

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

NAIANE SILVA CARDOSO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO DE BARU (*Dipteryx alata* Vog.) SOBRE A
MODULAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL E DO PERFIL METABOLÔMICO EM RATOS
DIABÉTICOS**

Alfenas/MG

2024

NAIANE SILVA CARDOSO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO DE BARU (*Dipteryx alata* Vog.) SOBRE A
MODULAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL E DO PERFIL METABOLÔMICO EM RATOS
DIABÉTICOS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula.

Coorientadora: Ana Paula de Melo Loureiro.

Alfenas/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Cardoso, Naiane Silva.

Avaliação dos efeitos do óleo de baru (*Dipteryx alata* Vog.) sobre a modulação da função renal e do perfil metabólico em ratos diabéticos / Naiane Silva Cardoso. - Alfenas, MG, 2024.

162 f. : il. -

Orientador(a): Fernanda Borges de Araújo Paula.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Nefropatia diabética. 2. Estresse oxidativo. 3. Metabólica. 4. *Dipteryx*. I. Paula, Fernanda Borges de Araújo, orient. II. Título.

NAIANE SILVA CARDOSO

"AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO DE BARU (*Dipteryx alata* Vog.) SOBRE A MODULAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL E DO PERFIL METABÓLICO EM RATOS DIABÉTICOS"

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 07 de junho de 2024.

Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Deila Rosely Carneiro
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Gérsika Bitencourt Santos
Instituição: Universidade Professor Edson Antônio Velano

Profa. Dra. Carla Speroni Ceron
Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Borges de Araújo Paula, Professor do Magistério Superior**, em 07/06/2024, às 17:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1262458** e o código CRC **85E2655A**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por toda força que colocou em meu coração permitindo minha chegada até aqui e pela coragem de enfrentar o que está por vir.

À Universidade Federal de Alfenas e aos membros do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela disposição e auxílio em todas as etapas desde a minha matrícula.

Às agências de fomento, pelo apoio financeiro, que tornou possível a realização deste trabalho e a minha dedicação exclusiva.

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

Este trabalho também contou com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 400865/2019-0 (Chamada pública Nº 01/2019- Apoio a formação de Doutores em Áreas Estratégicas).

À minha orientadora, Fernanda Borges de Araújo Paula pela oportunidade, desde a minha primeira iniciação científica, pelos ensinamentos, apoio, paciência, dedicação e incentivo. Com a sua orientação e conhecimentos consegui realizar este trabalho. Obrigada pela confiança, pelo carinho e por auxiliar no meu crescimento profissional.

Aos meus amigos do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica e Experimental, em especial à Julia Rosental, grande amiga e colaboradora deste trabalho. Aos amigos do programa de pós-graduação e colegas de trabalho durante esse tempo. Aos antigos alunos de pós-graduação Bruno Cesar, Carla Miguel, Mayara Áthina que tanto me ensinaram e me proporcionaram maior independência na realização das experimentações. Vocês tiveram grandes influências no meu crescimento na pesquisa. A Damaris, mais que uma técnica do laboratório, uma amiga sempre disposta a ajudar e aconselhar. Obrigada pela amizade e parceria de todos.

Aos alunos de iniciação científica Caroline Jeronimo, Isis Giovana, Mirella César, Patrick Augusto, Tainá Stênico, Pedro Octávio e as alunas de estágio Taís Mendes e Laiskely Caetano que foram grandes companheiros de trabalho e extremamente dedicados na pesquisa. Sou grata por toda contribuição e tenho

certeza de que sem o apoio de todos vocês esta jornada teria sido bem mais difícil. Vocês me ensinaram muito nestes anos e certamente me lembrarei de vocês e deste período da minha vida com muita alegria. Sentirei saudades da convivência, das risadas e parceria. Obrigada por tudo!

Agradeço também a minha coorientadora, Ana Paula de Melo Loureiro pela contribuição e ajuda nos ensaios realizados no seu laboratório. Aos alunos Ricardo Maekawa e Elisabete Marzola, pela colaboração e auxílio nos ensaios dos metabólitos. A Dra. Sueli Regina Baggio e ao Prof. Rômulo Dias Novaes, pelas colaborações. Todos foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Agradeço a toda minha família, que mesmo sem entender sobre a área da pesquisa, sempre me incentivaram a procurar o melhor e me apoiaram na minha decisão. Aos meus pais Mario Cardoso e Maria Lourdes Silva Cardoso por toda educação, apoio e suporte que sempre me forneceram, aos meus irmãos Nayara e Felipe, a uma grande amiga, Letícia Costa, sempre incentivando nos momentos difíceis. Todos vocês sempre reforçaram meu potencial.

Meu eterno respeito a todos que participaram deste trabalho e me apoiaram durante esses anos!

RESUMO

A hiperglicemia no Diabetes Mellitus do tipo 2 (DM2) é o principal iniciador das alterações moleculares deletérias aos órgãos, que estão associadas ao estresse oxidativo. Como consequência, a doença renal diabética acomete cerca de 40% dos diabéticos. Um bom controle glicêmico pode reverter o estágio inicial da doença, sendo importante a busca de tratamentos complementares que possam auxiliar na prevenção dos danos induzidos pelo DM2. O óleo extraído da amêndoa de baru é rico em ácidos graxos monoinsaturados capazes de estimular a liberação da insulina. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da ingestão do óleo de baru sobre a função renal, o estresse oxidativo e o perfil metabólico no rim de ratos normais e diabéticos. A extração do óleo foi realizada por prensagem mecânica das amêndoas de baru. Neste estudo foi adotado um modelo de indução de DM2. Ratos machos wistar receberam ração hiperlipídica (30%) por 28 dias e em seguida uma injeção via intraperitoneal de estreptozotocina (35mg/kg). Os animais saudáveis permaneceram com a dieta padrão. Após a confirmação do diabetes (glicemia casual >250mg/dl) foram iniciados os tratamentos dos animais saudáveis e diabéticos com água e o óleo de baru nas doses de 0,75 g/kg; 1,5 g/kg e 3,0 g/kg, metformina (200 mg/kg) e gliclazida (10 mg/kg) isoladas e associadas com o óleo de baru (1.5 g/kg), durante 90 dias. Na etapa final do tratamento foram realizados o teste de tolerância oral à glicose (TTOG) e o teste de tolerância à insulina (TTI). O sangue total, a urina e os rins foram coletados para a determinação dos marcadores bioquímicos. A avaliação das atividades de enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) e dos níveis de malonaldeído (MDA) foram realizadas no soro e nos rins dos animais. No rim foram realizadas a avaliação histológica e a determinação do perfil metabólico. O tratamento com o óleo de baru nas doses de 1,5 g/kg e 3,0 g/kg, reduziram o consumo de ração e água, aumentaram a responsividade dos animais no TTOG e TTI, e diminuiu a glicose sérica, a creatinina e a albuminúria, nos animais diabéticos. A dose de 3,0 g/kg apresentou efeito mais significativo nos marcadores de função renal. No entanto, quando avaliado o estresse oxidativo no tecido renal, observa-se que o grupo diabético tratado com 1,5 g/kg do óleo, foi capaz de atenuar a redução das atividades das enzimas SOD, CAT e GPx em relação aos demais tratamentos com o óleo de baru e reduzir os níveis de MDA. Todos os tratamentos apresentaram efeitos benéficos em reduzir os danos histológicos renais e os níveis dos metabólitos do ciclo de Krebs e das adenosinas do metabolismo energético. A associação da metformina com o óleo de baru apresentou melhor capacidade no controle glicêmico e da função renal, já que reduziu os níveis de glicose sérica, frutamina, creatinina e albuminúria. Além disso, esse tratamento demonstrou capacidade de modular o metabolismo oxidativo, com a restauração das atividades das enzimas antioxidantes.

Palavras-chaves: Nefropatia diabética; Estresse oxidativo; Metabólica; Dipteryx.

ABSTRACT

Hyperglycemia is the main initiator of deleterious molecular changes to organs, which have been associated with oxidative stress. Because these events, diabetic kidney disease affects around 40% of diabetics. Good glycemic control can reverse the initial stage of the disease, and it is important to search for complementary treatments that can help prevent the damage induced by DM2. The oil extracted from baru almonds is rich in monounsaturated fatty acids, capable of stimulating the release of insulin. This work aimed to evaluate the effects of ingesting baru oil on renal function and oxidative stress in the kidneys of normal and diabetic rats. Oil extraction was carried out by mechanical pressing of baru almonds using a hydraulic press. In this study we adopted a DM2 induction model. Male Wistar rats received a high-fat diet (30%) for 28 days and then an intraperitoneal injection of streptozotocin (35mg/kg). Healthy animals remained on the standard diet. After confirming diabetes (casual blood glucose >250mg/dl), treatments of healthy and diabetic animals were started with water and baru oil at doses of 0.75 g/kg; 1.5 g/kg and 3.0 g/kg, metformin (200 mg/kg) and gliclazide (10 mg/kg) alone and associated with baru oil (1.5 g/kg), for 90 days. In the final stage of treatment, the oral glucose tolerance test (OGTT) and the insulin tolerance test (ITT) were performed. Whole blood, urine and kidneys were collected to determine biochemical markers. The evaluation of the activities of antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) as well as the analysis of malonaldehyde (MDA) were carried out in the serum and kidneys of the animals. Histological evaluation and determination of the metabolic profile were carried out in the kidney. Treatment with baru oil at doses of 1.5 g/kg and 3.0 g/kg reduced feed and water consumption, increased animal responsiveness in the OGTT and ITT, and decreased serum glucose and creatinine and albuminuria, in diabetic animals. The dose of 3.0 g/kg had a more significant effect on renal function markers. However, when evaluating oxidative stress in kidney tissue, it was observed that the diabetic group treated with 1.5 g/kg of the oil was able to attenuate the reduction in the activities of the enzymes SOD, CAT and GPx about the other treatments. with baru oil and reduce MDA levels. All treatments showed beneficial effects in reducing renal histological damage and the levels of metabolites of the Krebs cycle and adenosines of energy metabolism. The association of metformin with baru oil showed better ability to control glycemic and renal function, as it reduced serum glucose, fructosamine, creatinine and albuminuria levels. Furthermore, this treatment demonstrated the ability to modulate oxidative metabolism, restoring the activities of antioxidant enzymes.

Keywords: Diabetic Nephropathies; Oxidative stress; Metabolomics; Dipteryx

Lista de Figuras

Figura 1 -	Vias alternativas ativadas pelos metabólitos intermediários das vias glicolíticas em decorrência a hiperglicemia e à inibição da GAPDH.....	27
Figura 2 -	Semente de Baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog) secas.....	34
Figura 3 -	Processo de Extração e óleo de Baru	34
Figura 4 -	Delineamento experimental	35
Figura 5 -	Pellets da ração caseira hiperlipídica 30%.....	39
Figura 6 -	Fotografias das etapas de realização do teste de tolerância oral à glicose.	40
Figura 7 -	Etapas do teste de tolerância à insulina.....	41
Figura 8 -	Métricas utilizadas para avaliação da área e dos diâmetros no software Image Image Pro Plus 4.5®.....	46
Figura 9 -	Cromatograma obtido da análise do perfil de ácidos graxos do óleo de baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.).....	52
Figura 10 -	Marcadores bioquímicos da função renal no soro de animais controles e diabéticos.....	81
Figura 11 -	Volume urinário, creatinina urinária e microalbuminúria de animais controles e diabéticos.....	85
Figura 12 -	Marcadores hepáticos ratos saudáveis e diabéticos.....	88
Figura 13 -	Marcadores do perfil lipídico ratos saudáveis e diabéticos.....	89
Figura 14 -	Atividade de SOD, CAT e Gpx no soro dos grupos saudáveis e diabéticos não tratados e tratados com óleo de baru e/ou fármaco.....	94
Figura 15 -	Atividade de SOD, CAT e Gpx nos homogeneizado de rim dos grupos saudáveis e diabéticos não tratados e tratados com óleo de baru e/ou fármaco.....	98
Figura 16 -	Medidas morfometrias dos rins de animais saudáveis e diabéticos.....	115
Figura 17 -	Medidas morfométricas dos rins de animais saudáveis e diabéticos.....	116
Figura 18 -	Níveis de AMP, ADP e ATP de animais controle e diabéticos tratados e tratados com óleo de baru e/ou fármaco.....	121
Figura 19 -	Níveis de NAD, NMN e nicotinamida no rim de animais saudáveis e diabéticos tratados e tratados com óleo de baru e/ou fármaco.....	123
Figura 20 -	Níveis da arginina, asparagina, aspartato, agrininosuccinato, gluamato e glutamina de animais controle e diabéticos.....	126
Figura 21 -	Níveis de hidroxiglutarato, lactato e dos intermediários do ciclo de Krebs no rim de animais saudáveis e diabéticos.....	131

Lista de Gráficos

Gráfico 1 -	Glicemias casuais dos animais pertencentes ao grupo controle e diabético antes da administração de STZ.....	55
Gráfico 2 -	Glicemias casuais dos animais pertencentes ao grupo controle e diabético após da administração de STZ.....	55
Gráfico 3 -	Evolução dos pesos dos animais ao longo do período de indução e tratamento.....	57
Gráfico 4 -	Média do peso final dos animais controles e diabéticos no final do tratamento.....	59
Gráfico 5 -	Estimativa do consumo de ração em gramas/rato/dia dos animais diabéticos e controle durante o tratamento.....	61
Gráfico 6 -	Estimativa do consumo de água (ml/rato/dia) pós indução, dos grupos controles e diabéticos nas últimas semanas do tratamento	64
Gráfico 7 -	Média ponto a ponto das curvas glicêmicas do TTOG.....	66
Gráfico 8 -	Área sob a curva das curvas glicêmicas do TTOG.....	67
Gráfico 9 -	Média ponto a ponto das curvas glicêmicas do TTI.....	70
Gráfico 10 -	Área sob a curva das curvas glicêmicas dos grupos experimentais	70
Gráfico 11 -	Glicose sérica dos animais após 8h de jejum.....	73
Gráfico 12 -	Níveis de frutossamina no soro dos animais após a eutanásia.....	77
Gráfico 13 -	Níveis de Hemoglobina glicada (%) no sangue total dos animais....	79
Gráfico 14 -	Níveis de MDA no soro dos grupos saudáveis e diabéticos não tratados e tratados com óleo de baru e/ou fármaco.....	102
Gráfico 15 -	Níveis de MDA pmol/mg de proteína obtidas com o homogeneizado dos rins dos animais controles e diabéticos não tratados e tratados com óleo de baru e/ou fármaco.....	105

Lista de Tabela

Tabela 1 -	Composição de macronutrientes das rações padrão e hiperlipídica.....	39
Tabela 2 -	Fragmentações e tempo de retenção utilizados para quantificação de AMP, ADP e ATP.....	48
Tabela 3 -	Fragmentações e tempo de retenção utilizado para quantificação dos metabólitos negativos.....	48
Tabela 4 -	Fragmentações e tempo de retenção utilizado para quantificação dos metabólitos positivos.....	49
Tabela 5 -	Perfil de ácidos graxos totais (%) do óleo extraído das amêndoas de baru por prensagem mecânica.....	52
Tabela 6 -	Perfil de ácidos graxos específicos do óleo extraído das amêndoas de baru por prensagem mecânica.....	53
Tabela 7 -	Média dos pesos dos animais no início do protocolo de indução (1º semana).....	57
Tabela 8 -	Peso absoluto e relativo dos rins dos grupos saudáveis e diabéticos não tratados e tratados com óleo de baru e/ou fármaco.....	110

© Marca Registrada

Lista de símbolos

Lista de abreviatura

AGEs	Produtos de Glicação Avançada
AGL	Ácidos Graxos Livres
ALT	Alanina aminotransferase
AMPK	Proteína quinase ativada por Monofosfato de Adenosina
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BCAAS	Aminoácidos de cadeia ramificada
CAT	Catalase
c-HDL	Colesterol HDL (Lipoproteína de alta densidade)
CPT1	Carnitina palmitoil transferase 1,
CTE	Cadeia transportadora de elétrons (CTE)
DRC	Doença renal crônica
DRD	Doença renal diabética
DAG	Diglicerídeos
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERONs	Espécies Reativas de oxigênio e nitrogênio
GAP	Gliceraldeído- 3- Fosfato
GIP	Polipeptídio Inibitório Gástrico
GLP-1	Peptídeo Semelhante ao Glucagon-1
GLUT1	Transportador de Glicose do Tipo 1
GLUT4	Transportador de Glicose do Tipo 4
GPR	Receptor Acoplado à Proteína G
GSH	Glutathiona Reduzida
GPx	Glutathiona Peroxidase
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HO ²	Radical hidroperoxila
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio

IL-6	Interleucina 6
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
Keap1	Proteína 1 associada à ECH do tipo Kelch
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MDA	Malondialdeído
MUFAS	Ácidos Graxos Monoinsaturados
NAG	N-acetil-β-d-glucosaminidase
NAN	Nicotinamida
Nox	NADPH oxidase
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PARP 1	Poli-ADP-Ribose Polimerase
PKC	Proteína quinase C
PUFAS	Ácidos Graxos Polinsaturados
RI	Resistência à insulina
SFA	Ácidos Graxos Saturados
SOD	Superóxido dismutase
STZ	Estreptozotocina
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TTI	Teste de tolerância à insulina
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TTOG	Teste de tolerância oral à glicose
VLDL	Lipoproteínas de muita baixa densidade
ω- 9	Ácido oleico
ω- 6	Ácido linoleico

Sumário

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	DIABETES MELLITUS	20
2.2	DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC).....	22
2.3	ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA RENAL DIABÉTICA	25
2.4	PERFIL METABÓLICO NO DIABETES MELLITUS	28
2.5	ÓLEO DE BARU.....	30
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	COLETA, PREPARO DO VEGETAL E EXTRAÇÃO DO ÓLEO	34
4.2	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS	35
4.3	ANIMAIS.....	35
4.3.1	Indução do diabetes	38
4.3.2	Produção da ração hiperlipídica	38
4.3.3	Avaliação de parâmetros biológicos	39
4.3.4	Avaliação da tolerância oral à glicose e à insulina	40
4.3.5	Obtenção das amostras	41
4.3.6	Avaliação do controle glicêmico e dos marcadores bioquímicos	42
4.3.7	Medição do peso corporal e índice renal	43
4.3.8	Preparo de homogeneizado dos rins	43
4.3.9	Avaliação dos efeitos do óleo de baru sobre o estresse oxidativo ...	43
4.3.9.1.1	HPLC-DAD.....	43
4.3.9.1.2	<i>Determinação dos níveis de MDA</i>	44
4.3.9.2	<i>Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes</i>	44
4.3.9.2.1	<i>Determinação da atividade de Superóxido Dismutase (SOD)</i>	44
4.3.9.2.2	<i>Determinação da atividade de catalase (CAT)</i>	45
4.3.9.2.3	<i>Determinação da atividade de Glutathione Peroxidase (Gpx)</i>	45
4.3.10	Analises histológicas e morfométricas do rim	45
4.3.11	Quantificação de metabólitos intracelulares	47
4.3.12	Análise estatística	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51

5.1	SECAGEM E EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE BARU	51
5.2	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE BARU ..	51
5.3.	ENSAIO BIOLÓGICO.....	54
5.3.1	Indução do diabetes mellitus do tipo 2	54
5.3.3	Teste de tolerância oral à glicose	66
5.3.4	Teste de tolerância à insulina.....	69
5.3.5	Avaliação do tratamento do óleo de baru sobre os marcadores bioquímicos	73
5.3.6	Avaliação das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica	93
5.3.7	Peso absoluto e relativo dos rins.	109
5.3.8	Análises histológicas e histomorfométricas do rim.....	112
5.3.9	Efeito do óleo de baru nas vias metabólicas das células renais	120
6	CONCLUSÃO	136
	REFERÊNCIAS	139
	ANEXO A- Composição da ração comercial padrão nuvila.....	158
	ANEXO B- Comitê de ética no uso de animais UNIFAL-MG.....	159
	ANEXO C	160
	Certificado de Análise do cloridrato de Metformina	160
	ANEXO D- Protocolo para coloração com Hematoxilina e Eosina	162

1 INTRODUÇÃO

A mudança de hábitos alimentares e a presença do sedentarismo observada nos últimos anos são uns dos principais fatores para o desenvolvimento da obesidade, a qual, está altamente associada à perturbação do metabolismo da glicose, resultando no desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Carbone, *et al.*, 2019; Hurtado; Vella 2019).

O DM2 é o tipo mais comum de diabetes, corresponde de 90% a 95% de todos os casos de DM, possuindo etiologia complexa e multifatorial (SBD, 2023). Por muito tempo, o DM2 foi associado ao envelhecimento somado ao sedentarismo, porém a prevalência nos adolescentes se tornou mais presente atualmente. A idade média dos jovens com diagnóstico do DM2 é de aproximadamente 13 anos, coincidindo com o período de maior resistência à insulina (SBD 2023; Valaiyapathi; Gower; Ashraf, 2020).

Este tipo de diabetes se trata de uma desordem metabólica caracterizada pela hiperglicemia, resultante de uma produção inadequada de insulina e incapacidade do organismo em responder totalmente à insulina. Por se tratar de uma doença oligossintomática, a mesma pode permanecer, por anos, sem ser diagnosticada, contribuindo para o desenvolvimento das complicações diabéticas (ADA, 2023; SBD, 2023).

A hiperglicemia contribui para o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, produtos de glicação avançada e citocinas inflamatórias, resultando em danos celulares e teciduais, originando as complicações diabéticas (Afroz *et al.*, 2019). Dentre elas destaca-se a nefropatia diabética que se inicia com pequenas lesões renais, caracterizadas pelo aumento na excreção de albumina, entre 30 e 200 mg por dia. Esta situação pode evoluir para nefropatia clínica com proteinúria atingindo nível nefrótico e posteriormente pode progredir para doença renal crônica (DRC), sendo necessário realizar diálise ou transplante (Rao *et al.*, 2019).

De acordo com a Associação Americana de Diabetes (2019), a DRC ocorre em 20 a 40% dos pacientes com diabetes, estando presente principalmente no DM2. Além disso, entre as pessoas com diabetes tipo 1 ou 2, a presença de DRC aumenta significativamente o risco cardiovascular e os

custos com saúde. A DRC pode progredir para doença renal em estágio terminal (DRT), necessitando de diálise ou transplante renal.

Um mecanismo importante pelo qual a hiperglicemia leva ao dano renal é o estresse oxidativo resultante do excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da depleção da defesa antioxidante. O aumento da produção de EROs decorrente da hiperglicemia crônica pode ocorrer por meio de diferentes vias, com destaque para a via de formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), via dos poliois e ativação da proteína quinase C (Ni *et al.*, 2019).

As alterações da função renal são consequências dos elevados níveis de glicose sérica, os quais levam a alterações hemodinâmicas de veias e artérias renais, perda de podócitos, apoptose e redução da taxa de filtração glomerular (TFG). A maioria dessas alterações podem ser revertidas em um estágio inicial da doença pelo bom controle glicêmico, e por isso a importância de buscar alimentos com capacidade hipoglicemiante, para atuar junto com os medicamentos existentes (Rao *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2017).

Neste contexto, o baru (*Dipteryx alata* Vog) possui várias aplicações na culinária, sendo que o óleo obtido das suas amêndoas é utilizado em diferentes pratos típicos da região do Cerrado. O óleo é rico em ácidos graxos monoinsaturado (MUFAs) e ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), sendo relatada a presença dos ácidos oleico (ω 9), linoleico (ω 6) e palmítico como componentes majoritários (Reis *et al.*, 2018).

Vários estudos têm demonstrado que estes ácidos graxos (AG) e/ou seus metabólitos podem exercer diferentes ações no organismo, podendo influenciar processos metabólicos e afetar o estado de saúde. Tem sido demonstrado que o ácido oleico é capaz de estimular a liberação do peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e conseqüentemente ter ação insulínica, por potencializar a secreção de insulina (Ascaso, 2014; Ripken *et al.*, 2014), além de exercer uma importante ação anti-inflamatória.

A ação insulínica do GLP-1 reduz o risco de microalbuminúria e a progressão para nefropatia evidente no diabetes tipo 2. Além disso, há evidências de ações do GLP-1 no rim, sendo capaz de induzir a natriurese e diurese, aumentar a filtração glomerular e o fluxo sanguíneo renal. Todas essas ações são evidenciadas pela presença de receptores do GLP-1 nas células

tubulares proximais, nos glomérulos e na vasculatura renal (Crajoinas *et al.*, 2011; Jensen *et al.*, 2015).

O ácido linoleico e, principalmente, os seus metabolitos podem exercer efeitos antagônicos, podendo apresentar efeitos benéficos, como hipoglicemiante e hipolipemiante (Gurumallu *et al.*, 2022; Thijssen; Hornstra; Mensink, 2005). Por outro lado, estudos têm demonstrado que determinados AG e ou de seus metabolitos podem apresentar efeitos negativos sobre a saúde. É conhecido que o ácido araquidônico, um dos principais derivados do ácido linoleico, tem uma importante ação pró-inflamatória, vasoconstritora e pró-trombótica (Turolo *et al.*, 2018).

Sendo assim, a presença destes AG no óleo obtido da semente do baru pode ter importantes implicações sobre a saúde, uma vez que a quantidade e o tipo de lipídios ingeridos podem influenciar o metabolismo lipídico, resistência à insulina, risco cardiovascular e inflamação, podendo exercer efeitos benéficos ou prejudiciais sobre a saúde (Bastos; Rogero; Arêas, 2009; SBC, 2013).

Considerando que o controle dos níveis glicêmicos em pacientes diabéticos leva à diminuição da produção de fatores inflamatórios e do estresse oxidativo que resultam em danos teciduais, torna-se interessante o estudo de alimentos que possam interferir não somente no controle glicêmico como também prevenir a evolução das complicações diabéticas, como por exemplo, aquelas que afetam os rins.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico heterogêneo caracterizado pela presença de hiperglicemia por comprometimento da secreção de insulina, ação deficiente da insulina ou associação de ambos fatores. Pode ser classificado em: DM 1, DM 2; diabetes gestacional e diabetes mellitus associado a outras causas específicas (Ada, 2021; Punthakee; Goldenberg; Katz, 2018).

O diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) é o tipo mais comum de diabetes, pois corresponde de 90% a 95% de todos os casos de DM, possuindo etiologia complexa e multifatorial. É caracterizado pela resistência à insulina, deficiência parcial na secreção de insulina e alterações na secreção de incretinas (SBD, 2023). O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é a segunda causa mais comum de diabetes, caracterizado pela deficiência absoluta de insulina resultante da destruição autoimune das células β pancreáticas. Já os demais tipos de diabetes ocasionados por distúrbios genéticos e monogênicos por exemplo, representam uma pequena fração dos casos (Welch; Vella, 2022).

A prevalência do DM2 multiplicou acentuadamente com o aumento de obesidade nas últimas décadas, sendo mais comum em adultos mais velhos, no entanto tem sido cada vez mais vista em crianças, adolescentes e adultos jovens devido aos níveis crescentes de obesidade, inatividade física e dieta inadequada (IFD, 2021; Welch; Vella, 2022). Segundo a Federação Internacional do Diabetes (2021), a estimativa de prevalência de diabetes em adultos de 20 a 79 anos mais que triplicou nos últimos anos, chegando a 537 milhões de portadores do diabetes em 2021, sendo previsto que até 2030 esse número pode atingir 643 milhões de pessoas

A urbanização e o crescimento socioeconômico acelerado favorecem as mudanças no estilo de vida. A globalização, caracterizada pela expansão do comércio internacional, migração e interconexão cultural, influenciou significativamente os padrões alimentares em todo o mundo, sendo incluído a alta ingestão de carnes vermelhas e processadas, carboidratos refinados e açúcares livres. Além disso, as influências socioeconômicas levaram ao aumento do transporte motorizado e ocupações sedentárias, que em conjunto

com a má alimentação levam ao aumento do sobrepeso e da obesidade (Aras; Tchang; Pape, 2021; Tinajero; Malik, 2021).

O DM2 é uma doença complexa, sendo que seu desenvolvimento é influenciado por uma série de fatores de risco, classificados como não modificáveis como genética, etnia e idade e outros modificáveis, tais como estilo de vida, padrão alimentar, tabagismo e nível de atividade física. O sobrepeso e a obesidade são fatores de risco do DM2 bem estabelecidos, mas vale ressaltar que a ausência de um IMC elevado não exclui o risco da resistência à insulina, tendo em vista que o percentual de gordura corporal e adiposidade visceral corroboram para o início desta patologia (Tinajero; Malik, 2021).

O termo “diabesidade” traz a relação de ambas condições estarem relacionadas com o início da ingestão de alimentos calóricos e a ação prejudicada da leptina, que favorece o acúmulo de gordura nos tecidos, como pâncreas e músculo esquelético. Em decorrência deste processo, ocorre a lipotoxicidade, onde os ácidos graxos livres em excesso induz o estado de resistência à insulina periférica (Aras; Tchang; Pape, 2021).

A produção inadequada de insulina e incapacidade do organismo de responder totalmente à este hormônio é definida como resistência à insulina. Durante este estado, a insulina é ineficaz e, portanto, sinaliza inicialmente um aumento na produção de insulina para reduzir os níveis crescentes de glicose, mas com o tempo há o desenvolvimento de produção inadequada da mesma, levando a falha na sua produção, o que contribui para elevação glicêmica (IFD, 2021).

A Sociedade Brasileira de Diabetes (2022) estabelece que o diagnóstico é por meio da identificação da hiperglicemia, através da glicemia plasmática de jejum (>126 mg/dl), a glicose no teste de tolerância oral (>200 mg/dl) e a hemoglobina glicada (A1c) superior à 6,5%. Para os casos de pré-diabetes, transição do metabolismo normal da glicose para o DM2, é estabelecido a glicemia em jejum (>100 e <126 mg/dl) e uma glicemia plasmática de 2 horas após um teste oral de tolerância à glicose (>140 e <200 mg/dl).

Entretanto, por se tratar de uma doença com início silencioso e alguns portadores assintomáticos na fase inicial, muitos pacientes descobrem a doença após anos com a presença da hiperglicemia (IFD, 2021).

A hiperglicemia crônica causa um aumento nos produtos de glicação, capazes de induzir a inflamação, lesão das paredes arteriais e alterações no tecido vascular, resultando nas complicações macrovasculares, as quais abrangem a aterosclerose, doenças coronarianas, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica. Os vasos sanguíneos menores também são afetados pelo dano aterosclerótico, levando a complicações microvasculares, como neuropatia periférica diabética, retinopatia e nefropatia (Afroz *et al.*, 2019; Avogaro; Fadini, 2019).

O controle glicêmico almejado no tratamento do diabetes é essencial para prevenção das complicações micro e macrovasculares, melhorando a qualidade de vida dos pacientes. Embora exista um grande número de opções terapêuticas para o controle dos níveis glicêmicos do DM2, o tratamento abordado é individualizado para cada paciente de acordo com o risco de hipoglicemia, tolerabilidade dos efeitos adversos, gerenciamento das doses e custo (SBD, 2023).

O DM gera gastos econômicos significativos sobre os países, sistemas de saúde e os portadores de diabetes. As despesas com DM têm um impacto substancial no gasto total com saúde em todo mundo, representando 11,5% do total dos gastos globais com saúde. O Brasil somou em cerca de 42,9 bilhões de dólares de despesas com o DM e suas complicações em 2021 (IFD, 2021).

O tratamento do diabetes, vai além do uso de medicações, sendo necessário a associação dos fármacos com uma intervenção na dieta, como a melhora da qualidade dos carboidratos, redução da ingestão de grãos refinados, o aumento da ingestão de grãos integrais e alimentos vegetais mais saudáveis, assim como a prática de atividades físicas (Tinajero; Malik, 2021).

2.2 DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC)

A DRC é uma das principais complicações para pacientes diabéticos e a causa mais significativa de doença renal em estágio terminal (DRT). Os rins são alvos dos danos causados pelo excesso de glicose, levando ao desenvolvimento da nefropatia diabética e da DRC (SBD, 2023). A DRC abrange todo tipo de lesão renal com redução na taxa de filtração glomerular e presença de anormalidades na excreção de albumina na urina enquanto a nefropatia diabética é uma

condição crônica do rim com as mesmas alterações da DRC, adicionando-se a proteinúria persistente associada ao aumento da pressão arterial (Turatt; Hohl; Martins, 2016).

