveu redução nos níveis de TBARS (Figura 19A), porém não melhorou os níveis de AGEs fluorescentes no plasma em relação aos animais do grupo H, novamente sugerindo anulação nos efeitos benéficos observados com os tratamentos isolados (Figura 19B).

É importante observar que os tratamentos de animais H com trigonelina, curcumina ou curcumina+trigonelina em iogurte aumentaram a atividade da enzima antioxidante PON 1, quando comparados aos valores dos grupos P, H e HI (Figura 19C).

Figura 19. Níveis de TBARS, AGEs fluorescentes e atividade PON 1 no plasma de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.



Os valores representam média $\pm$ erro padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente. As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$.

4.7 Efeitos dos tratamentos com iogurte, trigonelina e/ou curcumina em biomarcadores do estresse glicoxidativo e da inflamação no fígado de animais obesos

A caracterização do estresse glicoxidativo em fígado de animais H foi observada pelos os níveis elevados de TBARS (89%, Figura 20A), AGEs fluorescentes (51%, Figura 20B), níveis proteicos de RAGE (144%, Figura 20C) e Bax (82%, Figura 20D), em relação ao grupo P. Marcadores da inflamação também encontram-se alterados em fígado de animais H. Houve aumento de 96% nos níveis proteicos de NF- κ B (Figura 20E), aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-6 (2,4 vezes, Figura 20F) e TNF- α (1,5 vezes, Figura 20G) e redução nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 (2,4 vezes, Figura 20H), em relação aos valores em fígado de animais P.

O tratamento de animais em dieta H com iogurte não promoveu redução nos níveis de TBARS (Figura 20A) no fígado. Entretanto, animais HI apresentaram redução de 32% nos níveis de AGEs fluorescentes (Figura 20B) e redução de 102% nos níveis de RAGE (Figura 20C) no fígado. Animais HI também apresentaram redução de 54% no conteúdo de Bax (Figura 20D) e redução de 66% nos níveis de NF- κ B (Figura 20E), em relação aos valores observados nos animais H. Em fígado de animais HI, também foram

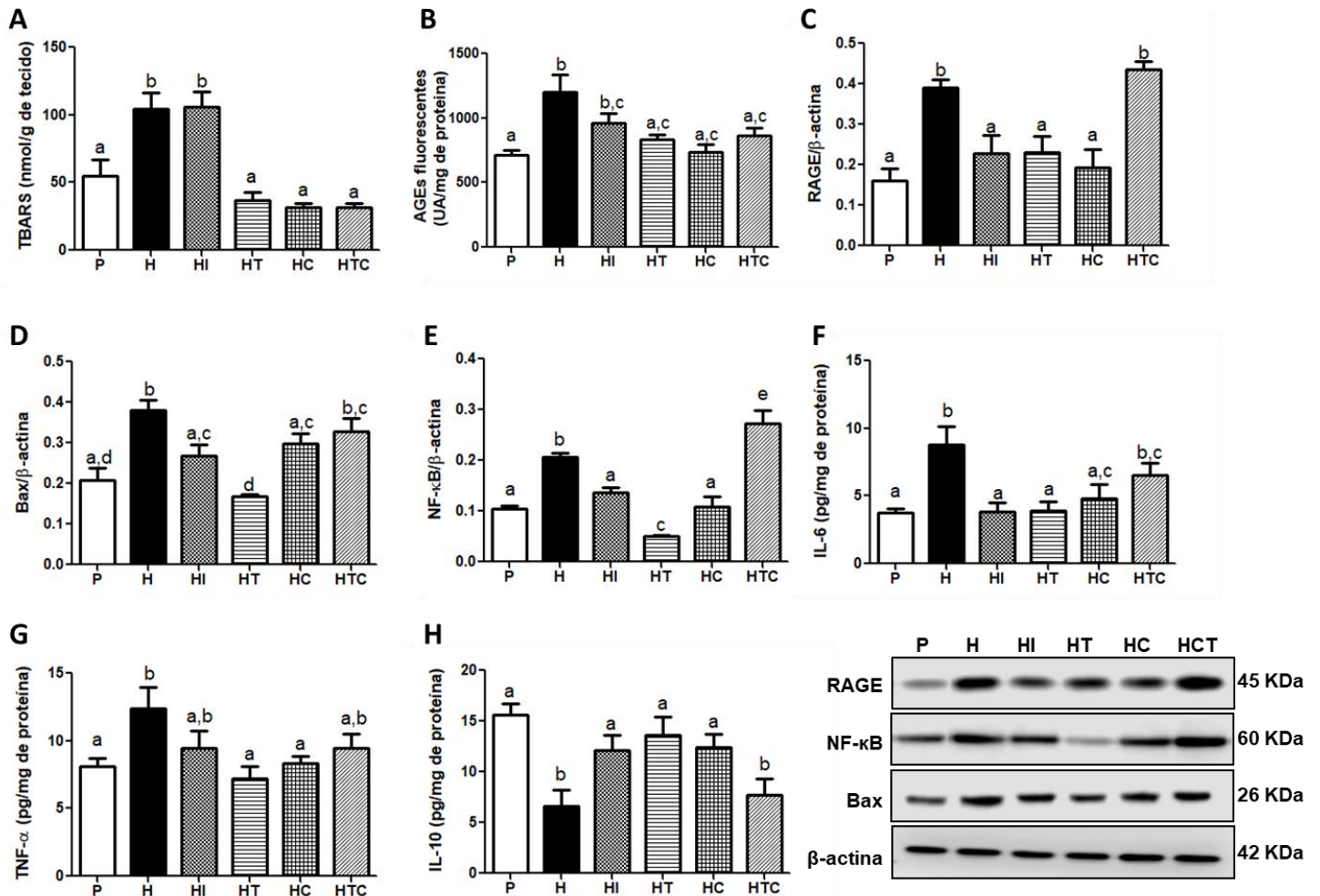
observados menores níveis de IL-6 (2,3 vezes; Figura 20F), tendência de redução nos níveis de TNF- α (Figura 20G) e aumento (2 vezes) nos níveis de IL-10 (Figura 20H), em relação ao grupo H.

O tratamento de animais em dieta H com trigonelina em iogurte atenuou o estresse glicoxidativo no fígado, uma vez que foram observadas reduções nos níveis de TBARS (3 vezes, Figura 20A), AGEs fluorescentes (1,4 vezes, Figura 20B), níveis proteicos de RAGE (2 vezes, Figura 20C) e de Bax (2 vezes, Figura 20D). O tratamento com trigonelina também atenuou a inflamação no fígado de animais alimentados com dieta H. Animais HT apresentaram redução nos níveis de NF- κ B (4 vezes; Figura 20E), redução nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (2 vezes; Figura 20F) e TNF- α (2 vezes; Figura 20G) e aumento nos níveis de IL-10 (2,5 vezes; Figura 20G) em comparação aos valores observados no grupo H.

O tratamento de animais em dieta H com curcumina em iogurte também reduziu o estresse glicoxidativo no fígado, uma vez que foram observados menores níveis de TBARS (3 vezes; Figura 20A), AGEs fluorescentes (2 vezes; Figura 20B), redução nos níveis proteicos de RAGE (2 vezes; Figura 20C). É interessante notar que o tratamento com curcumina não reduziu os níveis proteicos de Bax (Figura 20D). Houve redução da inflamação no fígado de animais tratados com curcumina, uma vez que foi observada redução nos níveis proteicos de NF- κ B (47%; Figura 20E), redução nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (46%; Figura 20F) e TNF- α (33%; Figura 20G), e aumento nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 (88%; Figura 20H), quando comparados aos valores no grupo H.

O tratamento de animais em dieta H com a combinação de trigonelina e curcumina em iogurte reduziu os níveis de TBARS (3 vezes; Figura 20A), AGEs fluorescentes (1,4 vezes; Figura 20B) e os níveis das citocinas IL-6 (1,3 vezes; Figura 20F) e TNF- α (1,3 vezes; Figura 20G) no fígado, em comparação aos valores observados em animais do grupo H. No entanto, diferente dos tratamentos com trigonelina e curcumina isoladamente, a combinação destes ativos naturais não foi capaz de reduzir os níveis de RAGE (Figura 20C), Bax (Figura 20D), NF- κ B (Figura 20E), também não foi capaz de aumentar os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 20H), os quais foram semelhantes aos valores encontrados no grupo H, novamente mostrando a perda das respostas benéficas dos tratamentos isolados com os fitoquímicos, quando administrados em combinação.

Figura 20. Níveis de TBARS (A) e AGEs fluorescentes (B), níveis proteicos de RAGE (C), Bax (D) e NF- κ B (E), níveis de citocinas inflamatórias IL-6 (F), TNF- α (G) e citocina anti-inflamatória IL-10 (H) no fígado de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.



Os valores representam média $\pm$ erro padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente. As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$.

4.8 Efeitos dos tratamentos com iogurte, trigonelina e/ou curcuminina em biomarcadores relacionados ao *status* energético, potencial antioxidante e detoxificação de AGEs no fígado de animais obesos

Camundongos alimentados com dieta H durante 9 semanas apresentaram mudanças nos biomarcadores relacionados ao *status* energético, potencial antioxidante e componentes envolvidos na detoxificação de AGEs no fígado (Figura 21). Animais H apresentaram redução nos níveis proteicos de SIRT 1 (60%), níveis de fosforilação de AMPK (47%), e níveis proteicos de PGC-1 α (61%) e de NRF 2 (44%). Em fígado de animais H também houve redução nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px (Figuras 21E, F e G), em relação aos valores observados em animais P. Animais do grupo H não apresentaram alterações nos níveis hepáticos de GLO 1 (Figura 21H) e de AGE-R1 (Figura 21I) em relação aos valores em fígado de animais do grupo P.

O tratamento de animais em dieta H com iogurte não promoveu alterações no conteúdo de SIRT 1 no fígado, no entanto, promoveu aumento de 2 vezes nos níveis de fosforilação de AMPK (Figura 21B) e nos níveis proteicos de PGC-1 α (Figura 21C), em relação aos valores em animais H. Animais do grupo HI não apresentaram aumentos nos níveis de NRF 2 ou nas atividades das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GSH-Px), bem como nos níveis de GLO 1 e AGE-R1, em relação aos valores observados em fígado de animais do grupo H (Figura 21).

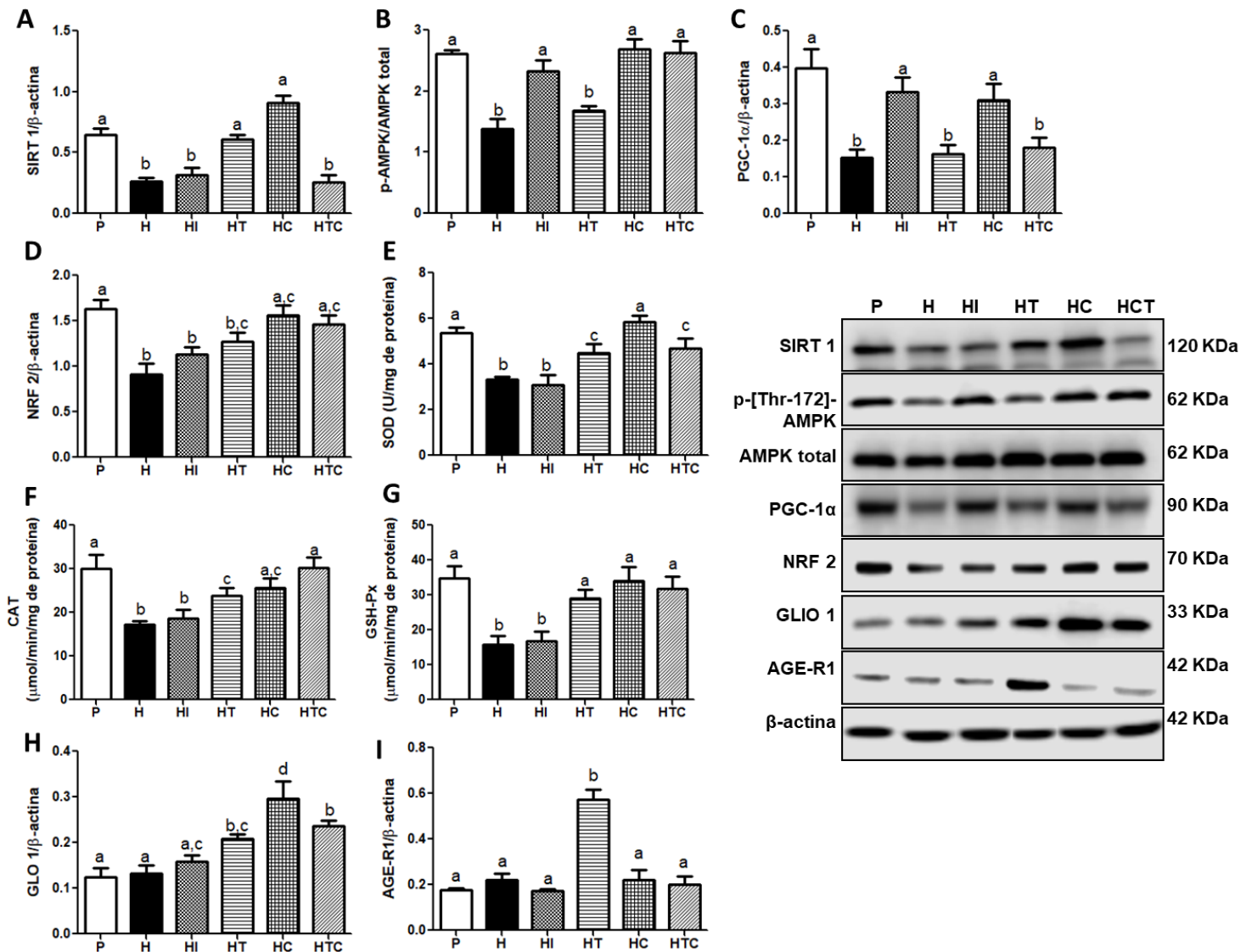
O tratamento de animais em dieta H com trigonelina em iogurte não promoveu alterações nos níveis de fosforilação de AMPK (Figura 21B) ou nos níveis proteicos de PGC-1 α (Figura 21C) no fígado, em relação aos valores observados no grupo H. Por outro lado, animais HT apresentaram aumento de 2,3 vezes nos níveis proteicos de SIRT 1 (Figura 21A) e aumento de 1,4 vezes nos níveis de NRF 2 no fígado, em comparação ao grupo H. Os animais do grupo HT também apresentaram aumentos nas atividades das enzimas antioxidantes SOD (35%; Figura 21E), CAT (37%; Figura 21F) e GSH-Px (82%; Figura 21G), quando comparados aos valores do grupo H. O tratamento com trigonelina em iogurte também promoveu aumento nos níveis de GLO 1 (58%; Figura 21H) no fígado, em relação aos valores do grupo H. Além disso, o tratamento com trigonelina apresentou efeito benéfico potencial no estímulo ao componente AGE-R1, cujos níveis proteicos aumentaram 3 vezes em relação aos valores observados em animais H (Figura 21I). Os aumentos significativos de GLO 1 e AGE-R1 observados em fígado de animais HT certamente contribuíram para um menor

estresse glicativo, evidenciado pela redução significativa nos níveis de AGEs, em combinação com os níveis reduzidos de RAGE (Figuras 20B e C).

O tratamento de animais em dieta H com curcumina em iogurte promoveu o maior aumento no *status* energético hepático, em relação aos tratamentos com iogurte, trigonelina ou combinação de trigonelina+curcumina em iogurte (Figura 21). Animais HC apresentaram aumentos de 100% nos níveis de SIRT 1 (Figura 21A), de 50% na fosforilação de AMPK (Figura 21B), de 40% nos níveis de PGC-1 α e de NRF 2 (Figura 21C e D), quando comparado ao grupo H. O grupo HC também apresentou aumentos nas atividades das enzimas antioxidantes SOD (76%; Figura 21E), CAT (48%; Figura 21F) e GSH-Px (114%; Figura 21G), em relação ao grupo H. Embora o tratamento com curcumina não tenha promovido mudanças nos níveis proteicos de AGE-R1 (Figura 21H), o tratamento promoveu aumento significativo nos níveis de GLO 1 no fígado (2 vezes; Figura 21I), o qual pode explicar a redução observada nos níveis de AGEs no fígado de animais HC (Figura 21B).

O tratamento de animais em dieta H com a combinação de trigonelina e curcumina em iogurte aumentou em 48% os níveis de fosforilação de AMPK (Figura 21B) no fígado, em relação aos valores observados no grupo H. Diferente dos tratamentos isolados, o tratamento combinado de trigonelina + curcumina não aumentou os níveis proteicos de SIRT 1 ou de PGC-1 α (Figura 21A e C). Apesar de serem observados alguns pontos negativos na terapia combinada, esta promoveu aumento nos níveis de NRF 2 (Figura 21D) e nas atividades das enzimas antioxidantes CAT (Figura 21F) e GSH-Px (Figura 21G) no fígado. Também foram observados aumentos nos níveis proteicos de GLO 1 (80%; Figura 21H) em fígado de animais HTC, o qual pode ter contribuído para a redução nos níveis de AGEs (Figura 20B).

Figura 21. Níveis proteicos de SIRT 1 (A), níveis de fosforilação de AMPK (B), níveis proteicos de PGC-1 α (C) e NRF 2 (D), atividades de enzimas antioxidantes SOD (E), CAT (F) e GSH-Px (G), níveis proteicos de GLO 1 (H) e AGE-R1 (I) no fígado de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.



Os valores representam média $\pm$ erro padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente. As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$.

4.9 Efeitos dos tratamentos com iogurte, trigonelina e/ou curcumina em biomarcadores do estresse glicoxidativo e da inflamação no rim de animais obesos

Os níveis de TBARS no rim de animais H foram aumentados (34%) em relação aos valores encontrados em rim de animais P (Figura 22A). Animais do grupo H também apresentaram maiores níveis de AGEs fluorescentes (60%; figura 22B), níveis proteicos de RAGE (60%; Figura 22C) e Bax (82%; Figura 22D), caracterizando em conjunto o estabelecimento de estresse glicoxidativo neste tecido devido à oferta de dieta H. Também foram observados aumentos no conteúdo de NF- κ B (3 vezes; Figura 22E), níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-6 (2 vezes; Figura 22F) e TNF- α (1,3 vezes; Figura 22G) e redução (50%) nos níveis de IL-10, em relação aos resultados encontrados em rim de animais do grupo P (Figura 22H). Em conjunto, os achados indicam que o consumo de dieta H por camundongos durante 9 semanas promoveu no rim um aumento da peroxidação lipídica, estresse glicativo, apoptose e inflamação.

O tratamento de animais em dieta H com iogurte não melhorou o estresse oxidativo no rim, uma vez que os níveis de TBARS em rim de animais HI (Figura 22A) foram semelhantes aos valores em grupo H. Entretanto, o tratamento com iogurte reduziu em 24% os níveis de AGEs fluorescentes (Figura 22B), níveis proteicos de RAGE (66%, figura 22C) e de Bax (3 vezes; Figura 22D), em relação aos valores encontrados em animais do grupo H. O tratamento com iogurte não atenuou os níveis de NF- κ B (Figura 22E). No entanto, animais HI apresentaram aumento de 86% nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 22H), redução de 59% nos níveis de IL-6 (Figura 22F) e redução de 21% nos níveis de TNF- α (Figura 22G), em relação aos valores em animais do grupo H.

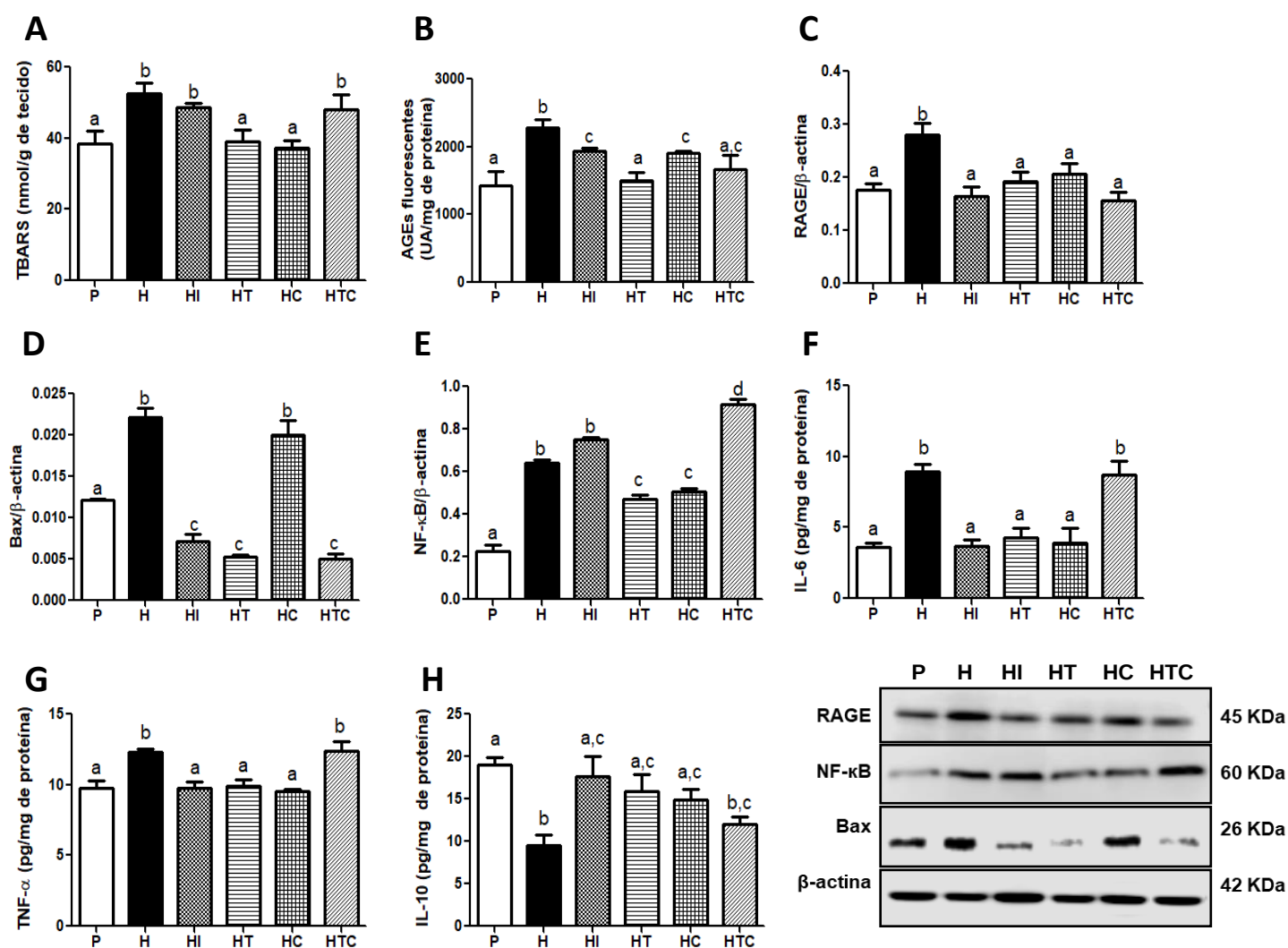
O tratamento de animais em dieta H com trigonelina promoveu redução de 35% os níveis de TBARS (Figura 22A), redução de 55% os níveis de AGEs fluorescentes (Figura 22B), redução de 50% nos níveis proteicos de RAGE (Figura 22C) e redução de 4 vezes nos níveis de Bax (Figura 22D) no rim. O tratamento com trigonelina também reduziu os níveis renais de NF- κ B (1,4 vezes; Figura 22E), IL-6 (Figura 22F) e TNF- α (Figura 22G), e aumentou em 2 vezes nos níveis de IL-10 (Figura 22H), em comparação aos valores encontrados em rins de animais H. Podemos sugerir que a trigonelina preveniu os efeitos deletérios promovidos pela ingestão de dieta H no rim, devido às suas ações antioxidante, antiglicação e anti-inflamatória.

O tratamento de animais em dieta H com curcumina em iogurte reduziu em 40% os níveis de TBARS (Figura 22A) e em 26% os AGEs fluorescentes (Figura 22B).

Animais HC também apresentaram redução nos níveis de RAGE (Figura 22C) no rim, em relação ao grupo H, porém não apresentaram alterações nos níveis proteicos de Bax (Figura 22D). O tratamento com curcumina também reduziu o conteúdo renal de NF- κ B (1,3 vezes; Figura 22E), bem como os níveis de IL-6 (2,3 vezes; Figura 22F) e de TNF- α (1,3 vezes; Figura 22G), e aumentou os níveis de IL-10 (2 vezes; Figura 22H), em relação aos valores encontrados em rins de animais do grupo H.

O tratamento de animais em dieta H com a combinação de trigonelina e curcumina em iogurte não promoveu melhorias nos níveis renais de TBARS (Figura 22A), em comparação ao grupo H. Por sua vez, animais HTC apresentaram redução nos níveis de AGEs fluorescentes (Figura 22B) e nos níveis proteicos de RAGE (Figura 22C) e de Bax (Figura 22D). Contudo, o tratamento com a combinação dos ativos naturais não reduziu os níveis de NF- κ B (Figura 22E), pelo contrário, o aumento observado nos níveis deste marcador de inflamação foi até mesmo maior que aquele observado em animais H. Também houve aumento das citocinas IL-6 (Figura 22F) e TNF- α (Figura 22G) e redução nos níveis de IL-10 (Figura 18H) em rim de animais tratados com trigonelina + curcumina em iogurte. Corroborando os resultados obtidos nos tecidos adiposos branco epididimal, fígado e rim, a combinação dos ativos naturais anulou os efeitos benéficos isolados da trigonelina e curcumina.

Figura 22. Níveis de TBARS (A) e AGEs fluorescentes (B), níveis proteicos de RAGE (C), Bax (D) e NF- κ B (E), níveis de citocinas inflamatórias IL-6 (F), TNF- α (G) e citocina anti-inflamatória IL-10 (H) no rim de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.



Os valores representam média $\pm$ erro padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente. As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$.

4.10 Efeitos dos tratamentos com iogurte, trigonelina e/ou curcumina em biomarcadores relacionados ao *status* energético, potencial antioxidante e detoxificação de AGEs no rim de animais obesos

Animais em dieta H apresentaram alterações em biomarcadores relacionados ao *status* energético, potencial antioxidante e componentes que participam da detoxificação de AGEs no rim (Figura 23). Animais H apresentaram redução significativa nos níveis proteicos de SIRT 1 (63%; Figura 23A), níveis de fosforilação de AMPK (52%; Figura 23B) e níveis proteicos de PGC-1 α (24%; Figura 23C) no rim, em relação aos valores encontrados em rins de animais do grupo P. Reduções nos níveis de NRF 2 (61%; Figura 23D) e nas atividades das enzimas antioxidantes SOD (24%; Figura 23E), CAT (36%; Figura 23F) e GSH-Px (30%; Figura 23G) também foram observadas nos rins de animais alimentados com dieta H, em relação aos animais alimentados com dieta P. Animais H também apresentaram redução de 46% no conteúdo renal de GLO 1 (Figura 23H) no rim quando comparados aos animais P, o que pode ter contribuído para os maiores níveis de AGEs fluorescentes neste tecido (Figura 23B). Assim como no fígado, não foram observadas diferenças nos níveis de AGE-R1 em rim de animais H em relação ao grupo P (Figura 23I).

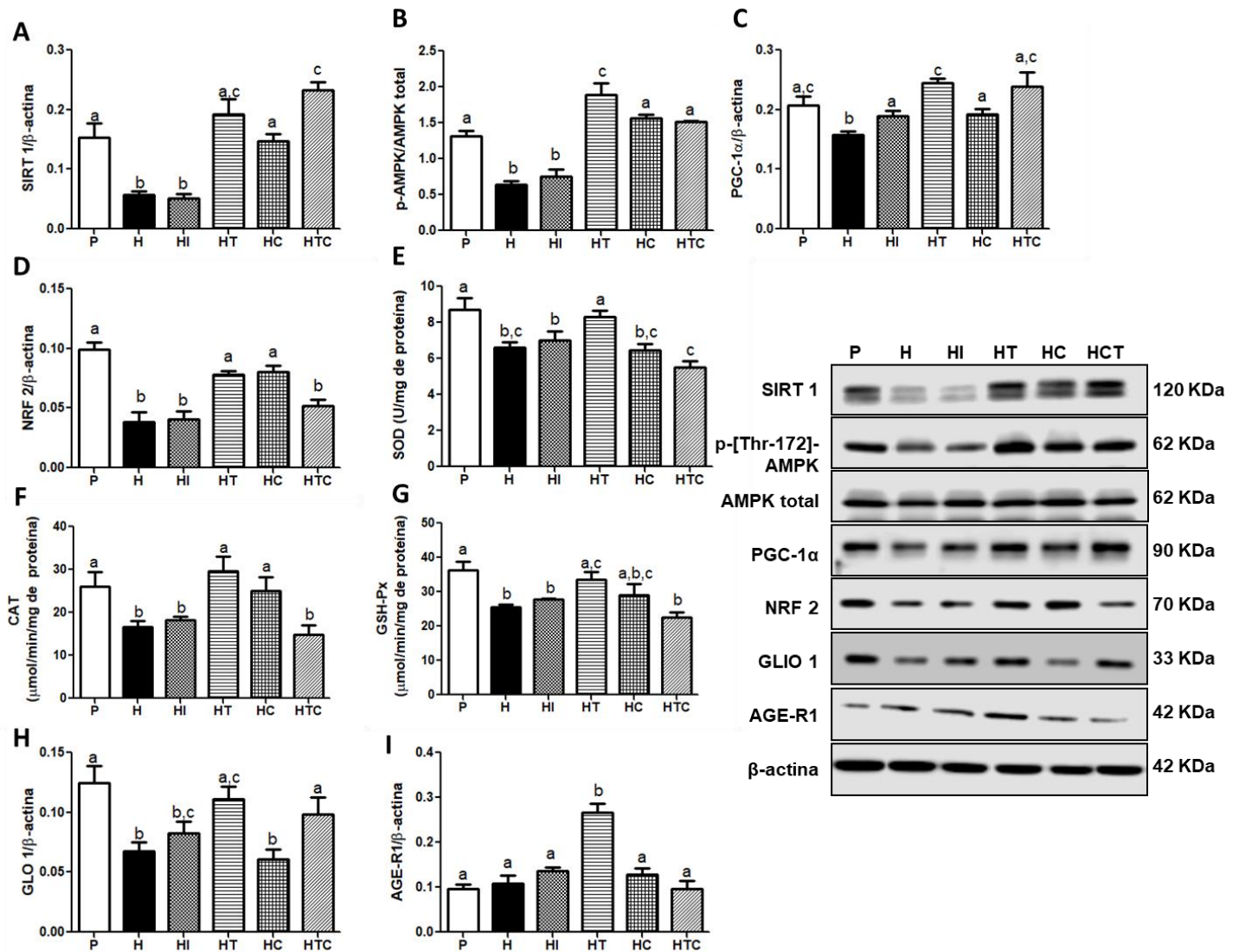
O tratamento de animais em dieta H com iogurte não promoveu mudanças no conteúdo de SIRT 1 (Figura 23A), na fosforilação de AMPK (Figura 23B), nos níveis de PGC-1 α (Figura 23C) e de NRF 2 (Figura 23D) no rim, quando comparado ao grupo H. Animais HI também não apresentaram melhorias nas atividades das enzimas antioxidantes SOD (Figura 23E), CAT (Figura 23F) e GSH-Px (Figura 23G), bem como não apresentaram mudanças nos níveis de GLO 1 (Figura 23H) ou de AGE-R1 (Figura 23I), em comparação aos valores encontrados no grupo H.

O tratamento de animais em dieta H com trigonelina em iogurte melhorou os níveis dos marcadores relacionados ao *status* energético no rim: foi observado um aumento significativo na fosforilação de AMPK (95%, figura 23B), bem como aumentos nos níveis de SIRT 1 (89%; figura 23A), PGC-1 α (42%; figura 23C) e NRF 2 (40%, figura 23D), quando comparado aos animais do grupo H. As atividades das enzimas antioxidantes SOD (Figura 23E), CAT (Figura 23F) e GSH-Px (Figura 23G) também foram aumentadas no rim de animais HT. O potencial antiglicativo da trigonelina pode ser observado via aumento nos níveis renais de GLO 1 (35%) e de AGE-R1 (164%), em relação ao grupo H (Figura 23H e I).