O diabetes, a hipertensão e a doença renal estão interligadas, dessa maneira o desenvolvimento da nefropatia diabética é dividida em cinco estágios, baseados nas alterações na taxa de filtração glomerular e na excreção urinária de albumina. O primeiro estágio inicia com a elevação da TFG, e da hipertrofia glomerular, já no segundo estágio observam-se alterações histológicas, como expansão da matriz mesangial e espessamento da membrana basal. No terceiro estágio há o aumento da albuminúria, taxa de excreção da albumina na urina (<30 mg/dia no estado fisiológico). Quando a albuminúria se eleva para faixa de 30-300 mg/dia, passa a ser denominada de microalbuminúria. Nesta fase surge também os sintomas de hipertensão. A quarta fase é caracterizada por proteinúria evidente (> 300 mg / dia), associada a um aumento adicional da microalbuminúria, juntamente com a elevação de ureia e creatinina no sangue. No estágio final da nefropatia, a TFG é mínima, fase em que o paciente já necessita de hemodiálise, pois durante o desenvolvimento da doença renal, a capacidade de filtração dos rins também diminui gradualmente (John, 2016; Sharma *et al.*, 2017).

No entanto, nos últimos anos, foram relatados casos de insuficiência renal sem albuminúria em pacientes diabéticos, demonstrando que os estágios da nefropatia diabética nem sempre acontecem sequencialmente, devido a associação de fatores múltiplos no DM como hipertensão, dislipidemia, obesidade e idade (SBD, 2023; Yamazaki *et al.*, 2021).

De acordo com a Associação Americana de Diabetes (2019), a DRC ocorre em 20 a 40% dos pacientes com diabetes, estando presente principalmente no DM2. Além disso, entre as pessoas com diabetes tipo 1 ou 2, a presença de DRC aumenta significativamente o risco cardiovascular e os custos com saúde. A DRC pode progredir para DRT, necessitando de diálise ou transplante renal.

A patogênese da doença renal diabética é um processo complexo que envolve diversos fatores, como inflamação, estresse oxidativo e fatores epigenéticos. A hiperglicemia crônica induz alterações metabólicas que modulam várias vias de sinalização intracelular, fatores de transcrição, citocinas,

quimiocinas e fatores de crescimento. Essas alterações estimulam anormalidades estruturais, como espessamento da membrana basal glomerular, lesão podocitária e expansão da matriz mesangial, juntamente com uma taxa de filtração glomerular reduzida (Keri; Samji; Blumenthal, 2018; Sharma *et al.*, 2017).

Um dos fatores importantes no desenvolvimento da doença renal diabética (DRD) é o fenômeno conhecido como “memória metabólica”, tendo em vista que a exposição anterior à hiperglicemia contribui para o desenvolvimento das complicações renais, mesmo após o tratamento normalizar os índices glicêmicos. Considera-se que os picos hiperglicêmicos passados levam à metilação do DNA, modificação nas histonas e acúmulo dos AGEs (Yamazaki *et al.*, 2021).

Outro mecanismo importante pelo qual a hiperglicemia leva ao dano renal é o estresse oxidativo resultante do excesso de EROs e da depleção da defesa antioxidante. O aumento da produção de EROs decorrente da hiperglicemia crônica pode ocorrer por meio de diferentes vias, com destaque para a via de formação dos AGEs, via dos polióis, ativação da proteína quinase C (PKC) e de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) (Bhatti *et al.*, 2022; Ni *et al.*, 2019).

Em relação as complicações renais, poucos são os estudos que abordam o perfil metabólico na doença renal diabética, contudo é relatado elevação dos intermediários do ciclo de Krebs, principalmente o fumarato, resultante da ativação da NADPH oxidase 4 (Nox4) que reduz os níveis da fumarato hidratase. O fumarato por sua vez aumenta a expressão de TGF- β , fator que lava a alterações celulares, contribuindo para o desenvolvimento da doença renal diabética (De Oliveira *et al.*, 2017; You *et al.*, 2016).

Assim, a nefropatia diabética surge inicialmente como uma DRC, com a presença de algumas alterações como hiperfiltração glomerular, aumento do fluxo sanguíneo renal e hipertrofia do rim. A maioria dessas alterações pode ser revertida em um estágio inicial pelo bom controle glicêmico, e por isso se faz necessário a busca de alternativas como alimentos, suplementos ou medicamentos novos que possam auxiliar o tratamento do diabetes, seja por influenciar o controle glicêmico como também por influenciar processo

metabólicos e ou vias de sinalização relacionadas ao desenvolvimento das complicações diabéticas (IFD, 2021; Sharma *et al.*, 2017).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA RENAL DIABÉTICA

O estresse oxidativo é um fenômeno causado pelo desequilíbrio entre a formação e a remoção de espécies oxidantes, as quais abrangem as EROs. As EROs são moléculas quimicamente ativas e subprodutos naturais do metabolismo do oxigênio, geradas em sua maioria nas mitocôndrias, seguidas do peroxissomos e retículo endoplasmático, mas também a partir de outras reações e complexos, como a NADPH-oxidase (NOx) (Luo *et al.*, 2016; Papachristoforou *et al.*, 2020).

Os principais tipos de espécies oxidantes produzidas em sistemas biológicos incluem EROs como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), radical singlete (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\cdot}), além do óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ($ONOO^-$), essas duas últimas denominadas de espécies reativas de nitrogênio (ERN). Essas espécies têm suas funções fisiológicas no organismo, envolvidas nos processos de sinalização e regulação celular, indução de apoptose e principalmente auxiliando na resposta imunológica. Além disso, elas têm um papel essencial no estímulo de resposta inflamatórias, pela ativação das proteínas quinases, fatores de transcrição e auxiliam na expressão gênica dos fatores pró-inflamatórios (Darenskaya; Kolesnikova; Kolesnikov, 2021).

Na verdade, a produção dos baixos níveis de EROs tem efeitos benéficos para o organismo, na modulação das funções celulares por meio de reações redox e na defesa contra patógenos invasores e células cancerosas por macrófagos e linfócitos citotóxicos. Por outro lado, a produção exacerbada dessas espécies leva ao dano oxidativo das células, com o comprometimento das enzimas, reações metabólicas, dos lipídeos, proteínas e DNA, interferindo na viabilidade celular (Papachristoforou *et al.*, 2020).

A hiperglicemia é o fator principal que aumenta a produção das EROs em pacientes diabéticos e ainda contribui para diminuição da resposta antioxidante. Através das alterações hemodinâmicas e do metabolismo de carboidratos e lipídeos, ocorre a ativação de vias que levam a formação de EROs, como a

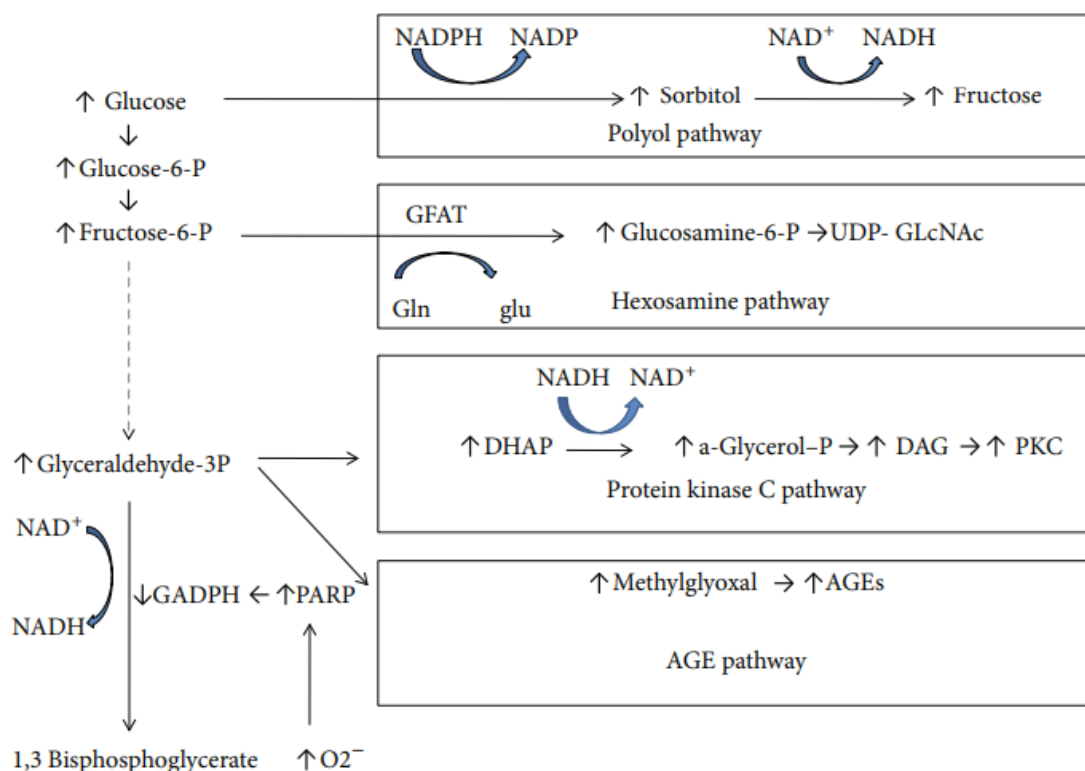
ativação da via do poliol, da hexosamina, de proteínas quinases e acúmulo dos AGEs. Como consequência da ativação destas vias de sinalização, processos como autofagia, inflamação e fibrose decorrem das alterações patológicas do tecido atingido (Luo *et al.*, 2016).

As mitocôndrias são significativamente influenciadas pela alteração no estado redox em condições hiperglicêmicas, e o acúmulo de EROs nesta organela leva ao comprometimento mitocondrial, contribuindo na patogênese da DRD. Os tecidos cardíaco e renal possuem mais mitocôndrias que os demais órgãos, concentrando ainda mais as EROs nestes locais, além de afetar os principais mecanismos de proteção antioxidante (Tanase *et al.*, 2022).

Entre os diversos alvos das EROs, o dano no DNA leva à ativação da enzima de reparo, a poli-ADP-ribose polimerase 1 (PARP 1), que inibe a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), levando ao acúmulo de gliceraldeído-3-fosfato (GAP). O acúmulo deste último contribui para a autooxidação da glicose, no qual leva a formação de H₂O₂, elevando os níveis de EROs, e de glioxal, precursor de AGEs (Darenskaya; Kolesnikova; Kolesnikov, 2021).

Os glomérulos renais são compostos por células endoteliais, mesangiais e podócitos, que contêm em sua membrana o transportador de glicose GLUT1 (constitutivo) e GLUT4 (dependente de insulina). A captação de glicose nessas células não é impedida pela resistência à insulina, por conta do aumento da captação da mesma pelo GLUT1, porém a oxidação da glicose é diminuída, já que ocorre a inibição da GAPDH. Dessa forma os intermediários glicolíticos seguem vias citosólicas alternativas, como a via do poliol e ativação da PKC, contribuindo para os mecanismos patogênicos das DRD (Ahmad; Draves; Rosca, 2021). A Figura 1 esquematiza as vias alternativas ativadas pelos metabólitos intermediários da via glicolítica.

Figura 1 - Vias alternativas ativadas pelos metabólitos intermediários das vias glicolíticas em decorrência a hiperglicemia e à inibição da GAPDH



Fonte: (Papachristoforou *et al.*, 2020)

Legenda: A superprodução mitocondrial de O₂⁻ durante condições hiperglicêmicas ativa quatro vias principais de dano hiperglicêmico ao inibir o GAPDH. NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; NADH: dinucleotídeo de nicotinamida adenina; GAPDH: gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase; PARP: poli-ADP-ribose polimerase; GFAT: glutamina:fructose-6-fosfato amidotransferase; UDP-GlcNAc: UDP-N-acetilglucosamina; DAG: diacilglicerol; IDADE: produto final de glicação avançada.

O excesso de glicose, faz com que ela seja convertida em sorbitol, seguindo a via do polioli. O problema do aumento da ativação dessa via é a depleção de NADPH citosólico e glutatona reduzida (GSH), importante no controle do estresse oxidativo. O gliceraldeído-3-fosfato é outro metabólito intermediário que também se eleva no diabetes, contribuindo para o aumento do diacilglicerol, responsável pela ativação crônica das isoformas da proteína quinase C, das quais a PKC-β2 tem especial relevância no rim diabético, pois ativa vias a jusante que levam à inflamação e acúmulo de matriz extracelular (Ahmad; Draves; Rosca, 2021; Darenskaya; Kolesnikova; Kolesnikov, 2021).

A produção de AGEs diante o acúmulo de glicose promove o aumento de EROs pela ligação com o receptor RAGE. As células epiteliais tubulares, células

mesangiais e os podócitos expressam esses receptores. A ligação do RAGE aos AGEs ativa a NADPH oxidase para aumentar a produção de EROs nas células renais, alterando a conformação molecular e as atividades enzimáticas. Como consequência, o estresse oxidativo ativado medeia as vias de sinalização com estímulo da inflamação (por exemplo, NF- κ B e TNF- β). Com isso, ocorre a liberação de moléculas de adesão, fatores endoteliais vasculares e fatores inflamatórios, levando a múltiplos mecanismos que contribuem para a lesão renal, como fibrose intersticial renal e expansão mesangial (Jangale *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2023).

A formação excessiva de EROs ativam uma série de vias de sinalização sensíveis ao estresse, incluindo NF- κ B, p-38 MAPK. A via de sinalização MAPK pode transduzir sinais de estímulo extracelular relacionados a proliferação celular, crescimento e apoptose. A ativação dessa via está relacionada a progressão da fibrose renal (Bhatti *et al.*, 2022).

2.4 PERFIL METABÓLICO NO DIABETES MELLITUS

O diabetes é caracterizado pelo distúrbio do metabolismo de glicose, lipídeos e aminoácidos no qual podem ser analisadas pela metabolômica, estudo de pequenas moléculas e intermediários bioquímicos, auxiliando na identificação de novos biomarcadores de risco para as complicações diabéticas (Floegel *et al.*, 2013). O estudo dos metabólitos é um campo que pode complementar o diagnóstico clínico, revelar novos mecanismos potenciais e processo moleculares associados à síndrome metabólica e avaliar terapias específicas (Gravina *et al.*, 2022). Os metabólitos são substratos e produtos intermediários e finais do metabolismo que conduzem as funções celulares, no qual refletem disfunções fisiológicas, portanto o estudo dessas moléculas ajuda a elucidar mecanismos patológicos (Johnson; Ivanisevic; Siuzdak, 2016).

Diferentes estudos que avaliam o perfil metabólico e caracterizam a impressão digital metabolômica no DM2 relatam que as principais alterações metabólicas estão no metabolismo de carboidratos e aminoácidos onde verifica-se um aumento nas concentrações de fenilalanina, isoleucina (Floegel *et al.*, 2013; Friedrich *et al.*, 2018). Contudo essas alterações não se diferem apenas de indivíduos saudáveis e portadores de DM, Rawat *et al.*, (2019) descreveram

que uma série de metabólitos do Ciclo de Krebs, do metabolismo de aminoácidos e de metilamina apresentavam-se totalmente modificados em pacientes com complicações diabéticas em comparação com diabéticos sem complicações. Dentre os metabólitos alterados, os pertencentes do ciclo de Krebs como o succinato, citrato e glutamato, tiveram grande destaque, pois apresentaram alterações mais significativas, se apresentando como possíveis marcadores de prognóstico.

Os intermediários metabólicos, bem como os produtos de determinadas vias, podem fornecer um reflexo mais direto do estado fisiológico. Considerando que os metabólitos também são eliminados na urina, a disfunção renal pode afetar a eliminação e reabsorção dessas moléculas, impactando nos níveis circulantes dos metabólitos (Rong *et al.*, 2022). Alguns metabólitos dosados no plasma de pacientes com doença renal são associados com o início e a progressão da DRC (Cheng *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2019). Como biomarcadores bem estabelecidos no DM2, os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), incluindo leucina, isoleucina e valina, encontram-se elevados no plasma de pessoas e animais diabéticos (Li *et al.*, 2023; Wang, Shuangyuan *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2021). Já é bem estabelecido que a redução do catabolismo de BCAAs promove a hiperativação da via da rapamicina e fosforilação da proteína do substrato do receptor de insulina, levando a disfunção mitocondrial das células beta pancreáticas (Wang, Shuangyuan *et al.*, 2022). No entanto, a correlação de BCAAs com a DRD são alvos de estudos recentes. Zhou *et al.*, (2023) descobriram que a elevação de valina e a leucina plasmática são correlacionadas com diminuição dos níveis de TFG e aumento dos níveis de albuminúria, levando a distinção de pacientes com DRD e pacientes com DM2.