O tratamento de animais em dieta H com curcumina em iogurte aumentou os níveis de fosforilação de AMPK (70%, figura 23B) e os níveis proteicos de SIRT 1 (59%, figura 23A) no rim, quando comparado aos valores no grupo H. Animais HC não apresentaram alterações nos níveis proteicos de PGC-1 α (Figura 23C) em relação ao grupo H. Observou-se um aumento de 42% no conteúdo de NRF 2 (Figura 23D) no rim de animais HC, em relação ao grupo H. O tratamento com curcumina em iogurte não melhorou as atividades de SOD (Figura 23E) ou de GSH-Px (Figura 23G), no entanto, aumentou em 50% a atividade de CAT (Figura 23F) no rim de animais alimentados com dieta H. Animais HC também não apresentaram alterações nos níveis renais de GLO 1 e de AGE-R1 (Figuras 23H e I), em comparação aos valores observados em animais H.

O tratamento de animais em dieta H com a combinação de trigonelina e curcumina em iogurte aumentou os níveis de fosforilação de AMPK (66%, Figura 23B), os níveis proteicos de SIRT 1 (115%, figura 23A) e de PGC-1 α (40%, figura 23C) no rim, em relação ao grupo H. O tratamento com a combinação de ativos naturais em iogurte novamente anulou os efeitos dos tratamentos isolados com trigonelina ou curcumina, uma vez que foram observados no rim baixos níveis de NRF 2 (Figura 23D) e baixas atividades das enzimas antioxidantes SOD (Figura 23E), CAT (Figura 23F) e GSH-Px (Figura 23G), cujos perfis ficaram semelhantes aos observados em rim de animais H. Porém, animais HTC apresentaram aumento nos níveis de GLO 1 no rim (25%; figura 23H), em relação aos animais H. O tratamento com a combinação de trigonelina e curcumina não foi capaz de alterar os níveis de AGE-R1 no rim (Figura 23I) em comparação aos valores observados no grupo H, anulando o benefício promovido pela trigonelina isoladamente.

Figura 23. Níveis proteicos de SIRT 1 (A), níveis de fosforilação de AMPK (B), níveis proteicos de PGC-1 α (C) e NRF 2 (D), atividades de enzimas antioxidantes SOD (E), CAT (F) e GSH-Px (G), níveis proteicos de GLO 1 (H) e AGE-R1 (I) no rim de camundongos alimentados durante 9 semanas com dietas P, H e tratados com iogurte, trigonelina (50 mg/kg) e/ou curcumina (90 mg/kg) em iogurte.



Os valores representam média $\pm$ erro padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si estatisticamente. As diferenças entre os grupos foram consideradas em $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do modelo experimental de obesidade e resistência à insulina

O modelo experimental de obesidade induzida pela ingestão de dieta hiperlipídica é caracterizado pelo aumento da ingestão energética, culminando em aumento no ganho de peso corporal e massas de tecidos adiposos (WINZELL; AHRÉN, 2004; WANG e LIAO, 2013). No presente estudo, camundongos C57BL/6 foram alimentados com uma dieta padrão, normocalórica (P) ou com uma dieta hiperlipídica (H). Tal como esperado, camundongos alimentados com uma dieta rica em lipídeos (H) durante 9 semanas desenvolveram alterações metabólicas associadas à obesidade. A ingestão de dieta H por 9 semanas promoveu um aumento nos níveis plasmáticos de triacilgliceróis, colesterol e HDL-colesterol. A oferta de dieta H também causou redução na sensibilidade à insulina e consequentemente intolerância à glicose. Como um indicador de lesão hepática, foi observada alteração nos níveis plasmáticos de marcador de integridade de hepatócitos (ALT).

Os animais mantidos em dieta H apresentaram aumento da ingestão calórica, bem como aumento nas massas de tecidos adiposos e hipertrofia das células adiposas, o que contribuiu, pelo menos em parte, para o maior ganho de massa corporal. A hipertrofia adinócítica certamente explica o quadro de inflamação observada no tecido adiposo branco epididimal. A inflamação no tecido adiposo branco epididimal foi observada em animais do grupo H via aumento nos níveis proteicos de NF- κ B e nos níveis de adipocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e TNF- α , o que pode ter contribuído para o aumento da resistência à insulina neste tecido, observado via redução na fosforilação de AKT. Uma menor fosforilação de AKT em animais do grupo H também foi observada em músculos *gastrocnemius*. A redução na fosforilação da AKT em tecidos adiposos brancos e no músculo esquelético pode explicar a resistência à insulina, intolerância à glicose e o aumento na glicemia de jejum nos animais do grupo H. Observou-se também redução nos níveis da adipocina anti-inflamatória IL-10 em tecido adiposo branco de animais H, corroborando o aumento de adipocinas pró-inflamatórias e a resistência à insulina. A IL-10 é uma potente citocina imunossupressora que controla a progressão de quadros inflamatórios. Desta maneira, a redução de IL-10 pode prejudicar seus efeitos imunossupressores na inibição da síntese e atividade de adipocinas pró-inflamatórias (IL-

6 e TNF- α), o que por sua vez favorece a resistência à insulina na obesidade (LUMENG et al., 2007; HONG et al., 2009; KWON e PESSIN, 2013).

Sabe-se que o tecido adiposo é um órgão endócrino ativo que secreta adipocinas, tais como leptina, adiponectina, TNF- α , IL-6 e proteína ligadora de retinol-4 (RBP-4). Estas adipocinas podem atuar em outros tecidos, incluindo cérebro, fígado e músculo, participando da regulação da ingestão de alimentos, balanço energético e sensibilidade à insulina (CYPESS; KAHN, 2013). Além da secreção de adipocinas, o tecido adiposo também libera AGL. Os AGL liberados em excesso pelo tecido adiposo podem ativar a sinalização de vias inflamatórias, ao se ligarem ao receptor TRL-4 (*toll-like receptor 4*), induzindo a ativação de IkK. Após ser ativada, a IkK pode fosforilar IRS-1 em resíduos de serina, inibindo assim a sinalização da insulina. A ativação de IkK também culmina em fosforilação de IkB, estimulando sua degradação proteassomal. IkB atua como um inibidor de NF- κ B. Com a degradação de IkB, ocorre subsequente liberação de NF- κ B que, no núcleo, se liga ao DNA e estimula a transcrição gênica de mediadores inflamatórios, incluindo TNF- α e IL-6 (BAKER et al., 2012). A ativação de vias pró-inflamatórias, incluindo o estímulo à produção de TNF- α , inibe a conversão de pré-adipócitos em adipócitos maduros, promovendo a expansão do tecido adiposo, culminando em resistência à insulina, especialmente via inibição de IRS-1 (LAUTERBACH; WUNDERLICH, 2017). Além disso, a influência do TNF- α na resposta imune resulta principalmente em aumento na produção de outras citocinas, tal como a IL-6 (MAKKI, et al., 2013). A IL-6 está fortemente relacionada aos estados inflamatórios crônicos, incluindo inflamação de baixo grau associada à obesidade e ao DM tipo 2. O aumento nos níveis sistêmicos de IL-6 está associado à elevada massa corporal, não apenas em modelos experimentais de obesidade em roedores, mas também em humanos obesos (JUNG; CHOI, 2014).

Além do tecido adiposo branco, o tecido adiposo marrom é importante nos eventos relacionados à termogênese e balanço energético. A ablação do tecido adiposo marrom reduz o gasto de energia e aumenta a obesidade em resposta a oferta de dietas ricas em gordura. A AMPK desempenha um papel vital na regulação, desenvolvimento e na manutenção da função mitocondrial do tecido adiposo marrom (DESJARDINS; STEINBERG, 2018). A ativação da AMPK em tecido adiposo marrom suprime PPAR γ e inibe a adipogênese, o que consequentemente reduz o acúmulo de gorduras (LI et al., 2018). A fosforilação da AMPK inibe a síntese de lipídeos via redução na expressão gênica de acetil-CoA carboxilase (ACC) (RUDERMAN; PRENTKI, 2004). Nossos

resultados mostram que animais obesos apresentam uma redução na fosforilação de AMPK em associação ao aumento da massa do tecido adiposo marrom em animais do grupo H.

A fim de avaliar as alterações em marcadores da termogênese em tecido adiposo marrom de animais H, foram avaliados os conteúdos de UCP 1. O aumento nos níveis proteicos de UCP 1 e a redução na fosforilação de AMPK sugerem que uma resposta termogênica adaptativa foi induzida pela ingestão da dieta hiperlipídica (FINK et al., 2007; SO et al. 2009; FROMME; KLINGENS, 2010; GARCÍA-RUIZ et al., 2015). Para a atividade termogênica, o tecido adiposo marrom utiliza os lipídeos armazenados, bem como os triglicerídeos e glicose da circulação sistêmica como substratos para a termogênese (WU et al., 2012; BERANGER et al., 2013). Como resultado, embora animais H tenham níveis aumentados de UCP 1 no tecido adiposo marrom, tal resposta parece não ter sido suficiente para atenuar os níveis circulantes de glicose e triacilgliceróis, contribuindo para os aumentos observados nas massas de tecidos adiposos brancos, marrom e massa corporal.

A obesidade possui dois principais componentes participantes da instalação e manutenção da resistência a insulina: a lipotoxicidade e a inflamação crônica de baixo grau, em fígado, músculo esquelético e tecido adiposo (GUILHERME et al., 2008; GLASS; OLEFSKY, 2012). Em relação à lipotoxicidade, quando a ingestão de energia excede a capacidade de armazenamento dos tecidos adiposos brancos, o acúmulo de lipídeos em outros tecidos é favorecido. O principal determinante da lipotoxicidade parece ser o aumento nos níveis de AG, culminando em acúmulo de metabólitos potencialmente tóxicos em tecidos não-adiposos (GLASS; OLEFSKY, 2012). O aumento no peso do fígado observado em animais H pode estar relacionado à deposição ectópica de AG e/ou acúmulo de triacilgliceróis nos hepatócitos, que por sua vez podem contribuir para o desenvolvimento de doença hepática não-alcoólica (DHNA), e em sua forma mais grave, esteatose hepática não alcoólica (EHNA), podendo progredir para fibrose e cirrose (ZÁMBÓ et al., 2013). Já no rim, o acúmulo de lipídeos nas células glomerulares e túbulos intersticiais aumentam a expressão da proteína de ligação ao elemento regulador de esteróis (SREBP-1), um fator de transcrição que desempenha papel fundamental na expressão de genes relacionados à lipogênese (acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintase) (DECLÈVES et al., 2013; MARTINS; MÁ, 2015). Aumento na deposição de triacilgliceróis nos rins devido à ingestão de dietas hiperlipídicas pode explicar, pelo menos em parte, o aumento observado na massa deste

tecido, em animais H. Portanto, faz-se necessária a realização da análise do conteúdo de triacilgliceróis em fígado e rim de camundongos mantidos em dieta H por 9 semanas.

Os resultados de nosso estudo sugerem que o aumento dos níveis circulantes de glicose e triacilgliceróis, bem como o possível aumento no armazenamento de AG promovido pelo excesso de nutrientes, podem estar associados ao estabelecimento da resistência insulínica. Essas alterações também criam uma condição favorável para o aumento excessivo na geração de ERO, estes participantes do estresse oxidativo (FURUKAWA et al., 2017).

Um equilíbrio entre os níveis de compostos oxidantes e antioxidantes é essencial para o funcionamento adequado do organismo. Porém, um aumento na produção de ERO é uma das várias respostas celulares frente ao excesso no fornecimento de nutrientes, condição esta que ocorre na obesidade, bem como o alto teor de glicose, AG saturados e AG do tipo trans, que participam do estabelecimento do estresse oxidativo via mecanismos, que incluem: aumento na geração de ânion superóxido via aumento na atividade de NADPH oxidase, aumento no fluxo de substratos pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, aumento na auto-oxidação da glicose, ativação de proteína quinase C (PKC), e aumento no fluxo de substrato pelas vias do poliol e hexosamina. Assim, na obesidade, especificamente em relação ao metabolismo oxidativo mitocondrial, o excesso de AG e glicose e sua oxidação culminam em aumento na oferta de elétrons (transportados por NADH e FADH_2 para a cadeia transportadora de elétrons), e tal condição favorece que elétrons encontrem o oxigênio, gerando ERO, tal como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, entre outros (SERRA et al., 2013; DE MELLO et al., 2018).

Os principais antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH-Px), que atuam por meio de mecanismos de prevenção e/ou controle da formação de ERO. A enzima antioxidante paraoxonase 1 (PON 1), ligada à HDL, protege a LDL e células circulantes contra danos oxidativos, prevenindo respostas inflamatórias nas células endoteliais de parede arterial.

Assim, o estresse oxidativo tem origem no desequilíbrio entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes, em favor da produção excessiva de ERO ou em detrimento da velocidade de sua remoção pelos antioxidantes. O estresse oxidativo pode levar à oxidação de biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA, com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o potencial dano oxidativo observado em células e tecidos. Além disso, ao danificar

estruturas celulares, o estresse oxidativo pode desencadear ou potencializar uma resposta inflamatória (SAVINI et al., 2013).

No presente estudo, o estresse oxidativo foi evidenciado em animais obesos H via aumento da lipoperoxidação, com níveis elevados de TBARS (plasma, fígado e rim), redução na atividade da PON 1 (plasma) e nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px (fígado e rim). Observou-se também redução na expressão de NRF 2 no fígado e rim de animais H. Considerando que NRF 2 é um importante fator de transcrição reconhecido na modulação da resposta antioxidante (LIN et al, 2016), a redução nos níveis de NRF 2 corroboram a redução observada na atividade das enzimas antioxidantes em animais obesos H, o que pode contribuir para a ocorrência de acúmulo de ERO, dando origem a um quadro de estresse oxidativo (BIRBEN et al., 2012).

Além da geração de ERO nas mitocôndrias, aumentos nos níveis de AGEs também exacerbam a formação de ERO. AGEs são formados sob condições hiperglicêmicas; muitos AGEs são gerados por uma combinação entre processos de glicação e oxidação, assim podem desencadear ou exacerbar o estresse oxidativo. A formação de AGEs ocorre lentamente, sob condições fisiológicas, porém sob condições de resistência à insulina, hiperglicemia e peroxidação lipídica, a velocidade de geração de AGEs aumenta consideravelmente, contribuindo para o desenvolvimento das complicações da obesidade, DM, aterosclerose, insuficiência renal, esteatose e cirrose hepáticas. Além das mudanças diretas nas estruturas e funções das proteínas, a lesão mediada por AGEs também ocorre via ligação dos AGEs aos receptores RAGE (SANTOS et al., 2013; NOWOTNY et al., 2015). A sinalização dependente de AGE-RAGE ativa NADPH oxidase, aumentando a formação de ERO (CHEN et al., 2018). Os produtos finais de lipoxidação avançada (ALEs), incluindo 4-hidroxinonenal (HNE) e hidroxicenel α,β -insaturado, são formados por mecanismos envolvendo a peroxidação lipídica; essas espécies reativas podem formar adutos com proteínas, muitas vezes resultando em disfunção proteica (CANNIZZARO et al., 2017). Desta forma, de acordo com os achados do presente estudo, o aumento na intolerância à glicose, resistência à insulina e estresse oxidativo induzido por dieta hiperlipídica em camundongos promoveu um aumento nos níveis de AGEs fluorescentes no plasma, fígado e rim. Animais obesos também apresentaram aumento nos níveis proteicos de RAGE no fígado e rim, o que pode ter contribuído para ativação de apoptose nestes tecidos; a indução de apoptose em fígado e rim de animais H foi evidenciada pelos aumentos nos níveis da proteína pró-apoptótica Bax.

A interação entre AGEs e RAGE também favorece a inflamação. A ativação de RAGE desencadeia vias de sinalização intracelulares dependentes de fosfatidilinositol-3-quinase e proteínas quinases ativadas por mitógeno ERK1 e ERK2. Essas vias culminam na ativação de NF- κ B e subsequente indução de expressão gênica pró-inflamatória dirigida este fator (OLIVEIRA et al., 2013; BONGARZONE et al., 2017). A ativação do NF- κ B-p65, após a ligação do RAGE, prolonga as respostas pró-inflamatórias e promove assim subsequente disfunção celular (POP-BUSUI; PIETROPAOLO, 2011). Como o próprio RAGE é regulado pelo NF- κ B, estes eventos podem aumentar, amplificar e sustentar a disfunção celular. Com o estabelecimento da inflamação, o estresse oxidativo é amplificado por aumento na produção de ERO, bem como via redução na atividade de SOD. Por fim, a sinalização de RAGE também promove a apoptose aumentando a expressão de proteínas pró-apoptóticas (Bax, citocromo C, caspase-9, caspase-3) e diminuindo a expressão de Bcl-2 (proteína antiapoptótica) (PALANISSAMI; PAUL, 2018). De acordo com nossos achados, a ativação de RAGE em animais obesos H pode ter contribuído para o aumento da inflamação no fígado e rim, via aumento nos níveis proteicos de NF- κ B, bem como das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α , e redução nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10. O aumento da inflamação por meio da ativação de NF- κ B, por sua vez, também pode ter contribuído para os maiores níveis proteicos de RAGE no fígado e rim de animais obesos, tornando-se assim um ciclo vicioso.

Além da capacidade de se ligarem aos RAGE, Os AGEs também exercem seus efeitos via interação com outros tipos de receptores específicos presentes em superfícies celulares. A família do complexo AGE-R, incluindo AGE-R1, detoxifica AGEs e contribui para a contra-regulação de potentes sinais pró-inflamatórios desencadeados pelas vias dependentes de AGE-RAGE (LU et al., 2004). Os AGEs aumentados induzem, como contrapartida, uma expressão aumentada de AGE-R1, cuja ativação suprime RAGE, e pode assim atenuar o estresse glicoxidativo celular (OTT et al., 2014).

Além dos AGE-r, outro sistema de detoxificação dos AGEs é o sistema da glioxalase. O sistema da glioxalase é composto pelas enzimas GLO 1 e GLO2; este sistema suprime a formação e o acúmulo de AGEs via eliminação de compostos precursores de AGEs, em especial o metilglioxal. Assim, em resposta ao estresse dicarbonílico (acúmulo de metilglioxal), o NRF 2 aumenta a regulação de GLO 1. Em modelo de obesidade em camundongos mutantes de leptina (ob/ob), a proteína GLO 1

encontra-se reduzida em fígado (SANCHES et al., 2002). Tem sido descrito um aumento no ganho de peso em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e com deficiência de GLO 1, por outro lado há diminuição no ganho de peso em camundongos superexpressando GLO 1 (MAESSEN et al., 2014; RABANNI et al., 2016), sugerindo um papel funcional da GLO 1 não somente no estresse glicativo, mas também no ganho ponderal. Nossos resultados mostram que, apesar de serem observados níveis elevados de AGEs e RAGE no fígado e rim de animais obesos, os mecanismos de detoxificação dos AGEs, incluindo GLO 1 e AGE-R1, não foram alterados nestes animais que receberam dieta hiperlipídica, somente os níveis de GLO 1, que se encontram diminuídos em rim de animais H.

Defeitos na função oxidativa mitocondrial e a subsequente diminuição do gasto energético podem contribuir para as disfunções metabólicas observadas na obesidade, via redução de sensores energéticos metabólicos (BOURNAT e BROWN, 2016). Os efetores intracelulares AMPK e SIRT 1 são importantes sensores de nutrientes, e podem atuar como reguladores inflamatórios. Quando ativados, AMPK e SIRT 1 inibem a produção hepática de glicose, síntese de colesterol e de triacilgliceróis, e estimulam a oxidação dos ácidos graxos. A AMPK inibe indiretamente a sinalização de NF- κ B através dos mediadores SIRT 1 e PGC-1 α , controlando a expressão de fatores inflamatórios (ZHANG et al., 2017). Por outro lado, AMPK também pode ser inibida em resposta à inflamação crônica de baixo grau por TNF- α e IL-6 (STEINBERG et al., 2006). A redução nos níveis de SIRT 1 também pode induzir a inflamação, via aumento na expressão de genes inflamatórios (ZHAO et al., 2017). O alto consumo calórico inibe a atividade da AMPK devido aos altos níveis de ATP intracelular. Isso reduz os níveis NAD⁺ e assim a atividade de SIRT 1. Como consequência, os reguladores transcricionais que estão sujeitos à desacetilação de SIRT 1 são inibidos, incluindo PGC-1 α . Consequentemente, pode ocorrer inibição na atividade de NRF 2 que, tal como dito anteriormente, tem importante papel na modulação da atividade mitocondrial e na expressão de enzimas antioxidantes (OLMOS et al., 2013; GAO et al., 2014; DI EMIDIO et al., 2019). Desta forma, o aumento de marcadores inflamatórios em no fígado e rim de animais H, em associação ao elevado consumo energético, podem ter contribuído para a redução observada nos níveis proteicos de SIRT 1, AMPK, PGC-1 α e NRF 2, a atividade prejudicada destes componentes pode ter sustentado a inflamação e o estresse glicoxidativo em fígado e rim de animais obesos do grupo H.

Sendo assim, a ingestão de dieta hiperlipídica promoveu diversas alterações metabólicas conduzindo à inflamação, estresse glicoxidativo, apoptose e mudanças significativas no *status* energético em fígado e rim. Com isso, torna-se importante o estudo de ativos naturais na prevenção/atenuação das complicações associadas à obesidade.

5.2 Tratamento com iogurte na atenuação dos distúrbios metabólicos em modelo animal de obesidade e resistência à insulina

O tratamento de animais H com iogurte promoveu melhorias importantes em diversos parâmetros alterados em camundongos devido à ingestão da dieta hiperlipídica, em relação aos animais obesos não tratados. O tratamento com iogurte preveniu o aumento da ingestão calórica e do ganho de peso corporal, promoveu redução nas massas de tecidos adiposos e tamanho de adipócitos, reduziu os níveis de glicemia de jejum, triacilgliceróis e colesterol, melhorou a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina, e aumentou os níveis de fosforilação de AKT em tecido muscular. O tratamento com iogurte não melhorou a fosforilação de AKT no tecido adiposo branco epididimal, mas preveniu a inflamação neste tecido devido à redução nos níveis de NF- κ B e adipocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e aumento nos níveis de IL-10.

Os efeitos do iogurte na redução da massa corporal podem estar relacionados aos mecanismos mediados por bactérias probióticas (BORGERAAS et al. 2018). Estudos mostram um aumento nas bactérias dos filos de Firmicutes e uma diminuição nos filos de Bacteroidetes na obesidade, e acredita-se que tal alteração esteja associada ao aumento na absorção de energia dos alimentos, bem como ao aumento na inflamação de baixo grau (JOHNSON et al., 2017; LECOMTE et al., 2015). O consumo de probióticos regula a microbiota intestinal, podendo ser uma estratégia eficaz que contribui para a perda de peso em casos de sobrepeso e obesidade (PAHWA et al., 2017).

A redução nas massas de tecidos adiposos e tamanho de adipócitos, e possivelmente a redução das massas de fígado e rim após o tratamento de animais em dieta H com iogurte, em conjunto podem ter relação com um aumento na oxidação de ácidos graxos. Park et al. (2013) observaram um aumento na expressão de genes do metabolismo energético em animais obesos suplementados com *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus plantarum*, incluindo PGC-1 α , CPT 1, CPT 2 e ACOX 1, estes estão relacionados ao aumento na oxidação de ácidos graxos no fígado. Em nosso estudo, observamos um aumento significativo na fosforilação de AMPK no tecido adiposo

marrom e fígado de animais em dieta H e tratados com iogurte, o que pode estar relacionado ao menor ganho de massa nestes tecidos, uma vez que a fosforilação de AMPK estimula a oxidação de ácidos graxos (PULINILKUNNIL et al., 2011; MOTTILLO et al., 2016)

Efeitos de probióticos nos níveis de colesterol têm sido atribuídos a um conjunto de mecanismos: (i) inibição da síntese de colesterol pelos produtos de fermentação de bactérias lácticas, principalmente ácidos graxos de cadeia curta; (ii) facilitam a eliminação do colesterol pelas fezes; (iii) inibição da absorção de colesterol no intestino; (iv) interferem na reabsorção de sais biliares, facilitando sua eliminação e mobilização para produzir sais biliares, resultando em uma queda nos níveis circulantes de colesterol (MOROTI et al., 2012; LEE et al., 2009). Algumas espécies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* e *Streptococcus* demonstraram ter a capacidade de diminuir os níveis de colesterol no plasma. Bactérias probióticas podem reduzir a reabsorção de ácidos biliares via mecanismos que envolvem a circulação entero-hepática (OOI; LIONG, 2010).

O consumo de probióticos é capaz de modular o perfil da microbiota intestinal, seus produtos e metabólitos (LPS e AGCC); consequentemente, os níveis circulantes de LPS e o estado inflamatório são reduzidos em tecidos sensíveis à insulina, assim como reduzem a S-nitrosilação de macromoléculas em músculos e a infiltração de macrófagos no fígado e tecido adiposo, promovendo assim aumento da sensibilidade à insulina e redução do estresse oxidativo (CARVALHO; SAAD, 2013).

Nossos resultados sugerem que o tratamento de animais em dieta H com iogurte reduziu a inflamação via aumento da IL-10 (tecido adiposo epididimal e fígado), redução nos níveis de NF- κ B, IL-6 e TNF- α no tecido adiposo epididimal e fígado. O aumento da fosforilação de AMPK e nos níveis de PGC1- α no fígado de animais tratados com iogurte também pode ter contribuído para uma menor expressão de NF- κ B (SALMINEN et al., 2011), prevenindo o desenvolvimento de processos inflamatórios nesse tecido. Embora no rim o iogurte não tenha alterado os níveis de NF- κ B, seu potencial efeito anti-inflamatório neste tecido parece estar relacionado ao aumento de IL-10 e redução nos níveis de IL-6 e TNF- α .

Os probióticos podem produzir vários metabólitos benéficos, com atividade antioxidante, tais como glutatona, butirato e folato. O efeito de probióticos no estresse oxidativo também está associado à diminuição nos níveis de TBARS, quelação de íons metálicos, prevenção da produção de óxido nítrico, aumento nas atividades das enzimas

antioxidantes SOD e CAT, aumento de NRF 2 e diminuição na atividade de NOX (HAMER et al., 2009; LEBLANC et al., 2011; SPYROPOULOS et al., 2011; AL-SHERAJI et al., 2012; WANG et al., 2017). Nossos resultados mostram que o tratamento de animais em dieta H com iogurte atenuou o estresse oxidativo via aumento na atividade de PON 1 e redução dos níveis de TBARS no plasma. Entretanto, o tratamento com iogurte não preveniu o estresse oxidativo no fígado e rim em animais H, uma vez que os níveis de TBARS e atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GSH-Px) ficaram semelhantes entre animais HI e H.

O aumento na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina em animais tratados com iogurte pode ter contribuído para a atenuação do estresse glicativo, uma vez que houve redução nos níveis de AGEs no plasma, fígado e rim, bem como redução nos níveis proteicos de RAGE (fígado e rim). A inibição na cascata de sinalização RAGE resulta em redução da inflamação e apoptose celular (MAO et al., 2018). Figarola et al. (2014) sugeriram que o metilglioxal é capaz de induzir apoptose em células endoteliais humanas. Assim, corroborando estes achados, podemos sugerir que os menores níveis da proteína pró-apoptótica Bax no fígado e rim de animais tratados com iogurte pode se dar via inibição de RAGE.

Em resumo, o tratamento com iogurte promoveu diversos benefícios em animais alimentados com dieta hiperlipídica, tais como: redução da ingestão alimentar, do ganho de massa corporal, da hipertrofia adipocítica, bem como o aumento da sensibilidade a insulina e da tolerância à glicose. Também se encontrou associado a efeitos anti-inflamatórios (tecido adiposo epididimal, fígado e rim). Com base nesses resultados, torna-se interessante o estudo da adição de ativos naturais em iogurte na tentativa de potencializar seus efeitos, em especial agregar potencial antioxidante e anti-AGE, e assim prevenir os distúrbios associados à obesidade.

5.3 Tratamento com trigonelina em iogurte na atenuação dos distúrbios metabólicos em modelo animal de obesidade e resistência à insulina

O tratamento de animais mantidos em dieta H com trigonelina em iogurte praticamente preveniu todas as alterações avaliadas neste modelo experimental de obesidade. Observou-se que a trigonelina agregou valor adicional aos benefícios já observados somente com o iogurte, quando animais alimentados com dieta H foram tratados com iogurte enriquecido com trigonelina.

Houve redução significativa da ingestão calórica, seguida de menor ganho de peso corporal, bem como redução nas massas de tecidos adiposos e tamanho de adipócitos; ocorreu redução da glicemia de jejum, dos níveis circulantes de triacilgliceróis e colesterol, e aumento da tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina em animais HT. Estudos têm demonstrado que a trigonelina é capaz de inibir a adipogênese via redução na expressão de PPAR γ , bem como é capaz de reduzir o acúmulo de lipídeos em adipócitos (ILAVENIL et al., 2014). Ramulu et al. (2011) relataram que as sementes de feno-grego (*Trigonella-foenum-graecum* L.) diminuem os níveis de colesterol via redução na atividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase. Estudo realizado por Yoshinari e Igarashi (2010) mostrou que a trigonelina melhorou a tolerância à glicose, glicemia de jejum e os níveis de insulina sérica via aumento na razão glicoquinase/glicose-6-P no fígado, e redução nos níveis de TNF- α em animais KK-A^y (modelo experimental de DM tipo 2).

O potencial anti-inflamatório da trigonelina foi observado em nosso estudo principalmente em tecido adiposo branco epididimal. O tratamento de animais em dieta H com trigonelina promoveu aumento nos níveis de IL-10, bem como redução nos níveis de NF- κ B, IL-6 e TNF- α , o que pode ter contribuído para o aumento na fosforilação de AKT estimulada pela insulina, neste tecido. Assim, podemos sugerir que o potencial anti-inflamatório da trigonelina contribuiu para o aumento da sensibilidade à insulina em tecido adiposo branco visceral, o que corrobora, pelo menos em parte, os benefícios deste tratamento na tolerância à glicose.

No tecido adiposo marrom, o tratamento com trigonelina promoveu aumento significativo de SIRT 1 e na fosforilação de AMPK. Curiosamente, não aumentou os níveis de PGC-1 α e UCP 1, mas aumentou o conteúdo de NRF 2. A ativação de SIRT 1/AMPK desempenha um papel central na regulação do metabolismo dos ácidos graxos (SCHUG; LI, 2011). Tanto NRF 2 quanto SIRT 1 são conhecidos por proteger as células de distúrbios relacionados ao estresse oxidativo (TANG, 2016; DAVID et al., 2017); assim, o aumento da via SIRT 1/AMPK/NRF 2 está envolvido na inibição do estresse oxidativo e inflamação. No entanto, mais investigações são necessárias para interpretar a importância da ativação de SIRT 1/AMPK/NRF 2 por trigonelina no tecido adiposo marrom de animais alimentados com dieta H. Sabendo-se que a ativação de SIRT 1 e AMPK inibe a síntese (via ACC) e aumenta a oxidação (via CPT 1) de ácidos graxos, culminando assim em redução no acúmulo ectópico de lipídeos (PINKY GAIDHU; CEDDIA, 2017), tais ações podem ter contribuído para a manutenção da

massa de tecido adiposo marrom de animais em dieta H e tratados com trigonelina após 9 semanas.

A trigonelina mostrou potente efeito protetor contra o estresse oxidativo e glicativo, no plasma, uma vez que houve redução nos níveis de TBARS e AGEs. Animais HT também apresentaram aumento na atividade da enzima antioxidante PON 1, o que por sua vez pode ter contribuído para a redução do estresse glicoxidativo no plasma. A atividade de PON 1 pode ser inibida por processos de oxidação de glicação (BANSAL et al., 2013; YAMAMOTO, 2018). O aumento na atividade de PON 1, via hidrólise de peróxidos lipídicos, pode contribuir para a atenuação do estresse oxidativo associado a doenças cardiovasculares na obesidade e no diabetes mellitus (KOTUR-STEVLJEVIC et al., 2008).

Corroborando os efeitos antiglicativos plasmáticos da trigonelina em animais alimentados com dieta hiperlipídica, um estudo realizado por Chowdhury et al. (2017) demonstrou potente efeito anti-glicação *in vitro* da trigonelina. Aldakinah et al. (2017) também relataram que a ação da trigonelina na redução da glicemia culmina em redução de proteínas glicadas e produtos relacionados à glicação, tais como frutossamina e AGEs.

Outro papel importante da trigonelina está na sua capacidade em reduzir e prevenir danos hepáticos e renais. Tem sido sugerido que a trigonelina pode auxiliar no tratamento de doenças hepáticas não alcoólicas (AFIFI et al., 2016). A trigonelina é capaz de reduzir a apoptose nos hepatócitos via aumento na expressão da proteína Bcl-2 e diminuir os níveis da proteína Bax (ZHANG et al., 2015). Alterações degenerativas no rim, incluindo fibrose no tecido renal em ratos diabéticos, foram também reduzidas após o tratamento com trigonelina (GHULE et al., 2012).