A comparação de metabólitos plasmáticos entre pacientes saudáveis e diabéticos, já é bem abordado na literatura (Cheng *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2019; Rawat *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2021). No entanto, os estudos ainda são limitados pelo tipo de metabólitos avaliados, tipo de amostra utilizado e avaliação no tratamento da hiperglicemia. São raros os estudos que avaliaram os metabólitos em tecido renal de animais modelos de DM. As alterações do perfil metabólico renal de animais com modelo de nefropatia induzida por adriamicina, demonstram que o metabolismo da alanina, prolina e arginina podem prever a progressão da proteinúria. Já o desequilíbrio no metabolismo de beta-alanina e do ciclo de

Krebs está associado a progressão do dano renal e hipertensão (Wang, Chunliu *et al.*, 2022) . Zhao *et al.*, (2015) avaliaram os efeitos de uma fórmula herbal da medicina tradicional chinesa nos metabólitos renais de ratos com nefropatia diabética. Os autores observaram que alterações nos aminoácidos, carboidratos e lipídeos foram reduzidas com o tratamento da nefropatia diabética.

Em ratos com lesão renal aguda, foi observado o desbalanço no metabolismo de nicotinato e da nicotinamida, com a redução na formação de NAD⁺. O tratamento com a decocção Huangqi-Danshen foi capaz de restaurar os níveis dos metabólitos e enzimas relacionadas a biossíntese de NAD⁺ (Liu *et al.*, 2023). Já no trabalho de Rong *et al.*, (2022) reforça que a elevação dos BCAAs e da citrulina nos rins de camundongos com a doença renal diabética, e a regulação negativa destes aminoácidos após o tratamento com arteméter. Muito pouco foi publicado sobre a metabolômica do tecido renal de animais diabéticos com alteração da função renal.

2.5 ÓLEO DE BARU

A árvore de baru (*Dipteryx alata* Vog), uma espécie de planta nativa do cerrado brasileiro, apresenta frutas, polpas de alta qualidade e amêndoas que possuem potencial para uso humano, incluindo o preparo de alimentos e aplicações médicas, o que contribui para a economia local. As amêndoas de baru possuem o interesse científico devido à sua composição nutricional (Fetzer *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2019).

As sementes de baru apresentam altos níveis de lipídeos, proteínas e fibras, contendo alto valor energético com 476-560 kcal / 100 g (Souza *et al.*, 2019). Além do mais, o óleo é rico em MUFAs e PUFAs, apresentando também ferro, cálcio e zinco (Fetzer *et al.*, 2018). De acordo com Reis *et al.*, (2016), o ácido oleico é o componente majoritário no óleo de baru (44,65 g/100g), enquanto entre os PUFAs, o ácido linoleico (28,05g/100g) é predominante. Os autores relataram também a presença de ácidos graxos saturados, como o ácido palmítico 5,87, seguido pelos ácidos lignocérico (4,84g/100g), esteárico (4,34g/100g), behênico (3,18g/100g) e araquídico (1,15g/100g).

Os compostos bioativos presente em nozes e sementes de leguminosas como os ácidos graxos MUFAs e PUFAs, carotenoides, tocoferóis, fosfolipídeos, estão associados com a redução do estresse oxidativo e inflamação (Paulo *et al.*, 2023). Portanto, o interesse em óleos vegetais comestíveis aumentou devido a seus efeitos benéficos à saúde, como redução do colesterol e prevenção da aterosclerose (Marques *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2019).

A presença de nutrientes e outras moléculas no intestino delgado estimula a liberação de hormônios de saciedade, como a colecistocinina (CCK), o GLP-1 e o peptídeo YY (PYY) que atuam na diminuição do esvaziamento gástrico, do apetite e, conseqüentemente, da ingestão de alimentos (Ripken *et al.*, 2014).

Os lipídios têm sido amplamente pesquisados e são conhecidos por estimular a liberação de hormônios da saciedade, dentre eles o GLP-1. Entre as classes lipídicas, a ingestão de MUFAs como o ácido oleico tem demonstrado um melhor controle glicêmico em pacientes diabéticos, pois ao estimularem a liberação de GLP-1, este atua sobre as células β pancreáticas, promovendo a liberação de insulina e suprimindo a de glucagon (Granado-Casas; Mauricio, 2019; Ripken *et al.*, 2014).

A ação insulínica do GLP-1 reduz o risco de microalbuminúria e a progressão para nefropatia evidente no diabetes tipo 2. Além disso, há evidências de ações do GLP-1 no rim, sendo capaz de induzir a natriurese e diurese, aumentar a filtração glomerular e o fluxo sanguíneo renal. Todas essas ações são evidenciadas pela presença de receptores do GLP-1 nas células tubulares proximais, nos glomérulos e na vasculatura renal (Crajoinas *et al.*, 2011; Jensen *et al.*, 2015).

Uma dieta rica em ácido linoleico pode contribuir na redução dos níveis de colesterol na lipoproteína de baixa densidade (LDL) em indivíduos saudáveis auxiliando na prevenção de doenças cardiovasculares. Além disso, tem sido relatado que o ácido linoleico pode exercer um efeito modulador da inflamação e da fibrose na síndrome nefrótica (Stefano *et al.*, 2021). Por outro lado, também têm demonstrado que AG e ou seus metabólitos podem apresentar efeitos negativos sobre a saúde. É conhecido que o ácido araquidônico, um dos principais derivados do ácido linoleico, tem uma importante ação pró-inflamatória, vasoconstritora e pró-trombótica (Turolo *et al.*, 2018).

Embora os AG saturados sejam considerados pró-inflamatórios, existem divergências nas ações entre os diferentes compostos. Enquanto o ácido palmítico tem sido apontado como um composto com ação pró-inflamatória, sendo seus níveis associados positivamente aos níveis de diversos marcadores de inflamação, estudos relacionados ao ácido esteárico têm demonstrado que este ácido graxo também pode apresentar efeitos positivos e negativos sobre a saúde (Turolo *et al.*, 2018). Perreault *et al.*, (2014) relataram que os níveis de ácido esteárico se correlacionaram inversamente com os níveis de marcadores de inflamação em soro de indivíduos jovens. Além disso, em estudos realizados com células em cultura foi observado que o ácido esteárico atuou como inibidor de proteína tirosina fosfatase 1B, estimulando a captação de glicose por adipócitos (Tsuchiya; Kanno; Nishizaki, 2013). Em contrapartida, Lu *et al.*, (2016) demonstraram por meio de estudos em cultura celular e em camundongos que o ácido esteárico foi capaz de induzir severa lipotoxicidade em células beta pancreáticas.

Sendo assim, a presença destes AG no óleo obtido da semente do baru pode ter importantes implicações sobre a saúde, uma vez que a quantidade e o tipo de lipídios ingeridos podem influenciar o metabolismo lipídico, resistência à insulina, risco cardiovascular e inflamação, podendo exercer efeitos benéficos ou prejudiciais sobre a saúde (Bastos; Rogero; Arêas, 2009). Neste sentido, cabe ressaltar que as características químicas associadas à quantidade de AG ingeridos na alimentação são fatores determinantes de tais efeitos (Hanke *et al.*, 2013; Markman *et al.*, 2021).

Embora alguns autores tenham demonstrado que a semente do baru, pode apresentar capacidade de reduzir a pressão arterial e a inflamação (Sano; Ribeiro; Brito, 2004; Siqueira *et al.*, 2012), há ainda poucos estudos relacionados aos efeitos da ingestão do óleo isolado desta semente sobre a segurança alimentar no consumo da mesma e sobre diferentes patologias.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar os efeitos da ingestão do óleo de baru sobre o controle glicêmico, função renal, perfil metabólico e estresse oxidativo em ratos normais e diabéticos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

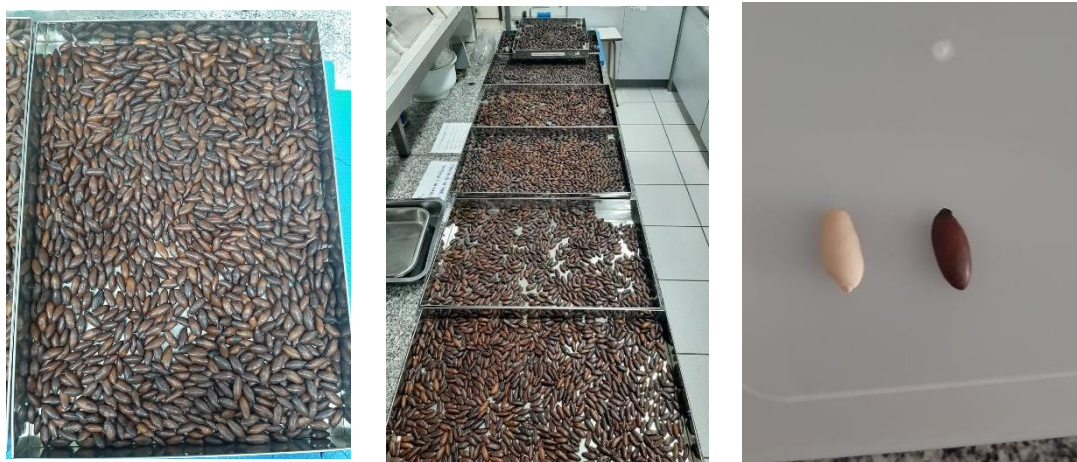
- a) Avaliar os efeitos da ingestão do óleo de baru sobre o controle glicêmico em ratos normais e diabéticos;
- b) Verificar os efeitos da ingestão do óleo de baru sobre morfologia renal em ratos normais e diabéticos;
- c) Analisar os efeitos da ingestão do óleo de baru sobre o perfil metabólico no rim de ratos normais e diabéticos;
- d) Analisar os efeitos da ingestão do óleo de baru sobre marcadores bioquímicos da função renal em soro e urina ratos normais e diabéticos;
- e) Analisar a ação do óleo de baru nas estruturas histológicas do rim de ratos saudáveis e diabéticos;
- f) Avaliar os efeitos da ingestão do óleo de baru sobre a peroxidação lipídica em soro e rim de ratos normais e diabéticos;
- g) Verificar os efeitos da ingestão do óleo de baru sobre a atividade de enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase em soro e rim de ratos normais e diabéticos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA, PREPARO DO VEGETAL E EXTRAÇÃO DO ÓLEO

As amêndoas de baru foram obtidas de produtores da região de Januária, Minas Gerais, Brasil (coordenadas 15° 29' 16" S 44° 21' 43" O), em dezembro de 2020 e 2021 e 2022. Estas foram armazenadas no Laboratório de Bioquímica Clínica da UNIFAL-MG, em embalagens plásticas, em temperatura de 2 a 8°C. As amêndoas foram selecionadas e submetidas à torrefação em estufa com circulação de ar a 65° C por 60 minutos, conforme descrito por (Lemos, 2012), para inativação dos compostos antinutricionais presentes na semente *in natura* (Figura 2).

Figura 2 - Semente de Baru (*Dipteryx alata* Vog) secas



Fonte: da autora

A extração do óleo foi realizada por prensagem mecânica utilizando-se prensa hidráulica, em temperatura ambiente (25°C) com pressão de 3 a 12 toneladas (Ferreira et al., 2006). O óleo obtido foi armazenado em frasco âmbar, em temperatura entre 2 e 8°C. A Figura 3 demonstra o processo de extração do óleo de baru.

Figura 3 - Processo de Extração e óleo de Baru



Fonte: da autora

O protocolo de extração do óleo foi o mesmo utilizado por Cruz *et al.*, (2023), sendo que a obtenção das amêndoas de baru, assim como a obtenção do óleo foram realizadas entre os meses de Janeiro e Maio, em 3 anos distintos, com a obtenção de 4 alíquotas do óleo. Neste trabalho, utilizamos a mistura do óleo obtido das duas últimas extrações.

4.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

Para avaliação da composição de AG, foi realizada a análise em cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS), utilizando um Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas GC-MS QP-2010 Plus Shimadzu® Corporation (Kyoto, Japão). A preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) foi realizada segundo (Hartman; Lago, 1973) e as condições cromatográficas foram estabelecidas segundo Horwitz (2010) e Firestone (2014). Estes ensaios foram realizados em colaboração com a Dra. Sueli Regina Baggio no Instituto de Tecnologia de Alimentos, em Campinas-SP.

4.3 ANIMAIS

O trabalho de Cruz *et al.*, (2023) desenvolvido no laboratório, foi utilizado como ensaio piloto para o desenvolvimento deste projeto. Neste trabalho, o óleo de baru foi utilizado como tratamento para os animais diabéticos nas doses de 1.0 g/kg, 1.5g/kg e 2.0 g/kg, durante 60 dias. Os resultados obtidos por Cruz *et*

al., (2023), forneceu subsídios para o estabelecimento do tempo de tratamento, assim como o ajuste das doses do óleo de baru adotado no presente estudo.

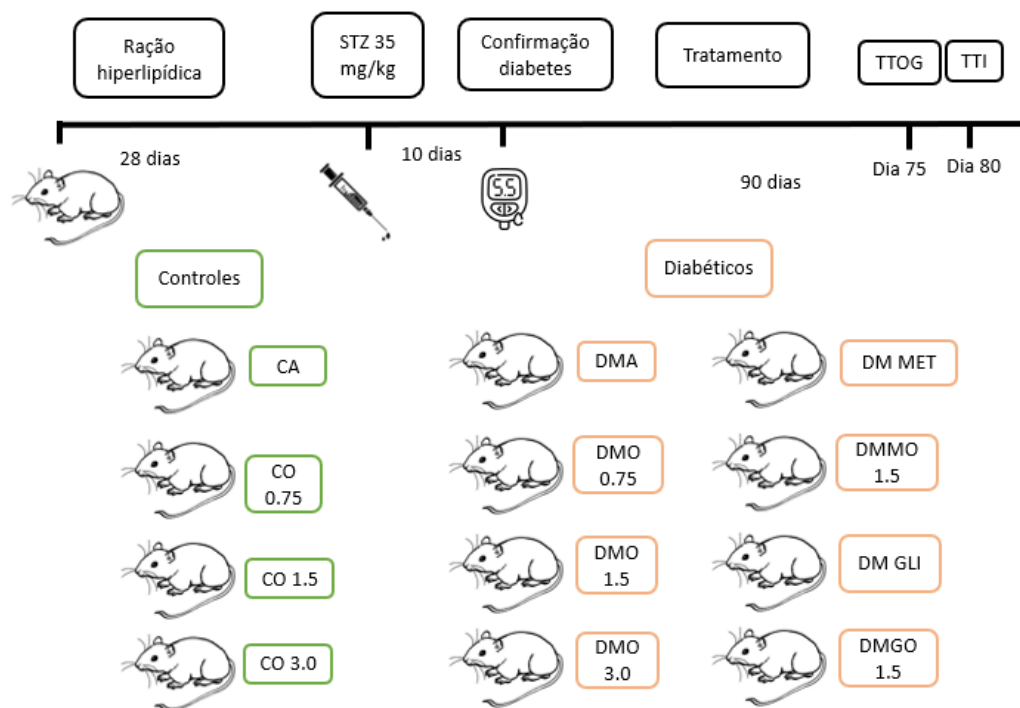
Para a realização dos ensaios biológicos foram utilizados ratos machos Wistar, com peso entre 200 ± 22 g, obtidos do Biotério da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram mantidos em caixas de polietileno e receberam água e ração comercial padrão *ad libitum*. Os animais foram mantidos em condições de temperatura $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 45%-60% de umidade e expostos a um ciclo de luz 12h/12h. O projeto foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da UNIFAL-MG sob número de protocolo 0057/2021 (Anexo B).