Nossos resultados indicam que a trigonelina promoveu proteção hepática e renal via redução nos níveis de TBARS, AGEs e níveis proteicos de RAGE no fígado e rim. A redução do estresse glicoxidativo após o tratamento com trigonelina em iogurte contribuiu também para redução nos níveis de Bax, em relação ao grupo H e também aos demais grupos (P, HI, HC e HTC), prevenindo assim a apoptose no fígado e rim. O tratamento com trigonelina também apresentou importante efeito anti-inflamatório no fígado e rim de animais em dieta hiperlipídica, observado via aumento da citocina anti-inflamatória IL-10, redução nos níveis proteicos de NF- κ B e redução das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α . A redução nos níveis de NF- κ B após o tratamento com trigonelina pode ter participação na redução dos níveis proteicos de RAGE, e vice-versa.

O fígado é um dos órgãos onde a SIRT 1 desempenha papel crucial na regulação do metabolismo lipídico e da inflamação, modificando o *status* de acetilação de várias moléculas-alvo, incluindo histonas, reguladores transcricionais e seus co-reguladores (YOU et al., 2015). Acreditamos que parte do efeito protetor da trigonelina no fígado, promovendo redução do estresse oxidativo, inflamação e apoptose de animais em dieta H pode estar associado ao aumento nos níveis de SIRT 1. Estudos têm demonstrado que SIRT 1 reduz o nível de estresse oxidativo e a extensão da inflamação no coração e cérebro de ratos (ALCENDOR et al., 2007; SHAH et al., 2017). Ajmo et al. (2008) observaram que o tratamento com resveratrol estimulou SIRT 1 e atenuou a esteatose hepática em camundongos obesos. Estudos recentes têm relacionado SIRT 1 com a translocação nuclear de NRF 2, contribuindo para a proteção contra o dano celular causado pelo estresse oxidativo (CHAI et al., 2018; SHI et al., 2019). Shah et al. (2017) sugerem que estratégias que ativem a via SIRT 1/NRF 2 podem ser interessantes na inibição de distúrbios neurodegenerativos induzidos por LPS em ratos tratados com melatonina. O aumento nos níveis de NRF 2 no fígado de animais tratados com trigonelina pode ter relação com os aumentos observados em SIRT 1, consequentemente contribuindo para os aumentos nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px, protegendo o tecido contra os danos oxidativos promovidos pela dieta hiperlipídica.

Um potencial efeito benéfico do tratamento com trigonelina foi observado no rim de animais mantidos em dieta hiperlipídica. A trigonelina parece ter aumentado os níveis de componentes do eixo SIRT 1/AMPK/PGC-1 α , protegendo o rim contra os danos promovidos pela dieta hiperlipídica. A fosforilação mediada por AMPK e a desacetilação mediada por SIRT 1 aumentam a atividade de PGC-1 α (CANTÓ et al., 2009). A ativação de PGC-1 α oferece possibilidades interessantes para a atenuação de doenças renais. Sabe-se que a redução de PGC-1 α leva a uma maior suscetibilidade à fibrose na doença renal crônica (EMMA et al., 2016). Como descrito na caracterização do modelo de obesidade, SIRT 1, AMPK e PGC-1 α estão fortemente interligadas na modulação da homeostase energética. Assim, a trigonelina pode ser um importante ativo natural na prevenção de complicações renais, via aumento na expressão dessas proteínas.

Como um co-ativador de fatores de transcrição, o PGC-1 α pode se ligar a membros da família de receptores nucleares, incluindo o NRF 2 (SINGH et al., 2016). No rim, tanto SIRT 1 quanto PGC-1 α podem ter contribuído para os maiores níveis de NRF 2

em animais tratados com trigonelina. NRF 2 controla a expressão de genes cujos produtos aumentam a capacidade antioxidante celular. NRF 2 aumenta a expressão de componentes dos sistemas de defesa antioxidantes, incluindo SOD, CAT e GSH-Px (NGUYEN et al., 2009; MA, 2013). Nossos resultados sugerem que a ativação do eixo SIRT 1/AMPK/ PGC-1 α /NRF 2 pelo tratamento de animais em dieta H com trigonelina pode ter contribuído para os aumentos observados nas atividades de SOD, CAT e GSH-Px no rim, reduzindo o estresse oxidativo. Yoshinari et al. (2013) observaram que a administração de trigonelina em ratos GK (Goto Kakizaki; modelo experimental de DM tipo 2) aumenta as atividades de SOD, CAT e GSH-Px e reduz os níveis de hemoglobina glicada. O tratamento de ratos diabéticos com trigonelina foi capaz de promover, em pâncreas, redução de óxido nítrico e malondialdeído, e aumento nas atividades de SOD e CAT e nos níveis de GSH (SUBRAMANIAN; PRASATH, 2014). O tratamento de ratos diabéticos com sementes de *Trigonella-foenum-graecum* L. restaurou as atividades de SOD, CAT, GSH-Px (glutathione peroxidase) e GSH-Rd (glutathione reductase) no fígado e rim (GENET et al., 2002; MOHAMAD et al., 2004), e reduziu a lipoperoxidação (XUE et al., 2011) em fígado e rim.

Os AGEs são metabólitos tóxicos produzidos em excesso em condições de hiperglicemia (WAUTIER., 2017). A produção dos AGEs pode ser atenuada pela ação do sistema da glioxalase. Neste sistema, a enzima GLO 1 catalisa a conversão de metilglioxal em SD-lactilglutathione, em reação dependente de GSH, a qual é posteriormente metabolizada em D-lactato por ação da GLO 2. GLO 2 e NRF 2 estão envolvidos na reciclagem de GSH, fornecendo o co-fator essencial para a atividade enzimática de GLO 1 (HOLLENBACH, 2017). Ativadores de NRF 2 induzem aumento na expressão gênica e na atividade de GLO 1 (XUE et al., 2012). O aumento na expressão de GLO 1 diminui as concentrações de adutos proteicos derivados de metilglioxal. No entanto, em condições que culminam em níveis elevados de AGEs, e que são frequentemente acompanhadas de aumento no estresse oxidativo, ambos a saturação do sistema da glioxalase e a exaustão da ativação de NRF 2 podem ocorrer (XUE et al., 2012; MASTROCOLA, 2017). Podemos sugerir que o aumento nos níveis de NRF 2 em animais tratados com trigonelina pode ter contribuído para os aumentos observados nos níveis de GLO 1 em fígado e rim, o que pode contribuir para explicar a redução dos níveis de AGEs nestes tecidos.

Além do aumento em GLO 1, a trigonelina também aumentou os níveis de AGE-R1 no fígado e rim de animais alimentados com a dieta H, o que pode ter contribuído para

seus efeitos anti-glicação, em associação aos menores níveis de AGEs e de RAGE. Ao sequestrar e degradar proteínas modificadas por AGEs, o AGE-R1 impede o acúmulo dessas moléculas no citoplasma e no meio extracelular, o que pode contribuir para o não estímulo à produção de ERO ou de novos AGEs, suprimindo a lesão tecidual (VLASSARA et al, 2009; URIBARRI et al., 2011; VLASSARA et al., 2011).

Por fim, o tratamento com trigonelina em iogurte contribuiu significativamente para a redução da ingestão alimentar, bem como massa corporal, culminando em menor hipertrofia adipocítica, o que pode ter contribuído para a redução da inflamação e para o aumento da sensibilidade à insulina e tolerância à glicose. Efeitos importantes deste tratamento também foram observados em rim, o qual antenuou o estresse glicativo, oxidativo e a inflamação, bem como promoveu aumento importante em sensores do *status* energético, contribuindo para a manutenção/proteção do tecido renal de animais em dieta hiperlipídica.

5.4 Tratamento com curcumina em iogurte na atenuação dos distúrbios metabólicos em modelo animal de obesidade e resistência à insulina

Embora com menor intensidade em comparação aos efeitos da trigonelina, a curcumina em iogurte atenuou algumas alterações relacionadas à obesidade nos animais alimentados com dieta hiperlipídica. O tratamento com curcumina promoveu redução da ingestão calórica e assim menor ganho de peso corporal, quando comparado aos animais do grupo H. A atenuação no ganho de peso corporal foi corroborada pela redução nas massas de tecidos adiposos marrom e brancos epididimal e retroperitoneal, bem como foi observada uma redução da hipertrofia adipocítica em tecido adiposo branco epididimal.

A redução da hipertrofia no tecido adiposo branco epididimal em animais tratados com curcumina pode ter participação na atenuação da inflamação, observada pelos menores níveis de NF- κ B e de adipocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α . A curcumina não apresentou ação em IL-10 no tecido adiposo branco. O tratamento com curcumina não promoveu recuperação na capacidade de fosforilar a AKT, mesmo reduzindo a inflamação no tecido adiposo branco epididimal. Entretanto, aumentou significativamente a fosforilação de AKT no músculo *gastrocnemius*, o que pode ter participação na melhoria da sensibilidade à insulina e tolerância à glicose.

Estudos apontam que a ação da curcumina na atenuação da obesidade se deve a diversas ações, incluindo potencial anti-inflamatório, capacidade de inibição da

diferenciação de pré-adipócitos e potencial antioxidante (KIM et al., 2011; LONE et al., 2017). Segundo Kobori et al. (2018), a oferta de curcumina a animais alimentados com dieta hiperlipídica suprimiu o estresse do retículo endoplasmático, bem como reduziu o acúmulo de macrófagos e os níveis de NF- κ B no tecido adiposo epididimal, reduziu a expressão de leptina, e estimulou a lipólise no tecido adiposo branco epididimal, contribuindo para a redução da hipertrofia adipocítica. Em contrapartida, um estudo recente realizado por Silva et al. (2019) mostrou que a suplementação de curcumina a animais alimentados com dieta hiperlipídica não melhorou o peso corporal, a adiposidade, glicemia, dislipidemia e a intolerância à glicose, em relação aos animais mantidos em dieta hiperlipídica e não tratados.

Em determinadas condições, adipócitos tipo “marrom” ou adipócitos beges podem se desenvolver dentro do tecido adiposo branco, com características semelhantes aos adipócitos marrons, utilizando ácidos graxos para produzir calor (MULYA; KIRWAN, 2016). Em estudo realizado por Wang et al. (2015), a curcumina reduziu a massa corporal via estímulo ao aumento no número de adipócitos beges (“*browning*”) e pelo subsequente aumento da termogênese e biogênese mitocondrial em tecido adiposo branco inguinal. Nosso estudo mostra que o tratamento com curcumina provavelmente estimulou o programa termogênico no tecido adiposo marrom, via ativação de SIRT 1/AMPK/PGC-1 α /NRF 2 e UCP 1, contribuindo para a melhoria na regulação do balanço energético de animais HC, sugerindo uma possível participação desta via na redução da massa de tecidos adiposos, bem como no aumento da sensibilidade à insulina. Song et al. (2018) observaram que o tratamento de animais em dieta hiperlipídica com curcumina reduziu o tamanho de adipócitos marrons em associação ao aumento na expressão gênica de UCP 1, via ativação de PPAR α /PPAR γ .

O tratamento de animais em dieta H com curcumina promoveu aumento significativo da sensibilidade à insulina e tolerância à glicose, aumentou a atividade de PON 1 e reduziu os níveis de TBARS e AGEs no plasma. Corroborando nossos resultados, estudos também observaram os efeitos da curcumina na promoção do aumento na atividade de PON 1, contribuindo para atenuação do estresse oxidativo de ratos diabéticos (JANG et al., 2008; ALAPPAT; AWAD, 2010; ASSIS et al., 2017; ROXO et al., 2019).

Os efeitos do tratamento com curcumina no fígado também contribuíram significativamente para a atenuação do estresse glicoxidativo, via redução de TBARS, AGEs e RAGE. O tratamento com curcumina também reduziu a inflamação no fígado,

uma vez que foram observadas reduções nos níveis de NF- κ B, citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10. Corroborando nossos achados, Weisberg et al. (2008) observaram que em fígado de animais em dieta hiperlipídica e suplementados com curcumina reduziu a expressão de NF- κ B e os níveis de vários marcadores inflamatórios, incluindo SOCS 3, TNF- α e MCP 1.

Os efeitos da curcumina têm sido associados à regulação de múltiplos alvos celulares que participam do controle do metabolismo lipídico. Trabalhos demonstram que a estimulação de AMPK por curcumina promove inibição da enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), aumento na expressão de carnitina palmitoil transferase 1 (CPT-1) e redução da expressão de PPAR γ (EJAZ et al., 2009; BRADFORD, 2013), consequentemente ocorre redução da hiperlipidemia, uma vez que os alvos regulados pela curcumina culminam em redução na biossíntese de ácidos graxos e colesterol, bem como em aumento na velocidade de oxidação de ácidos graxos, no fígado e rim (JANG et al., 2008; MARTÍNEZ-MORÚA et al., 2013; SOTO-URQUIETA et al., 2014). A curcumina também é capaz de reduzir a lipogênese e o acúmulo de lipídeos no fígado de animais resistentes à insulina, e esses efeitos estão associados à inibição da transcrição de genes envolvidos na lipogênese hepática, tais como a proteína de ligação ao elemento regulatório do esterol 1c (SREBP1c) e a proteína de ligação ao elemento de resposta a carboidratos (ChREBP). Estudos também sugerem que a curcumina pode melhorar a glicemia via ativação da glicólise e inibição da gliconeogênese hepática (SEO et al., 2008; SHAO et al., 2012). Com isso, os efeitos do tratamento com curcumina em iogurte no fígado de animais em dieta hiperlipídica podem ter contribuído para a regulação do *status* energético via aumento na expressão de SIRT 1/AMPK/PGC-1 α , atenuando o estresse oxidativo, glicativo e inflamação.

Sabendo-se que um dos principais efeitos de PGC-1 α é a promoção de biogênese mitocondrial, principalmente devido a estimulação de NRF 1 e NRF 2 (SCARPULLA, 2008), nossos resultados mostram que a curcumina pode contribuir para atenuação da disfunção mitocondrial via aumento dos níveis proteicos de PGC-1 α e NRF 2 no fígado de animais em dieta hiperlipídica. O aumento nos níveis de NRF 2 em fígado de animais tratados com curcumina também pode ter contribuído para os aumentos observados nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px, justificando seu potencial antioxidante em animais alimentados com dieta hiperlipídica. Consequentemente, também observamos redução de TBARS em fígado de animais HC.

Diversos outros estudos utilizando modelos animais de DM experimental já demonstraram o potencial da curcumina em reduzir o estresse oxidativo via aumento nas atividades de enzimas antioxidantes, tais como SOD, CAT e GSH-Px, e assim culminando em redução da peroxidação lipídica (SEO et al., 2008; ARCARO et al., 2014; ASSIS et al., 2017; GUTIERRES et al., 2019).

Tal como já discutido anteriormente, NRF 2 também aumenta a expressão de GLO 1, promovendo assim a detoxificação do metilglioxal, o que pode explicar a redução do estresse glicativo em fígado de animais mantidos em dieta H e tratados com curcumina em iogurte. Não observamos efeitos da curcumina na expressão de AGE-R1. Em contrapartida, Tang e Chen (2014) relataram que a redução dos efeitos deletérios de AGEs após o tratamento com curcumina se deve ao aumento da detoxificação de AGEs por AGE-R1, bem como supressão de RAGE em células hepáticas.

Além dos benefícios observados no fígado, a curcumina reduziu o estresse glicoxidativo no rim, via diminuição nos níveis de TBARS, AGEs e RAGE. Também reduziu marcadores da inflamação neste tecido, promovendo diminuição nos níveis de NF- κ B e de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α . A curcumina também contribuiu para a promoção de aumentos nos níveis de SIRT 1 e AMPK, bem como nos níveis de NRF 2, o que pode ter contribuído para o aumento na atividade de CAT, e assim reduzindo os prejuízos renais provocados pela dieta hiperlipídica.

A curcumina vem sendo estudada em modelo experimental de doença renal crônica, e mostrou grande eficácia na redução do estresse oxidativo, inflamação, fibrose e apoptose, via aumento na expressão do fator de transcrição NRF 2 (ALI et al., 2018). Em estudo realizado por Wu et al. (2017), também foi avaliado o papel da curcumina na atenuação de lesão renal aguda de ratos, onde foi observado o efeito protetor deste ativo natural na redução do estresse oxidativo e na ativação de vias de sinalização dependentes de AMPK e NRF 2/HO-1.

Nossos resultados mostram que o tratamento de animais em dieta hiperlipídica com curcumina em iogurte contribuiu para o aumento da sensibilidade à insulina e tolerância à glicose. O tratamento com curcumina também estimulou o programa termogênico no tecido adiposo marrom e no fígado aumentou o *status* energético, atenuou o estresse glicativo, oxidativo e inflamatório, assim contribuindo para manutenção/proteção hepática de animais em dieta hiperlipídica.

5.5 Tratamento com a combinação de trigonelina e curcumina em iogurte na atenuação dos distúrbios metabólicos em modelo animal de obesidade e resistência à insulina

Sabendo-se dos efeitos isolados dos ativos naturais trigonelina e curcumina em iogurte na prevenção das alterações relacionadas à obesidade, e com a intenção de obter efeitos aditivos ou até mesmo sinérgicos, animais em dieta H foram tratados com a combinação de trigonelina e curcumina em iogurte.

Interessantemente, a combinação de trigonelina e curcumina em iogurte não melhorou alguns efeitos prejudiciais promovidos pela dieta H apresentando semelhança com o grupo de animais obesos não tratados e anulação dos efeitos benéficos dos compostos isolados (trigonelina ou curcumina em iogurte) contribuindo para: (i) intolerância à glicose e resistência à insulina, (ii) níveis elevados de AGEs plasmáticos, (iii) prejuízos na fosforilação de AKT no tecido adiposo branco epididimal e no músculo *gastrocnemius*, (iv) inflamação do tecido adiposo branco epididimal, com níveis elevados de IL-6 e redução nos níveis da adipocina anti-inflamatória IL-10, (v) inflamação no fígado e no rim, via elevados níveis proteicos de NF- κ B e de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) e redução de IL-10, (vi), aumento nos níveis proteicos de RAGE.

Por outro lado, efeitos benéficos também foram observados no tratamento de animais H com a combinação de trigonelina e curcumina. As reduções observadas na massa corporal, ingestão alimentar, adiposidade, tamanho de adipócitos, glicemia de jejum, níveis de colesterol, TBARS no plasma e AGEs no fígado e rim, podem estar associadas aos efeitos isolados do iogurte, devido à semelhança nos resultados obtidos com animais HI em relação aos animais HTC. Os aumentos nos níveis de PGC-1 α , NRF 2 e UCP 1 no tecido adiposo marrom, aumento da fosforilação de AMPK no fígado e no rim, e aumento na atividade das enzimas antioxidantes (CAT e GSH-Px) no fígado de animais HTC também podem ser atribuídos aos efeitos da curcumina em iogurte. Já redução nos níveis de TBARS e os aumentos de SOD e GLO 1 no fígado, bem como a redução de Bax e o aumento de SIRT 1 e PGC-1 α no rim de animais HTC podem ser atribuídos aos efeitos da trigonelina em iogurte. Já os prejuízos da combinação de trigonelina e curcumina em iogurte em animais mantidos em dieta H podem ser atribuídos à alteração na biodisponibilidade destes ativos naturais, ou ao alcance de níveis tóxicos destes antioxidantes, quando combinados.

Arcaro et al. (2014) investigaram as atividades antidiabéticas e antioxidantes *in vivo* da curcumina e da piperina, administradas no iogurte sozinhas ou em combinação. A piperina sabidamente atua como um *bioenhancer*, isto é, aumenta a biodisponibilidade de vários fármacos, e também da curcumina. A piperina promove inibição de enzimas que participam de processos de biotransformação no intestino e fígado, incluindo citocromo P 450 (CYP3A4), bem como inibe o transportador glicoproteína-P, envolvido no efluxo de drogas. Os autores observaram que o tratamento de ratos diabéticos com iogurte enriquecido com 90 mg/kg de curcumina atenuou parcialmente as alterações associadas ao estresse oxidativo em ratos diabéticos, melhorando a glicemia, aumentando as atividades de enzimas antioxidantes e reduzindo os níveis de biomarcadores de estresse oxidativo. A dose de 20 mg/kg de piperina em iogurte também se mostrou efetiva quanto às atividades antidiabética e antioxidante. Entretanto, os autores observaram que os efeitos benéficos observados com os tratamentos com curcumina e piperina, isoladamente, foram anulados quando estes ativos naturais foram administrados de forma combinada. De fato, tal combinação mostrou-se inclusive tóxica, uma vez que animais diabéticos tratados com curcumina + piperina apresentaram níveis plasmáticos de ALT maiores em relação aos animais diabéticos tratados curcumina ou piperina sozinhos, ou até mesmo em relação aos animais diabéticos tratados somente com o veículo, iogurte. Portanto, a administração concomitante de curcumina + piperina não trouxe vantagem alguma para a atividade antidiabética e antioxidante da curcumina, o que pode estar relacionado à inibição de sua biotransformação quando administrada com piperina, sugerindo assim que a atividade antidiabética da curcumina esteja associada a algum metabólito.

Ahmmmed et al. (2015), utilizando microsomas hepáticos de ratos, observaram que a trigonelina foi capaz de inibir a atividade de CYP3A4, entretanto tal inibição foi discreta quando comparada ao controle positivo, cetoconazol. Assim, podemos sugerir que, em nosso estudo, a trigonelina também possa estar inibindo as enzimas que participam dos processos de biotransformação da curcumina, nos animais que foram tratados com a combinação trigonelina + curcumina, não havendo a geração de níveis suficientemente necessários do(s) metabólito(s) da curcumina responsável(is) pelas ações benéficas deste ativo natural. Deve-se lembrar que nossos tratamentos foram realizados durante 9 semanas, o que poderia estar favorecendo o efeito inibitório *in vivo* da trigonelina sobre CYP3A4, causando impactos significativos sobre a biotransformação da curcumina.

Porém, além da anulação de diversos efeitos benéficos da curcumina, o tratamento combinado também anulou diversas das ações benéficas da trigonelina. Não há indícios de que a trigonelina seja biotransformada em animais. Podemos sugerir que a combinação de antioxidantes tenha permitido o alcance de níveis tóxicos devido à administração excessiva de antioxidantes. Dosagem e natureza química de antioxidantes exógenos podem ser fatores determinantes que impactam no equilíbrio entre os efeitos benéficos e os efeitos deletérios destes ativos naturais. Altas doses de compostos antioxidantes exógenos podem ser tóxicas, devido aos efeitos pró-oxidativos destes quando em altas concentrações ou quando na presença de íons metálicos, tal como os ácidos fenólicos derivados de ácidos benzóico e cinâmico (BOUAYED; BOHN 2010; YORDI et al., 2012).

O antioxidante dietético EGCG (*epigallocatechin-3-gallate*), existente no chá verde e encontrado também em outras preparações, em doses farmacológicas (30 e 60 mg/kg) elimina a ansiedade em camundongos, no entanto doses entre 120 a 150 mg/kg causou a morte de camundongos em menos de 24 horas, presumivelmente devido a sua alta hepatotoxicidade (GALATI et al., 2006).

Silva et al. (2019) também observaram que a suplementação de curcumina não melhorou vários parâmetros alterados em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, e também notaram que a curcumina causou acúmulo de lipídeos no pâncreas, de animais alimentados com dieta hiperlipídica ou padrão. Tal acúmulo de lipídeos no pâncreas foi considerado, pelos autores, como uma evidência de dano tecidual e, portanto, interpretado como toxicidade da curcumina. Esta toxicidade pode ser uma consequência da quantidade administrada; os autores descreveram que os animais receberam 8 mg de curcumina/animal/dia. Em nosso estudo, embora camundongos em dieta hiperlipídica tenham recebido uma quantidade menor (2,0-2,5 mg de curcumina/animal/dia), em combinação com a trigonelina e administrados por 9 semanas, esta terapia combinada pode ter favorecido o alcance de níveis tóxicos destes antioxidantes.

Além disso, a biotransformação de fármacos pode ser influenciada durante doenças infecciosas e inflamatórias, principalmente devido à regulação negativa das enzimas metabolizadoras, em nível transcricional e pós-transcricional (MALLICK et al., 2018); alterações associadas à obesidade podem culminar em alterações na biotransformação de fármacos. Em geral, a obesidade está associada a uma diminuição na atividade de CYP (TOMANKOVA et al., 2015). Na obesidade, várias citocinas também se

encontram envolvidas na alteração da expressão e atividade de CYPs (MALLICK et al., 2017). Aumento de IL-6 reduz a atividade de citocromo P450, podendo levar à alteração na biodisponibilidade de drogas metabolizadas por CYP; a redução nos níveis desta citocina pode recuperar a função dessas enzimas (MAO et al., 2012). Um estudo realizado por Klein et al. (2015) confirmou que a indução da inflamação por IL-6 em cultura de células hepáticas reduziu significativamente a expressão da maioria das enzimas P450, destacando-se CYP3A4, após 24 horas.

A sinalização de citocinas pode afetar a regulação de CYP3A4 mediada por receptores nucleares via PXR (*receptor pregnano x*) ou CAR (*constitutive androstane receptor*, NR1i3), ou afetando a ação de RXR α (*receptor de ácido X retinóico alfa*) e HNF4 α (fator nuclear de hepatócito 4 α). A produção de citocinas também ativa a enzima óxido nítrico sintase 2, formando óxido nítrico (NO), e este inibe as atividades de P450 (MORGAN et al., 2011).

Aumentos nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 estão sendo considerados interessantes nos tratamentos de doenças inflamatórias crônicas, incluindo artrite reumatoide (HERNÁNDEZ-BELLO et al., 2017), doença inflamatória intestinal (ENGELHARDT; GRIMBACHER, 2014) e inflamação atrial causada pela obesidade (KONDO et al., 2018). IL-10 diminui a liberação de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para o aumento na atividade do CYP3A (GORSKI et al., 2000). Sabendo-se dos efeitos da IL-6 na inibição de CYP450 e do aumento na atividade desta enzima por IL-10, também podemos sugerir que o aumento de IL-6 e a redução de IL-10 no fígado de animais em dieta H e tratados com trigonelina + curcumina pode ter contribuído para alterações na biotransformação da curcumina, causando assim a anulação dos diversos efeitos benéficos da curcumina administrada isoladamente.

Dagdeviren et al. (2016) mostraram que camundongos com superexpressão muscular específica de IL-10 (M^{IL10}) são protegidos da resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica no músculo esquelético. IL-10 tem mostrado importância na atenuação da inflamação e resistência à insulina na obesidade e no DM; tem sido sugerido que IL-10 exerce ações benéficas em células beta pancreáticas. Em camundongos tratados com baixa dose de streptozotocina, a administração de IL-10 promoveu aumento na função das células beta pancreáticas, reduziu significativamente a insulite e evitou a hiperglicemia e progressão do diabetes (YANG et al., 2002; XU et al., 2015; SHEHATA et al., 2015). Além disso, em condições hiperglicêmicas, o aumento de AGEs e a ativação de RAGE contribuem para a inflamação, e também

suprimem os níveis de IL-10 (POP-BOSUI; PIETROPAOLO, 2011). Assim, podemos sugerir que parte dos efeitos anulados pela combinação trigonelina + curcumina, isto é, intolerância à glicose, resistência à insulina, aumento nos níveis de AGEs plasmáticos e de RAGE no fígado, sejam consequência da redução significativa nos níveis de IL-10 no tecido adiposo branco epididimal, fígado e rim, contribuindo assim para o estresse glicativo em animais mantidos na dieta H e tratados com esta combinação de fitoquímicos.

Torna-se importante o estudo de combinações de ativos naturais, pois não é sempre que tais combinações promovem melhorias à saúde via efeitos benéficos combinados. Ativos naturais, além de promoverem suas respostas farmacodinâmicas, também podem atuar em processos que alterem a biodisponibilidade de outros componentes ou mesmo apresentar efeito tóxico quando combinados ou em altas doses.

6. CONCLUSÃO

Os tratamentos de animais em dieta hiperlipídica com trigonelina ou com curcumina em iogurte, de maneira isolada, exercem ações antihiperlglicêmicas e antihiperlipidêmicas, melhoram a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina. O tratamento com curcumina em iogurte contribuiu para o aumento da sensibilidade à insulina no músculo *gastrocnemius* e apresentou efeitos importantes na prevenção das alterações metabólicas promovidas pela oferta de dieta hiperlipídica, via estímulo ao programa termogênico no tecido adiposo marrom, e levou à proteção hepática contra o estresse glicoxidativo. Em animais alimentados com dieta hiperlipídica, o tratamento com trigonelina em iogurte desempenhou os melhores efeitos na redução da ingestão alimentar, prevenção do ganho de massa corporal, atenuação da hipertrofia adipocítica e potencial anti-inflamatório no tecido adiposo branco epididimal, ações estas que podem ter participação na promoção do aumento da sensibilidade à insulina e tolerância à glicose. A trigonelina também apresentou potencial anti-inflamatório, antioxidante e anti-glicação, sendo um ativo natural promissor na redução dos danos relacionados ao estresse glicoxidativo no fígado e rim de animais obesos. A trigonelina também contribuiu para regulação do metabolismo energético no rim. O tratamento de animais obesos com a combinação de trigonelina e curcumina em iogurte aumentou a resistência à insulina, uma vez que foram observadas diminuições nos níveis de fosforilação da AKT em músculo esquelético e principalmente em tecido adiposo branco. A

combinação dos ativos naturais anulou os efeitos isolados da trigonelina e da curcumina, contribuindo para inflamação no tecido adiposo epididimal, fígado e rim.

A adição no iogurte dos ativos naturais trigonelina ou curcumina, de forma isolada, podem ser uma suplementação benéfica na prevenção ou atenuação das alterações metabólicas observadas em camundongos que desenvolvem obesidade e resistência à insulina via ingestão de dieta hiperlipídica.

7. REFERÊNCIAS

ABATE, G. et al. Advanced glycation end products (AGES) in food: focusing on Mediterranean pasta. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 5, n. 6, p. 1, 2015.

AFIFI, Nehal A. et al. Trigonelline attenuates hepatic complications and molecular alterations in high-fat high-fructose diet-induced insulin resistance in rats. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 95, n. 4, p. 427-436, 2016.

AGGARWAL, Bharat B. et al. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. **Anticancer research**, v. 23, n. 1/A, p. 363-398, 2003.

AHIMA, Rexford S. Digging deeper into obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2076-2079, 2011.

AHMAD, Rasheed et al. Elevated expression of the toll like receptors 2 and 4 in obese individuals: its significance for obesity-induced inflammation. **Journal of inflammation**, v. 9, n. 1, p. 48, 2012.

AHMED, Syed Minhaj Uddin et al. Nrf2 signaling pathway: pivotal roles in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 2, p. 585-597, 2017.

AJMO, Joanne M. et al. Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 295, n. 4, p. G833-G842, 2008.

ALAPPAT, Lini; Awad, Atif B. Curcumin and obesity: evidence and mechanisms. **Nutrition reviews**, v. 68, n. 12, p. 729-738, 2010.

ALARD, Jeanne et al. Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. **Environmental microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1484-1497, 2016.

ALCALÁ, Martín et al. Mechanisms of impaired brown adipose tissue recruitment in obesity. **Frontiers in physiology**, v. 10, p. 94, 2019.

ALCENDOR, Ralph R. et al. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. **Circulation research**, v. 100, n. 10, p. 1512-1521, 2007.

ALI, Badreldin H. et al. Curcumin ameliorates kidney function and oxidative stress in experimental chronic kidney disease. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 122, n. 1, p. 65-73, 2018.

- AL-SHERAJI, Sadeq Hasan et al. Hypcholesterolaemic effect of yoghurt containing Bifidobacterium pseudocatenulatum G4 or Bifidobacterium longum BB536. **Food chemistry**, v. 135, n. 2, p. 356-361, 2012.
- ALDAKINAH, Amat-Alrazaq A. et al. Trigonelline and vildagliptin antidiabetic effect: improvement of insulin signalling pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2017.
- ALISSA, Eman M.; FERNS, Gordon A. Functional foods and nutraceuticals in the primary prevention of cardiovascular diseases. **Journal of nutrition and metabolism**, v. 2012, 2012.
- ANDERSON, James W.; GILLILAND, Stanley E. Effect of fermented milk (yogurt) containing Lactobacillus acidophilus L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 43-50, 1999.
- ARCARO, Carlos Alberto et al. Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic rats. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e113993, 2014.
- ASENSIO, Cédric et al. The lack of β -adrenoceptors results in enhanced insulin sensitivity in mice exhibiting increased adiposity and glucose intolerance. **Diabetes**, v. 54, n. 12, p. 3490-3495, 2005.
- ASSIS, Renata Pires et al. Combined Effects of Curcumin and Lycopene or Bixin in Yoghurt on Inhibition of LDL Oxidation and Increases in HDL and Paraoxonase Levels in Streptozotocin-Diabetic Rats. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 4, p. 332, 2017.
- ASHRAF, Rabia; SHAH, Nagendra P. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 54, n. 7, p. 938-956, 2014.
- ASTRUP, Arne. Yogurt and dairy product consumption to prevent cardiometabolic diseases: epidemiologic and experimental studies-. **The American journal of clinical nutrition**, v. 99, n. 5, p. 1235S-1242S, 2014.
- ATTIA, Hanan Naeim et al. Protective effects of combined therapy of gliclazide with curcumin in experimental diabetic neuropathy in rats. **Behavioural pharmacology**, v. 23, n. 2, p. 153-161, 2012.
- AYALA, Antonio; MUÑOZ, Mario F.; ARGÜELLES, Sandro. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014.
- BAKER, Rebecca G.; HAYDEN, Matthew S.; GHOSH, Sankar. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. **Cell metabolism**, v. 13, n. 1, p. 11-22, 2011.
- BANERJEE, Jheelam; BRUCKBAUER, Antje; ZEMEL, Michael B. Activation of the AMPK/Sirt1 pathway by a leucine-metformin combination increases insulin sensitivity in skeletal muscle, and stimulates glucose and lipid metabolism and increases life span in Caenorhabditis elegans. **Metabolism**, v. 65, n. 11, p. 1679-1691, 2016.
- BANSAL, Savita et al. A study on serum advanced glycation end products and its association with oxidative stress and paraoxonase activity in type 2 diabetic patients with vascular complications. **Clinical Biochemistry**, v. 46, n. 1-2, p. 109-114, 2013.
- BAQUER, Najma Zaheer et al. Metabolic and molecular action of Trigonella foenum-graecum (fenugreek) and trace metals in experimental diabetic tissues. **Journal of biosciences**, v. 36, n. 2, p. 383-396, 2011.

- BARNABY, Omar S. et al. Comparison of modification sites formed on human serum albumin at various stages of glycation. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 3, p. 277-285, 2011.
- BASTA, Giuseppina; SCHMIDT, Ann Marie; DE CATERINA, Raffaele. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. **Cardiovascular research**, v. 63, n. 4, p. 582-592, 2004.
- BEAUCHAMP, Charles; FRIDOVICH, Irwin. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.
- BEERS, Roland F.; SIZER, Irwin W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of biological chemistry**, v. 195, n. 1, p. 133-140, 1952.
- BERANGER, Guillaume E. et al. In vitro brown and “brite”/“beige” adipogenesis: human cellular models and molecular aspects. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 5, p. 905-914, 2013.
- BERGMEYER, H. U.; GAWEHN, K. **Methods of enzymatic analysis**. 2nd English Edition. New York, N. Y.: Academic Press, 1974. v. 1.
- BHATTI, Jasvinder Singh; BHATTI, Gurjit Kaur; REDDY, P. Hemachandra. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders—A step towards mitochondria based therapeutic strategies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 5, p. 1066-1077, 2017.
- BIRBEN, Esra et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9, 2012.
- BOBULESCU, Ion Alexandru. Renal lipid metabolism and lipotoxicity. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 19, n. 4, p. 393, 2010.
- BONGARZONE, Salvatore et al. Targeting the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE): a medicinal chemistry perspective. **Journal of medicinal chemistry**, v. 60, n. 17, p. 7213-7232, 2017.
- BORGERAAS, Jonhson H. et al. Effects of probiotics on body weight, body mass index, fat mass and fat percentage in subjects with overweight or obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Obesity Reviews**, v. 19, n. 2, p. 219-232, 2018.
- BOUAYED, Jaouad; BOHN, Torsten. Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 3, n. 4, p. 228-237, 2010.
- BOURNAT, Juan C.; BROWN, Chester W. Mitochondrial dysfunction in obesity. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 17, n. 5, p. 446, 2010.
- BRADFORD, Peter G. Curcumin and obesity. **Biofactors**, v. 39, n. 1, p. 78-87, 2013.
- BRONDANI, Leticia de Almeida et al. The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 56, n. 4, p. 215-225, 2012.
- BROWNLEE, Michael. The pathobiology of diabetic complications. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615-1625, 2005.

- CAI, Weijing et al. Oral advanced glycation endproducts (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and sirtuin 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 39, p. 15888-15893, 2012.
- CANTÓ, Carles; AUWERX, Johan. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. **Current opinion in lipidology**, v. 20, n. 2, p. 98, 2009.
- CANTÓ, Carles et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. **Nature**, v. 458, n. 7241, p. 1056, 2009.
- CANNIZZARO, Luca et al. Regulatory landscape of AGE-RAGE-oxidative stress axis and its modulation by PPAR γ activation in high fructose diet-induced metabolic syndrome. **Nutrition & metabolism**, v. 14, n. 1, p. 5, 2017.
- CANNON, Barbara; NEDERGAARD, J. A. N. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological reviews**, v. 84, n. 1, p. 277-359, 2004.
- CARVALHO, Bruno Melo; ABDALLA SAAD, Mario Jose. Influence of gut microbiota on subclinical inflammation and insulin resistance. **Mediators of inflammation**, v. 2013, Article ID 986734, 13 pages, 2013.
- CHAI, DongDong et al. Nrf2 activation induced by Sirt1 ameliorates acute lung injury after intestinal ischemia/reperfusion through NOX4-mediated gene regulation. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 781-792, 2018.
- CHAVAKIS, Triantafyllos; BIERHAUS, Angelika; NAWROTH, Peter P. RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. **Microbes and infection**, v. 6, n. 13, p. 1219-1225, 2004.
- CHAVEZ, Jose Antonio; SUMMERS, Scott A. Lipid oversupply, selective insulin resistance, and lipotoxicity: molecular mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 3, p. 252-265, 2010.
- CHAU, Mary DL et al. Fibroblast growth factor 21 regulates energy metabolism by activating the AMPK–SIRT1–PGC-1 α pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 28, p. 12553-12558, 2010.
- CHEN, Jie-Hua et al. Role of advanced glycation end products in mobility and considerations in possible dietary and nutritional intervention strategies. **Nutrition & metabolism**, v. 15, n. 1, p. 72, 2018.
- CHIN, Kok-Yong. The spice for joint inflammation: anti-inflammatory role of curcumin in treating osteoarthritis. **Drug design, development and therapy**, v. 10, p. 3029, 2016.
- CHOUGALA, Mallikarjun B. et al. Effect of curcumin and quercetin on lysosomal enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats. **Clinical nutrition**, v. 31, n. 5, p. 749-755, 2012.
- CHOWDHURY, Amrita A. et al. In vitro antiglycating effect and in vivo neuroprotective activity of Trigonelline in d-galactose induced cognitive impairment. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 2, p. 372-377, 2017.
- CHUENG SAMARN, Somlak et al. Reduction of atherogenic risk in patients with type 2 diabetes by curcuminoid extract: a randomized controlled trial. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 2, p. 144-150, 2014.

- CIOFFI, Federica et al. Effect of iodothyronines on thermogenesis: focus on brown adipose tissue. **Frontiers in endocrinology**, v. 9, p. 254, 2018.
- COSTA, Lucio G. et al. Serum paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 103, n. 1, p. 66-76, 1990.
- CONLON, Michael A.; BIRD, Anthony R. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. **Nutrients**, v. 7, n. 1, p. 17-44, 2014.
- CRINO, Michelle et al. The influence on population weight gain and obesity of the macronutrient composition and energy density of the food supply. **Current obesity reports**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2015.
- CUMMINGS, JH et al. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. **Gut**, v. 28, n. 10, p. 1221-1227, 1987.
- CUSI, Kenneth. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. **Gastroenterology**, v. 142, n. 4, p. 711-725. e6, 2012.
- CYPESS, Aaron M.; KAHN, C. Ronald. The role and importance of brown adipose tissue in energy homeostasis. **Current opinion in pediatrics**, v. 22, n. 4, p. 478, 2010.
- DAGDEVIREN, Sezin et al. IL-10 prevents aging-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 2, p. 701-710, 2016.
- DALLE-DONNE, Isabella et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clinical chemistry**, v. 52, n. 4, p. 601-623, 2006.
- DAVID, Joshua A. et al. The Nrf2/Keap1/ARE pathway and oxidative stress as a therapeutic target in type II diabetes mellitus. **Journal of diabetes research**, v. 2017, Article ID 4826724, 15 pages, 2017.
- DE MELLO, Aline Haas et al. Mitochondrial dysfunction in obesity. **Life sciences**, v. 192, p. 26-32, 2018.
- DECLÈVES, Anne-Emilie et al. Regulation of lipid accumulation by AMK-activated kinase in high fat diet-induced kidney injury. **Kidney international**, v. 85, n. 3, p. 611-623, 2014.
- DEN BESTEN, Gijs et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal of lipid research**, v. 54, n. 9, p. 2325-2340, 2013.
- DESJARDINS, Eric M.; STEINBERG, Gregory R. Emerging role of AMPK in Brown and Beige adipose tissue (BAT): implications for obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. **Current diabetes reports**, v. 18, n. 10, p. 80, 2018.
- DI EMIDIO, Giovanna et al. SIRT1 participates in the response to methylglyoxal-dependent glycation stress in mouse oocytes and ovary. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1865, n. 6, p. 1389-1401, 2019.
- DOMINY, John E.; PUIGSERVER, Pere. Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 7, p. a015008, 2013.
- DOMINY JR, John E. et al. Nutrient-dependent regulation of PGC-1 α 's acetylation state and metabolic function through the enzymatic activities of Sirt1/GCN5. **Biochimica et biophysica acta (BBA)-proteins and proteomics**, v. 1804, n. 8, p. 1676-1683, 2010.

- D'ONOFRIO, Nunzia; SERVILLO, Luigi; BALESTRIERI, Maria Luisa. SIRT1 and SIRT6 signaling pathways in cardiovascular disease protection. **Antioxidants & redox signaling**, v. 28, n. 8, p. 711-732, 2018.
- EBBERT, Jon; JENSEN, Michael. Fat depots, free fatty acids, and dyslipidemia. **Nutrients**, v. 5, n. 2, p. 498-508, 2013.
- EJAZ, Asma et al. Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. **The Journal of nutrition**, v. 139, n. 5, p. 919-925, 2009.
- ELLWOOD, Kathleen et al. Considerations on an approach for establishing a framework for bioactive food components. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 5, n. 6, p. 693-701, 2014.
- EMMA, Francesco et al. Mitochondrial dysfunction in inherited renal disease and acute kidney injury. **Nature Reviews Nephrology**, v. 12, n. 5, p. 267, 2016.
- ENGELHARDT, Karin R.; GRIMBACHER, Bodo. IL-10 in humans: lessons from the gut, IL-10/IL-10 receptor deficiencies, and IL-10 polymorphisms. In: FILLATREAU, Simon; O'GARRA, Anne (Editor). **Interleukin-10 in Health and Disease**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. p. 1-18.
- FABBRINI, Elisa; SULLIVAN, Shelby; KLEIN, Samuel. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. **Hepatology**, v. 51, n. 2, p. 679-689, 2010.
- FAVERO, Gaia et al. Browning of Adipose Tissue and Sirtuin Involvement. In: SZABLEWSKI, Leszek. (Editor). **Adipose Tissue**. IntechOpen, 2018. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/adipose-tissue/browning-of-adipose-tissue-and-sirtuin-involvement>.
- FAZIO, Sergio; LINTON, M. F. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. **Frontiers in Bioscience**, v. 6, n. March, p. D515-D525, 2001.
- FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, Alba et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 5, p. 3117-3132, 2011.
- FERREIRA, Lydia M. et al. Experimental models in research. **Acta cirurgica brasileira**, v. 20, p. 28-34, 2005.
- FINK, Brian D. et al. Mitochondrial proton leak in obesity-resistant and obesity-prone mice. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 5, p. R1773-R1780, 2007.
- FLEMING, Thomas H. et al. Reactive metabolites and AGE/RAGE-mediated cellular dysfunction affect the aging process—a mini-review. **Gerontology**, v. 57, n. 5, p. 435-443, 2011.
- FROMME, Tobias; KLINGENSPOR, Martin. Uncoupling protein 1 expression and high-fat diets. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 300, n. 1, p. R1-R8, 2010.
- FURUKAWA, Shigetada et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752-1761, 2017.
- GAHRUIE, Hadi Hashemi et al. Scientific and technical aspects of yogurt fortification: A review. **Food Science and Human Wellness**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2015.

- GALIC, Sandra; OAKHILL, Jon S.; STEINBERG, Gregory R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 316, n. 2, p. 129-139, 2010.
- GAO, Arwen W.; CANTÓ, Carles; HOUTKOOPER, Riekelt H. Mitochondrial response to nutrient availability and its role in metabolic disease. **EMBO molecular medicine**, v. 6, n. 5, p. 580-589, 2014.
- GARCIA, Daniel; SHAW, Reuben J. AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance. **Molecular cell**, v. 66, n. 6, p. 789-800, 2017.
- GARCÍA-RODRÍGUEZ, Juan L. et al. SIRT1 controls liver regeneration by regulating bile acid metabolism through farnesoid X receptor and mammalian target of rapamycin signaling. **Hepatology**, v. 59, n. 5, p. 1972-1983, 2014.
- GARCÍA-RUIZ, E. et al. The intake of high-fat diets induces the acquisition of brown adipocyte gene expression features in white adipose tissue. **International journal of obesity**, v. 39, n. 11, p. 1619, 2015.
- GARG, Abhimanyu. Lipodystrophies and Dyslipidemias. In: GARG, A. (Editor). **Dyslipidemias: Pathophysiology, Evaluation and Management**. totowa, Heidelberg: Humana Press, 2015. p. 287-302.
- GENET, Solomon et al. Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). **Molecular and cellular biochemistry**, v. 236, n. 1-2, p. 7-12, 2002.
- GHULE, Arvindkumar E. et al. Trigonelline ameliorates diabetic hypertensive nephropathy by suppression of oxidative stress in kidney and reduction in renal cell apoptosis and fibrosis in streptozotocin induced neonatal diabetic (nSTZ) rats. **International immunopharmacology**, v. 14, n. 4, p. 740-748, 2012.
- GILL, J. A.; LA MERRILL, Michele A. An emerging role for epigenetic regulation of Pgc-1 α expression in environmentally stimulated brown adipose thermogenesis. **Environmental Epigenetics**, v. 3, n. 2, p. dvx009, 2017.
- GIRALT, Marta; VILLARROYA, Francesc. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions?. **Endocrinology**, v. 154, n. 9, p. 2992-3000, 2013.
- GORSKI, J. Christopher et al. In vivo effects of interleukin-10 on human cytochrome P450 activity. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 67, n. 1, p. 32-43, 2000.
- GOOSSENS, Gijs H. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. **Physiology & behavior**, v. 94, n. 2, p. 206-218, 2008.
- GOVINDARAJ, Jayanthi; PILLAI, Subramanian Sorimuthu. Rosmarinic acid modulates the antioxidant status and protects pancreatic tissues from glucolipotoxicity mediated oxidative stress in high-fat diet: streptozotocin-induced diabetic rats. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 404, n. 1-2, p. 143-159, 2015.
- GOWANS, Graeme J. et al. AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. **Cell metabolism**, v. 18, n. 4, p. 556-566, 2013.
- GLASS, Christopher K.; OLEFSKY, Jerrold M. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. **Cell metabolism**, v. 15, n. 5, p. 635-645, 2012.
- GRANT, Ryan W.; DIXIT, Vishwa Deep. Adipose tissue as an immunological organ. **Obesity**, v. 23, n. 3, p. 512-518, 2015.

GUILHERME, Adilson et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 9, n. 5, p. 367, 2008.

GUL, Khalid; SINGH, A. K.; JABEEN, Rifat. Nutraceuticals and functional foods: The foods for the future world. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 56, n. 16, p. 2617-2627, 2016.

GUNAWARDENA, Dhanushka et al. Anti-inflammatory activity of cinnamon (*C. zeylanicum* and *C. cassia*) extracts—identification of E-cinnamaldehyde and o-methoxy cinnamaldehyde as the most potent bioactive compounds. **Food & function**, v. 6, n. 3, p. 910-919, 2015.

GUPTA, Subash C. et al. Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. **Natural product reports**, v. 28, n. 12, p. 1937-1955, 2011.

GUTIERRES, Vânia O. et al. Curcumin-supplemented yoghurt improves physiological and biochemical markers of experimental diabetes. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 3, p. 440-448, 2012.

GUTIERRES, Vânia Ortega et al. Curcumin improves the effect of a reduced insulin dose on glycemic control and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. **Phytotherapy Research**, 2019.

HAAN, Claude; BEHRMANN, Iris. A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. **Journal of immunological methods**, v. 318, n. 1-2, p. 11-19, 2007.

HAMDEN, Khaled et al. Corrigendum to "Inhibition of Key Digestive Enzymes Related to Diabetes and Hyperlipidemia and Protection of Liver-Kidney Functions by Trigonelline in Diabetic Rats"[Sci Pharm. 2013; 81: 233–246]. **Scientia pharmaceutica**, v. 82, n. 2, p. 449, 2014.

HAMER, Henrike M. et al. Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. **Clinical Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 88-93, 2009.

HARMS, Matthew J. et al. Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. **Cell metabolism**, v. 19, n. 4, p. 593-604, 2014.

HASEGAWA, Kazuhiro et al. Kidney-specific overexpression of Sirt1 protects against acute kidney injury by retaining peroxisome function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 17, p. 13045-13056, 2010.

HENRY, Robert R. et al. Timothy. New options for the treatment of obesity and type 2 diabetes mellitus (narrative review). **Journal of diabetes and its complications**, v. 27, n. 5, p. 508-518, 2013.

HERNÁNDEZ-BELLO, J. et al. Aberrant expression of interleukin-10 in rheumatoid arthritis: relationship with IL10 haplotypes and autoantibodies. **Cytokine**, v. 95, p. 88-96, 2017.

HOLLAND, William L. et al. Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. **Cell metabolism**, v. 5, n. 3, p. 167-179, 2007.

HOLLENBACH, Marcus. The role of glyoxalase-I (Glo-I), advanced glycation endproducts (AGEs), and their receptor (RAGE) in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma (HCC). **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 11, p. 2466, 2017.

HONG, Eun-Gyoung et al. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. **Diabetes**, v. 58, n. 11, p. 2525-2535, 2009.

HUANG, Kaipeng et al. Sirt1 resists advanced glycation end products-induced expressions of fibronectin and TGF- β 1 by activating the Nrf2/ARE pathway in glomerular mesangial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 528-540, 2013.

HUANG, Kaipeng; GAO, Xiang; WEI, Wentao. The crosstalk between sirt1 and keap1/Nrf2/are anti-oxidative pathway forms a positive feedback loop to inhibit FN and TGF- β 1 expressions in rat glomerular mesangial cells. **Experimental cell research**, v. 361, n. 1, p. 63-72, 2017.

HUANG, Kai-Peng et al. AGEs-RAGE system down-regulates Sirt1 through the ubiquitin-proteasome pathway to promote FN and TGF- β 1 expression in male rat glomerular mesangial cells. **Endocrinology**, v. 156, n. 1, p. 268-279, 2015.

IGEL, LI. et al. Why Weight? An Analytic Review of Obesity Management, Diabetes Prevention, and Cardiovascular Risk Reduction. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 20, n. 8, p. 39, 2018.

ILAVENIL, Soundharrajan et al. Trigonelline attenuates the adipocyte differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 cells. **Phytomedicine**, v. 21, n. 5, p. 758-765, 2014.

INOGUCHI, Toyoshi et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD (P) H oxidase in cultured vascular cells. **Diabetes**, v. 49, n. 11, p. 1939-1945, 2000.

JANG, Eun-Mi et al. Beneficial effects of curcumin on hyperlipidemia and insulin resistance in high-fat-fed hamsters. **Metabolism**, v. 57, n. 11, p. 1576-1583, 2008.

JIA, Jun-jing et al. The polymorphisms of UCP1 genes associated with fat metabolism, obesity and diabetes. **Molecular biology reports**, v. 37, n. 3, p. 1513-1522, 2010.

JIMÉNEZ-FLORES, Lizbeth M. et al. A PPAR γ , NF- κ B and AMPK-dependent mechanism may be involved in the beneficial effects of curcumin in the diabetic db/db mice liver. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 8289-8302, 2014.

JOHNSON, Elizabeth L. et al. Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes. **Journal of Molecular Medicine**, v. 95, n. 1, p. 109-117, 2017.

JOKINEN, Riikka et al. Adipose tissue NAD⁺-homeostasis, sirtuins and poly (ADP-ribose) polymerases-important players in mitochondrial metabolism and metabolic health. **Redox biology**, v. 12, p. 246-263, 2017.

JUNG, Un Ju; CHOI, Myung-Sook. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 4, p. 6184-6223, 2014.

JUNGE, Wolfgang et al. Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffe method. **Clinica chimica acta**, v. 344, n. 1-2, p. 137-148, 2004.

KADAIKUNNAN, Shine et al. Identification and quantification of phenolic compounds from *Trigonella foenum graecum* L. and its in-vitro antioxidant, anticancer and antimicrobial activities. **Fresen. Environ. Bull**, v. 24, p. 2643-2649, 2015.

- KALASKA, Bartłomiej et al. Antithrombotic effects of pyridinium compounds formed from trigonelline upon coffee roasting. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 13, p. 2853-2860, 2014.
- KANG, Hye et al. Flavonoids, Potential Bioactive Compounds, and Non-Shivering Thermogenesis. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1168, 2018.
- KANG, Yea Eun et al. The roles of adipokines, proinflammatory cytokines, and adipose tissue macrophages in obesity-associated insulin resistance in modest obesity and early metabolic dysfunction. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0154003, 2016.
- KAPLAN, Marielle; AVIRAM, Michael. Oxidized low density lipoprotein: atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxonase. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, v. 37, n. 8, p. 777-787, 1999.
- KARTHIKESAN, Krishnamoorthy et al. Protective effect of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid against streptozotocin–nicotinamide generated oxidative stress induced diabetes. **Journal of functional foods**, v. 2, n. 2, p. 134-142, 2010.
- KAZAK, Lawrence et al. Genetic depletion of adipocyte creatine metabolism inhibits diet-induced thermogenesis and drives obesity. **Cell metabolism**, v. 26, n. 4, p. 660-671. e3, 2017.
- KIM, Choon Young et al. Curcumin inhibits adipocyte differentiation through modulation of mitotic clonal expansion. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 22, n. 10, p. 910-920, 2011.
- KIM, Eun et al. Recent advances in proteomic studies of adipose tissues and adipocytes. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 3, p. 4581-4599, 2015.
- KIM, Hye-Jin et al. Effects of PGC-1 α on TNF- α –induced MCP-1 and VCAM-1 expression and NF- κ B activation in human aortic smooth muscle and endothelial cells. **Antioxidants & redox signaling**, v. 9, n. 3, p. 301-307, 2007.
- KIM, Joungmok et al. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. **Experimental & molecular medicine**, v. 48, n. 4, p. e224, 2016.
- KIM, MY. et al. Resveratrol prevents renal lipotoxicity and inhibits mesangial cell glucotoxicity in a manner dependent on the AMPK–SIRT1–PGC1 α axis in db/db mice. **Diabetologia**, v. 56, n. 1, p. 204-217, 2013.
- KIM, Mi Hye et al. Peroxiredoxin 5 regulates adipogenesis-attenuating oxidative stress in obese mouse models induced by a high-fat diet. **Free Radical Biology and Medicine**, 2018.
- KLEIN, Marcus et al. A systematic comparison of the impact of inflammatory signaling on absorption, distribution, metabolism, and excretion gene expression and activity in primary human hepatocytes and HepaRG cells. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 43, n. 2, p. 273-283, 2015.
- KLEINER, Sandra et al. Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1 α in adipose tissues. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 109, n. 24, p. 9635-9640, 2012.
- KOBORI, Masuko et al. Dietary intake of curcumin improves eif2 signaling and reduces lipid levels in the white adipose tissue of obese mice. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 9081, 2018.
- KOHN, Henry Irving; LIVERSEDGE, Margaret. 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, n. 3, p. 292-300, 1944.

KONDO, Hidekazu et al. Interleukin 10 Treatment Ameliorates High-Fat Diet-Induced Inflammatory Atrial Remodeling and Fibrillation. **Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology**, v. 11, n. 5, p. e006040, 2018.

KOTUR-STEVLJEVIC, Jelena et al. PON1 status is influenced by oxidative stress and inflammation in coronary heart disease patients. **Clinical biochemistry**, v. 41, n. 13, p. 1067-1073, 2008.

KUSMINSKI, Christine M.; BICKEL, Perry E.; SCHERER, Philipp E. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. **Nature reviews Drug discovery**, v. 15, n. 9, p. 639, 2016.

KWON, Hyokjoon; PESSIN, Jeffrey E. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. **Frontiers in endocrinology**, v. 4, p. 71, 2013.

LAGOUGE, Marie et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . **Cell**, v. 127, n. 6, p. 1109-1122, 2006.

LAUTERBACH, Mario AR; WUNDERLICH, F. Thomas. Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 469, n. 3-4, p. 385-396, 2017.

LEBLANC, Jean Guy et al. Use of superoxide dismutase and catalase producing lactic acid bacteria in TNBS induced Crohn's disease in mice. **Journal of biotechnology**, v. 151, n. 3, p. 287-293, 2011.

LEE, Do Kyung et al. Lactic acid bacteria affect serum cholesterol levels, harmful fecal enzyme activity, and fecal water content. **Lipids in health and disease**, v. 8, n. 1, p. 21, 2009.

LECOMTE, Virginie et al. Changes in gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0126931, 2015.

LEHNERT, Thomas et al. Economic costs of overweight and obesity. **Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism**, v. 27, n. 2, p. 105-115, 2013.

LEWIS, Jeffrey R.; MOHANTY, Smruti R. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. **Digestive diseases and sciences**, v. 55, n. 3, p. 560-578, 2010.

LI, Tiange et al. Milk fat globule membrane attenuates high-fat diet-induced obesity by inhibiting Adipogenesis and increasing uncoupling protein 1 expression in white adipose tissue of mice. **Nutrients**, v. 10, n. 3, p. 331, 2018.

LI, Xiaoling. SIRT1 and energy metabolism. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 45, n. 1, p. 51-60, 2013.

LI, Hong-Liang; LIU, De-Pei; LIANG, Chih-Chuan. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. **Journal of molecular medicine**, v. 81, n. 12, p. 766-779, 2003.

LIAO, Jung Chun et al. Raf/ERK/Nrf2 signaling pathway and MMP-7 expression involvement in the trigonelline-mediated inhibition of hepatocarcinoma cell migration. **Food & nutrition research**, v. 59, n. 1, p. 29884, 2015.

LIN, Ting-Yu; CANTLEY, Lewis C.; DENICOLA, Gina M. NRF2 rewires cellular metabolism to support the antioxidant response. In: MORALES-GONZALES, J. A. (Editor). **A Master Regulator of Oxidative Stress-The Transcription Factor Nrf2**. InTech, 2016. Disponible

em: <https://www.intechopen.com/books/a-master-regulator-of-oxidative-stress-the-transcription-factor-nrf2>

LITVINOV, Dmitry; MAHINI, Halleh; GARELNABI, Mahdi. Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases. **North American journal of medical sciences**, v. 4, n. 11, p. 523, 2012.

LONE, Jameel et al. Curcumin induces brown fat-like phenotype in 3T3-L1 and primary white adipocytes. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 27, p. 193-202, 2016.

LÓPEZ-DÍEZ, Raquel et al. Cellular mechanisms and consequences of glycation in atherosclerosis and obesity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1862, n. 12, p. 2244-2252, 2016.

LOPES-RODRIGUES, Vanessa et al. A novel curcumin derivative which inhibits P-glycoprotein, arrests cell cycle and induces apoptosis in multidrug resistance cells. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 25, n. 2, p. 581-596, 2017.

LORDAN, Ronan et al. Dairy Fats and Cardiovascular Disease: Do We Really Need to Be Concerned?. **Foods**, v. 7, n. 3, p. 29, 2018.

LOWRY, Oliver H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUMENG, Carey N.; BODZIN, Jennifer L.; SALTIEL, Alan R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 1, p. 175-184, 2007.

MA, Qiang. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 53, p. 401-426, 2013.

MADONNA, Rosalinda; DE CATERINA, Raffaele. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes—part I: pathways of vascular disease in diabetes. **Vascular pharmacology**, v. 54, n. 3-6, p. 68-74, 2011.

MAESSEN, D. et al. Glyoxalase-1 overexpression reduces body weight and adipokine expression, and improves insulin sensitivity in high-fat diet-induced obese mice. **Diabetologia**, New York, v. 57, Suppl. 1, p. S290-S291, 2014.

MAKKI, Kassem; FROGUEL, Philippe; WOLOWCZUK, Isabelle. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. **ISRN inflammation**, v. 2013, Article 139239, 2013.

MALLICK, Pankajini et al. Regulation of drug-metabolizing enzymes in infectious and inflammatory disease: Implications for biologics—small molecule drug interactions. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 13, n. 6, p. 605-616, 2017.

MAO, YX. et al. RAGE-dependent mitochondria pathway: a novel target of silibinin against apoptosis of osteoblastic cells induced by advanced glycation end products. **Cell death & disease**, v. 9, n. 6, p. 674, 2018.

MAO, Zhao et al. DEC1 binding to the proximal promoter of CYP3A4 ascribes to the downregulation of CYP3A4 expression by IL-6 in primary human hepatocytes. **Biochemical pharmacology**, v. 84, n. 5, p. 701-711, 2012.

MARINOVIC, Marcelo P. et al. Crotamine induces browning of adipose tissue and increases energy expenditure in mice. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 5057, 2018.

- MARTINELLI, Nicola et al. Paraoxonases: ancient substrate hunters and their evolving role in ischemic heart disease. **Advances in clinical chemistry**. Elsevier, v. 59, p. 65-100, 2013.
- MARTÍNEZ-MORÚA, Antonia et al. Curcumin decreases oxidative stress in mitochondria isolated from liver and kidneys of high-fat diet-induced obese mice. **Journal of Asian natural products research**, v. 15, n. 8, p. 905-915, 2013.
- MARTINS, Ana Rita; MAS, Sebastian. Lipotoxicidade e rim. **Portuguese Journal of Nephrology & Hypertension**, v. 29, n. 4, p. 306-315, 2015.
- MASTORIKOU, M. et al. Glycation of paraoxonase-1 inhibits its activity and impairs the ability of high-density lipoprotein to metabolize membrane lipid hydroperoxides. **Diabetic medicine**, v. 25, n. 9, p. 1049-1055, 2008.
- MASTROCOLA, Raffaella. AGEs and neurodegeneration: the Nrf2/glyoxalase-1 interaction. **Oncotarget**, v. 8, n. 4, p. 5645, 2017.
- MATSUDA, Morihiro; SHIMOMURA, Iichiro. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. **Obesity research & clinical practice**, v. 7, n. 5, p. e330-e341, 2013.
- MAURY, Eléonore; BRICHARD, S. M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 314, n. 1, p. 1-16, 2010.
- MCARDLE, Maeve A. et al. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. **Frontiers in endocrinology**, v. 4, p. 52, 2013.
- MEHTA, Astha et al. Piperine and quercetin enhances antioxidant and hepatoprotective effect of curcumin in paracetamol induced oxidative stress. **Int J Pharmacol**, v. 8, n. 2, p. 101-107, 2012.
- MERHI, Z. Advanced glycation end products and their relevance in female reproduction. **Human Reproduction**, v. 29, n. 1, p. 135-145, 2013.
- MIHAYLOVA, Maria M.; SHAW, Reuben J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. **Nature cell biology**, v. 13, n. 9, p. 1016, 2011.
- MITTAL, Manish et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants & redox signaling**, v. 20, n. 7, p. 1126-1167, 2014.
- MOGENSEN, Trine H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 2, p. 240-273, 2009.
- MOHAMAD, Sameer et al. Lower doses of vanadate in combination with trigonella restore altered carbohydrate metabolism and antioxidant status in alloxan-diabetic rats. **Clinica chimica acta**, v. 342, n. 1, p. 105-114, 2004.
- MORGAN, Edward T.; LEE, Choon-Myung; NYAGODE, Beatrice A. Regulation of drug metabolizing enzymes and transporters in infection, inflammation, and cancer. **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**, p. 1-45, 2011.
- MOROTI, Camila et al. Effect of the consumption of a new symbiotic shake on glycemia and cholesterol levels in elderly people with type 2 diabetes mellitus. **Lipids in health and disease**, v. 11, n. 1, p. 29, 2012.
- MONTANARI, T.; Pošćić, N.; COLITTI, M. Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review. **Obesity Reviews**, v. 18, n. 5, p. 495-513, 2017.