Ao todo, foram utilizados 90 animais, divididos em 12 grupos experimentais com 8 a 6 animais cada (Charan; Kantharia, 2013), sendo os grupos:

- a) CA (controle): animais não diabéticos tratados com água (n=7);
- b) CO 0,75: animais não diabéticos tratados com óleo da semente de Baru (0,75 g/Kg), (n=8);
- c) CO 1,5: animais não diabéticos tratados com óleo da semente de Baru (1,5g/Kg), (n=8);
- d) CO 3,0: animais não diabéticos tratados com óleo da semente de Baru (3g/Kg), (n=8);
- e) DMA: animais diabéticos tratados com água (n=8);
- f) DMO 0,75: animais diabéticos tratados com óleo da semente de baru (0,75 g/Kg), (n=8);
- g) DMO 1,5: animais diabéticos tratados com óleo da semente de Baru (1,5g/Kg), (n=6);
- h) DMO 3,0: animais diabéticos tratados com óleo da semente de Baru (3,0g/Kg), (n=8);
- i) DM MET: animais diabéticos tratados com metformina (200mg/Kg), (n=8);
- j) DM MO: animais diabéticos tratados com metformina (200mg/Kg) e óleo (1,5 mg/Kg), (n=6);
- k) DM GLI: animais diabéticos tratados com glicazida (10 mg/Kg), (n=8);
- l) DM GO: animais diabéticos tratados com glicazida (10 mg/Kg) e óleo (1,5 mg/Kg), (n=7).

Após a indução do diabetes, os animais foram tratados com óleo e ou fármacos durante 90 dias (Reis, 2016). Segue abaixo o delineamento experimental (Figura 4):

Figura 4 - Delineamento experimental



Fonte: da autora.

A divisão dos animais nos diferentes grupos foi realizada de maneira a garantir que não houvesse diferença estatística significativa no peso corporal entre os grupos no início do estudo.

As doses do óleo de baru foram baseadas em um trabalho prévio desenvolvido por Reis *et al.*, (2018) e definidas após o desenvolvimento de um protocolo piloto com doses entre 1,0 g/kg e 2,0 g/kg por Cruz *et al.*, (2023). A escolha da dose de metformina foi fundamentada nos trabalhos de Simanenkova *et al.*, (2021) e Zaabi *et al.*, (2021), enquanto a gliclazida seguiu o proposto nos estudos de Attia *et al.*, (2012), Sena *et al.*, (2009) e Abdelkader *et al.*, (2020).

O cloridrato de metformina foi adquirido direto do fabricante e solubilizado em água (200 mg em 2 ml de água). O certificado de análise está no Anexo C. A gliclazida utilizada recebe o nome comercial Azukon®. Os comprimidos (3

comprimidos) foram macerados e posteriormente solubilizados em água (229,3 mg em 8,6 ml).

4.3.1 Indução do diabetes

Para indução do DM2 os ratos foram alimentados com dieta hipercalórica (hiperlipídica), com metodologia baseada nos trabalhos de (Surwit *et al.*, 1988), (Skovsø, 2014), (Correia-Santos *et al.*, 2012) , assim como em protocolos desenvolvidos anteriormente no laboratório de bioquímica clínica. A idade dos ratos no início da indução foi de 7 semanas (ratos adultos). A oferta da dieta hipercalórica foi mantida por 28 dias, durante o processo de indução. Ao final deste período, e após 12 horas de jejum, os animais receberam uma injeção peritoneal de estreptozotocina (STZ) (Cayman Chemical®) em baixa dose (35 mg.kg⁻¹) dissolvida em veículo (solução de citrato de sódio 0,01M, pH = 4,5), enquanto os animais do grupo controle receberam apenas o veículo via intraperitoneal (Zhang *et al.*, 2008). A glicemia casual dos animais foi aferida antes e 10 dias após a injeção de STZ, por meio da excisão caudal e do uso do glicosímetro da G-Tech Free Lite®. Os animais que apresentaram a glicemia casual acima de 250mg/dL foram considerados diabéticos. Após a confirmação do diabetes, os animais voltaram a receber a ração comercial, sendo a mesma ofertada ao grupo controle. No caso de reversão do diabetes, durante o início do protocolo, o animal recebeu uma segunda dose de STZ de 35 mg/kg-1.

4.3.2 Produção da ração hiperlipídica

Inicialmente foi elaborada uma dieta hiperlipídica a fim de elevar a concentração de gordura presente na ração comercial (NUVILAB CR-1, QUIMTIA®, Anexo A). Desta forma, para o preparo da ração, a cada 700g de ração triturada e peneirada 300g de banha de porco (BRF – Sadia®) foram adicionados. Após misturar ração com a banha, os *pellets* foram feitos manualmente, no formado mais próximo ao padrão e secos em estufa por 24 horas à 65°C. A proporção final de lipídeos na ração foi de 32.8%. A Tabela 1

demonstra a composição da dieta hiperlipídica comparada a dieta padrão comercial, e a Figura 5 os *pelletes* da ração após o preparo.

Tabela 1- Composição de macronutrientes das rações padrão e hiperlipídica.

Macronutrientes	Ração Comercial Padrão (% em 1000g)	Ração Caseira Hiperlipídica 30% (% em 1000g)
Carboidratos	60%	42%
Proteínas	22%	15%
Lipídeos	4%	32.8%
Calorias g/kg	3.64 kcal/g	5.23 kcal/g

Fonte: da autora

Figura 5 - Pellets da ração caseira hiperlipídica 30%



Fonte: da autora

4.3.3 Avaliação de parâmetros biológicos

O peso corporal médio dos animais foi monitorado semanalmente em balança eletrônica semi-analítica. Para determinar o consumo médio diário de ração e água, a quantidade consumida em 24 horas foi verificada duas vezes por semana, durante todo o período de tratamento para cada grupo (Carvalho *et al.*, 2009).

4.3.4 Avaliação da tolerância oral à glicose e à insulina

A fim de verificar a responsividade destes animais frente ao desafio de sobrecarga de glicose em relação à correção da glicemia bem como o grau de resistência à administração de insulina, no final do tratamento, a partir dos 80 dias de tratamento, os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose (TTOG) e teste de tolerância à insulina (TTI).

Para a realização do TTOG, os animais ficaram em jejum nas 8h antecedentes ao teste, e a glicemia basal foi aferida no ponto T0. Em seguida, foi administrada uma solução de glicose a 50% na dose de 2g/kg via oral, por gavagem. Posteriormente a glicemia foi aferida nos pontos T15 (15 min), T30 (30 min), T60 (60 min), T90 (90 min) e T120 (120 min). A metodologia foi baseada nos trabalhos de (Yan *et al.*, 2019) e Oliveira (2019). Afigura 6 mostra as etapas de realização do teste de tolerância oral à glicose.

Figura 6 - Fotografias das etapas de realização do teste de tolerância oral à glicose



Fonte: da autora.

Legenda: A- Administração da solução de glicose 50% por gavagem, B- excisão feita na ponta da calda do animal, C- Aferição da glicemia pelo glicosímetro.

Para o TTI também foi necessária a realização da padronização do mesmo, para isso a dose testada foi de 2UI/Kg de Insulina Regular (Humulin R, Eli Lilly®), baseado no protocolo adotado por (Inácio *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2019). A insulina foi diluída em solução fisiológica (NaCl 0,9%, p/v) na proporção de 2:1 (insulina: solução fisiológica). A glicemia casual foi aferida no tempo zero T0, logo em seguida foi administrada em injeção subcutânea na dose de 2UI/Kg

e posteriormente a glicemia foi aferida nos tempos T15 (15 min), T30 (30 min) e T60 (60 min).

Uma solução de D-glicose 50% (p/v) foi previamente preparada e administrada na dose de 2g/kg ao final do TTI aos animais do grupo controle, a fim de evitar quadros hipoglicêmicos nos mesmos. A figura 7 mostra as etapas de realização do teste de tolerância à insulina.

Figura 7 - Etapas do teste de tolerância à insulina



Fonte: da autora.

Legenda: A- Excisão feita na ponta da calda do animal, B- Administração da insulina via subcutânea, C- Aferição da glicemia pelo glicosímetro.

4.3.4 Obtenção das amostras

Ao término dos 90 dias de tratamento com o óleo de baru, água e os hipoglicemiantes, os animais permaneceram em jejum por 8 horas e em seguida receberam o tramadol na dose de 12,5 mg/kg e o tiopental na dose de 40mg/kg, ambos via intraperitoneal. O sangue foi colhido por punção cardíaca e distribuído em tubos siliconizados sem aditivo para obtenção de soro e em tubos contendo EDTA para análise da hemoglobina glicada. O soro foi obtido por centrifugação do sangue colhido em tubos siliconizados a 1500g durante 15 minutos e utilizado para a avaliação dos marcadores bioquímicos e avaliação do perfil metabólico. Os rins foram retirados, sendo que o rim direito teve 3 cortes transversais e a porção do meio, com a medida aproximada de 6 mm, foi armazenada em formaldeído a 10% para posterior análise histológica, enquanto outra porção foi armazenada a -80°C, em tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M contendo inibidores de proteases, para avaliação dos demais parâmetros. Para os ensaios de

metabolômica, uma porção do rim esquerdo, foi imersa no nitrogênio líquido logo após a coleta e armazenada à -80°C.

Nas 48 horas que antecederam a eutanásia, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas no período de 12h para coleta de urina, após esse período os animais voltaram para as caixas de polietileno (Castro *et al.*, 2014). As amostras foram armazenadas a -80°C, para a determinação de microalbuminúria e creatininúria.

4.3.6 Avaliação do controle glicêmico e dos marcadores bioquímicos

As concentrações de glicose sérica foram determinadas pelo método enzimático-tinder (LABTEST®), enquanto a determinação da frutossamina sérica ocorreu pelo método cinético colorimétrico baseado na redução do azul de nitrotetrazólio (BIOCLIN®). A concentração de ureia no soro foi realizada por método enzimático cinético UV ((LABTEST®), e a concentração de creatinina sérica foi determinada segundo o método de Jaffé modificado (LABTEST®).

O perfil lipídico também foi avaliado, pela determinação de triglicerídeos (BIOCLIN®) e colesterol total (LABTEST®) pelo método enzimático-Trinder e o colesterol HDL por método enzimático direto (LABTEST®). A concentração de lipoproteínas aterogênicas foi estimada através da diferença entre a concentração de CT e de colesterol HDL, e expressa como colesterol não HDL. Para avaliação da segurança alimentar do óleo de baru, foram avaliadas a atividade de AST e ALT por método cinético UV (LABTEST®).

Os níveis de creatinina na urina foram determinados segundo o método de Jaffé modificado (LABTEST®), enquanto os níveis de microalbuminúria foram analisados por imunoturbidimetria (LABTEST®).

Esses marcadores bioquímicos foram analisados no equipamento automatizado da marca Labtest modelo LABMAX PLENNO.

Para avaliação da hemoglobina glicada, foi determinada a concentração de HbA1C no sangue total, colhido com EDTA, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), no equipamento de marca BIO-RAD D-10TM Hemoglobin Testing System.

4.3.7 Medição do peso corporal e índice renal

Os pesos corporais dos ratos foram determinados no final do tratamento e o índice renal (IR) foi dado pela razão entre o peso do rim e o peso corporal (Pal; Sinha; Sil, 2014a). Segue abaixo a fórmula utilizada:

$$IR = \frac{\text{peso do rim esquerdo (g)} + \text{peso do rim direito (g)}}{\text{peso corporal (g)}} \times 100$$

4.3.8 Preparo de homogeneizado dos rins

Parte dos tecidos renais foram homogeneizados em tampão fosfato (PBS) contendo *pool* de inibidores de proteases comercial, Benzamidina (5ul/ml), Leupeptina (2ul/ml) e fluoreto de metilfenilsulfonil (PMSF - 100 mg/mL) e, em seguida, centrifugadas a 3000g por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante obtido foi utilizado para determinação da atividade de enzimas antioxidantes. Outra parte do tecido (50 mg) foi homogeneizada em 500 µl de PBS e 72 µl de butil-hidroxitolueno (0,2% v/v). As alíquotas de sobrenadantes foram utilizadas para avaliação da peroxidação lipídica.

4.3.9 Avaliação dos efeitos do óleo de baru sobre o estresse oxidativo

4.3.9.1 Avaliação da peroxidação lipídica:

4.3.9.1.1 HPLC-DAD

As análises realizadas com UV/VIS foram conduzidas em um equipamento da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-20AT, um detector de arranjo de fotodiodos PDA-20AV, um auto injetor (Proeminence SIL-20AC) e um forno para colunas (CTO-10AS/VP) controlado por um módulo de comunicação CBM-20^a. Os dados foram processados pelo software LC-Solution 1.21 (Shimadzu, Kyoto, Japão).

4.3.9.1.2 Determinação dos níveis de MDA

A avaliação da peroxidação lipídica foi feita através da quantificação do malonaldeído no soro e nos rins por HPLC-DAD, realizado na Universidade de São Paulo, no departamento de Análises toxicológicas. Alíquotas de 100 µl de soro e homogeneizado de rim foram hidrolisadas para liberação do MDA e de proteínas a partir da adição de 10 µl de NaOH 4M e incubação a 60°C por 30 min sob agitação de 100rpm. Ao término da incubação, 150 µl de H₂SO₄ 1% (v/v) foram adicionados e as amostras foram submetidas à vigorosa agitação por 20 segundos com posterior centrifugação a 9.300 g por 10 min. Após a centrifugação, 175 µl do sobrenadante foram coletados e incubados com 25 µl de uma solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH, 1 mg/ml em HCl 2M). A reação de derivatização ocorreu em temperatura ambiente, ao abrigo de luz durante 30 min. Alíquotas de 50 µl (soro) e 100 µl (homogenato do rim) foram injetadas no sistema de HPLC-DAD, descrito no item anterior (de Oliveira *et al.*, 2017). A condição cromatográfica utilizada foi a seguinte: uma Coluna Luna C18 250mmx4,6mm, ID 5 µm (Phenomenex, Torrance, EUA), com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, EUA) foram eluídas com um gradiente de água (Solução A) e acetonitrila (Solução B) ambas suplementadas com ácido acético à 2% v/v, a 30°C, com fluxo de 1ml/min (0-28 min, 10-100% de B; 28-30 min, 100-20% de B; 30-40 min, 20% de B). O detector de DAD foi fixado em 306 nm para o monitoramento do produto MDA-DNPH.

4.3.9.2 Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes

4.3.9.2.1 Determinação da atividade de Superóxido Dismutase (SOD)

Alíquotas do soro (30µL) e do homogeneizado de rim (40µL) foram incubadas com hidroxilamina 0,1 mM, hipoxantina 0,1 mM e xantina oxidase 3,4 x 10⁻³ U/mL a 37°C, durante trinta minutos, na ausência de luz. Após incubação, foi adicionado ácido sulfanílico, α-naftilenodiamino e ácido acético glacial, sendo mantidos à temperatura ambiente por vinte minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 550 nm. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína, onde U é compreendida como

a atividade da enzima capaz de inibir 50% da reação nas condições citadas (Õyanagui, 1984).

4.3.9.2.2 *Determinação da atividade de catalase (CAT)*

O ensaio da catalase, pelo método de Aebi (1984) quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela própria enzima presente na amostra. Alíquotas do soro (1µl) e do homogeneizado de rim (2 µl) foram incubadas em PBS pH 7,4. A reação foi iniciada com a adição de H₂O₂ 100 mM, sendo a absorbância monitorada durante um minuto. A cinética de decomposição de H₂O₂ foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do mesmo a 240 nm. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína, onde U corresponde à atividade da enzima que promove a hidrólise de 1 µmol de H₂O₂ por minuto (Aebi, 1984).

4.3.9.2.3 *Determinação da atividade de Glutathione Peroxidase (Gpx)*

A Gpx foi determinada no soro e no rim pelo método de Sinet *et al.* (1975) através do monitoramento da absorbância à 300 nm, à 37°C, de uma mistura contendo: glutathione reduzida 6 mM, tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, NADPH 1 mM, glutathione redutase 1 UI e alíquotas do plasma (12 µl) ou do homogeneizado de rim (20 µl) . Após 3 minutos de incubação, a reação foi iniciada pela adição de t-butil-hidroperóxido (0,07 g/mL). A cinética de oxidação do NADPH foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar para o mesmo, a 340 nm. A atividade enzimática foi calculada em função da concentração de proteína na amostra (SINET *et al.*,1975).

4.3.10 **Analises histológicas e morfométricas do rim**

Após a coleta do rim, o órgão foi cortado ao meio (corte sagital), sendo que uma das partes foi cortada transversalmente em 3 partes, a porção central do rim direito após o corte transversal foi fixada por 24 horas em formalina neutra

tamponada a 10% (fosfato de sódio monobásico e dibásico). Após esse período, os tecidos foram tratados com álcool etílico 50% por 30 min e posteriormente foi armazenado em álcool etílico 70%.

Para o preparo das peças histológicas, os fragmentos dos rins de tamanho aproximado de 6 mm foram desidratados em bateria de álcool 70%, 90%, álcool absoluto (I, II e III), xilol I e II, ficando imersos em cada solução durante 60 minutos. Após o término da bateria de desidratação, as peças foram colocadas em cassetes de plástico e levadas para estufa (aproximadamente a 60°C), onde ficaram imersas em parafina histológica (Dinâmica®) overnight.

Para o emblocamento foi utilizada parafina histológica (Dinâmica®). Na microtomia, os cortes foram feitos com espessura de 0,5µm e colocados em lâminas de vidro simples sem adesivos. Para evitar a repetição das análises nas mesmas células os cortes foram feitos de modo semi-seriado em intervalos regulares de 15µm.

Antes da coloração, as lâminas contendo os cortes foram colocadas em estufa a 60°C por uma hora para secagem. Os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina (H.E.) de acordo com o protocolo do Laboratório de Histologia da Unifal-MG (Anexo D).

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz e as imagens capturadas usando um fotomicroscópio Zeiss Scope A1 e câmera Axio Cam ICc3 Zeiss (Zeiss®, Alemanha) com o software Axio Vision 4.8.

O cálculo da área do glomérulo e do corpúsculo renal foi feito na objetiva de 40x. Para tal, foram calculadas as áreas de, em média, 150 glomérulos e corpúsculos renais por grupo, totalizando 1800 análises. A área de espaço de Bowmann foi mensurada pela diferença da área do corpúsculo renal pela área do glomérulo. Também foi realizado a contagem de celularidade glomerular, em média, foram avaliados 150 glomérulos por grupo, totalizando 1800 contagens.

O número de células por milímetro quadrado do glomérulo foi obtido pela razão da celularidade glomerular pela área do glomérulo. Além disso, foram coletados os diâmetros de cada glomérulo para o cálculo do volume do glomérulo, obtido por meio da fórmula:

$$V = (4/3) \times \pi b^2a$$

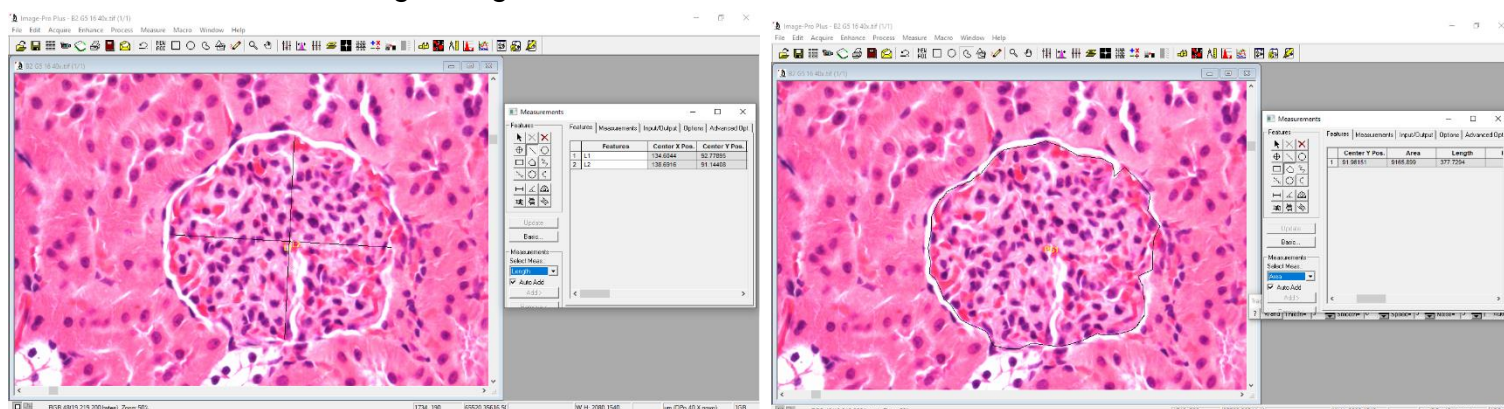
Onde: "a": diâmetro maior

“b”: diâmetros do glomérulo

As análises de morfologia quantitativa foram baseadas nos trabalhos de Mandarin-de-Lacerda e Fernandes-Santos (Fernandes-Santos *et al.*, 2013; Mandarin-De-Lacerda, 2003; Zhou *et al.*, 2019).

Todas as análises foram feitas com o software Image Pro Plus 4.5® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

Figura 8 - Métricas utilizadas para avaliação da área e dos diâmetros no software Image Image Pro Plus 4.5®



Fonte: da autora

4.3.11 Quantificação de metabólitos intracelulares

Para determinação dos metabólitos intracelulares, foi realizada a quantificação de AMP, ADP, ATP, arginina, adenosina, argininosuccinato, asparagina, aspartato, glutamato, glutamina, NAD, nicotinamida, nicotinamida mononucleotídeo (NMN), 2-hidroxioglutarato, lactato, succinato, malato, citrato e fumarato utilizando o espectrômetro de massas do tipo Ion Trap (amaZon Speed, Bruker Daltonics) acoplado a UFLC disponível no Laboratório Multiusuário de Espectrometria de Massas da FCF USP (LMEM-FCFUSP).

O preparo de amostras foi realizado como descrito por Rahmsn *et al.*, (2014) com algumas modificações. Aproximadamente 12 mg de tecido renal foram homogeneizados em 200 µl de água deionizada, sob banho de gelo. Para extração dos metabólitos intracelulares, uma alíquota de 20 µl de homogeneizado foi misturada com 463,4 µl solvente de extração (solução com 40% de acetonitrila, 40% de metanol e 20% de água) e com o padrão interno. Para dosagem das adenosinas (AMP, ADP e ATP) foi utilizado 15 µl de ATP ($^{13}\text{C}_{10}$ $^{15}\text{N}_5$ – 500 pmol) como padrão interno. Para dos metabólitos negativos

(malato, citrato, lactato, argininosuccinato, fumarato e hidroxiglutarato) foi utilizado 3,05 µl de ácido benzoico (C₆H₅COOH- 50 pmol) como padrão interno, enquanto para os metabólitos positivos (arginina, adenosina, asparagina, aspartato, glutamato, glutamina, NAD, nicotinamida, NMN) 3,02 µl de benzamida (5 pmol) foi utilizada como padrão interno. As amostras foram homogenizadas em vórtex e centrifugadas por 15 min a 20.000 g. O sobrenadante (450 µl) foi transferido para um novo tubo e passar pela secagem completa a vácuo. As amostras foram ressuspensas em 15 µl de água e centrifugadas por 5 min a 16.000g. Por fim, 6 µl da solução final foram injetados no sistema LC-Ion trap MS.

Para determinação das adenosinas o equipamento foi programado para o modo positivo. As fragmentações e energias utilizadas no MRM são descritas na Tabela 2. As razões entre áreas (metabólitos/ ATP ¹³C₁₀ ¹⁵N₅) foram utilizadas para quantificação. A seguinte condição cromatográfica foi utilizada: uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) com uma coluna Luna Omega PS C18 (150 x 2.1 mm i.d., 5.0 µm, 100A Phenomenex) eluida em gradiente por uma solução constituída de 0,01% de ácido fórmico em água (Solução A) e 40% de acetonitrila em tampão acetato de amônio 10 mM (Solução B) a 35°C, com fluxo 0,700 µL/min (0 – 1,5 min, 0-100% de B; 1,5 – 5 min, 100 - 30% de B; 5-6 min, 30-20% de B/ 6-14 min, 20 – 0% de B).

Tabela 2 - Fragmentações e tempo de retenção utilizados para quantificação de AMP, ADP e ATP

Metabólito	m/z	Fragmento m/z	Tempo de retenção (min)
AMP	348	136	2.9
ADP	428	136	3.0
ATP	508	410	3.1
ATP marcado (padrão interno)	523	425	3.1

Fonte: da autora

Para determinação dos metabólitos negativos o equipamento foi programado para o modo negativo. As fragmentações e energias utilizadas no MRM são descritas na Tabela 3. As razões entre áreas (metabólitos/ ácido

benzoico) foram utilizadas para quantificação. A seguinte condição cromatográfica foi utilizada: uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) com uma coluna Luna Omega PS C18 (150 x 2.1 mm i.d., 5.0 µm, 100A Phenomenex) eluída em gradiente por uma solução constituída de 0,01% de ácido fórmico em água (Solução A) e 40% de acetonitrila em tampão acetato de amônio 10 mM (Solução B) a 35°C, com fluxo 0,450 mL/min (0 – 4 min, 0-50% de B; 4– 5 min, 60 -100% de B; 5-5,5 min, 100-2% de B; 5,5-6 min, 2 – 40% de B; 6 - 15 min, 40 – 2% de B).

Tabela 3 - Fragmentações e tempo de retenção utilizado para quantificação dos metabólitos negativos

Metabólito	m/z	Fragmento m/z	Tempo de retenção (min)
2-Hidroxiglutarato	147	128,9	1.7
Lactato	89	Não houve	1.5
Succinato	117	Não houve	2.1
Malato	133	115	1.5
Citrato	191	111 e 173	2.3
Fumarato	115	71,25	2.8

Fonte: da autora

Para determinação dos metabólitos positivos o equipamento foi programado para o modo positivo. As razões entre áreas (metabólitos/benzamida) foram utilizadas para quantificação. A seguinte condição cromatográfica foi utilizada: uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) com uma coluna Luna Omega PS C18 (150 x 2.1 mm i.d., 5.0 µm, 100A Phenomenex) eluída em gradiente por uma solução constituída de 0,01% de ácido fórmico em água (Solução A) e 40% de acetonitrila em tampão acetato de amônio 10 mM (Solução B) a 35°C, com fluxo 0,450 mL/min (0 – 3 min, 0-20% de B; 3 – 6 min, 20 -60% de B; 6-7 min, 60-90% de B; 7-15 min, 90 – 0% de B).

As fragmentações e energias utilizadas no MRM são descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Fragmentações e tempo de retenção utilizado para quantificação dos metabólitos positivos.

Metabólito	m/z	Fragmento m/z	Tempo de retenção (min)
Asparagina	133	87	1.1
Glutamina	147	130	1.2
Aspartato	134	116	1.6
NAD	664	524	5.4
Glutamato	148	130	1.3
Argininossuccinato	291	273	1.4
Arginina	175	157	1.0
Nicotinamida	123	80	3.6
NMN	335	123	1.6
Adenosina	268	136	5.3
Benzamida (padrão interno)	122	105	6.8

Fonte: da autora

4.3.12 Análise estatística

Para as variáveis quantitativas foi utilizado o teste de T-student. Para a análise de três ou mais médias foi utilizado ANOVA e como análise post-hoc foi utilizado o teste de Tukey. As variáveis contínuas foram testadas quanto à sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. O teste de comparação entre as médias foi realizado após a retirada de valores discrepantes (outliers).

Nos testes de Tolerância oral à Glicose e de Tolerância à Insulina foi utilizado o cálculo da Área sobre a curva seguido do teste ANOVA para comparação das médias da área sobre a curva.

O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$ para todas as análises. Neste trabalho são apresentadas as médias e o desvio padrão de cada marcador. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R 4.2.1 (2022) através do R Studio RStudio 2022.02.3+492 (2022) e pacote ExpDes (Ferreira; Cavalcanti; Nogueira, 2014). Os gráficos foram elaborados utilizando o software GraphPad Prism 8.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir segue a descrição dos resultados dos ensaios experimentais adotados neste trabalho.

5.1 SECAGEM E EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE BARU

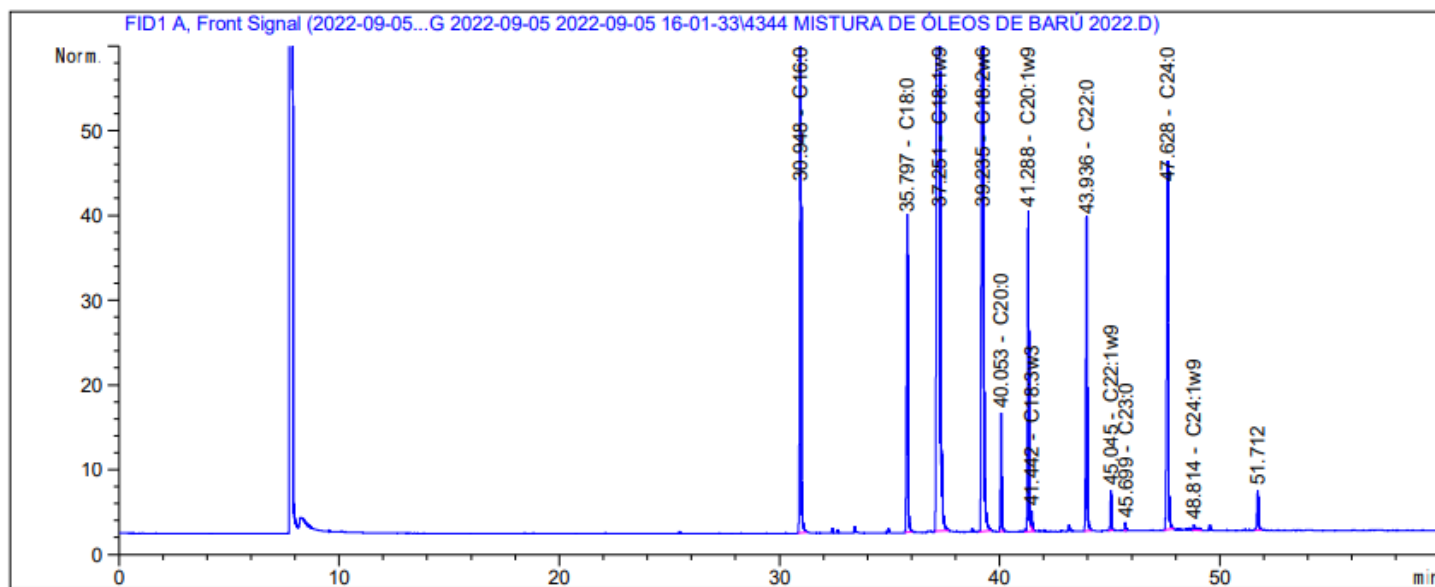
O peso das sementes de baru antes da secagem na estufa foi de 9,942 kg e após a secagem, o peso final foi de 9,890, kg, totalizando uma perda de 52g do peso bruto. O processo de extração do óleo das amêndoas resultou na obtenção de 2,64 litro de óleo, desta forma o rendimento foi de 26,7 %.

Os métodos empregados para extração de biomoléculas normalmente utilizam o uso de solventes orgânicos, porém alternativas mais ecológicas foram desenvolvidas a fim de preservar as biomoléculas. A prensagem mecânica é considerada um método eficaz para extração de compostos derivados de plantas, como semente, já que não é necessária a adição de nenhum composto químico e o óleo resultante é 100% puro, com suas propriedades originais. A única desvantagem desse processo é o baixo rendimento obtido no volume de óleo (Kapadia *et al.*, 2022).

5.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE BARU

Como citado anteriormente, os dois últimos processo de obtenção e coleta do óleo de baru realizado no trabalho de Cruz *et al.*, (2023) foram utilizados neste trabalho. Foi realizada a caracterização de uma alíquota a partir da mistura do óleo de baru obtido das duas extrações. A Figura 9 e as Tabelas 5 e 6 apresentam os resultados obtidos na caracterização de ácidos graxos do óleo de baru.

Figura 9 - Cromatograma obtido da análise do perfil de ácidos graxos do óleo de baru (*Dipteryx alata* Vog.)