MOTTILLO, Emilio P. et al. Lack of adipocyte AMPK exacerbates insulin resistance and hepatic steatosis through brown and beige adipose tissue function. **Cell metabolism**, v. 24, n. 1, p. 118-129, 2016.

MROZ, JR. Clinical enzymology. In: ANDERSON, S.C.; COCKAYNE, S. **Clinical chemistry concepts & applications**. New York: Mc Graw-Hill, 2003. cap.11, p.179-202.

MULYA, Anny; KIRWAN, John P. Brown and beige adipose tissue: therapy for obesity and its comorbidities?. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, v. 45, n. 3, p. 605-621, 2016.

NEGRE-SALVAYRE, Anne et al. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. **British journal of pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 6-20, 2008.

NGUYEN, Truyen; NIOI, Paul; PICKETT, Cecil B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 20, p. 13291-13295, 2009.

NICKERSON, Helen D.; DUTTA, Sanjoy. Diabetic complications: current challenges and opportunities. **Journal of cardiovascular translational research**, v. 5, n. 4, p. 375-379, 2012.

NIEDZWIECKI, Aleksandra et al. Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. **Nutrients**, v. 8, n. 9, p. 552, 2016.

NOEMAN, Saad A. et al. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 3, n. 1, p. 17, 2011.

NØHR, Mark K. et al. GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes. **Endocrinology**, v. 154, n. 10, p. 3552-3564, 2013.

NOTO, Michael J. et al. RAGE-mediated suppression of Interleukin-10 results in enhanced mortality in a murine model of *Acinetobacter baumannii* sepsis. **Infection and immunity**, v. 85, n. 3, p. e00954-16, 2017.

NOWOTNY, Kerstin et al. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. **Biomolecules**, v. 5, n. 1, p. 194-222, 2015.

OLIVEIRA, Mauren Isfer Anghebem et al. RAGE receptor and its soluble isoforms in diabetes mellitus complications. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, n. 2, p. 97-108, 2013.

OLMOS, Yolanda et al. SirT1 regulation of antioxidant genes is dependent on the formation of a FoxO3a/PGC-1 α complex. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 13, p. 1507-1521, 2013.

ONG, Janus P. et al. Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in morbidly obese patients. **Obesity surgery**, v. 15, n. 3, p. 310-315, 2005.

OOI, Lay-Gaik; LIONG, Min-Tze. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n. 6, p. 2499-2522, 2010.

OTT, Christiane et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox biology**, v. 2, p. 411-429, 2014.

OKTAY, Ahmet Afşin et al. The interaction of cardiorespiratory fitness with obesity and the obesity paradox in cardiovascular disease. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 60, n. 1, p. 30-44, 2017.

PAHWA, Roma et al. Gut Microbiome and Inflammation: A Study of Diabetic Inflammasome-Knockout Mice. **Journal of Diabetes Research**, v. 2017, Article ID 6519785, 5 pages, 2017.

PALANISSAMI, Gowri; PAUL, Solomon FD. RAGE and Its Ligands: Molecular Interplay Between Glycation, Inflammation, and Hallmarks of Cancer—a Review. **Hormones and Cancer**, v. 9, n. 5, p. 295-325, 2018.

PAN, Deng et al. A novel proteoglycan from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies protects kidney function and ameliorates diabetic nephropathy via its antioxidant activity in C57BL/6 db/db mice. **Food and chemical toxicology**, v. 63, p. 111-118, 2014.

PARK, Do-Young et al. Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in diet-induced obese mice is associated with gut microbial changes and reduction in obesity. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e59470, 2013.

PARTO, Parham; LAVIE, Carl J. Obesity and Cardiovascular Diseases. **Current Problems in Cardiology**, v. 42, n. 11, p. 376-394, November 2017.

PENNACCHI, Paula Comune et al. 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.

PILZ, Jürgen et al. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2, 4-dinitrophenylhydrazine derivative. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 742, n. 2, p. 315-325, 2000.

PINKY GAIDHU, Mandeep; CEDDIA, Rrolando Bacis. Remodeling glucose and lipid metabolism through AMPK activation: relevance for treating obesity and Type 2 diabetes. **Clinical Lipidology**, v. 4, n. 4, p. 465-477, 2009.

PINKAS, Adi; ASCHNER, Michael. Advanced glycation end-products and their receptors: Related pathologies, recent therapeutic strategies, and a potential model for future neurodegeneration studies. **Chemical research in toxicology**, v. 29, n. 5, p. 707-714, 2016.

PODRINI, Christine et al. High-fat feeding rapidly induces obesity and lipid derangements in C57BL/6N mice. **Mammalian genome**, v. 24, n. 5-6, p. 240-251, 2013.

POHER, Anne-Laure et al. Brown adipose tissue activity as a target for the treatment of obesity/insulin resistance. **Frontiers in physiology**, v. 6, p. 4, 2015.

POP-BUSUI, Rodica; PIETROPAOLO, Massimo. Metabolic syndrome and inflammation. In: **Immunoendocrinology: Scientific and Clinical Aspects**. Humana Press, Totowa, NJ, 2011. p. 69-92.

POULSEN, Malene W. et al. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 10-37, 2013.

PRADA, PO; SAAD, MJA. Bases moleculares da sinalização da insulina. In: CINTRA DE, Ropelle; ER, Pauli JR. **Obesidade e diabetes – fisiopatologia e sinalização celular**. São Paulo: Sarvier, 2011.

PRICE, Nathan L. et al. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. **Cell metabolism**, v. 15, n. 5, p. 675-690, 2012.

PROTZEK, AOP. et al. Insulin and glucose sensitivity, insulin secretion and β -cell distribution in endocrine pancreas of the fruit bat *Artibeus lituratus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 157, n. 2, p. 142-148, 2010.

PUIGSERVER, Pere et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 829-839, 1998.

PULINILKUNNIL, Thomas et al. Adrenergic regulation of AMP-activated protein kinase in brown adipose tissue in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 11, p. 8798-8809, 2011.

RABBANI, Naila; THORNALLEY, Paul J. Glyoxalase 1 modulation in obesity and diabetes. **Antioxidants & redox signaling**, v. 30, n. 3, p. 354-374, 2018.

RAINS, Justin L.; JAIN, Sushil K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 5, p. 567-575, 2011.

RAHMAN, Shahedur; ISLAM, Rezuhanul. Mammalian Sirt1: insights on its biological functions. **Cell Communication and Signaling**, v. 9, n. 1, p. 11, 2011.

RAMULU, Punna et al. Hypolipidemic effect of soluble dietary fiber (galactomannan) isolated from fenugreek seeds in WNIN (GR-Ob) obese rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 19, p. 4804-4813, 2011.

REEVES, Philip G. et al. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RICE, M. Catherine; O'BRIEN, Stephen J. Genetic variance of laboratory outbred Swiss mice. **Nature**, v. 283, n. 5743, p. 157, 1980.

RIFAI, N.; WARNICK, G.R. Lipids, Lipoproteins, Apolipoproteins, and Other Cardiovascular Risk Factors. In: BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E. **Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics**. 40th. ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2006. cap.26, p.903-981.

RÍOS-COVIÁN, David et al. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 185, 2016.

RITTER, Olesja et al. Lipid-mediated muscle insulin resistance: different fat, different pathways?. **Journal of molecular medicine**, v. 93, n. 8, p. 831-843, 2015.

RODGERS, Joseph T. et al. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. **Nature**, v. 434, n. 7029, p. 113, 2005.

RODGERS, Joseph T.; PUIGSERVER, Pere. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 31, p. 12861-12866, 2007.

ROXO, Daniela Fernandes et al. 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.

RUDERMAN, Neil; PRENTKI, Marc. AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 4, p. 340, 2004.

RUPÉREZ, Azahara; GIL, Angel; AGUILERA, Concepción. Genetics of oxidative stress in obesity. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 2, p. 3118-3144, 2014.

RUSH, JW.; SCANDIFORD, SD. Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. **Clinical Biochemistry**, v.36, p.345-351, 2003.

SALMINEN, Antero; HYTTINEN, Juha MT; KAARNIRANTA, Kai. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. **Journal of molecular medicine**, v. 89, n. 7, p. 667-676, 2011.

SANCHEZ, Jean-Charles et al. Effect of rosiglitazone on the differential expression of diabetes-associated proteins in pancreatic islets of C57Bl/6 lep/lep mice. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, n. 7, p. 509-516, 2002.

SANTOS, Juliana et al. Development of nonalcoholic hepatopathy: contributions of oxidative stress and advanced glycation end products. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 10, p. 19846-19866, 2013.

SAVARY, Stéphane et al. Fatty acids-induced lipotoxicity and inflammation. **Current drug metabolism**, v. 13, n. 10, p. 1358-1370, 2012.

SAVINI, Isabella et al. Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 5, p. 10497-10538, 2013.

SCARPULLA, Richard C. Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1147, n. 1, p. 321-334, 2008.

SCHAFFER, JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. **Current opinion in lipidology**, v. 14, p. 281-287, 2003.

SCHEJA, Ludger; HEEREN, Joerg. Metabolic interplay between white, beige, brown adipocytes and the liver. **Journal of hepatology**, v. 64, n. 5, p. 1176-1186, 2016.

SCHUG, Thaddeus T.; LI, Xiaoling. Sirtuin 1 in lipid metabolism and obesity. **Annals of medicine**, v. 43, n. 3, p. 198-211, 2011.

SEALE, Patrick et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. **Nature**, v. 454, n. 7207, p. 961, 2008.

SEO, Kwon-Il et al. Effect of curcumin supplementation on blood glucose, plasma insulin, and glucose homeostasis related enzyme activities in diabetic db/db mice. **Molecular nutrition & food research**, v. 52, n. 9, p. 995-1004, 2008.

SERRA, Dolors et al. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 3, p. 269-284, 2013.

SHAO, Weijuan et al. Curcumin prevents high fat diet induced insulin resistance and obesity via attenuating lipogenesis in liver and inflammatory pathway in adipocytes. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e28784, 2012.

SHAH, Shahid Ali et al. Melatonin Stimulates the SIRT 1/Nrf2 Signaling Pathway Counteracting Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Oxidative Stress to Rescue Postnatal Rat Brain. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 23, n. 1, p. 33-44, 2017.

SHAN, Tizhong et al. Distinct populations of adipogenic and myogenic Myf5-lineage progenitors in white adipose tissues. **Journal of lipid research**, v. 54, n. 8, p. 2214-2224, 2013.

SHARMA, Abhishek et al. Meta-analysis of the relation of body mass index to all-cause and cardiovascular mortality and hospitalization in patients with chronic heart failure. **American Journal of Cardiology**, v. 115, n. 10, p. 1428-1434, 2015.

- SHEHATA, AM. et al. 11-Keto- β -boswellic acids prevent development of autoimmune reactions, insulinitis and reduce hyperglycemia during induction of multiple low-dose streptozotocin (MLD-STZ) diabetes in mice. **Hormone and Metabolic Research**, v. 47, n. 06, p. 463-469, 2015.
- SHI, Si et al. Melatonin attenuates acute kidney ischemia/reperfusion injury in diabetic rats by activation of the SIRT1/Nrf2/HO-1 signaling pathway. **Bioscience reports**, v. 39, n. 1, p. BSR20181614, 2019.
- SINGH, Shailendra P. et al. PGC-1 alpha regulates HO-1 expression, mitochondrial dynamics and biogenesis: Role of epoxyeicosatrienoic acid. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 125, p. 8-18, 2016.
- SCHIPPA, Serena; CONTE, Maria Pia. Dysbiotic events in gut microbiota: impact on human health. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 5786-5805, 2014.
- SMITH, Briohny W.; ADAMS, Leon A. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, n. 8, p. 456-465, 2011.
- SO, Mandy et al. Analysis of time-dependent adaptations in whole-body energy balance in obesity induced by high-fat diet in rats. **Lipids in health and disease**, v. 10, n. 1, p. 99, 2011.
- SONG, Zhuolun et al. Dietary Curcumin Intervention Targets Mouse White Adipose Tissue Inflammation and Brown Adipose Tissue UCP1 Expression. **Obesity**, v. 26, n. 3, p. 547-558, 2018.
- SONG, Fei et al. RAGE regulates the metabolic and inflammatory response to high-fat feeding in mice. **Diabetes**, v. 63, n. 6, p. 1948-1965, 2014.
- SOTO-URQUIETA, María G. et al. Curcumin restores mitochondrial functions and decreases lipid peroxidation in liver and kidneys of diabetic db/db mice. **Biological research**, v. 47, n. 1, p. 74, 2014.
- SPYROPOULOS, Basileios G. et al. Antioxidant properties of probiotics and their protective effects in the pathogenesis of radiation-induced enteritis and colitis. **Digestive diseases and sciences**, v. 56, n. 2, p. 285-294, 2011.
- SUBRAMANIAN, Sorimuthu Pillai; PRASATH, Gopalan Sriram. Antidiabetic and antidyslipidemic nature of trigonelline, a major alkaloid of fenugreek seeds studied in high-fat-fed and low-dose streptozotocin-induced experimental diabetic rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 4, n. 4, p. 475-480, 2014.
- STINKENS, Rudi et al. Targeting fatty acid metabolism to improve glucose metabolism. **Obesity reviews**, v. 16, n. 9, p. 715-757, 2015.
- SUN, Beicheng; KARIN, Michael. Obesity, inflammation, and liver cancer. **Journal of hepatology**, v. 56, n. 3, p. 704-713, 2012.
- TANG, Bor Luen. Sirt1 and the mitochondria. **Molecules and cells**, v. 39, n. 2, p. 87, 2016.
- TANG, Youcai; CHEN, Anping. Curcumin eliminates the effect of advanced glycation end-products (AGEs) on the divergent regulation of gene expression of receptors of AGEs by interrupting leptin signaling. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 94, n. 5, p. 503, 2014.
- THARAHESWARI, M. et al. Trigonelline and diosgenin attenuate ER stress, oxidative stress-mediated damage in pancreas and enhance adipose tissue PPAR γ activity in type 2 diabetic rats. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 396, n. 1-2, p. 161-174, 2014.

- TANGVARASITTICHAI, Surapon. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. **World journal of diabetes**, v. 6, n. 3, p. 456, 2015.
- TELCI, Aysegül et al. Oxidative protein damage in early stage Type 1 diabetic patients. **Diabetes research and clinical practice**, v. 50, n. 3, p. 213-223, 2000.
- TILG, Herbert; KASER, Arthur. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2126-2132, 2011.
- TIMPER, Katharina et al. IL-6 improves energy and glucose homeostasis in obesity via enhanced central IL-6 trans-signaling. **Cell reports**, v. 19, n. 2, p. 267-280, 2017.
- TOMANKOVA, Veronika et al. Altered cytochrome P450 activities and expression levels in the liver and intestines of the monosodium glutamate-induced mouse model of human obesity. **Life sciences**, v. 133, p. 15-20, 2015.
- TOWBIN, Harry et al. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.
- TOWNSEND, Kristy; TSENG, Yu-Hua. Brown adipose tissue: recent insights into development, metabolic function and therapeutic potential. **Adipocyte**, v. 1, n. 1, p. 13-24, 2012.
- TRAUNER, Michael et al. Fatty liver and lipotoxicity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 3, p. 299-310, 2010.
- TSUCHIYA, Hiroyuki et al. High-fat, high-fructose diet induces hepatic iron overload via a hepcidin-independent mechanism prior to the onset of liver steatosis and insulin resistance in mice. **Metabolism**, v. 62, n. 1, p. 62-69, 2013.
- URIBARRI, Jaime et al. Restriction of advanced glycation end products improves insulin resistance in human type 2 diabetes: potential role of AGER1 and SIRT1. **Diabetes care**, v. 34, n. 7, p. 1610-1616, 2011.
- VAN GAAL, Luc F. et al. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 875, 2006.
- VATTEM, Dhiraj A. et al. Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, v. 14, n. 2, p. 120, 2005.
- VILLALBA, Julian A. et al. Obesity-Induced Lipotoxicity Increases Endoplasmic Reticular (ER) Stress-Mediated Alveolar Cell Apoptosis Following Experimental Lung Injury. In: AMERICAN THORACIC SOCIETY 2015. International Conference: D96. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 189, A6339, 2014.
- VILLARD, Elise F.; GUERIN, Maryse. Reverse Cholesterol Transport in HDL Metabolism: Modulation of Structural and Functional Features of HDL Particles. In: KOMODA, T Tsugikazu. (Editor). **The HDL Handbook**. 2nd. ed. London: Academic Press, 2014. p. 65-101.
- VLASSARA, Helen et al. Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the antiinflammatory AGE receptor-1. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 11, p. 4483-4491, 2009.
- VLASSARA, Helen; STRIKER, Gary E. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, n. 9, p. 526, 2011.

WANG, Chao-Yung; LIAO, James K. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. In: WEICHHART, Thomas. (Editor). **mTOR: Methods and Protocols**. Totowa, N.J.: Humana Press, 2012. p. 421-433.

WANG, Shan et al. Curcumin promotes browning of white adipose tissue in a norepinephrine-dependent way. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 466, n. 2, p. 247-253, 2015.

WANG, Songbo et al. Resveratrol induces brown-like adipocyte formation in white fat through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) α 1. **International journal of obesity**, v. 39, n. 6, p. 967, 2015.

WANG, Yang et al. Antioxidant properties of probiotic bacteria. **Nutrients**, v. 9, n. 5, p. 521, 2017.

WANG, Huifen et al. Yogurt consumption is associated with better diet quality and metabolic profile in American men and women. **Nutrition Research**, v. 33, n. 1, p. 18-26, 2013.

WANG, Yang et al. Bacillus amyloliquefaciens SC06 alleviates the oxidative stress of IPEC-1 via modulating Nrf2/Keap1 signaling pathway and decreasing ROS production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 7, p. 3015-3026, 2017.

WAUTIER, Marie-Paule; GUILLAUSSÉAU, Pierre-Jean; WAUTIER, Jean-Luc. Activation of the receptor for advanced glycation end products and consequences on health. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 11, n. 4, p. 305-309, 2017.

WEISBERG, Stuart P. et al. Dietary curcumin significantly improves obesity-associated inflammation and diabetes in mouse models of diabetes. **Endocrinology**, v. 149, n. 7, p. 3549-3558, 2008.

WEST, David B. et al. Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 262, n. 6, p. R1025-R1032, 1992.

WHO (World Health Organization). Obesity and Overweight. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em: 11 de julho de 2017.

WIEST, Reiner et al. Impaired hepatic removal of interleukin-6 in patients with liver cirrhosis. **Cytokine**, v. 53, n. 2, p. 178-183, 2011.

WILLIAMS, Cameron B.; GURD, Brendon J. Skeletal muscle SIRT1 and the genetics of metabolic health: therapeutic activation by pharmaceuticals and exercise. **The application of clinical genetics**, v. 5, p. 81, 2012.

WISE, Jacqui. Eating a yoghurt a day is linked to lower risk of type 2 diabetes. **BMJ**, v. 349, Article g7081, 2014.

WINZELL, Maria Sörhede; ÅHRÉN, Bo. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. suppl 3, p. S215-S219, 2004.

WRÓBLENSKI, F.; LADUE, J. S. Serum glutamic- pyruvic transaminase in cardiac and hepatic diseases. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.91, p.569-571, 1956.

WU, Jindao et al. Effect of curcumin on glycerol-induced acute kidney injury in rats. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 10114, 2017.

WU, Jun et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 366-376, 2012.

XIE, Jianling et al. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). **Cellular signalling**, v. 25, n. 11, p. 2185-2197, 2013.

XIE, Xiao-Yun et al. Curcumin attenuates lipolysis stimulated by tumor necrosis factor- α or isoproterenol in 3T3-L1 adipocytes. **Phytomedicine**, v. 20, n. 1, p. 3-8, 2012.

XU, Aijing et al. Interleukin-10 gene transfer into insulin-producing β cells protects against diabetes in non-obese diabetic mice. **Molecular medicine reports**, v. 12, n. 3, p. 3881-3889, 2015.

XU, Elaine et al. Targeted disruption of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 promotes diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. **Endocrinology**, v. 150, n. 8, p. 3503-3512, 2009.

XU, Elaine et al. Temporal and tissue-specific requirements for T-lymphocyte IL-6 signalling in obesity-associated inflammation and insulin resistance. **Nature communications**, v. 8, p. 14803, 2017.

XUE, Mingzhan et al. Transcriptional control of glyoxalase 1 by Nrf2 provides a stress-responsive defence against dicarbonyl glycation. **Biochemical Journal**, v. 443, n. 1, p. 213-222, 2012.

XUE, Wanli et al. Trigonella foenum graecum seed extract protects kidney function and morphology in diabetic rats via its antioxidant activity. **Nutrition Research**, v. 31, n. 7, p. 555-562, 2011.

YACOUB, Rabi; LEE, Kyung; HE, John Cijiang. The role of SIRT1 in diabetic kidney disease. **Frontiers in endocrinology**, v. 5, p. 166, 2014.

YAMAGISHI, Sho-ichi et al. Inhibitors of advanced glycation end products (AGEs): potential utility for the treatment of cardiovascular disease. **Cardiovascular therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 50-58, 2008.

YAMAMOTO, Isamu; HONDA, Teruko. Advanced Glycation End Products Decrease PON1 Gene Expression and Increase PAF-AH Gene Expression. **Atherosclerosis**, v. 32, Supplements, p. 106, 2018.

YANG, Zandong et al. Suppression of autoimmune diabetes by viral IL-10 gene transfer. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 12, p. 6479-6485, 2002.

YATURU, Subhashini. Obesity and type 2 diabetes. **Journal of Diabetes Mellitus**, v. 1, n. 04, p. 79, 2011.

YE, Jianping. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. **International journal of obesity**, v. 33, n. 1, p. 54, 2009.

YORDI, Estela Guardado et al. Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship evidence. In: **Nutrition, well-being and health**. IntechOpen, 2012. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/nutrition-well-being-and-health/antioxidant-and-prooxidant-effect-of-polyphenol-compounds-and-structure-activity-relationship-eviden>.

YOSHINARI, O.; Igarashi, K. Anti-diabetic effect of trigonelline and nicotinic acid, on KK-Ay mice. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 20, p. 2196-2202, 2010.

YOSHINARI, Orie; Takenake, Asako; Igarashi, Kiharu. Trigonelline ameliorates oxidative stress in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. **Journal of medicinal food**, v. 16, n. 1, p. 34-41, 2013.

YOSHINO, Jun et al. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD⁺ intermediate, treats the pathophysiology of diet-and age-induced diabetes in mice. **Cell metabolism**, v. 14, n. 4, p. 528-536, 2011.

YOU, Min et al. Sirtuin 1 signaling and alcoholic fatty liver disease. **Hepatobiliary surgery and nutrition**, v. 4, n. 2, p. 88, 2015.

YUAN, Yang et al. Advanced glycation end products (AGEs) increase renal lipid accumulation: a pathogenic factor of diabetic nephropathy (DN). **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 126, 2017.

ZÁMBÓ, Veronika et al. Lipotoxicity in the liver. **World journal of hepatology**, v. 5, n. 10, p. 550, 2013.

ZAMEER, Saima et al. A review on therapeutic potentials of Trigonella foenum graecum (fenugreek) and its chemical constituents in neurological disorders: Complementary roles to its hypolipidemic, hypoglycemic, and antioxidant potential. **Nutritional neuroscience**, p. 1-7, 2017.

ZARZUELO, María José et al. SIRT1 inhibits NADPH oxidase activation and protects endothelial function in the rat aorta: implications for vascular aging. **Biochemical pharmacology**, v. 85, n. 9, p. 1288-1296, 2013.

ZHANG, Chenhong et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. **The ISME journal**, v. 4, n. 2, p. 232, 2010.

ZHANG, Dong-Fang et al. Protection effect of trigonelline on liver of rats with non-alcoholic fatty liver diseases. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 8, n. 8, p. 651-654, 2015.

ZHANG, Dong-Wei et al. Curcumin and diabetes: a systematic review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, Article ID 636053, 16 pages, 2013.

ZHAO, Le et al. Combination treatment with quercetin and resveratrol attenuates high fat diet-induced obesity and associated inflammation in rats via the AMPK α 1/SIRT1 signaling pathway. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 14, n. 6, p. 5942-5948, 2017.

ZHAO, Jiong et al. Suppression of fatty acid synthase, differentiation and lipid accumulation in adipocytes by curcumin. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 351, n. 1-2, p. 19-28, 2011.

ZHOU, J.; Chan, L.; ZHOU, S. Trigonelline: a plant alkaloid with therapeutic potential for diabetes and central nervous system disease. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 21, p. 3523-3531, 2012.

ZHOU, Jiyin et al. Experimental diabetes treated with trigonelline: effect on β cell and pancreatic oxidative parameters. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 27, n. 3, p. 279-287, 2013.

ZHANG, Min et al. Protective benefits of AMP-activated protein kinase in hepatic ischemia-reperfusion injury. **American journal of translational research**, v. 9, n. 3, p. 823, 2017.

ZHU, Yan et al. Interleukin-10 inhibits neuroinflammation-mediated apoptosis of ventral mesencephalic neurons via JAK-STAT3 pathway. **International immunopharmacology**, v. 50, p. 353-360, 2017.

ZILIN, Sun et al. The determination of AGE-peptides by flow injection assay, a practical marker of diabetic nephropathy. **Clinica chimica acta**, v. 313, n. 1, p. 69-75, 2001.

ZORDOKY, Beshay NM et al. AMPK-dependent inhibitory phosphorylation of ACC is not essential for maintaining myocardial fatty acid oxidation. **Circulation research**, v. 115, n. 5, p. 518-524, 2014.

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 03/2016

Interessada: MARIANA DE CAMPOS DA COSTA

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Projeto: Avaliação da trigonelina e curcumina, isoladas ou co-administradas em iogurte, em modelo experimental de diabetes mellitus tipo 2

Parecer nº 19/2016 – Comissão de Ética no Uso de Animais

O coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa “Avaliação da trigonelina e curcumina, isoladas ou co-administradas em iogurte, em modelo experimental de diabetes mellitus tipo 2”, apresentado pela pós-graduanda MARIANA DE CAMPOS DA COSTA, sob orientação da Professora Doutora Amanda Martins Baviera, do Departamento de Análises Clínicas desta Faculdade.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em MARÇO de 2019, em formulário para este fim.

Araraquara, 31 de março de 2016.



Prof. Dr. CARLOS CÉSAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

Trigonelline and curcumin alone, but not in combination, counteract oxidative stress and inflammation and increase glycation product detoxification in the liver and kidney of mice with high-fat diet-induced obesity[☆]

Mariana Campos Costa^a, Tayra Ferreira Oliveira Lima^a, Carlos Alberto Arcaro^a, Maiara Destro Inacio^a, Alexander Batista-Duharte^a, Iracilda Zeppone Carlos^a, Luís Carlos Spolidorio^b, Renata Pires Assis^{a,c}, Iguatemy Lourenço Brunetti^a, Amanda Martins Baviera^{a,*}

^aSão Paulo State University (Unesp), School of Pharmaceutical Sciences, Department of Clinical Analysis, Araraquara, São Paulo, Brazil

^bSão Paulo State University (Unesp), Araraquara School of Dentistry, Department of Physiology and Pathology, Araraquara, São Paulo, Brazil

^cPaulista University (UNIP), Institute of Health Sciences, Araraquara, São Paulo, Brazil

Received 3 May 2019; received in revised form 17 August 2019; accepted 12 November 2019

Abstract

The development of obesity-associated complications is related to various pathogenic events including chronic inflammation, oxidative stress and generation of advanced glycation end products (AGEs). Due to their antioxidant, anti-inflammatory and antiglycation properties, trigonelline and curcumin are interesting candidates to counteract complications of obesity and diabetes mellitus. The current study aimed to investigate the effects of treatment with curcumin or trigonelline mixed into yoghurt, alone or in combination, on mice fed high-fat diet (HFD); the focus was mainly on the potential of these phytochemicals to counteract oxidative and glycation stress. Yoghurt alone improved glucose tolerance and reduced proinflammatory cytokine levels in HFD mice; however, it did not affect the antioxidant status. Trigonelline-enriched yoghurt prevented fat accumulation in adipose tissue, improved both insulin sensitivity and glucose tolerance and exerted anti-inflammatory and antiglycation activities (reduced AGEs and AGE receptor levels and increased the levels of components related to AGE detoxification) in liver and kidney of HFD mice. Curcumin-enriched yoghurt exerted anti-inflammatory and potent antioxidant properties (increased antioxidant enzyme activities and decreased lipid peroxidation) in liver and kidney of HFD mice. However, several beneficial effects were nullified when trigonelline and curcumin were administered in combination. Trigonelline and curcumin have emerged as promising complementary therapy candidates for liver and kidney complications associated with obesity. However, the administration of these phytochemicals in combination, at least in HFD mice, was not effective; inhibition of biotransformation processes and/or the reaching of toxic doses during combined treatment may be prevailing over the individual pharmacodynamic actions of these phytochemicals.

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Obesity; Advanced glycation; Oxidative stress; Inflammation; Trigonelline; Curcumin

1. Introduction

Obesity is a leading public health issue that has reached global pandemic proportions. It represents a risk factor for comorbidities

and noncommunicable diseases, including diabetes mellitus, heart and vascular disorders and several cancer types, among others [1]. Emerging concepts implicate various pathogenic events in the development and progression of obesity complications, including

Abbreviations: AGEs, advanced glycation end products; AGE-R, AGE-receptor; ALT, alanine aminotransferase; AUC, area under the curve; Bax, Bcl2 associated X protein; C, control diet; CAT, catalase; CYP3A4, cytochrome P540 3A4; eWAT, epididymal white adipose tissue; GLO 1, glyoxalase 1; GSH-Px, glutathione peroxidase; HDL-cholesterol, high-density lipoprotein-cholesterol; H&E, hematoxylin and eosin; HFD, high-fat diet; iBAT, interscapular brown adipose tissue; IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10; ITT, insulin tolerance test; NADP⁺, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; NF-κB, nuclear factor κB; NRF 2, nuclear erythroid 2-related factor 2; OGTT, oral glucose tolerance test; PON 1, paraoxonase 1; RAGE, receptor for AGEs; ROS, reactive oxygen species; rpWAT, retroperitoneal white adipose tissue; SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; TNF-α, tumor necrosis factor-alpha

^{*} Funding: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (Grant Number 98/09152-6; 16/23644-9), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (Grant Number 305936/2017-4), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil-Finance Code 001, Scientific Support and Development Program of School of Pharmaceutical Sciences (UNESP) (PADC/FCFAr/UNESP, Grant Number 2017/02-1).

^{*} Corresponding author at: Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, Rodovia Araraquara Jaú, km 01 – s/n, Campos Ville, Araraquara, São Paulo, Brazil, CEP 14800-903. Tel.: +55 16 3301 5717.

E-mail address: amanda.baviera@unesp.br (A.M. Baviera).

low-grade chronic inflammation, oxidative stress and protein glycation.

Chronic systemic inflammation in obesity originates from adipocyte hypertrophy, resulting in adipose tissue local immune responses. Adipose cells and infiltrating macrophages are the major sources of proinflammatory cytokines, mainly interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), which participate in the onset of insulin resistance [2,3]. In addition, these adipokines are regarded as potent inducers of reactive oxygen species (ROS) production [3,4]. Increased ROS levels may be involved in nuclear factor κ B (NF- κ B) activation, which in turn may increase proinflammatory cytokine expression [5]. Moreover, oxidative stress contributes to the glycation process, leading to increased generation of advanced glycation end products (AGEs) [6]. AGE formation is also widely accelerated under hyperglycemic conditions via protein glycation and the generation of dicarbonyl compounds, including glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone [7,8]. Many detrimental AGE-induced consequences during the onset of obesity and diabetes complications are related to the receptor for AGEs (RAGE); RAGE activation stimulates signaling pathways leading to insulin resistance development, low-grade inflammation and oxidative stress exacerbation [9,10]. In addition, NF- κ B induces RAGE expression and the activation of this receptor perpetuates NF- κ B induction [11]. Altogether, there is a complex interplay among inflammation, oxidative stress and glycation processes, which leads to a pathogenic profile causing various disturbances in the course of obesity.