Fonte: da autora

Legenda: 1- Palmítico 2- Estearico 3- Oleico 4- Linoleico 5- Araquídico 6- Cis-11-eicosenoico 7- Alfa linolênico 8- Behênico 9- Erúcico 10- Lignocérico

Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos totais (%) do óleo extraído das amêndoas de baru por prensagem mecânica

Ácidos graxos totalizados	% Área	g/100g
Saturado	19.61	18.74716
Monoinsaturado	51.33	49.07148
Poliinsaturado	28.52	27.26512
Ômega 3	0.13	0.12428
Ômega 6	28.39	27.14084
trans	0	0
N.I.	0.54	0.51624
TOTAL	100	

Fonte: da autora

Tabela 6 - Perfil de ácidos graxos específicos do óleo extraído das amêndoas de baru por prensagem mecânica

Ácido Graxo	% Área	g/100 g
C 16:0 (Palmítico)	6.31	6.03
C 18:0 (Esteárico)	3.94	3.77
C 18: 1 ômega 9 (Oléico)	48.12	46
C 18:2 ômega 6 (Linoleico)	28.39	27.14
C 20:0 (Araquídico)	1.05	1
C 20:1 ômega 9 (Cis-11-eicosenoico)	2.88	2.75
C 18:3 ômega 3 α (Alfa linolênico)	0.13	0.12
C 22:0 (Behênico)	3.48	3.33
C 22:1 ômega 9 (Erúcico)	0.33	0.32
Não identificado	0.08	0.08
C 24:0 (Lignocérico)	4.83	4.62
Não identificado	0.46	0.44
TOTAL	100	

Fonte: da autora

A análise do perfil de ácidos graxos do óleo extraído da amêndoa de baru demonstrou a presença majoritária de ácidos graxos mono e poliinsaturados, respectivamente. Entre os ácidos graxos monoinsaturados, o ácido oleico é o componente com maior concentração, enquanto o ácido linoleico foi o ácido graxo poliinsaturado predominante. Também foi observado a presença de ácidos graxos saturados (ácido palmítico), em uma menor proporção, seguido pelos ácidos lignocérico, esteárico, behênico e araquídico (Tabelas 5 e 6).

Os resultados obtidos à cerca da composição de ácidos graxos presentes no óleo de baru neste trabalho corroboram com achados de outros autores, como Schincaglia *et al.*, (2020) e Lemos (2012). A predominância dos ácidos graxos insaturados no óleo de baru, indica um possível potencial dietoterápico, considerando os efeitos benéficos da ingestão deste tipo de gordura. Os PUFA's podem atuar como antioxidantes regulando a via de sinalização antioxidante como também modular processos inflamatórios. A deficiência de ácidos graxos

essenciais raramente foi descrita em humanos, porém a baixa ingestão contribui o desenvolvimento de doenças como dermatite, hipertensão renal, distúrbios da atividade mitocondrial, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, desenvolvimento cerebral prejudicado, artrite, depressão e diminuição da resistência do corpo à infecção (Djuricic; Calder, 2021).

As condições de processamento e armazenamento desempenham um papel crítico na preservação da qualidade do óleo. A exposição de óleos vegetais a temperaturas mais elevadas, umidade e luz pode acelerar o processo de hidrólise da gordura levando a formação de ácidos graxos livres (Shen *et al.*, 2021). Assim a qualidade no processamento da matéria prima, assim como o produto final é importante para aplicação do óleo na indústria alimentícia e farmacêutica.

A caracterização completa do óleo de baru, extraído por prensagem a frio, assim como a avaliação da sua qualidade foi realizada por (Paulo *et al.*, 2023), demonstrou baixos níveis de ácidos graxos livres e baixa acidez. O perfil de ácidos graxos totais foi menor na proporção MUFAS/PUFAS em relação ao obtido em nosso trabalho, porém a predominância de ácido oleico e ácido linoleico foi semelhante.

5.3. ENSAIO BIOLÓGICO

Tendo em vista os resultados obtidos no protocolo piloto, principalmente em relação aos marcadores bioquímicos de lesão renal não alterados pelo diabetes durante o protocolo de 60 dias (Cruz *et al.*, 2023), o grupo de pesquisa optou por alterar o tempo de tratamento e aumentar o intervalo entre as doses do óleo de baru. Segue abaixo os resultados do protocolo experimental.

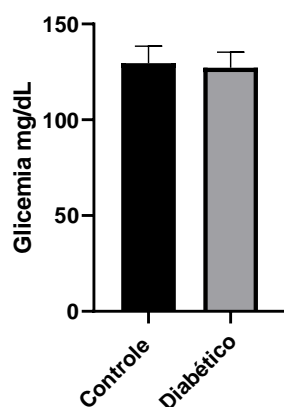
5.3.1 Indução do diabetes mellitus do tipo 2

Os dados obtidos no ensaio piloto demonstraram que antes da administração de estreptozotocina, as médias da glicemia do grupo controle e diabético foram, respectivamente, de 129,6 mg/dL \pm 8,84 e 127,2 mg/dL \pm 8,10, não apresentando diferença estatística entre os grupos ($p= 0,1848$). Já após a

administração de uma dose baixa de STZ, verificou-se que a média glicêmica dos animais pertencentes ao grupo controle foi de 113,1 mg/dL \pm 8,91 e do grupo diabético foi de 425,3 mg/dL \pm 70,91 ($p < 0,001$).

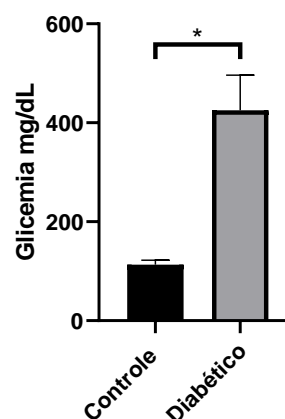
Os gráficos 1 e 2 apresentam as glicemias aferidas antes e após a administração da STZ.

Gráfico 1 - Glicemias casuais dos animais pertencentes ao grupo controle e diabético antes da administração de STZ.



Fonte: Da Autora

Gráfico 2 - Glicemias casuais dos animais pertencentes ao grupo controle e diabético após a administração de STZ.



Fonte: Da Autora

O desenvolvimento da resistência à insulina e do quadro de pré-diabetes está altamente relacionado com os índices de obesidade e sobrepeso na população, principalmente nos jovens e adolescentes (Aras; Tchang; Pape, 2021). De acordo com a IFD (2021), cerca de 240 milhões de pessoas vivem com o diabetes não diagnosticado, devido a falha no diagnóstico precoce do pré-diabetes e nas ações de prevenção do desenvolvimento do diabetes e das suas complicações. Os estágios iniciais do desenvolvimento do DM2 podem ser até reversíveis de acordo com a mudança no estilo de vida e uso de fitoterápicos capazes de controlar o nível glicêmico, dessa forma a padronização de modelos de resistência à insulina e DM2 em roedores é essencial, porém difícil de ser aplicada nos trabalhos científicos (Preciado-Saldaña *et al.*, 2023).

O protocolo de indução de DM neste trabalho, resultou na glicemia casual dos animais diabéticos superior que os animais saudáveis, assim foi possível verificar que o protocolo foi efetivo na indução do diabetes.

5.3.2 Monitoramento do peso e consumo de água e ração

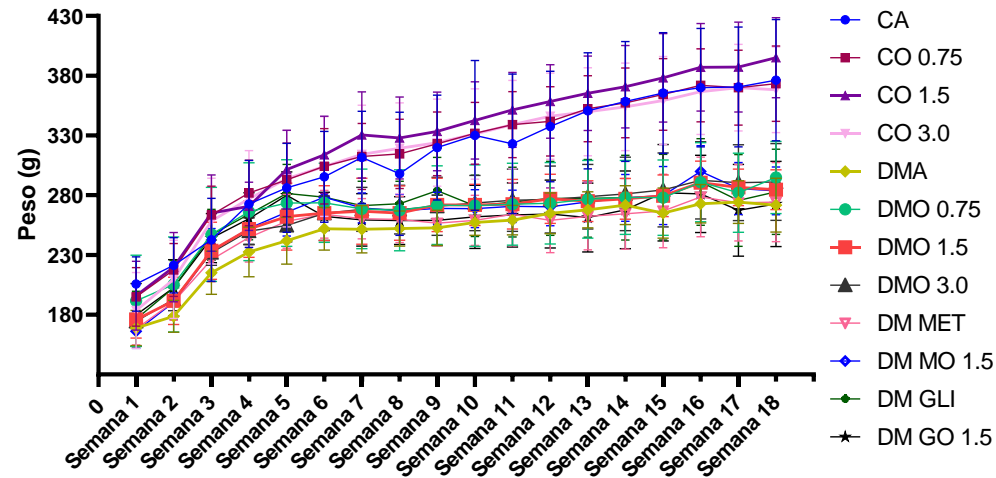
Durante o período de indução e tratamento, realizou-se o monitoramento do peso dos animais e do consumo de água e ração. A tabela abaixo representa as médias dos pesos dos animais no início do protocolo de indução e o gráfico 3 representa a média dos pesos obtidos em cada semana durante todo período de experimentação (4 meses).

Tabela 7 - Média dos pesos dos animais no início do protocolo de indução (1ª semana)

	CA	CO 0.75	CO 1.5	CO 3.0	DMA	DMO 0.75	DMO 1.5	DMO 3.0	DM MET	DM MO 1.5	DM GLI	DM GO 1.5
Peso	171.1 ±	163 ±	164.8 ±	148.8 ±	142.7 ±	158.8 ±	144.8 ±	150 ±	147 ±	144.5 ± 10.9 ^a	143.1 ±	146.1 ±
Semana 1	19.19 ^a	27.12 ^a	29.66 ^a	30.68 ^a	9.25 ^a	36.5 ^a	30.4 ^a	11.69 ^a	11.02 ^a		9.32 ^a	10.47 ^a
Peso	272.7 ±	271.9 ±	270.6 ±	276.9 ±	250.1 ±	266.3 ±	251.3 ±	250 ±	244.8 ±	256.4 ±	264 ±	259 ± 20.41 ^a
Semana 4	36.41 ^a	27.38 ^a	20.26 ^a	40.44 ^a	47.94 ^a	40.95 ^a	35.63 ^a	11.02 ^a	20.68 ^a	20.02 ^a	21.34 ^a	

Legenda: Os resultados representam a média ± desvio padrão do peso na primeira semana do protocolo experimental. Letras iguais na mesma linha, para resultados estatisticamente iguais pelo teste de Tukey. O número de animais (n) de cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

Gráfico 3 - Evolução dos pesos dos animais ao longo do período de indução e tratamento.



Fonte: do Autor

Legenda: Os resultados representam a média ± desvio padrão do peso na primeira semana do protocolo experimental. Letras iguais para resultados estatisticamente iguais pelo teste de Tukey. O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

No início do protocolo, os animais dos grupos controles (n=32) tinham em média $196,4 \pm 28,3$ gramas, enquanto no final do protocolo, com 90 dias eles pesavam em média $378,2 \pm 37,7$ gramas. Esses dados demonstram um ganho médio de peso de 181,8 gramas, representando um aumento de 92,56 % no peso corporal final dos animais. Já os animais dos grupos diabéticos (n=64) apresentavam peso inicial de $177,5 \pm 26,4$ gramas e no final de $283,4 \pm 29,18$ gramas, representando aumento de 105,9 gramas, ou seja, 59,66 % do peso corporal.

Ao avaliar a evolução dos pesos dos animais dos grupos diabético e controle, verifica-se que até a quarta semana, ambos grupos têm um ganho de peso semelhante, não havendo diferença entre eles, porém na quinta semana é notório a diferença dos pesos entre os grupos controles e diabéticos ($p < 0,001$). Na quarta semana, antes da administração de STZ, verifica-se que a igualdade do peso entre os diferentes grupos experimentais ($p > 0,05$).

No decorrer da aplicação desse protocolo, realizamos o acompanhamento do peso corporal durante 18 semanas, onde é possível notar que os animais diabéticos, após o período de indução e instalação do diabetes (a partir da sétima semana), apresentaram uma elevação discreta no peso corporal ao longo do tratamento.

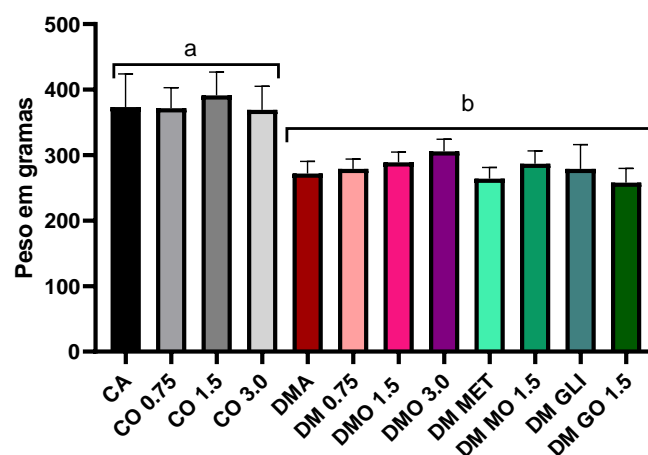
De acordo com o protocolo seguido por Correia Santos e colaboradores (2012), após o processo de indução o grupo diabético manteve o peso inicial e o grupo controle manteve a progressão no ganho de peso, sem diferença estatística entre os dois. Porém, eles avaliaram o peso somente até 20 dias após a indução, período menor comparado aos registros deste estudo. Já no protocolo de indução adotado por Guex *et al.*, (2019), com dieta hiperlipídica (70% gordura) e administração de STZ (35mg/kg) na quarta semana, demonstrou que a diferença de peso entre animais diabéticos e saudáveis se mantém até a 18^o semana, após a instalação do diabetes. Mesmo com a oferta de uma dieta com percentual de gordura mais alto, os animais diabéticos permaneceram com o peso corporal menor que os animais saudáveis.

A administração de STZ e a instalação do DM levou a perda de massa dos animais dos grupos diabéticos, impedindo a evolução do ganho de peso

corporal neste trabalho, semelhante ao protocolo de 60 dias adotado por Cruz *et al.*, (2023). Estes resultados podem estar associados à ação da estreptozotocina. É conhecido que baixas doses de estreptozotocina pode diminuir os níveis de insulina por destruir parcialmente as células beta, o que contribui para elevação da glicemia. A instalação do diabetes altera o metabolismo de lipídios, além de elevar do catabolismo proteico, gerando a perda de peso (Guex *et al.*, 2019; SALES *et al.*, 2011).

O gráfico 4 representa a média dos pesos dos animais nas duas últimas semanas do período final do tratamento.

Gráfico 4 - Média do peso final dos animais controles e diabéticos no final do tratamento (semana 18)



Fonte: Do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,001$) pelo teste de Tukey. O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

De acordo com o Gráfico 4, a ingestão do óleo de baru, em todas as doses administradas nos animais saudáveis, não apresentou houve diferença estatística ($p=0,65$) entre os grupos tratados com o óleo e o grupo tratado com água (CA). Isso também é observado entre os animais diabéticos tratados com água e os animais que receberam o óleo ($p>0,05$). Contudo entre os animais saudáveis e diabéticos, observa que os grupos controles apresentaram o peso

estatisticamente maior que os animais diabéticos ($p < 0,001$). O tratamento com os hipoglicemiantes administrados separadamente ou em combinação com o óleo na dose de 1.5 g/kg não diferiram entre si, sendo semelhante aos animais do grupo DMA.

Em relação ao efeito da ingestão do óleo de baru no peso dos animais saudáveis nos dois protocolos adotados, os resultados de peso final indicam que nenhuma das doses do óleo de baru foi capaz de alterar a massa corporal destes animais. Considerando que o ácido oleico estimula a saciedade pela liberação GLP-1 e produção de oleoiletanolamida (OEA) (Clara; Langhans; Mansouri, 2016; Igarashi *et al.*, 2023), era esperado uma redução do peso nos animais controles tratados com o óleo. Semelhante ao observado por este estudo, o tratamento de animais saudáveis com um coquetel de ácido succínico e o ácido oleico também não apresentou queda no peso dos animais controles na sétima semana de tratamento (Lattibeaudiere; Alexander-Lindo, 2022).