These recent advances in the understanding of the multistep metabolic syndrome pathogenesis have provided the basis to explore new therapeutic possibilities for obesity, diabetes mellitus and associated complications. In this sense, in addition to the identification of strategies that dampen low-grade inflammation and oxidative stress, RAGE inhibition and AGE detoxification induction are apparently attractive candidates for therapeutic development [12,13]. Among the AGE detoxification systems, the AGE-receptor (AGE-R) complex family and the glyoxalase system should be highlighted. The AGE-R complex consists of AGE-R1 (OST-48), AGE-R2 (80K-H) and AGE-R3 (galectin-3). AGE-R1 is active when bound to proteins modified by AGEs, promoting their endocytic uptake and degradation [8]. The glyoxalase system participates in methylglyoxal detoxification; it comprises two enzymes: glyoxalase 1 (GLO 1) catalyzing hemithioacetal isomerization (spontaneously produced in the reaction between methylglyoxal and reduced glutathione) to S-D-lactoylglutathione and glyoxalase 2 (GLO 2) catalyzing the hydrolysis of S-D-lactoylglutathione to D-lactate [14]. Low GLO 1 levels have been found in animal models of obesity and in obese individuals, leading to increased methylglyoxal levels and causing dicarbonyl stress, which contributes to insulin resistance and inflammation [13]. Therefore, the search for interventions stimulating antioxidant defenses and AGE detoxification systems, as well as inhibiting inflammation and the AGE/RAGE pathway, is an interesting direction for further investigation.

Natural bioactive compounds have attracted significant attention due to their anti-inflammatory, antioxidant and antiglycation activities against various disturbances and complications observed in obesity and diabetes mellitus [15,16]. Trigonelline (N-methylnicotinic acid; $C_7H_7NO_2$) is an alkaloid first isolated from the seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. (fenugreek). Trigonelline has exhibited beneficial effects on various obesity and diabetes symptoms [17–19]; however, studies focusing on its mechanism of action are still lacking. Curcumin (diferuloylmethane; $C_{21}H_{20}O_6$) is a yellow pigment isolated from the dried rhizomes of *Curcuma longa* L. (turmeric). Curcumin exerts pleiotropic activities against various diseases including obesity and diabetes mellitus [20,21]. More advances have been made in the identification of molecular targets for curcumin than for trigonelline; therefore, curcumin has emerged as an interesting option to be used in combination with trigonelline. Previous studies from our laboratory showed interesting results regarding the use of curcumin in

combination with other natural antioxidants [22] or with antidiabetic agents [23,24] to attenuate various diabetic symptoms. Therefore, in addition to advancing the understanding of curcumin and trigonelline mechanisms of action, another objective of this investigation was to introduce a therapeutic strategy combining curcumin and trigonelline, attempting to target the multiple disturbances observed in obesity.

The current study aimed to determine whether individual treatment with curcumin or trigonelline mixed into yoghurt has beneficial effects on the disturbances observed in fed high-fat diet (HFD) mice; the main focus was placed on the antioxidant and antiglycation activities of these phytochemicals and on their mechanism of action. The second goal of this study was to investigate the effects of combined treatment with trigonelline and curcumin mixed into yoghurt, introducing a new therapeutic strategy that targets various complications related to obesity.

2. Materials and methods

2.1. Animals and diets

C57Bl/6 male mice (4-week-old; weight 21 ± 0.10 g) were obtained from the Animal Facilities of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil. During the experimental period, animals were maintained in the Animal Facility of the Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (Unesp), Araraquara, Brazil. Mice were housed (two animals per cage) in a controlled environment of temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 5\%$) with 12 h light/dark cycle and with food and water ad libitum. After 2 weeks of acclimation and normal chow diet (Presença Nutrição Animal, Paulínia, São Paulo, Brazil), mice were fed for 9 weeks with control diet (C; 3.85 kcal/g; 4% lipids; Supplementary Table 1) or HFD (HFD; 5.40 kcal/g; 35% lipids; Supplementary Table 1) (Pragsoluções Biotecnologia e Comércio Ltda, Jau, São Paulo, Brazil). HFD enabled the development of obesity.

2.2. Experimental design and treatments

Curcumin from *Curcuma longa* (turmeric), powder (76% purity, product number C1386, batch number SLBH2403V, purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) and trigonelline (analytical standard, 100.4% purity, product number T5509, batch number BCBP6003V, purchased from Sigma Aldrich-Fluka, St. Louis, Missouri, USA) were mixed with commercial plain yoghurt (170 g containing 9.1 g carbohydrates, 6.8 g protein, 7.0 g total fat, 126 kcal, Nestlé®, Brazil), alone or in combination, using a homogenizer (27,000 rpm) for 90 s at ambient temperature (25°C).

Mice were randomly separated into six groups (14 animals/group): fed a control diet (C); fed a HFD (H); fed a HFD and treated with yoghurt (HY); fed a HFD and treated with trigonelline (50 mg/kg body weight) mixed into yoghurt (HT); fed a HFD and treated with curcumin (90 mg/kg body weight) mixed into yoghurt (HC); and fed a HFD and treated with trigonelline (50 mg/kg body weight) + curcumin (90 mg/kg body weight) mixed into yoghurt (HTC). All treatments were administered using gavage. Yoghurt (alone or containing trigonelline and/or curcumin) was administered by gavage to animals in a volume of 0.15 mL/day. The treatments started on the day of HFD offering to mice and were performed daily, between 08:00–09:00 a.m., for 9 weeks.

Body weight and food intake were assessed weekly. The oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT) were performed at week 7 and 8, respectively. Considering that animals were fasted before the OGTT and ITT, food intake monitoring was performed until week 6. At the end of the treatments (week 9), animals were fasted for 6 h, anesthetized (16 mg/kg xylazine and 90 mg/kg ketamine) and administered 3.8 IU/kg insulin (8 mice/group) or saline solution (6 mice/group) intraperitoneally to investigate AKT phosphorylation changes in epididymal white adipose tissues (eWAT); after 10 min insulin or saline administration, blood samples were collected by cardiac puncture in heparinized tubes and immediately centrifuged at $700 \times g$ for 10 min at 25°C to obtain plasma. *Gastrocnemius* skeletal muscles, eWAT, retroperitoneal white adipose tissue (rpWAT), interscapular brown adipose tissue (iBAT), liver and kidney were carefully removed, weighed, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analysis. Furthermore, eWAT samples were embedded into formalin for histological analysis.

All procedures were previously approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the School of Pharmaceutical Sciences, Unesp, Araraquara (CEUA/FCF/Car n° 03/2016).

2.3. Glucose homeostasis assays

At week 7, animals were fasted for 12 h, and the OGTT was performed at 11:00 a.m. after gavage with glucose (1 g/kg). Glycemia were measured before (0 min) and after (15, 30, 60, 90 and 120 min) the glucose challenge. A drop of blood was obtained from the mouse tail to determine the glycemia levels measured by glucometer (Abbott Diabetes Care Ltd., Brazil).

At week 8, mice were fasted for 6 h, and the ITT was performed at 01:00 p.m. after an intraperitoneal insulin injection (0.65 U/kg). Blood for glycemia determination was collected before (0 min) and after (15, 30, 45 and 60 min) the insulin injection.

2.4. Biochemical analyses

Glucose, triacylglycerol, cholesterol, high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-cholesterol), alanine aminotransferase (ALT), creatinine and urea levels were determined using commercial kits (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, Brazil).

Fluorescent AGEs in plasma and liver were assessed according to Zilin et al. [25] with modifications, whereas fluorescent AGEs in kidney were measured according to Pokupec et al. [26]. Plasma and liver homogenates were treated with 0.12 M trichloroacetic acid, 0.1 M sodium hydroxide and 1.2 M chloroform (plasma) or 2.4 M chloroform (liver). Kidney homogenates were supplemented with 0.1 M sodium hydroxide. The tubes were shaken vigorously, maintained at $10 \pm 2^\circ\text{C}$ for 30 min, and centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min at 10°C . Fluorescence intensities relative to the AGEs in supernatants were measured spectrofluorometrically with excitation and emission wavelengths of 370 and 440 nm, respectively, using a microplate multi-mode reader with split set at 16 nm, Synergy H1™, BioTek Instruments Inc. (Winooski, VT, USA). The results were expressed as arbitrary units of fluorescence per milligram protein.

Lipid peroxidation products, including malondialdehyde, were measured in deproteinized tissue samples (plasma, liver and kidney) using the thiobarbituric acid (TBA) reaction; TBA reactive substances (TBARS) were assessed according to Kohn and Liversedge [27]. The activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in liver and kidney were determined as previously described [22,28]. SOD activity was evaluated by the oxidation of xanthine in the presence of xanthine oxidase, which generates a superoxide anion reducing nitroblue tetrazolium chloride (NBT) to a formazan product. CAT activity was measured by monitoring the disappearance of hydrogen peroxide (H_2O_2). GSH-Px activity was determined by the oxidation of glutathione (GSH) in the presence of H_2O_2 ; in the presence of glutathione reductase, the oxidized glutathione is reduced to GSH with concomitant oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) to NADP^+ . The activity of paraoxonase 1 (PON 1) in plasma was measured by the hydrolysis of paraoxon and the release of *p*-nitrophenol [22].

2.5. Western blot analysis

Samples of eWAT, liver and kidney samples were homogenized (Polytron Omni TH01, Kennesaw, GA) in ice-cold buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 24 mM sodium deoxycholate, 0.01% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium orthovanadate, 1.5 μM aprotinin, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) and 2.1 μM leupeptin, obtaining whole cell lysates. The homogenates were centrifuged at $11,900 \times g$ at 4°C for 30 min, and the supernatants were used for protein determination [29]. Sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 2% SDS, 33.2 mM dithiothreitol (DTT) and 0.01% bromophenol blue; pH 6.8) was added to the supernatants. Samples containing 20–100 μg protein were subjected to SDS-PAGE electrophoresis on 8–12% acrylamide gels and were then electroblotted onto nitrocellulose membranes. Proteins were detected by overnight incubation at 4°C with specific primary antibodies (Supplementary Table 2). Primary antibody binding was detected by peroxidase-conjugated secondary antibodies (Supplementary Table 2) and visualized utilizing an enhanced chemiluminescent substrate (1.1 mM luminol sodium salt, 2.0 mM 4-iodophenylboronic acid, 5.3 mM hydrogen peroxide and 0.1 M Tris-HCl, pH 8.6). Chemiluminescent bands were captured with a C-Digit Blot Scanner (LI-COR, Lincoln, NE), and band intensities were analyzed using LI-COR Image Studio 4.0.

To determine the protein levels of the transcription factors nuclear erythroid 2-related factor 2 (NRF 2) and p65 subunit of NF- κB , cytosolic or nuclear fractions were

prepared according to Seubwai et al. [30] with modifications. Liver and kidney samples were homogenized in a glass Dounce homogenizer in hypotonic buffer (10 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin). After centrifugation at $2600 \times g$ for 3 min at 4°C , the supernatant containing the cytosolic fraction was collected. The pellet was used as the nuclear fraction, lysed with nuclear lysis buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 10% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin) and incubated on ice for 30 min. The nuclear fraction was obtained by centrifugation at $20,800 \times g$ for 10 min at 4°C . Samples of the nuclear and cytosolic fractions containing 50 μg protein were used for analyses of NF- κB and NRF 2 levels.

Results were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.) of the densitometric band analysis obtained from 5 replicates per group; for densitometry, blots were developed in the linear range. All results were normalized to β -actin (total protein extracts), histone (nuclear extracts), or total protein (protein phosphorylation studies). For each biomarker monitored by western blot, a representative mean value lane was selected to compose the Figures.

2.6. IL-6, TNF- α and interleukin-10 (IL-10) level measurements

Samples of eWAT, liver and kidney (supernatants from western blot analysis) were used for cytokine measurements. IL-6, TNF- α and IL-10 levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's protocol (Affymetrix eBioscience, San Diego, CA, USA), and the absorbance was measured at 450 nm. Then, the sample values were read based on the standard curve, and the cytokine concentrations were calculated.

2.7. Histological analysis

Samples of eWAT were fixed by immersion in 10% formaldehyde, dehydrated with alcohol and xylol and embedded in paraffin. Five-micrometer-thick adipose tissue sections were mounted on slides and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Adipose cells were observed under an optical microscope (Olympus BX51, Olympus Optical, Tokyo, Japan) at $400 \times$ magnification (10 ocular $\times$ 40 objective lens), and images were acquired with a digital camera (DP-71, Olympus, Tokyo, Japan). The area and diameter of white adipocytes from 5 animals/group (500 adipose cells/group) were analyzed in the Image J software. Results were expressed as mean $\pm$ S.E.M. for adipocyte area and diameter.

For eWAT stereometric analysis, a $2250 \mu\text{m}^2$ standard grid containing 9×9 squares of $50 \mu\text{m}$ was constructed using an image editor (Adobe Photoshop CS5) and superimposed on the digital images obtained from the histological sections. A single, previously trained and calibrated examiner performed the stereometric analysis using the dot counting technique. Adipocyte volumetric densities were determined by comparing the proportion between cell membrane and cytoplasm. Adipocytes were identified as univacuolar, optically empty cells, compressed to each other, with limits constituted by the cell membrane and by its displaced cytoplasm and rounded nucleus. The results were expressed as percentage (mean $\pm$ S.E.M.) of cell structure (cell membrane and cytoplasm) occurrence from measurements of each histological section.

2.8. Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. One-way analysis of variance followed by the Student–Newman–Keuls test was used to compare intergroup differences of physiological and biochemical parameters as well as oxidative stress biomarkers. Data were considered statistically significant at $P < .05$. Statistical analyses were performed using the program GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

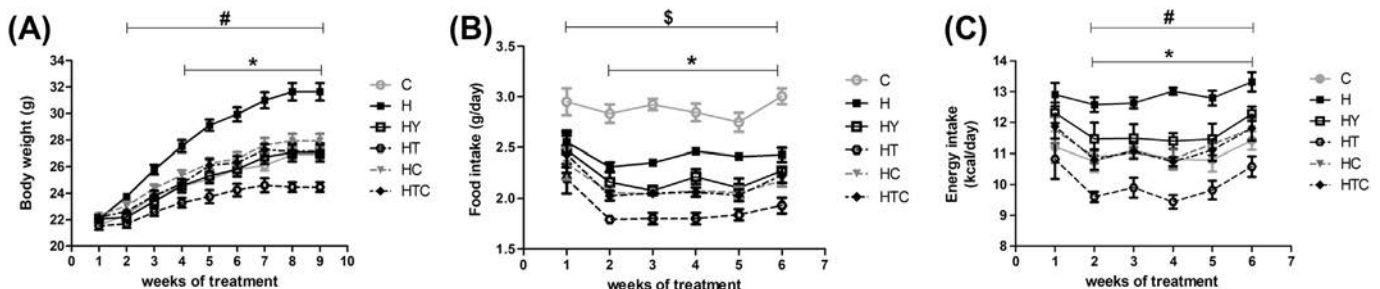


Fig. 1. Body weight and food and energy intake of mice fed a high-fat diet (HFD) and treated for 9 weeks with yoghurt enriched with trigonelline and curcumin alone or in combination. Body weight (A), food intake (B) and energy intake (C). Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M., $n = 14$. C: mice fed control diet; H: mice fed HFD; HY: mice fed HFD and treated with yoghurt; HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline in yoghurt; HC: mice fed HFD and treated with 90 mg/kg curcumin in yoghurt; HTC: HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline + 90 mg/kg curcumin in yoghurt. Differences between groups were considered significant at $P < .05$ and were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. #: H vs. C, HY, HT, HC, HTC; *: HT vs. C, H, HY, HC, HTC; \$: C vs. H, HY, HC, HT, HTC.

Table 1
Weights of tissues of mice fed a high-fat diet (HFD) and treated for 9 weeks with yoghurt enriched with trigonelline and curcumin alone or in combination

Tissues	C	H	HY	HT	HC	HTC
Epididymal WAT (g)	0.440±0.026 ^a	1.417±0.114 ^b	0.785±0.086 ^c	0.626±0.051 ^{a,c}	0.769±0.075 ^c	0.869±0.077 ^c
Retroperitoneal WAT (g)	0.103±0.006 ^a	0.509±0.035 ^b	0.301±0.045 ^c	0.187±0.020 ^a	0.256±0.030 ^c	0.283±0.032 ^c
Interscapular BAT (g)	0.075±0.005 ^a	0.100±0.007 ^b	0.067±0.004 ^a	0.068±0.003 ^a	0.060±0.003 ^a	0.072±0.005 ^a
Liver (g)	1.066±0.030 ^a	1.225±0.023 ^b	0.996±0.032 ^{a,c}	0.899±0.035 ^d	0.977±0.037 ^{a,c}	1.017±0.044 ^a
Kidney (g)	0.143±0.007 ^a	0.183±0.006 ^b	0.144±0.006 ^a	0.146±0.006 ^a	0.155±0.007 ^a	0.152±0.004 ^a

Values are expressed as mean±S.E.M., $n=14$. C: mice fed control diet; H: mice fed HFD; HY: mice fed HFD and treated with yoghurt; HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline in yoghurt; HC: mice fed HFD and treated with 90 mg/kg curcumin in yoghurt; HTC: HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline+90 mg/kg curcumin in yoghurt. Differences between groups were considered significant at $P<.05$ and were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. Means not sharing a common letter indicate significant differences in the analysis performed for each parameter, in a same tissue and for intergroup comparisons.

3. Results

3.1. Effects of trigonelline and curcumin on body weight gain, fat depots and food/energy intake in HFD mice

Throughout the 9 weeks of the experiment, mice fed HFD showed significant increases in body weight gain (Fig. 1A); fat depot mass accretion, including eWAT, rpWAT and iBAT (Table 1); and liver and kidney weight (Table 1). Hypertrophy of eWAT was confirmed in H mice using histological analysis, since enlargement of the adipocyte area (Fig. 2A and B) and diameter (Fig. 2A and C) were observed. In stereometric analysis, increased cytoplasm frequency (Fig. 2D) and decreased cell membrane frequency (Fig. 2E) indicated enlarged adipocyte volume. Mice fed HFD exhibited minor food intake (Fig. 1B) but increased energy intake (Fig. 1C).

Daily oral administration of yoghurt or curcumin-enriched yoghurt to mice fed a HFD decreased tissue weight (Table 1) and eWAT adiposity and hypertrophy (Fig. 2A–E); these changes can be explained, at least in part, by the slight decrease in food (Fig. 1B) and energy intake (Fig. 1C) observed in the HY and HC groups.

The strongest effects on obesogenic phenotype attenuation in HFD mice were achieved by treatment with trigonelline-enriched yoghurt. Since the beginning of treatment, even if receiving HFD, HT animals gained less body mass (3.0 ± 0.4 g) than both the H group (9.8 ± 0.5 g) and C group (5.3 ± 0.4 g). As a result, among all studied experimental conditions, the HT group exhibited the lowest body weight values after

9 weeks of treatment (Fig. 1A). Furthermore, trigonelline practically prevented the accretion of tissue weight (Table 1). Besides, the area (Fig. 2A and B) and diameter (Fig. 2A and C) of eWAT adipocytes were similar between the HT and C groups. Decreased cytoplasm frequency (Fig. 2D) and increased cell membrane frequency (Fig. 2E) were also observed in eWAT stereometric analysis, indicating lower adipocyte volume. These beneficial effects on obesity prevention were arguably a consequence of the marked decrease in food (Fig. 1B) and energy intake (Fig. 1C) caused by the trigonelline treatment.

Interestingly, when trigonelline was administered in combination with curcumin, the beneficial effects of trigonelline were not observed. HTC animals had lower body weight gain, (Fig. 1A), tissue weight (Table 1), food (Fig. 1B) and energy intake (Fig. 1C), eWAT adipocyte area (Fig. 2A and B) and diameter (Fig. 2A and C) and cytoplasm frequency (Fig. 2D), as well as increased cell membrane frequency (Fig. 2E) than the H group. Thus, HTC animals showed a profile similar to the one of the HC group. However, the effects of trigonelline on obesogenic phenotype prevention were not maintained when administered in combination with curcumin.

3.2. Effects of trigonelline and curcumin on glycemia, lipid profile, hepatic damage and renal function biomarkers and glycoxidative stress biomarkers in plasma of HFD mice

Mice fed HFD for 9 weeks exhibited higher fasting glucose (30%), triglyceride (21%), cholesterol (47%) and HDL-cholesterol (44%)

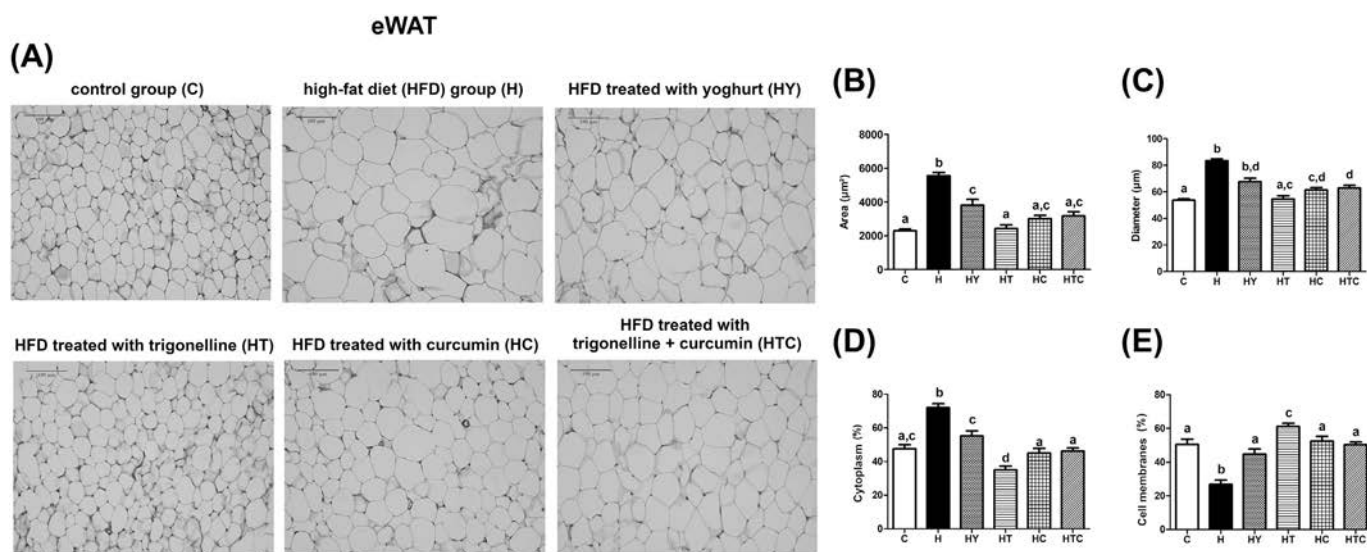


Fig. 2. Histology of epididymal white adipose tissue (eWAT) of mice fed a high-fat diet (HFD) and treated for 9 weeks with yoghurt enriched with trigonelline and curcumin alone or in combination. Representative microphotographs (400 × magnification) of eWAT stained sections from mice of different experimental groups. (A), quantifications of the mean area (B) and diameter (C) of eWAT adipocytes and frequency of cytoplasm (D) and plasma cell membranes (E) in eWAT. Values are expressed as mean±S.E.M., $n=5$. C: mice fed control diet; H: mice fed HFD; HY: mice fed HFD and treated with yoghurt; HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline in yoghurt; HC: mice fed HFD and treated with 90 mg/kg curcumin in yoghurt; HTC: HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline+90 mg/kg curcumin in yoghurt. Differences between groups were considered significant at $P<.05$ and were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. Means not sharing a common letter indicate significant differences.

Table 2

Plasma biochemical parameters of mice fed a high-fat diet (HFD) and treated for 9 weeks with yoghurt enriched with trigonelline and curcumin alone or in combination

Plasma parameters	C	H	HY	HT	HC	HTC
Glucose (mg/dL)	94±5.8 ^a	122±4.9 ^b	100±3.9 ^a	104±3.7 ^a	101±5.2 ^a	114±7.5 ^b
Triglycerides (mg/dL)	47±2.9 ^a	57±2.5 ^b	49±3.7 ^a	46±2.3 ^a	45±5.9 ^a	47±5.1 ^a
Cholesterol (mg/dL)	90±1.5 ^a	132±7.8 ^{b,c}	106±6.6 ^{a,b}	116±4.6 ^{a,b}	113±4.0 ^c	115±3.1 ^{a,b}
HDL-cholesterol (mg/dL)	82±1.0 ^a	118±5.1 ^b	98±5.8 ^c	95±5.2 ^c	105±2.2 ^{c,b}	105±1.7 ^{c,b}
ALT (U/L)	70±6.4 ^a	93±14.2 ^b	72±2.2 ^a	66±4.0 ^a	71±3.9 ^a	68±2.5 ^a
Creatinine (mg/dL)	0.09±0.008 ^a	0.08±0.003 ^a	0.09±0.012 ^a	0.08±0.005 ^a	0.09±0.008 ^a	0.10±0.004 ^a
Urea (mg/dL)	48±1.7 ^a	49±0.9 ^a	47±2.2 ^a	49±1.5 ^a	51±1.9 ^a	48±2.1 ^a
Fluorescent AGEs (UA/mg protein)	70±2.4 ^a	100±11.1 ^b	71±8.3 ^a	73±12.9 ^a	82±6.8 ^a	132±6.5 ^b
TBARS (μmol/L)	17±0.9 ^a	23±1.1 ^b	19±1.3 ^a	14±1.5 ^a	14±1.2 ^a	17±1.8 ^a
PON 1 (U/mg HDL)	1.220±0.075 ^a	0.865±0.052 ^b	1.231±0.078 ^a	1.725±0.185 ^c	1.546±0.160 ^c	1.475±0.069 ^c

Values are expressed as mean±S.E.M., $n=14$. C: mice fed control diet; H: mice fed HFD; HY: mice fed HFD and treated with yoghurt; HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline in yoghurt; HC: mice fed HFD and treated with 90 mg/kg curcumin in yoghurt; HTC: HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline+90 mg/kg curcumin in yoghurt. Differences between groups were considered significant at $P<0.05$ and were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. Means not sharing a common letter indicate significant differences in the analysis performed for each parameter and for intergroup comparisons.

plasma levels than C diet-fed mice (Table 2). No changes were observed in the plasma levels of kidney function-related markers in the H group; however, animals from the H group had significantly increased plasma ALT levels (33%), suggesting hepatic damage (Table 2). Concerning plasma glycoxidative stress biomarkers, H animals exhibited 43% and 35% increases of fluorescent AGEs (marker of protein glycation) and TBARS (marker of lipid peroxidation), respectively. Finally, the activity of PON 1, an antioxidant enzyme, was decreased by 28% in the H group (Table 2).

Treatment of HFD mice with yoghurt, curcumin-enriched yoghurt, or trigonelline-enriched yoghurt improved all plasma parameters, leading to decreases in glycemia, dyslipidemia, hepatic damage and glycoxidative stress biomarkers, as well as an increase in PON 1 activity (Table 2). HFD mice treated with yoghurt enriched with curcumin + trigonelline also showed improvement in various plasma-monitored parameters, except for glycemia and fluorescent AGEs, whose levels were as high as those of the H group (Table 2). It should be noted that yoghurt enriched with antioxidants, and especially trigonelline-enriched yoghurt, caused more pronounced PON 1 activity increase than yoghurt alone (Table 2).

3.3. Effects of trigonelline and curcumin on glucose homeostasis, insulin sensitivity and inflammatory cytokines in white adipose tissue of HFD mice

In the OGTT, 15 min after the glucose overload, the hyperglycemia peak developed by the H group was 36% higher than by the C group. After 120 min, the H group did not correct the glycemia (155.9±6.46 mg/dL) with the same efficiency as the C group (119.2±7.79 mg/dL) (Fig. 3A). Therefore, glucose tolerance was significantly impaired in H

mice in comparison to C mice (Fig. 3B). In the ITT, after insulin administration, the H group could not reduce the glycemia with the same efficiency as the C group (Fig. 3C), suggesting a decrease in insulin sensitivity (Fig. 3D), which may explain the glucose intolerance observed in HFD-fed mice. Corroborating these findings, both basal and insulin-stimulated AKT phosphorylation in eWAT were lower in the H group (60% and 34%, respectively) than in the C group (Fig. 4A and B). In comparison to the C group, the H group proinflammatory marker levels were increased, including TNF-α (3.5-fold; Fig. 4C) and IL-6 levels (2.7-fold; Fig. 4D). The expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was decreased by 31% in the adipose tissue of H mice (Fig. 4E).

HFD mice treatment with yoghurt, curcumin-enriched yoghurt, or trigonelline-enriched yoghurt attenuated glucose intolerance, insulin resistance (Fig. 3) and inflammatory eWAT profile (Fig. 4) in comparison to the H group.

The best results were observed in the HT group. Trigonelline was unique in improving both the basal and insulin-stimulated AKT phosphorylation in eWAT (Fig. 4A and B). The improvement of insulin sensitivity in HFD mice treated with trigonelline may be a consequence, at least in part, of preventing adipose tissue inflammation; TNF-α (Fig. 4C), IL-6 (Fig. 4D) and IL-10 (Fig. 4E) levels were similar between the C and HT groups.

Once again, the combined trigonelline + curcumin therapy mixed into yoghurt did not exhibit the beneficial effects of the antioxidants administered alone. Surprisingly, HTC animals demonstrated a marked decrease in insulin-stimulated AKT phosphorylation in adipose tissue, whose levels were lower than those in the H group (Fig. 4A and B). These findings help understand both insulin resistance

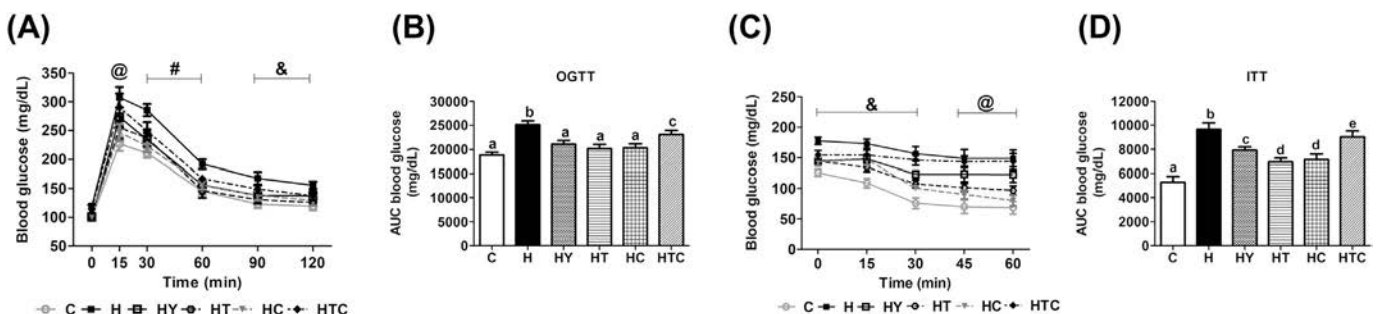


Fig. 3. Glucose tolerance and insulin sensitivity of mice fed a high-fat diet (HFD) and treated for 9 weeks with yoghurt enriched with trigonelline and curcumin alone or in combination. Oral glucose tolerance test (OGTT) (A), AUC of OGTT (B), insulin tolerance test (ITT) (C) and AUC of ITT (D). Values are expressed as mean±S.E.M., $n=14$. C: mice fed control diet; H: mice fed HFD; HY: mice fed HFD and treated with yoghurt; HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline in yoghurt; HC: mice fed HFD and treated with 90 mg/kg curcumin in yoghurt; HTC: HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline+90 mg/kg curcumin in yoghurt. AUC: area under the curve. Differences between groups were considered significant at $P<0.05$ and were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. In the AUC data, means not sharing a common letter indicate significant differences. @: H vs. C, HT, HC; #: H vs. C, HY, HT, HC, HTC; &: H vs. C, HY, HT, HC.

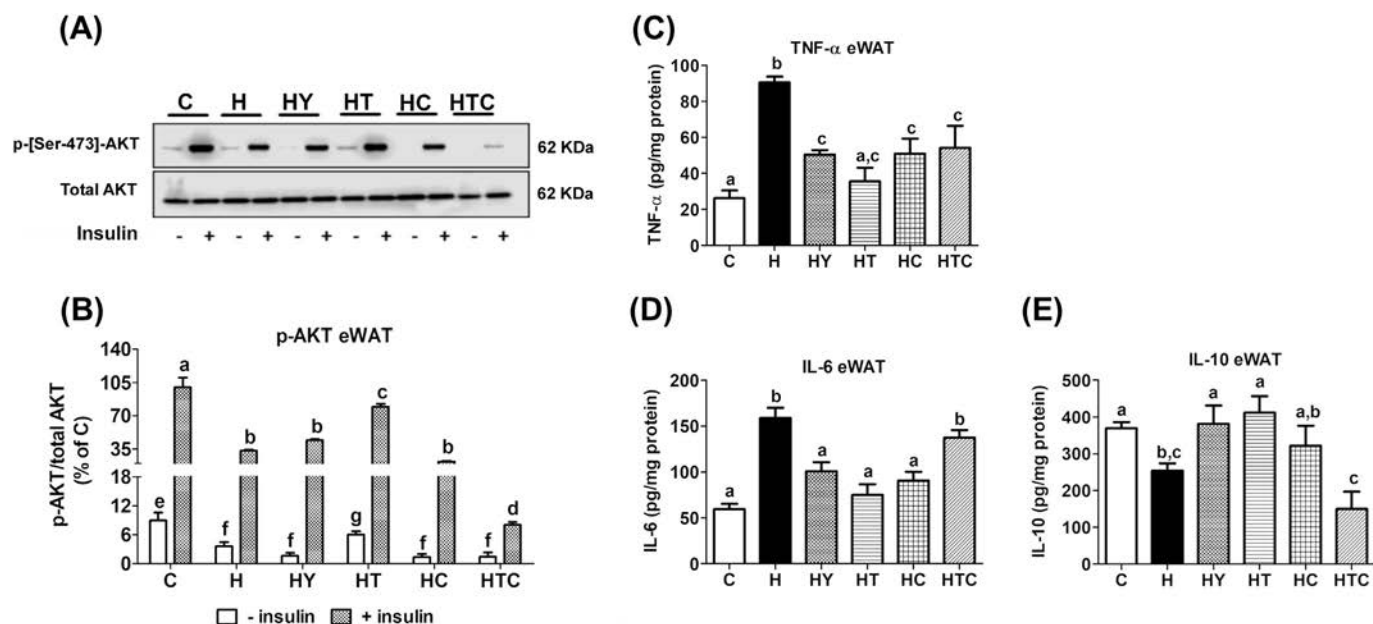


Fig. 4. AKT phosphorylation levels and cytokines levels in epididymal white adipose tissue (eWAT) of mice fed a high-fat diet (HFD) and treated for 9 weeks with yoghurt enriched with trigonelline and curcumin alone or in combination. Representative lanes of basal and insulin-stimulated AKT phosphorylation levels as detected by western blot analysis (A), densitometric analysis of western blot results for AKT phosphorylation (B), levels of TNF- α (C), IL-6 (D) and IL-10 (E). Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M., $n=14$. C: mice fed control diet; H: mice fed HFD; HY: mice fed HFD and treated with yoghurt; HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline in yoghurt; HC: mice fed HFD and treated with 90 mg/kg curcumin in yoghurt; HTC: HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline+90 mg/kg curcumin in yoghurt. AUC: area under the curve. Differences between groups were considered significant at $P<0.05$ and were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. Means not sharing a common letter indicate significant differences.

(Fig. 3D) and glucose intolerance (Fig. 3B) observed in the HTC group. Furthermore, HFD mice treated with trigonelline + curcumin demonstrated increased adipose tissue inflammation, since IL-6 levels were upregulated (Fig. 4D) and IL-10 levels were downregulated (Fig. 4E), reaching values similar to those of the H group.

3.4. Effects of trigonelline and curcumin on inflammation and glycoxidative stress biomarkers in the liver and kidney of HFD mice

Increased levels of fluorescent AGEs (Fig. 5A and C), TBARS (Fig. 5B and D) and RAGE (Fig. 6B and D) were found in the liver and kidney of H mice, supporting the onset of glycoxidative stress. Higher RAGE expression in these tissue types was accompanied by upregulated levels of protein Bcl2 associated X protein (Bax), a pro-apoptotic factor (Fig. 6C and E), and the proinflammatory cytokines TNF- α (Table 3) and IL-6 (Table 3). IL-10 expression was decreased in liver and kidney of H mice (Table 3). Both nuclear and cytosolic NF- κ B levels were increased in liver (Fig. 6G and H) and kidney (Fig. 6I and J) of H mice in comparison to the ones observed in C mice, suggesting that the expression of this transcription factor is upregulated in mice fed HFD.

Treatment with yoghurt alone caused some improvement in liver and kidney parameters of HFD mice. Low fluorescent AGEs (Fig. 5A and C) and RAGE (Fig. 6B and D) levels were observed, followed by decrease in TNF- α expression (Table 3). Bax levels were lower in the liver (Fig. 6C) and kidney (Fig. 6E) of HY mice with the more evident decrease observed in the kidney. The most prominent effect of yoghurt was observed on IL-6, whose levels in liver and kidney were similar those of the C group (Table 3). IL-10 was also upregulated in liver and kidney of HY mice (Table 3). However, it should be noted that lipid peroxidation remained high in liver and kidney of HFD mice treated with yoghurt (Fig. 5B and D). In comparison with H mice, yoghurt treatment alone caused decreases in the NF- κ B nuclear levels in liver (Fig. 6G) and kidney (Fig. 6I), whereas slight decreases in the cytosolic levels of this transcription factor were observed (Fig. 6H and J).

Many beneficial responses were observed in the liver and kidney of mice treated with trigonelline-enriched yoghurt. The most prominent

trigonelline effects were found on decreasing fluorescent AGEs (Fig. 5A and C), TBARS (Fig. 5B and D), RAGE (Fig. 6B and D), Bax (Fig. 6C and E), TNF- α (Table 3) and IL-6 (Table 3), whose levels in these tissues were similar those observed in the C group. NF- κ B levels were differentially regulated in liver and kidney of mice treated with trigonelline. In the liver of HT mice, a significant decrease of NF- κ B nuclear levels was observed (Fig. 6G), whereas its cytosolic levels remained increased (Fig. 6H), suggesting that trigonelline inhibits NF- κ B nuclear translocation. In the kidney of HT mice, both nuclear (Fig. 6I) and cytosolic NF- κ B levels (Fig. 6J) were decreased, implying an inhibition of NF- κ B expression. Furthermore, nuclear NF- κ B was practically undetectable in the kidney of HT mice. In both tissues, the strongest NF- κ B inhibition among the experimental conditions was observed in HFD mice treated with trigonelline.

The treatment of HFD mice with curcumin-enriched yoghurt decreased fluorescent AGEs (Fig. 5A and C) and TBARS (Fig. 5B and D). Moreover, RAGE (Fig. 6B and D), TNF- α (Table 3) and IL-6 (Table 3) levels were decreased in liver and kidney of HC mice. NF- κ B levels were also differentially regulated in liver and kidney of curcumin-treated mice. In the liver of HC mice, NF- κ B levels were decreased in both the nucleus (Fig. 6G) and cytoplasm (Fig. 6H), implying inhibited NF- κ B expression. In the kidney of HC mice, a significant decrease of NF- κ B nuclear levels was observed (Fig. 6I), paralleled by increased cytosolic levels (Fig. 6J), indicating that NF- κ B nuclear translocation was inhibited. Interestingly, HFD mice treatment with curcumin-enriched yoghurt did not downregulate Bax levels in the liver and kidney, which were similar than those of untreated H mice (Fig. 6C and E).

The combination of trigonelline + curcumin in yoghurt promoted beneficial effects. In the liver, this treatment decreased fluorescent AGEs (Fig. 5A), TBARS (Fig. 5B), TNF- α (Table 3) and IL-6 (Table 3). In the kidney of HTC mice, low levels of fluorescent AGEs (Fig. 6C), RAGE (Fig. 6D) and Bax (Fig. 6E) were observed. However, other parameters indicated that the combination of trigonelline + curcumin in yoghurt did not preserve the beneficial effects of the phytochemicals administered alone. TBARS (Fig. 5D) and TNF- α (Table 3) levels in kidney, as well as RAGE (Fig. 6D) and Bax (Fig. 6E) levels in liver were

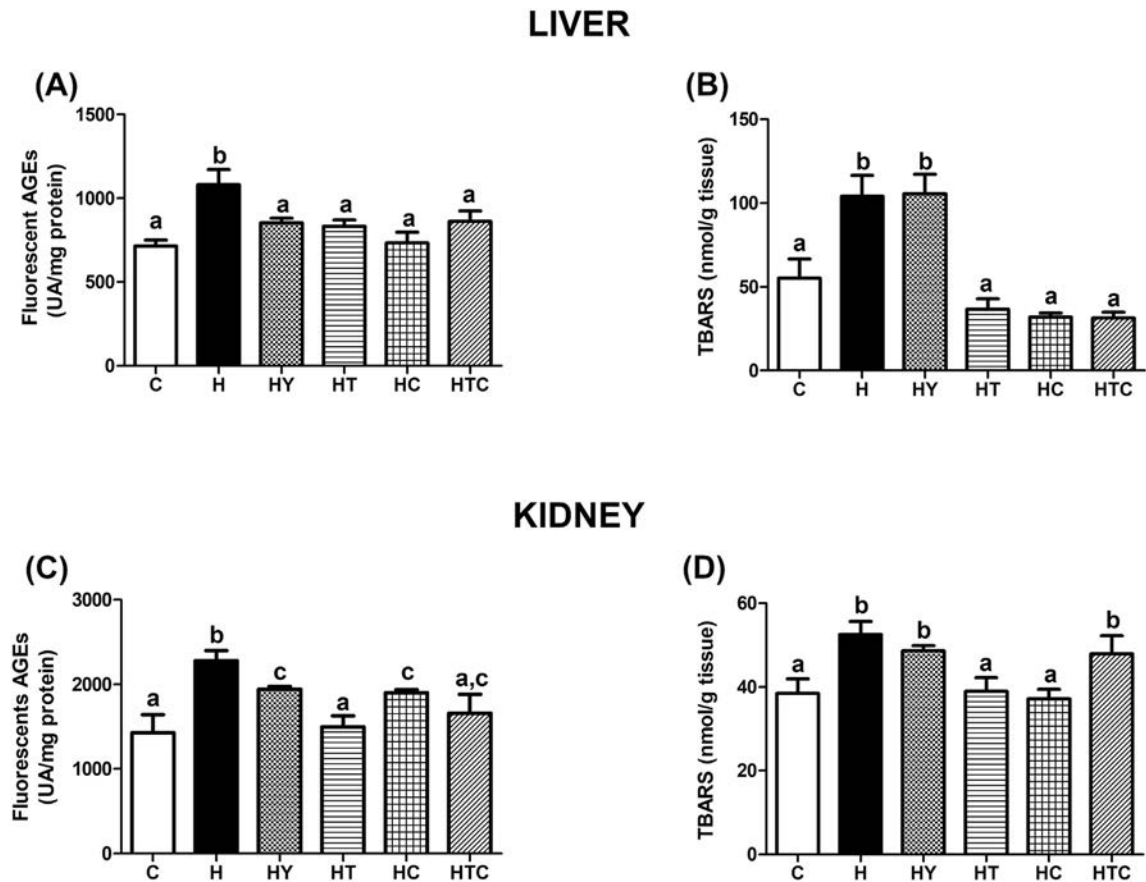


Fig. 5. Changes in glycoxidative stress biomarkers (fluorescent AGEs and TBARS) in liver and kidney of mice fed a high-fat diet (HFD) and treated for 9 weeks with yoghurt enriched with trigonelline and curcumin alone or in combination. Levels of fluorescent AGEs (A) and TBARS (B) in liver and levels of fluorescent AGEs (C) and TBARS (D) in kidney. Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M., $n = 14$. C: mice fed control diet; H: mice fed HFD; HY: mice fed HFD and treated with yoghurt; HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline in yoghurt; HC: mice fed HFD and treated with 90 mg/kg curcumin in yoghurt; HTC: HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline + 90 mg/kg curcumin in yoghurt. Differences between groups were considered significant at $P < .05$ and were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. Means not sharing a common letter indicate significant differences.

increased. IL-10 expression was decreased (Table 3), reaching values similar to those of the H group. Although NF- κ B cytosolic levels were lower in the liver of HTC mice than in the H mice (Fig. 6H), nuclear NF- κ B levels were strongly increased (Fig. 6G), reaching values higher than those of H mice, in agreement with the observed RAGE upregulation. In the kidney of HTC mice, nuclear NF- κ B levels were lower than the ones observed in H mice (Fig. 6I) but higher than the ones in HT and HC mice, suggesting that the beneficial effects of the isolated treatments were lost.

3.5. Effects of trigonelline and curcumin on AGE detoxification biomarkers, NRF 2 levels and antioxidant defenses in liver and kidney of HFD mice

Decreased activities of the antioxidant enzymes SOD (Fig. 7A and D), CAT (Fig. 7B and E) and GSH-Px (Fig. 7C and F) were observed in liver and kidney of H mice, explaining at least in part the increased TBARS levels. Furthermore, the nuclear levels of the transcription factor NRF 2 were increased (Fig. 8G), whereas its cytosolic levels were in parallel decreased (Fig. 8H) in liver of H mice, implicating its nuclear translocation as a compensatory mechanism for establishing oxidative stress (low antioxidant enzymes and increased lipid peroxidation). In kidney, nuclear NRF 2 levels were higher in H mice (Fig. 8I) than in C mice, whereas cytosolic levels did not differ between the groups (Fig. 8J). No changes were observed in components related to AGE detoxification, GLO 1 (Fig. 8B) and AGE-R1 (Fig. 8C) in the liver of

H mice; however, a significant decrease was detected in GLO 1 expression in the kidney of H mice (Fig. 8D).

Treatment of HFD mice with yoghurt alone did not improve the antioxidant status in liver (Fig. 7A, B, C) or kidney (Fig. 7D, E, F), in agreement with the increased lipid peroxidation. Nuclear (Fig. 8G) and cytosolic (Fig. 8H) NRF 2 levels in the liver did not differ between HY and H mice. In the kidney of HY mice, nuclear NRF 2 levels were lower than in H mice (Fig. 8I). Regarding the components related to AGE detoxification, only a slight increase was found in liver and kidney GLO 1 levels of HY mice (Fig. 8B and D).

Treatment with trigonelline-enriched yoghurt increased SOD (Fig. 7D), CAT (Fig. 7E) and GSH-Px (Fig. 7F) activities in the kidney in the most pronounced manner. Activities of antioxidant enzymes were also increased in the liver of HT mice (Fig. 7A, B, C). These findings may explain the low nuclear NRF 2 levels in liver (Fig. 8G) and kidney (Fig. 8I) of HT mice. In parallel, the cytosolic NRF 2 levels were increased in liver (Fig. 8H) and kidney (Fig. 8J) of HT mice. These findings may indicate that trigonelline acts as an inhibitor of NRF 2 nuclear translocation. The expression of components involved in AGE detoxification, including GLO 1, was significantly increased in liver and kidney of HT mice (Fig. 8B and D). Besides, trigonelline treatment was unique in increasing AGE-R1 expression; AGE-R1 levels were 2.6-fold higher in liver (Fig. 8C) and 2.5-fold higher in kidney (Fig. 8E) of HT mice than in H mice.

Whereas trigonelline exerted significant antioxidant effects on the kidney, treatment with curcumin-enriched yoghurt practically prevented the oxidative stress in the liver, since SOD (Fig. 8A), CAT

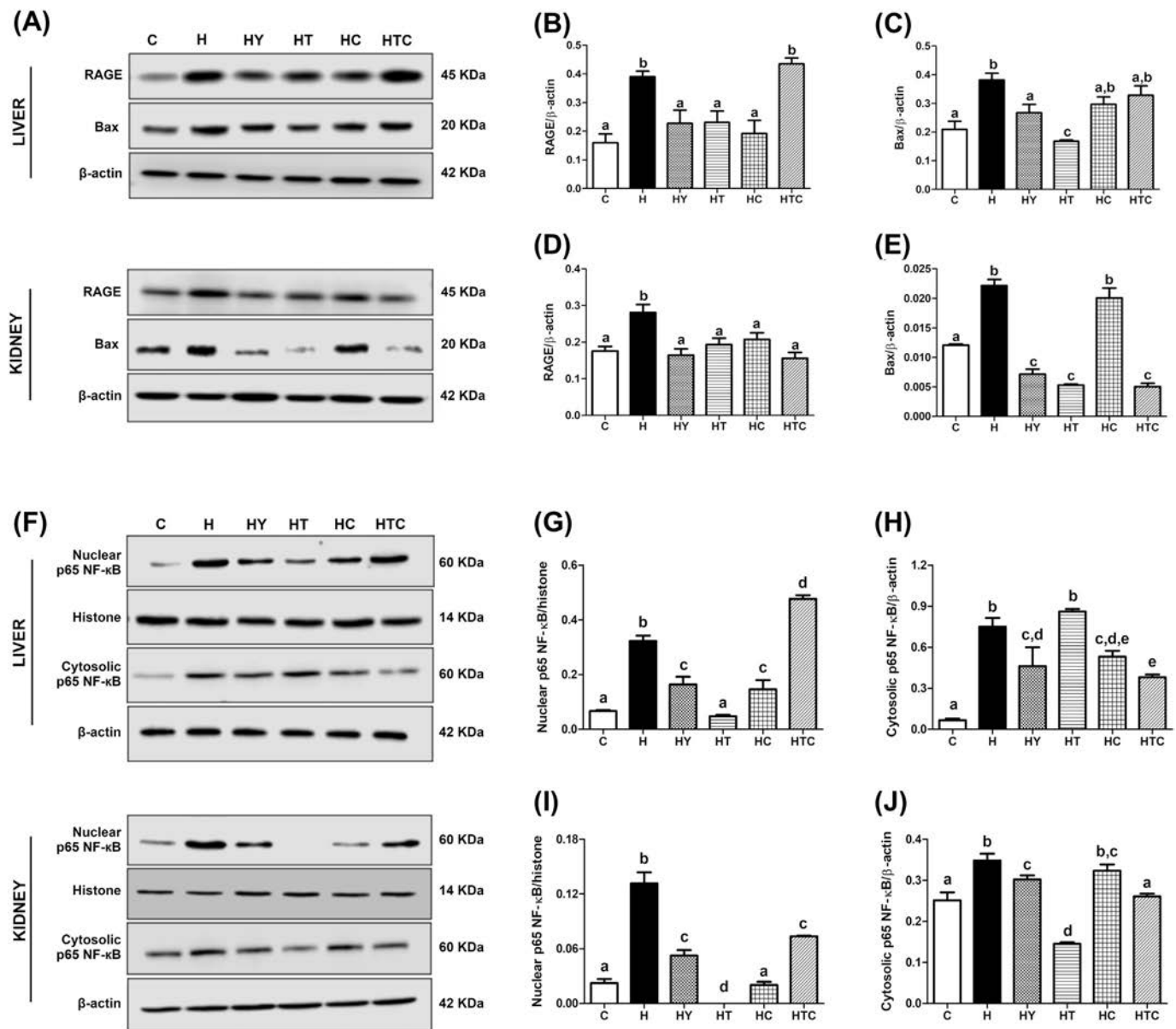


Fig. 6. Changes in RAGE signaling-related biomarkers (RAGE receptor, Bax and NF- κ B) in liver and kidney of mice fed a high-fat diet (HFD) and treated for 9 weeks with yoghurt enriched with trigonelline and curcumin alone or in combination. Representative lanes of protein levels as detected by western blot analysis for RAGE and Bax (A), densitometric analysis of western blot results for RAGE (B) and Bax (C) in liver and RAGE (D) and Bax (E) in kidney, representative lanes of protein levels as detected by western blot analysis for NF- κ B (F), nuclear and cytosolic NF- κ B levels in liver (G) and nuclear and cytosolic NF- κ B levels in kidney (H). Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M., $n=5$. C: mice fed control diet; H: mice fed HFD; HY: mice fed HFD and treated with yoghurt; HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline in yoghurt; HC: mice fed HFD and treated with 90 mg/kg curcumin in yoghurt; HTC: HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline + 90 mg/kg curcumin in yoghurt. Differences between groups were considered significant at $P<.05$ and were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. Means not sharing a common letter indicate significant differences.

Table 3
Cytokines levels in liver and kidney of mice fed a high-fat diet (HFD) and treated for 9 weeks with yoghurt enriched with trigonelline and curcumin alone or in combination

Cytokines	Tissues	C	H	HY	HT	HC	HTC
TNF- α	Liver	8.13 $\pm$ 0.59 ^a	12.40 $\pm$ 1.55 ^b	9.49 $\pm$ 1.21 ^{a,b}	7.22 $\pm$ 0.89 ^a	8.34 $\pm$ 0.55 ^a	9.47 $\pm$ 1.03 ^{a,b}
	Kidney	9.78 $\pm$ 0.49 ^a	12.32 $\pm$ 0.26 ^b	9.78 $\pm$ 0.41 ^a	9.95 $\pm$ 0.39 ^a	9.54 $\pm$ 0.14 ^a	12.38 $\pm$ 0.72 ^b
IL-6	Liver	3.73 $\pm$ 0.33 ^a	8.81 $\pm$ 1.33 ^b	3.86 $\pm$ 0.65 ^a	3.91 $\pm$ 0.66 ^a	4.79 $\pm$ 0.67 ^{a,c}	6.56 $\pm$ 0.91 ^{b,c}
	Kidney	3.60 $\pm$ 0.28 ^a	8.96 $\pm$ 0.48 ^b	3.71 $\pm$ 0.44 ^a	4.31 $\pm$ 0.66 ^a	3.91 $\pm$ 1.04 ^a	8.68 $\pm$ 0.99 ^b
IL-10	Liver	15.61 $\pm$ 1.15 ^a	6.58 $\pm$ 1.60 ^b	12.14 $\pm$ 1.52 ^a	13.61 $\pm$ 1.80 ^a	12.37 $\pm$ 1.40 ^a	7.69 $\pm$ 1.63 ^b
	Kidney	18.99 $\pm$ 0.95 ^a	9.48 $\pm$ 1.34 ^b	17.66 $\pm$ 2.37 ^{a,c}	15.93 $\pm$ 1.95 ^{a,c}	14.94 $\pm$ 1.19 ^{a,c}	11.97 $\pm$ 0.89 ^{b,c}

Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M., $n=14$. C: mice fed control diet; H: mice fed HFD; HY: mice fed HFD and treated with yoghurt; HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline in yoghurt; HC: mice fed HFD and treated with 90 mg/kg curcumin in yoghurt; HTC: HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline + 90 mg/kg curcumin in yoghurt. Differences between groups were considered significant at $P<.05$ and were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. Means not sharing a common letter indicate significant differences in the analysis performed for each parameter, in a same tissue and for intergroup comparisons.

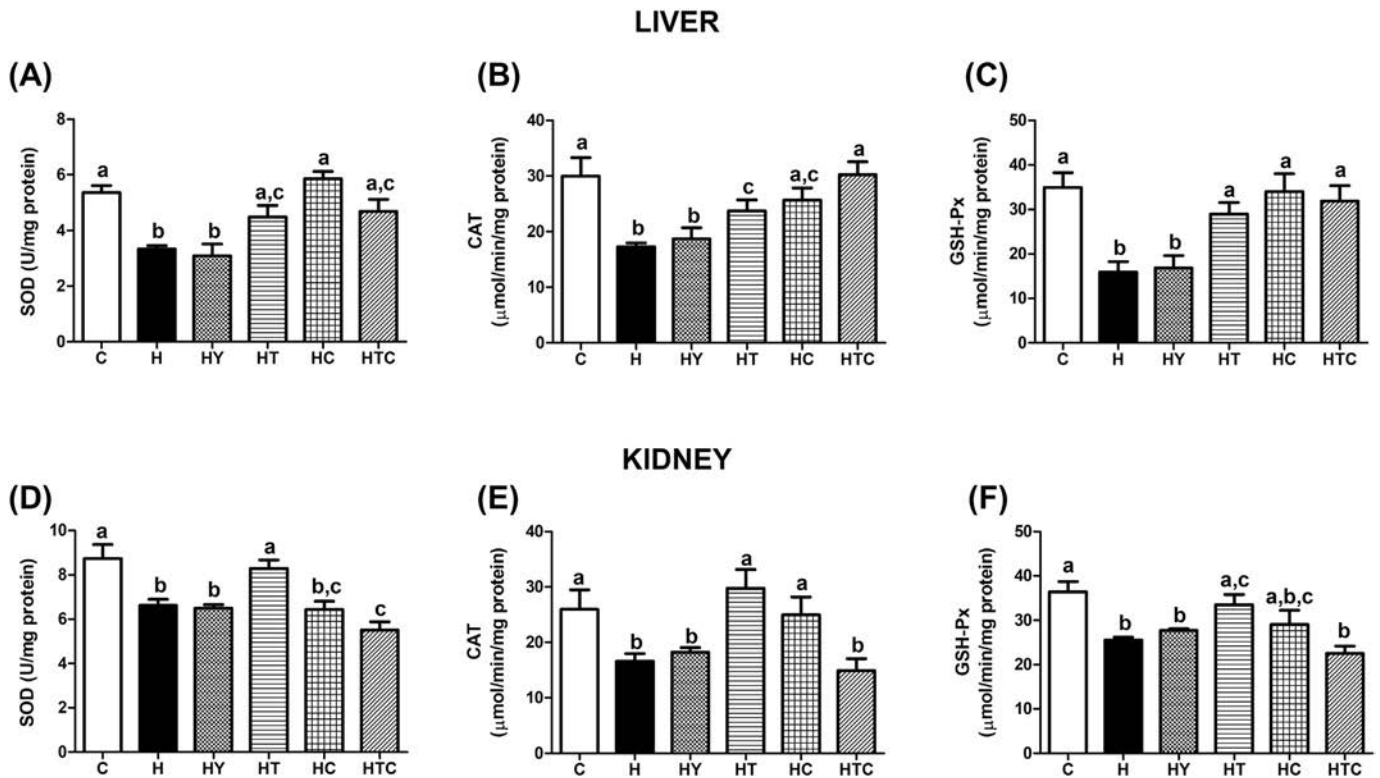


Fig. 7. Changes in antioxidant defense biomarkers (SOD, CAT and GSH-Px) in liver and kidney of mice fed a high-fat diet (HFD) and treated for 9 weeks with yoghurt enriched with trigonelline and curcumin alone or in combination. Activities of SOD (A), CAT (B) and GSH-Px (C) in liver and SOD (D), CAT (E) and GSH-Px (F) in kidney. Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M., $n=14$. C: mice fed a control diet; H: mice fed HFD; HY: mice fed HFD and treated with yoghurt; HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline in yoghurt; HC: mice fed HFD and treated with 90 mg/kg curcumin in yoghurt; HTC: HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline + 90 mg/kg curcumin in yoghurt. Differences between groups were considered significant at $P<0.05$ and were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. Means not sharing a common letter indicate significant differences.

(Fig. 8C) and GSH-Px (Fig. 8E) activities were similar between the HC and C groups. Furthermore, HC mice demonstrated increases in the antioxidant enzyme activities in the kidney (Fig. 8B, D, F). The increased antioxidant status was followed by significant decreases in NRF 2 nuclear levels in liver (Fig. 8G) and kidney (Fig. 8I) of HC mice, without significant changes in cytosolic levels (Fig. 8H and J). Although curcumin did not induce changes in GLO 1 expression in kidney (Fig. 8D), the best effect on GLO 1 induction in liver was promoted by curcumin treatment; GLO 1 levels were 2.3-fold higher in the liver of HC mice (Fig. 8B) than in the H group. Curcumin did not change AGE-R1 expression (Fig. 8C and E).

Antioxidant enzyme activities were increased in liver (Fig. 7A, B, C), but not in kidney (Fig. 7D, E, F), of mice treated with trigonelline + curcumin. Unlike the results observed with isolated treatments, the nuclear NRF 2 levels were increased in the liver of HTC mice (Fig. 8G), whereas cytosolic levels were decreased (Fig. 8H), suggesting that NRF 2 nuclear translocation was stimulated. In kidney of HTC mice, nuclear NRF 2 levels were similar to those of the HT and HC groups (Fig. 8I). Treatment with a combination of trigonelline + curcumin also increased GLO 1 levels in the liver (Fig. 8B) and kidney (Fig. 8D) but did not change AGE-R1 levels (Fig. 8C and E).

4. Discussion

The present study investigated the molecular mechanisms, by which trigonelline and curcumin, administered into yoghurt, exert protective effects on HFD mice; the main focus was liver and kidney, as well as biomarkers of glycatative and oxidative stress and inflammation. Yoghurt alone exerted modest effects, mainly improving glucose tolerance and reducing proinflammatory cytokines in eWAT, liver and kidney; however, the antioxidant status did not change. The

phytochemicals trigonelline and curcumin attenuated metabolic disturbances observed in animals with obesity and insulin resistance, presumably through distinct mechanisms. First, trigonelline administered into yoghurt had potent anti-obesogenic effects, preventing eWAT fat accumulation and reducing body weight gain in HFD mice, probably due to the inhibition of food and energy intake. Consequently, HFD mice treated with trigonelline exhibited low proinflammatory cytokine levels and maintained insulin sensitivity (increased levels of basal and insulin-stimulated AKT phosphorylation) in eWAT, which can contribute to the improvement in the glucose tolerance. Trigonelline also exerted potent anti-inflammatory (reducing nuclear NF- κ B and proinflammatory cytokine levels) and antiglycation (reducing RAGE and AGEs levels, and increasing the levels of GLO 1 and AGE-R1) activities in liver and kidney of HFD mice. Second, the beneficial effects of curcumin administered into yoghurt are apparently related to its anti-inflammatory (reducing the nuclear NF- κ B and proinflammatory cytokine levels) and potent antioxidant (increasing SOD, CAT and GSH-Px activities, and decreasing TBARS levels) properties in liver and kidney of HFD mice. Finally, due to their isolated beneficial effects exerted via distinct mechanisms, trigonelline and curcumin emerged as interesting candidates to be used in a combination therapeutic approach, aimed to attenuate the complications associated with obesity and other metabolic dysfunctions. However, when administered in combination, many of the individual beneficial effects of trigonelline and curcumin were nullified, indicating that combinations of compounds from natural origin are not always effective in promoting beneficial effects or safe for health.

In previous studies from our laboratory, investigating the therapeutic effects of phytochemicals on metabolic disturbances observed in diabetes mellitus, yoghurt was used for the oral administration of curcumin, carotenoids and other natural antioxidants [22–24,28]; the

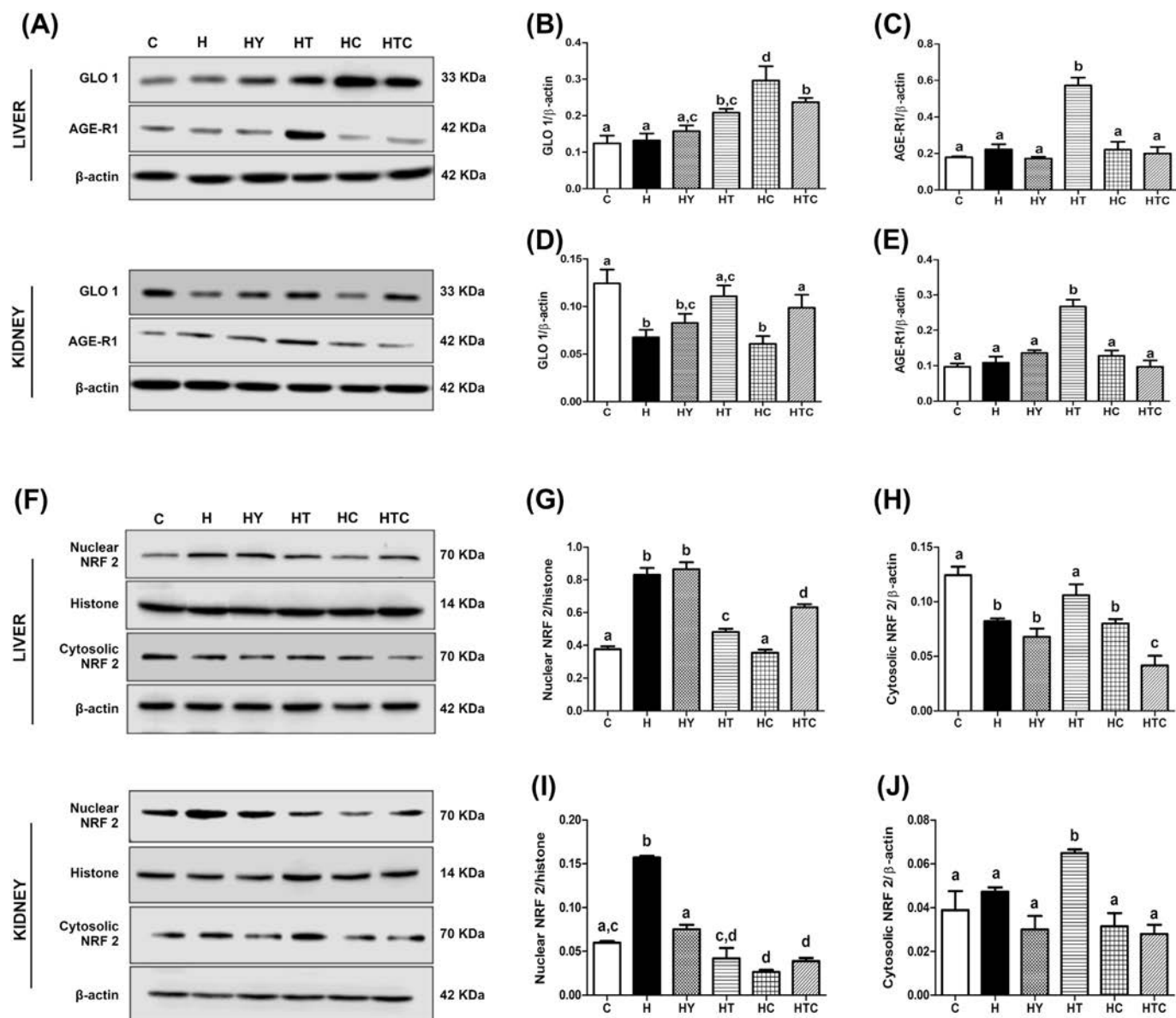


Fig. 8. Changes in AGE detoxification biomarkers (GLO 1 and AGE-R1) and nuclear/cytosolic NRF 2 levels in liver and kidney of mice fed a high-fat diet (HFD) and treated for 9 weeks with yoghurt enriched with trigonelline and curcumin alone or in combination. Representative lanes of protein levels as detected by western blot analysis for GLO 1 and AGE-R1 (A), densitometric analysis of western blot results for GLO 1 (B) and AGE-R1 (C) in liver, GLO 1 (D) and AGE-R1 (E) in kidney, representative lanes of protein levels as detected by western blot analysis for NRF 2 (F), nuclear and cytosolic NRF-2 levels in liver (G) and nuclear and cytosolic NRF-2 levels in kidney (H). Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M., $n=5$. C: mice fed control diet; H: mice fed HFD; HY: mice fed HFD and treated with yoghurt; HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline in yoghurt; HC: mice fed HFD and treated with 90 mg/kg curcumin in yoghurt; HTC: HT: mice fed HFD and treated with 50 mg/kg trigonelline + 90 mg/kg curcumin in yoghurt. Differences between groups were considered significant at $P<.05$ and were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test. Means not sharing a common letter indicate significant differences.

administration of these antioxidants into yoghurt resolved the problem of their low solubilities in water. These studies were performed in streptozotocin-diabetic rats (that mimic symptoms related to type 1 diabetes mellitus), and treatments with yoghurt alone did not change the physiological and biochemical parameters altered in this experimental model of diabetes. Furthermore, the administration of phytochemicals in yoghurt did not impair their benefits against diabetic symptoms. For these reasons, yoghurt was considered a vehicle for phytochemicals in our previous studies. Conversely, in the present study we reported that treatment of HFD mice with yoghurt alone caused reduction in obesity markers, including adipocyte size, eWAT weight and body weight. Reports in the literature indicate that treatment of HFD mice with probiotics can reduce body weight gain without changing food consumption [31,32], however, it

cannot be excluded that obesity reduction occurred in HY mice due to reduced food and energy intake. Glycemia and dyslipidemia were subtly less pronounced in HY mice. Furthermore, PON 1 activity was increased after treatment with yoghurt to levels similar to the ones in the C group. PON 1 activity reduction has been observed in a variety of diseases and metabolic dysfunctions, including obesity [33]. PON 1 glycation has been associated with a decrease in its activity [34]; thus, the less pronounced glycemia and lower circulating AGEs in HY mice may contribute to the recovery of PON 1 activity. It should be noted that PON 1 activities in mice treated with yoghurt enriched with trigonelline or curcumin were further increased in comparison with the ones in the yoghurt group. The present study intended to aggregate benefits to yoghurt against obesity disturbances, mainly oxidative stress, as will be explained below.

Glucose tolerance and insulin sensitivity were also improved in HY mice, whereas AKT phosphorylation in eWAT was not. Furthermore, inflammation was also reduced in eWAT, liver and kidney of HY mice. The beneficial effects of probiotic supplementation against insulin resistance may be mediated by improved gut integrity and decreased lipopolysaccharide and proinflammatory marker systemic levels [31]. HY mice exhibited reduced AGEs levels (in plasma, liver and kidney) and RAGE levels (in liver and kidney), suggesting less pronounced glycation stress. Further studies should investigate the mechanisms, by which yoghurt exerts these beneficial effects in HFD mice, mainly focusing on gut microbiota changes, intestinal permeability and systemic lipopolysaccharide levels.

However, it should be emphasized that, despite these beneficial properties, yoghurt did not improve the antioxidant status in liver and kidney of HFD mice and did not protect these tissues against lipid peroxidation. In addition to causing RAGE activation, oxidative stress plays critical roles in the onset of various obesity-associated complications [4,35]; therefore, it is apparently an important therapeutic target against these disturbances. This motivated us to continue this line of investigation, attempting to add benefits to yoghurt via its enrichment with trigonelline and/or curcumin.

Chronic treatment with trigonelline-enriched yoghurt practically prevented the obesity in mice fed HFD, which must be a consequence of the marked reduction in food and energy intake. Adipocyte hypertrophy (in eWAT) and mass accumulation (in rpWAT, eWAT and iBAT) were also prevented in HT mice and body gain was less pronounced than in C mice. To the best of our knowledge, this is the first evidence of trigonelline capacity to inhibit food ingestion in an experimental model of obesity, leading to the prevention of fat accretion in adipose tissues. Ilavenil and collaborators [36] found that trigonelline inhibits adipocyte differentiation and lipid accumulation in 3 T3-L1 cells. Altogether, the observed anti-adipogenic activity and inhibition of food/energy intake help explain the potent anti-obesogenic effect of trigonelline. One main consequence of trigonelline anti-obesogenic effect was the maintenance of insulin sensitivity in visceral eWAT; in our study, trigonelline-enriched yoghurt was the only treatment that improved both basal and the insulin-stimulated AKT phosphorylation in eWAT of mice. The maintenance of the insulin sensitivity in eWAT of HT mice was accompanied by low levels of the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6. In addition, IL-10 has been shown to protect adipocytes against TNF- α -induced insulin resistance [37]. Therefore, the increased IL-10 levels in eWAT of HT mice may contribute to AKT activation. Previous studies have reported that trigonelline decreases insulin resistance in association with anti-inflammatory responses in experimental models of obesity and diabetes [17,19].

Obesity-induced inflammation plays a pivotal role in the development and progression of liver disease, including non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), non-alcoholic steatohepatitis (NASH), fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma [38,39]. The occurrence of kidney diseases as obesity complications has also been associated with inflammation, mainly IL-6 upregulation, which has been correlated with renal arteriosclerosis [40]. Furthermore, these processes are aggravated by the harmful consequences of dicarbonyl stress and RAGE signaling. Dicarbonyl stress occurs when methylglyoxal production (accelerated during chronic hyperglycemia) exceeds its detoxification. Methylglyoxal reacts covalently with arginine and lysine residues in proteins, generating AGEs [7,14]. Many AGEs are RAGE ligands; persistent AGE/RAGE interaction triggers intracellular signaling pathways provoking oxidative stress, inflammation and apoptosis. Furthermore, the activation of both NF- κ B and the pro-apoptotic factor Bax is implicated in the mechanism by which RAGE promotes liver and kidney injuries; suppression of the activation of these two components is found after blockade or inhibition of RAGE, protecting against tissue damage [41–44]. Our study shows promising findings about the potent anti-inflammatory and antiglycation

activities of trigonelline in liver and kidney of obese animals. The treatment of HFD mice with trigonelline decreased the levels of fluorescent AGEs, RAGE receptor, TNF- α , IL-6 and the pro-apoptotic factor Bax. In addition, the nuclear NF- κ B levels were significantly lower in liver and kidney of HFD mice treated with trigonelline, which may be due to distinct mechanisms. Whereas in liver trigonelline apparently inhibits NF- κ B nuclear translocation of (since NF- κ B cytosolic levels were increased in parallel with the increased nuclear levels), in kidney trigonelline apparently decreases NF- κ B expression (since both the nuclear and cytosolic NF- κ B levels were downregulated). Moreover, considering that NF- κ B activation induces RAGE expression [11], the low RAGE levels found in the liver and kidney of mice treated with trigonelline may be related to the decreased nuclear NF- κ B levels.

Trigonelline has antiglycation potential, since it reduced the formation of fluorescent AGEs in an in vitro model-system of protein glycation in a previous study [45]. Furthermore, in addition to decrease the RAGE levels, we demonstrated that trigonelline acts as an inducer of components related to AGE detoxification. In both liver and kidney, trigonelline caused increases in GLO 1 and AGE-R1 levels. Bioactive compounds, acting as inducers of components related to AGE detoxification, mainly GLO 1, have arisen as promising therapies against injuries related to dicarbonyl stress and advanced glycation exacerbation, observed in obesity and diabetes mellitus [13,46]. To the best of our knowledge, this is the first evidence of that trigonelline induces components of AGE detoxification and causes RAGE down-regulation in liver and kidney of obese mice.

Furthermore, trigonelline increased the activities of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) and prevented lipid peroxidation (TBARS levels were similar between the C and HT groups). Our results imply that a possible trigonelline-induced antioxidant enzyme upregulation is apparently independent of NRF 2, since the nuclear translocation of this transcription factor was inhibited in liver and kidneys of mice treated with trigonelline. In fact, it has been consistently reported that trigonelline acts as an NRF 2 inhibitor, interfering in its nuclear translocation [47], which is in agreement with our findings. Yoshinari et al. [17] reported that mitigation of diabetic disturbances, including decrease in TNF- α and advanced glycation products, participates in the ameliorating effects of trigonelline on oxidative stress; these data are apparently in line with our findings related to the benefits promoted by trigonelline in HFD mice. Altogether, considering the multiple beneficial effects promoted by trigonelline, this phytochemical has emerged as an interesting candidate for use in complementary therapies or as a supplement to prevent or attenuate multiple obesity-associated complications.

Treatment of mice with curcumin-enriched yoghurt also caused benefits, several of them distinct from those induced by trigonelline. Although to a lower extent than trigonelline, curcumin decreased the food and energy intake, eWAT weight, adipocyte hypertrophy of visceral adipose tissue and body weight gain in comparison with untreated HFD mice. Furthermore, curcumin improved glucose tolerance and insulin sensitivity, although these effects were not accompanied by increase of AKT phosphorylation in eWAT. TNF- α and IL-6 were decreased in eWAT of HC mice. Most of the benefits promoted by curcumin-enriched yoghurt in visceral WAT, plasma biomarkers and insulin sensitivity were similar to the effects promoted by yoghurt alone, so we cannot affirm that they are directly related to curcumin. Therefore, we should highlight the main effects of curcumin-enriched yoghurt in HFD mice that are different from those of yoghurt: (i) further increase in PON 1 activity in plasma; (ii) significant decrease in TBARS levels in liver and kidney; and (iii) increase in SOD, CAT and GSH-Px activities in liver and kidney. As it can be observed, antioxidant defenses were improved in HFD mice treated with curcumin-enriched yoghurt in comparison with mice treated with yoghurt alone. Previous studies have reported that

supplementation of obese animals with curcumin protects against fat accretion in adipose tissue, insulin resistance, glucose homeostasis and tissue inflammation [48,49]. On the contrary, in a recent study by Silva and collaborators [50], curcumin supplementation did not improve various parameters altered in HFD mice, including glycemia, dyslipidemia, adiposity and glucose intolerance, corroborating our findings about possible absence of curcumin effects on parameters monitored in plasma and eWAT.

Curcumin caused strong induction of the antioxidant defenses in liver, since SOD, CAT and GSH-Px activities were significantly increased, reaching values similar those of C mice. Curcumin also increased the activities of antioxidant enzymes (CAT and GSH-Px) in kidney. Corroborating the antioxidant enzyme upregulation, there was a decrease in TBARS levels in liver and kidney of HC mice, which reached values similar to those observed in C mice. Altogether, curcumin treatment may prevent the induction of oxidative stress in liver and kidney of HFD mice. Consequently, lower nuclear NRF 2 levels were found in liver and kidney of HC mice than in H mice. As a ubiquitous transcription factor, NRF 2 acts as a master regulator of cell protection; during oxidative stress and under inflammatory conditions, NRF 2 is activated and upregulates the expression of antioxidant enzymes and other antistressor proteins, leading to decreases in ROS, inflammation and cell death [51]. Curcumin has been reported to act as an NRF 2 activator, increasing the nuclear levels of this transcription factor, which in turn contributes to curcumin protective effects on liver and kidney [52,53]. Our findings indicated that this possible curcumin action has occurred over the experimental period and prior to the 56th day of treatment, i.e., prior to the day of tissue collection for analyses. However, it cannot be ruled out the antioxidant properties of curcumin per se, having the ability to scavenge various reactive oxygen and nitrogen species [53], so contributing to its protective effects against lipid peroxidation in liver and kidney of mice fed HFD.

Besides preventing oxidative stress, curcumin contributed to dampening the harmful impact of AGEs via decreasing RAGE levels (in liver and kidney) and stimulating GLO 1 expression (in liver). In kidney, although curcumin did not promote changes in the expression of components related to AGE detoxification, it improved the antioxidant status, increasing the activities of CAT and GSH-Px, which may explain the low TBARS levels, and overall exerted beneficial effects on the tissue. Furthermore, curcumin decreased NF- κ B nuclear levels and proinflammatory cytokines in liver and kidney of HFD mice. NF- κ B inhibition ameliorates liver and kidney injuries associated with oxidative stress and inflammation and improves insulin resistance [54,55]. In this sense, curcumin protective effects in liver [48] and kidney [56] of obese animals have been reported.

Considering the benefits of treatment with curcumin or trigonelline alone in HFD mice, with the two phytochemicals often exhibiting distinct mechanisms to achieve their protective effects against obesity complications, we were motivated to combine these natural antioxidants in an attempt to obtain a promising complementary therapy for obesity and its complications. Unfortunately, treatment of mice with yoghurt enriched with curcumin and trigonelline impaired various benefits reached with the treatments alone. The main detrimental consequences of this combined therapy were the following: (i) the potent anti-obesogenic effect of trigonelline was nullified when administered in combination with curcumin; (ii) in eWAT, a marked decrease in insulin-stimulated AKT phosphorylation, with levels lower than those in untreated HFD mice, was observed, explaining insulin resistance; (iii) adipose tissue inflammation was maintained, mainly with increased IL-6 levels; (iv) in liver, RAGE, Bax and nuclear NF- κ B levels were increased and reached values similar or even higher than those of untreated HFD mice; and (v) in kidney, TBARS, nuclear NF- κ B, TNF- α and IL-6 levels were increased, whereas the activities of antioxidant enzymes remained low. Another interesting finding was the increased NRF 2 nuclear levels in liver of HTC mice, in parallel with

decreased the cytosolic levels, suggesting that its translocation to the nucleus was stimulated. Although TBARS levels were decreased and antioxidant enzyme activities were increased in liver of HTC mice, these animals showed other changes suggestive of disturbances, notably increases in RAGE, Bax and nuclear NF- κ B levels, which may explain the activation of a cytoprotective mechanism dependent of NRF 2.

In a previous study from our laboratory, aiming to increase the bioavailability and the antidiabetic activity of curcumin, this phytochemical was used in combination with piperine, which inhibit the enzymes involved in biotransformation processes, including cytochrome P540 3A4 (CYP3A4). In this study, Arcaro and collaborators [28] observed that the antidiabetic activity of curcumin was completely abolished when administered with piperine; in addition, this combination therapy apparently exerted liver toxicity, since significant increases in ALT levels were observed. The authors suggested that the antidiabetic activity of curcumin may be related to its metabolites. Recently, Zhang and collaborators [57] observed that both tetrahydrocurcumin and octahydrocurcumin, two main curcumin metabolites, exhibit potent *in vivo* anti-inflammatory effects via inhibition of the NF- κ B expression; interestingly, the biological effects of these metabolites were more pronounced than that of curcumin. Using rat liver microsomes, Ahmmed et al. [58] observed a concentration-dependent inhibitory effect of trigonelline on CYP3A4; however, this inhibition was very discrete when compared with the effect of the positive control ketoconazole. Altogether, and considering that treatments in our study were performed in the course of 9 weeks, the *in vivo* inhibitory effect of trigonelline on CYP3A4 could be favored, impacting curcumin biotransformation. In addition, many beneficial effects of trigonelline were also abolished in the presence of curcumin. There is no evidence that trigonelline is biotransformed in animals, so toxic responses due to excessive administration of antioxidants may be occurring. In addition, in the study by Silva and collaborators [50] curcumin supplementation did not improve various parameters altered in HFD mice, and caused fat accumulation in pancreas of mice fed HFD or even a chow diet, which was considered an evidence of tissue damage and therefore interpreted as curcumin toxicity. This toxicity may be a consequence of the quantity administered; authors described that mice received 8 mg curcumin/animal/day. In our study, although HFD mice received a lower quantity, 2.0–2.5 mg curcumin/animal/day, in combination with trigonelline and administered for 9 weeks, this combined therapy may be reaching toxic levels. Negative effects (absence of effects or harmful effects) of exogenous antioxidants administered at high doses have been reported [59].

Altogether, the present study provided evidence for the significant potential of trigonelline-enriched yoghurt and curcumin-enriched yoghurt to attenuate various disturbances observed in obese, HFD mice, including insulin resistance, glucose intolerance, inflammation and oxidative stress. Many antistressor components were also stimulated in liver and kidney of HFD mice treated with trigonelline or curcumin, with significant increases in antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) and in components involved with AGE detoxification (GLO 1 and AGE-R1), showing the potential mechanisms by which these phytochemicals can counteract both oxidative and the glycolytic stress. Moreover, although this study focused on exploring the beneficial effects of trigonelline and curcumin mixed into yoghurt, the effects of yoghurt alone cannot be ignored, especially the improvement in the glucose tolerance and reduction in inflammatory markers in HFD mice, highlighting the need for future investigations. Overall, trigonelline and curcumin have emerged as promising options to be used as complementary therapies for protection against obesity-associated complications in liver and kidney. Even with multiple benefits against obesity-related disorders, combined administration of trigonelline and curcumin to HFD mice does not appear to be a promising option. We hypothesize that a possible inhibition of biotransformation processes and/or the reaching of toxic doses may

be prevailing over the individual pharmacodynamic actions of these phytochemicals. Further investigations are necessary to dissect the mechanisms involved in the abrogation effects of combined treatment with trigonelline and curcumin, including studies in normal mice and pharmacokinetics studies, among others. These studies will also allow to advance the understanding of trigonelline and curcumin individual mechanisms of action.

Funding and acknowledgements

We thank José Antonio Sampaio Zuanon (São Paulo State University, School of Dentistry, Department of Physiology and Pathology, Araraquara, São Paulo, Brazil) for technical assistance. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil-Finance Code 001. We thank the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (Grant Number 98/09152–6; 16/23644–9), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (Grant Number 305936/2017–4) and Scientific Support and Development Program of School of Pharmaceutical Sciences (UNESP) (PADC/FCFAR/UNESP, Grant Number 2017/02-I) for the financial support.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MCC, AMB and ILB conceived and designed the study. MCC, TFOL, CAA, MDI, AB-D and RPA conducted the experiments, organized and analyzed data and performed the statistical analysis. AMB, MCC, TFOL, RPA, AB-D, ILB and LCS were involved in data interpretation and critical manuscript revisions for important intellectual content. ILB, IZP and LCS contributed with reagents. AMB, MCC, TFOL, RPA, AB-D, LCS and ILB wrote the paper. All authors read the manuscript and agreed with its publication.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108303>.

References

- [1] Hruby A, Hu FB. The epidemiology of obesity: a big picture. *Pharmacoeconomics* 2015;33:673–89. <https://doi.org/10.1007/s40273-014-0243-x>.
- [2] Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011;11:85–97. <https://doi.org/10.1038/nri2921>.
- [3] Kwon H, Pessin JE. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4(71). <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00071>.
- [4] Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, et al. Obesity. *Int J Mol Sci* 2011;12:3117–32. <https://doi.org/10.3390/ijms12053117>.
- [5] Morgan MJ, Liu Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res* 2011;21:103–15. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>.
- [6] Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules* 2015;5:194–222. <https://doi.org/10.3390/biom5010194>.
- [7] Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGES and ALES): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res* 2013;47:3–27. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.815348>.
- [8] Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol* 2014;2:411–29. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.016>.
- [9] Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1243:88–102. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06320.x>.
- [10] López-Díez R, Shekhtman A, Ramasamy R, Schmidt AM. Cellular mechanisms and consequences of glycation in atherosclerosis and obesity. *Biochim Biophys Acta* 2016;1862:2244–52. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2016.05.005>.
- [11] Bierhaus A, Nawroth PP. Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. *Diabetologia* 2009;52:2251–63. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1458-9>.
- [12] Aldini G, Vistoli G, Stefek M, Chondrogianni N, Grune T, Sereikaite J, et al. Molecular strategies to prevent, inhibit, and degrade advanced glycoxidation and advanced lipoxidation end products. *Free Radic Res* 2013;47:93–137. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.792926>.
- [13] Rabbani N, Thornalley PJ. Glyoxalase 1 modulation in obesity and diabetes. *Antioxid Redox Signal* 2019;30:354–74. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7424>.
- [14] Rabbani N, Thornalley PJ. Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. *Amino Acids* 2012;42:1133–42. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0783-0>.
- [15] Arulselvan P, Fard MT, Tan WS, Gothai S, Fakurazi S, Norhaizan ME, et al. Role of antioxidants and natural products in Inflammation. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:1–15. <https://doi.org/10.1155/2016/5276130>.
- [16] Yeh W-J, Hsia S-M, Lee W-H, Wu C-H. Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: a review of recent findings. *J Food Drug Anal* 2017;25:84–92. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.017>.
- [17] Yoshinari O, Takenake A, Igarashi K. Trigonelline ameliorates oxidative stress in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Med Food* 2013;16:34–41. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.2311>.
- [18] Zhou J, Chan L, Zhou S. Trigonelline: a plant alkaloid with therapeutic potential for diabetes and central nervous system disease. *Curr Med Chem* 2012;19:3523–31. <https://doi.org/10.2174/092986712801323171>.
- [19] Afifi NA, Ramadan A, Erian EY, Saleh DO, Sedik AA, Badawi M, et al. Trigonelline attenuates hepatic complications and metabolic alterations in high-fat high-fructose diet-induced insulin resistance in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2017;95:427–36. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0269>.
- [20] Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Padmavathi G, Monisha J, Roy NK, Prasad S, et al. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *Br J Pharmacol* 2017;174:1325–48. <https://doi.org/10.1111/bph.13621>.
- [21] Rivera-Mancía S, Trujillo J, Chaverri JP. Utility of curcumin for the treatment of diabetes mellitus: evidence from preclinical and clinical studies. *J Nutr Intermed Metab* 2018;14:29–41. <https://doi.org/10.1016/j.jnim.2018.05.001>.
- [22] Assis RP, Arcaro CA, Gutierrez VO, Oliveira JO, Costa PI, Baviera AM, et al. Combined effects of Curcumin and lycopene or Bixin in yoghurt on inhibition of LDL oxidation and increases in HDL and Paraoxonase levels in Streptozotocin-diabetic rats. *Int J Mol Sci* 2017;18:332. <https://doi.org/10.3390/ijms18040332>.
- [23] Gutierrez VO, Assis RP, Arcaro CA, Oliveira JO, Lima TFO, Beretta ALRZ, et al. Curcumin improves the effect of a reduced insulin dose on glycemic control and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. *Phyther Res* 2019;33:976–88. <https://doi.org/10.1002/ptr.6291>.
- [24] Roxo DF, Arcaro CA, Gutierrez VO, Costa MC, Oliveira JO, Lima TFO, et al. Curcumin combined with metformin decreases glycemia and dyslipidemia, and increases paraoxonase activity in diabetic rats. *Diabetol Metab Syndr* 2019;11:33. <https://doi.org/10.1186/s13098-019-0431-0>.
- [25] Zilin S, Naifeng L, Bicheng L, Jiping W. The determination of AGE-peptides by flow injection assay, a practical marker of diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta* 2001;313:69–75. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00651-9](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00651-9).
- [26] Pokupec R, Kalauz M, Turk N, Turk Z. Advanced glycation endproducts in human diabetic and non-diabetic cataractous lenses. Graef's arch. *Clin Experiment Ophthalmol* 2003;241:378–84. <https://doi.org/10.1007/s00417-002-0616-2>.
- [27] Kohn HI, Liversedge M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *J Pharmacol Exp Ther* 1944;82:292–300.
- [28] Arcaro CA, Gutierrez VO, Assis RP, Moreira TF, Costa PI, Baviera AM, et al. Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic rats. *PLoS One* 2014;9:e113993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113993>.
- [29] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- [30] Seubwai W, Wongkham C, Puapairoj A, Khuntikeo N, Pugkhem A, Hahnvanawong C, et al. Aberrant expression of NF- κ B in liver fluke associated cholangiocarcinoma: implications for targeted therapy. *PLoS One* 2014;9:e106056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106056>.
- [31] Balakumar M, Prabhu D, Sathishkumar C, Prabu P, Rokana N, Kumar R, et al. Improvement in glucose tolerance and insulin sensitivity by probiotic strains of Indian gut origin in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *Eur J Nutr* 2018;57:279–95. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1317-7>.
- [32] Lee E, Jung S-R, Lee S-Y, Lee N-K, Paik H-D, Lim S-I. *Lactobacillus plantarum* strain Ln4 attenuates diet-induced obesity, insulin resistance, and changes in hepatic mRNA levels associated with glucose and lipid metabolism. *Nutrients* 2018;10:643. <https://doi.org/10.3390/nu10050643>.
- [33] Cervellati C, Bonaccorsi G, Trentini A, Valacchi G, Sanz JM, Squerzanti M, et al. Paraoxonase, arylesterase and lactonase activities of paraoxonase-1 (PON1) in obese and severely obese women. *Scand J Clin Lab Invest* 2018;78:18–24. <https://doi.org/10.1080/00365513.2017.1405274>.
- [34] Yu W, Liu X, Feng L, Yang H, Yu W, Feng T, et al. Glycation of paraoxonase 1 by high glucose instigates endoplasmic reticulum stress to induce endothelial dysfunction in vivo. *Sci Rep* 2017;7:45827. <https://doi.org/10.1038/srep45827>.
- [35] Marsiglio L, Mantì S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, et al. Oxidative Stress in obesity: a critical component in human diseases. *Int J Mol Sci* 2014;16:378–400. <https://doi.org/10.3390/ijms16010378>.

- [36] Ilavenil S, Arasu MV, Lee J-C, Kim DH, Roh SG, Park HS, et al. Trigonelline attenuates the adipocyte differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 cells. *Phytomedicine* 2014;21:758–65. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.11.007>.
- [37] Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007;117:175–84. <https://doi.org/10.1172/JCI29881>.
- [38] Marchesini G, Moscatello S, Di Domizio S, Forlani G. Obesity-associated liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:s74–80. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1399>.
- [39] Sun B, Karin M. Obesity, inflammation, and liver cancer *J Hepatol* 2012;56:704–13. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.09.020>.
- [40] Navarro-Díaz M, Serra A, López D, Granada M, Bayés B, Romero R. Obesity, inflammation, and kidney disease *Kidney Int* 2008;74:S15–8. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.518>.
- [41] Zhou LL, Cao W, Xie C, Tian J, Zhou Z, Zhou Q, et al. The receptor of advanced glycation end products plays a central role in advanced oxidation protein products-induced podocyte apoptosis. *Kidney Int* 2012;82:759–70. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.184>.
- [42] Shen M, Lu J, Dai W, Wang F, Xu L, Chen K, et al. Corrigendum to “ethyl pyruvate ameliorates hepatic ischemia-reperfusion injury by inhibiting intrinsic pathway of apoptosis and autophagy”. *Mediators Inflamm* 2016;2016:5434275. <https://doi.org/10.1155/2013/461536>.
- [43] Sanajou D, Ghorbani Hagho A, Argani H, Aslani S. AGE-RAGE axis blockade in diabetic nephropathy: current status and future directions. *Eur J Pharmacol* 2018; 833:158–64. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.06.001>.
- [44] Wu Q, Li S, Li X, Sui Y, Yang Y, Dong L, et al. Inhibition of advanced Glycation Endproduct formation by Lotus seedpod Oligomeric Procyanidins through RAGE-MAPK signaling and NF- κ B activation in high-fat-diet rats. *J Agric Food Chem* 2015;63:6989–98. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01082>.
- [45] Chowdhury AA, Gawali NB, Bulani VD, Kothavade PS, Mestry SN, Deshpande PS, et al. In vitro antiglycating effect and in vivo neuroprotective activity of Trigonelline in d-galactose induced cognitive impairment. *Pharmacol Rep* 2018; 70:372–7. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.09.006>.
- [46] Mey JT, Dicarbonyl Stress Haus JM. Glyoxalase-1 in skeletal muscle: implications for insulin resistance and type 2 diabetes. *Front Cardiovasc Med* 2018;5:117. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00117>.
- [47] Zhu J, Wang H, Chen F, Fu J, Xu Y, Hou Y, et al. An overview of chemical inhibitors of the Nrf2-ARE signaling pathway and their potential applications in cancer therapy. *Free Radic Biol Med* 2016;99:544–56. <https://doi.org/10.1016/j.free-radbiomed.2016.09.010>.
- [48] Shao W, Yu Z, Chiang Y, Yang Y, Chai T, Foltz W, et al. Curcumin prevents high fat diet induced insulin resistance and obesity via attenuating Lipogenesis in liver and inflammatory pathway in adipocytes. *PLoS One* 2012;7:e28784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028784>.
- [49] Kobori M, Takahashi Y, Takeda H, Takahashi M, Izumi Y, Akimoto Y, et al. Dietary intake of Curcumin improves eIF2 signaling and reduces lipid levels in the white adipose tissue of obese mice. *Sci Rep* 2018;8:9081. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27105-w>.
- [50] Silva CB, Fassini PG, Ramalho LNZ, da Conceição EC, Zordan AJCM, Carlos D, Suen VMM. Curcuma supplementation in high-fat-fed C57BL/6 mice: no beneficial effect on lipid and glucose profile or prevention of weight gain. *Eur J Nutr* 2019; 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1887-7>.
- [51] Xu D, Xu M, Jeong S, Qian Y, Wu H, Xia Q, et al. The role of Nrf2 in liver disease: novel molecular mechanisms and therapeutic approaches. *Front Pharmacol* 2019; 9:1428. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01428>.
- [52] Li B, Wang L, Lu Q, Da W. Liver injury attenuation by curcumin in a rat NASH model: an Nrf2 activation-mediated effect? *Ir J Med Sci* 2016;185:93–100. <https://doi.org/10.1007/s11845-014-1226-9>.
- [53] Trujillo J, Chirino YI, Molina-Jijón E, Andérica-Romero AC, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: recent findings. *Redox Biol* 2013;17:448–56. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.09.003>.
- [54] Kim JE, Lee MH, Nam DH, Song HK, Kang YS, Lee JE, et al. Celastrol, an NF- κ B inhibitor, improves insulin resistance and attenuates renal injury in db/db mice. *PLoS One* 2013;8:e62068. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062068>.
- [55] Zeng T, Zhou J, He L, Zheng J, Chen L, Wu C, et al. Blocking nuclear factor-kappa B protects against diet-induced hepatic Steatosis and insulin resistance in mice. *PLoS One* 2016;11:e0149677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149677>.
- [56] Soto-Urquieta MG, López-Briones S, Pérez-Vázquez V, Saavedra-Molina A, González-Hernández GA, Ramírez-Emiliano J. Curcumin restores mitochondrial functions and decreases lipid peroxidation in liver and kidneys of diabetic db/db mice. *Biol Res* 2014;47(74). <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-74>.
- [57] Zhang Z-B, Luo D-D, Xie J-H, Xian Y-F, Lai Z-Q, Liu Y-H, et al. Curcumin's metabolites, Tetrahydrocurcumin and Octahydrocurcumin, possess superior anti-inflammatory effects in vivo through suppression of TAK1-NF- κ B pathway. *Front Pharmacol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01181>.
- [58] Ahmmed SM, Mukherjee PK, Bahadur S, Kar A, Mukherjee K, Karmakar S, et al. Interaction potential of Trigonella foenum graecum through cytochrome P450 mediated inhibition. *Indian J Pharmacol* 2015;47:530–4. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.165179>.
- [59] Bouayed J, Bohn T. Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev* 2010;3:228–37. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858>.