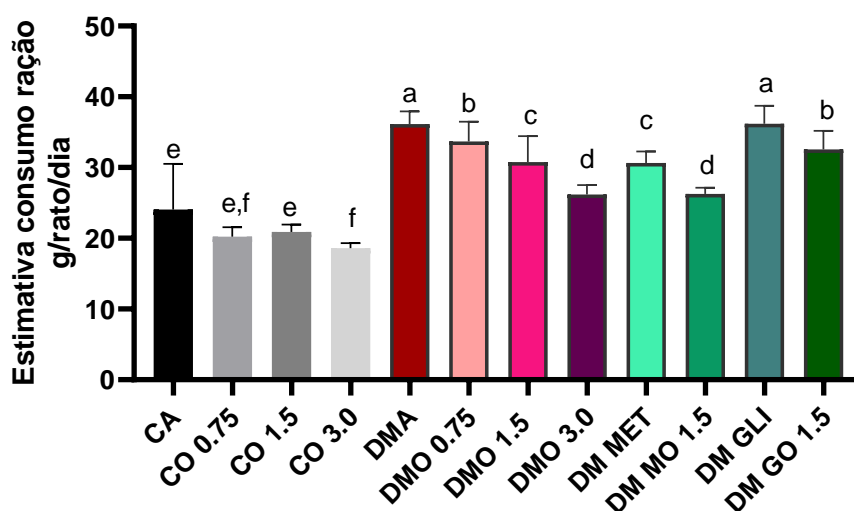
A administração do óleo de baru e dos fármacos utilizados neste estudo nos animais diabéticos, no protocolo de 60 e 90 dias, não apresentou um efeito protetor em relação à perda de peso ocasionada pela instalação do DM. O grupo diabético tratado com a maior dose do óleo apresentou uma tendência no ganho de massa corporal, mas sem significado estatístico. No trabalho de Abbas e Salem (2018), a metformina (200 mg/kg) também não alterou o peso dos animais diabéticos durante as 8 semanas de tratamento após a administração da estreptozotocina, sendo que o peso entre animais diabéticos com e sem tratamento permaneceu semelhante durante esse período. Conforme o resultado obtido pela metformina, o tratamento com glicazida (10mg/kg) em modelos animais com nefropatia diabética durante 8 semanas, também não alterou o peso corporal dos animais tratados em relação ao grupo diabético água, demonstrando que esses medicamentos não auxiliaram na prevenção da perda de peso em modelos de animais com DM (Safar; Abdelsalam, 2017).

Além do monitoramento do peso, o consumo de ração foi estimado com o controle do peso da ração ofertada. Durante o protocolo de indução do diabetes, foi ofertado aos animais do grupo diabético uma ração hiperlipídica caseira enquanto os animais do grupo controle receberam ração comercial. No início do

protocolo de indução, enquanto era ofertada a ração hiperlipídica, o consumo de ração desses foi em média $16,98 \pm 1,85$ gramas de ração/rato/dia, e do grupo controle foi $23,35 \pm 1,48$ gramas de ração/rato/dia, ($p < 0,001$).

O Gráfico 5 contém as médias da estimativa do consumo de ração de cada grupo durante o tratamento (período final de tratamento).

Gráfico 5 - Estimativa do consumo de ração em gramas/rato/dia dos animais diabéticos e controle nas três últimas semanas de tratamento.



Fonte: Do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,001$) pelo teste de Tukey. O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

Em relação ao período de tratamento dos animais, verifica-se que o consumo de ração não apresentou diferença entre os animais controles tratados com água e os grupos que receberam óleo nas doses de 0,75 g/kg e 1,5 g/kg ($p > 0,99$). Entretanto o grupo que recebeu a maior dose do óleo teve a média do consumo diário de ração estatisticamente menor que o grupo CA ($p = 0,0052$).

Os animais diabéticos (DMA) apresentaram o consumo maior de ração em relação aos animais saudáveis (CA), um sinal já esperado por se tratar de um sintoma clássico no diabetes, semelhante a outras observações com o controle de ração (Ahad *et al.*, 2014; Correia-Santos *et al.*, 2012). Os animais

tratados com a menor dose do óleo e com os hipoglicemiantes metformina e gliclazida isoladamente, apresentaram a estimativa de consumo diário de ração estatisticamente igual ao grupo DMA ($p=0,097$).

O grupo DMO 1,5 apresentou redução na ingestão de ração, sendo estatisticamente igual aos grupos DMO 3.0, DM MET, DMMO 1.5 e ao DMGO 1.5. O gráfico 6 evidencia que os grupos que apresentaram menor polifagia foram o DMO 3.0, DMMO 1.5 e DMGO 1.5.

Os modelos de indução do DM2 envolvem em sua maioria a oferta de uma dieta hipercalórica e hiperlipídica a fim de simular os mal hábitos alimentares presente no desenvolvimento natural do diabetes, em uma tentativa de levar à desregulação metabólica como a hiperinsulinemia, além do ganho de peso (Correia-Santos *et al.*, 2012; Skovsø, 2014). Durante o período de oferta da ração hiperlipídica, a estimativa do consumo médio de ração dos animais diabéticos foi menor que o controle, mas isso não afetou o peso corporal até a quarta semana (administração STZ), como pode ser observado no gráfico 3.

A dieta hiperlipídica, por possuir uma densidade calórica maior que a ração comercial, provocou uma maior saciedade, tendo em vista que os lipídeos possuem essa capacidade, pois estimulam a liberação de colecistoquina (Correia-Santos *et al.*, 2012). O menor consumo de ração também foi observado no estudo de Afane *et al.*, (2018), Correia Santos *et al.*, (2012) e Preciado-Saldaña *et al.*, (2023).

Durante o período de tratamento dos animais, a estimativa no consumo de ração entre os animais controles demonstrou que a maior dose do óleo de baru foi capaz de reduzir significativamente a ingestão de ração ($p=0,0052$). Esse dado sugere que na dose de 3,0 mg/kg, o óleo foi capaz de aumentar a saciedade, uma vez que a quantidade e o tipo de ácido graxo modulam a liberação de peptídeos e hormônios gastrointestinais (Camilleri, 2019). Como citado anteriormente, apesar de não ter sido observada a redução no peso ao comparar os controles que receberam água e óleo, a ação do óleo sobre a saciedade no grupo CO 3.0 foi presente nos períodos finais de tratamento. A densidade calórica da administração do óleo de baru somada ao consumo diário

de ração desses animais, podem ter se igualado aos demais animais controles, impedindo a redução do peso corpora no grupo CO 3.0.

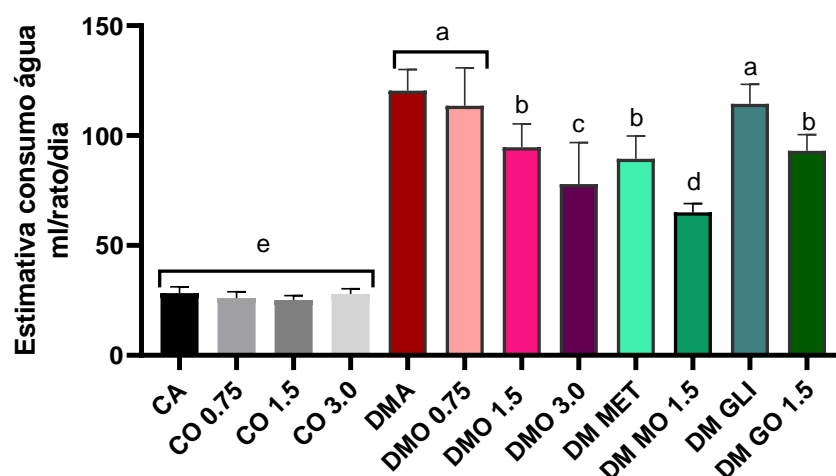
O efeito do óleo de baru na alimentação dos animais diabéticos apresenta uma tendência na diminuição da ingestão da ração de acordo com o aumento da dose do óleo, já que o grupo que recebeu óleo na dose de 1,5 g/kg e 3,0g/kg apresentaram menor consumo de ração quando comparado ao grupo DMA. No protocolo de 60 dias adotado por Cruz *et al.*, (2023), o efeito óleo de baru sobre a ingestão de ração começa a ser diferenciada do grupo DMA a partir da dose 1.0 g/kg.

O gráfico 13 evidencia que os grupos que apresentaram menor polifagia foram o DMO 3.0, DMMO 1.5 e DMGO 1.5, e quando estes foram comparados com os grupos tratados apenas com os hipoglicemiantes, verificou-se uma possível sinergia entre o óleo e os medicamentos testados. Esse efeito sinérgico também foi observado nos estudos de Sekar *et al.*, (2019) e Mourya *et al.*, (2018) que avaliaram a mangiferina e o ácido ursólico em combinação com a metformina e a gliclazida. No entanto, nesses estudos o tempo de tratamento foi inferior, sendo de 28 e 30 dias, respectivamente. No estudo de Khadke *et al.*, (2020), o tratamento de ratos wistar diabéticos durante 90 dias com o óleo de linhaça e de peixe, ambos associados com hipoglicemiantes oral, levou a redução no consumo de ração apenas ao grupo tratado com óleo de linhaça em combinação com a glibenclamida.

A estimativa do consumo médio de água antes da administração da STZ do grupo diabético (n= 64) foi de $32,17 \pm 1,22$ ml/rato/dia e o grupo controle (n=32) $36,88 \pm 4,40$ ml/rato/dia ($p=0,6145$). Após o protocolo de indução, a média da ingestão de água do grupo diabético foi de $96,7 \pm 18,81$ ml/rato/dia, contra o grupo controle com $26,87 \pm 1,02$ ml/rato/dia, evidenciando um aumento significativo ($p<0,0001$) no consumo de água.

O gráfico 6 apresenta a estimativa do consumo de água (ml/rato/dia) dos grupos controles e diabéticos no período final do tratamento.

Gráfico 6 - Estimativa do consumo de água (ml/rato/dia) pós indução, dos grupos controles e diabéticos nas últimas semanas do tratamento.



Fonte: Do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,001$) pelo teste de Tukey. O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

De acordo com os resultados apresentados acima, verifica-se que o grupo controle tratado com água apresentou consumo igual aos grupos controles tratados com as diferentes doses do óleo. Sendo que o consumo do grupo controle tratado com água não apresentou diferença estatística em relação aos animais diabéticos tratados com metformina e óleo na dose de 1,5g/kg ($p=0,06$).

O grupo DMA apresentou consumo diário de água de $117,4 \pm 8,59$ ml/rato/dia, enquanto os grupos DM 1,5 e DM 3,0 tiveram o consumo médio diário de água em $97,5 \pm 10,76$ ml/rato/dia e $79,38 \pm 17,81$ ml/rato/dia respectivamente, representando uma queda de 16,9% e 32,3% respectivamente, em relação ao grupo DMA. De acordo com esses dados pode-se deduzir que óleo de baru na dose de 1,5 g/kg e 3,0 g/kg, levou a redução da polidipsia em relação ao grupo tratado com 0,75 g/kg de óleo e ao grupo tratado com água ($p<0,001$).

Entre as três doses de óleo testadas, é importante observar a dose mediana, de 1,5g/kg foi igual estatisticamente aos grupos que receberam os

hipoglicemiantes isoladamente, indicando que para o consumo de água, esta dose atingiu o mesmo efeito da metformina e gliclazida.

O tratamento com o óleo na dose de 3,0g/kg reduziu o consumo de água em relação aos animais diabéticos sem tratamento, apresentando média estatisticamente menor ao grupo tratado apenas com metformina e gliclazida. Além disso ele também reduziu o consumo de água nos animais diabéticos comparados com o grupo DMO 1,5.

O grupo DM MO 1,5 apresentou consumo médio diário de água de $63,23 \pm 8,13$ ml/rato/dia, representando uma queda de 46,2% em relação ao grupo DMA. Já o grupo DM GO 1,5 reduziu o consumo de água nos animais diabéticos comparado com o grupo que recebeu apenas a gliclazida. A associação do óleo de baru com os hipoglicemiantes contribuiu significativamente para atenuação da polidipsia nos animais diabéticos, potencializando o efeito observado com a administração dos hipoglicemiantes, como também do óleo de maneira isolada.

Um sintoma comum presente no diabetes é a polidipsia, recorrente a um estado de hiper-osmolaridade que se dá em razão dos altos níveis de glicose circulante, que faz a água passar do meio intracelular para o extracelular, na tentativa de manter o equilíbrio osmótico (Lerco *et al.*, 2003).

No modelo de indução de resistência à insulina realizado por Preciado-Saldaña *et al.*, (2023), a ingestão de água entre controles e animais pré-diabético começa a diferir a partir do quarto dia após administração de STZ, onde os níveis glicêmicos começam a sofrer alterações. O tratamento de animais diabéticos com cúrcuma (300mg/kg) foi capaz de reduzir 62,2% o consumo diário de água, associado ao controle glicêmico obtido pelo tratamento após 12 semanas de indução (Tu *et al.*, 2019).

No estudo de Khadke *et al.*, (2020) que avaliou o efeito sinérgico de ácidos graxos ômega-3 e droga hipoglicemiante oral na normalização lipídica, o consumo de água e ração aumentou ($p < 0,001$) nos ratos diabéticos em relação aos ratos controles saudáveis, semelhante ao encontrado neste estudo. A associação do óleo de linhaça e o óleo de peixe com a glibenclamida levou a redução de 58,95% do consumo hídrico.

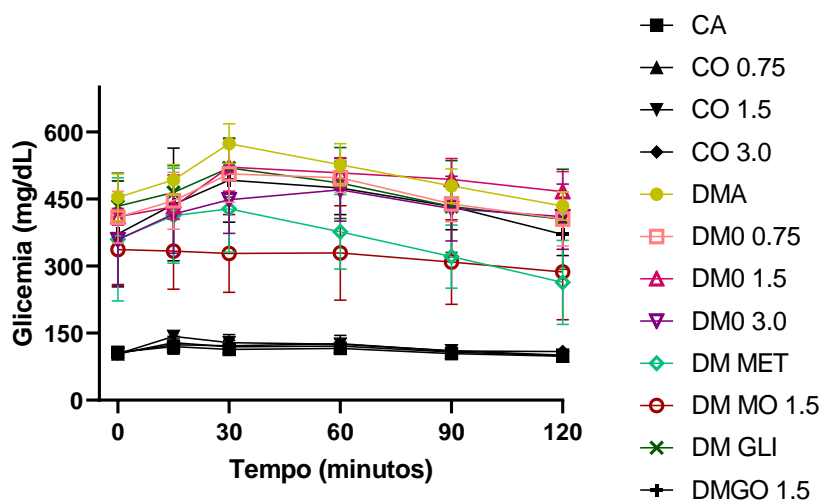
Sendo assim, nossos resultados sugerem que o efeito do óleo de baru sobre o consumo de água pode estar relacionado a uma possível ação hipoglicemiante do mesmo.

5.3.3 Teste de tolerância oral à glicose

O TTOG é um teste simples, amplamente utilizado na prática clínica para o diagnóstico de intolerância à glicose e diabetes tipo 2 (SBD, 2023). Este teste fornece indícios da progressão da intolerância à glicose a partir do monitoramento dos níveis plasmáticos de glicose após uma sobrecarga da mesma (Ernsberger, Koletsky, 2012).

O TTOG foi realizado a fim de verificar se o tratamento com o óleo de baru foi capaz de alterar a responsividade do organismo frente a administração de uma solução de glicose. Os gráficos abaixo demonstram a média glicêmica de cada ponto e a área sob a curva de cada grupo.

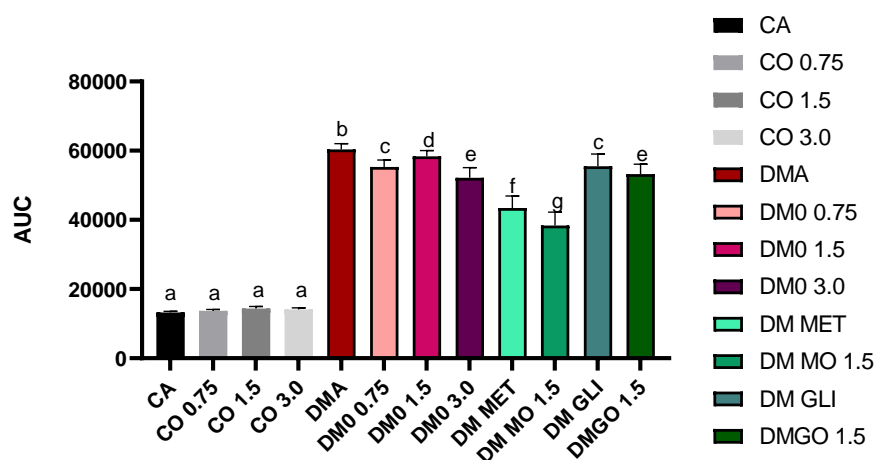
Gráfico 7 - Média ponto a ponto das curvas glicêmicas do TTOG



Fonte: Do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Médias glicêmicas \pm DP.

Gráfico 8 - Área sob a curva das curvas glicêmicas do TTOG



Fonte: Do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,001$) pelo teste de Tukey. O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

Ao analisar as médias glicêmicas dos animais controles, verifica-se que não houve diferença significativa entre os controles tratados com óleo e o grupo tratado com água, demonstrando que o tratamento do óleo de baru não alterou os níveis glicêmicos de animais saudáveis quando expostos a sobrecarga de glicose ($p > 0,09$).

Quanto aos animais diabéticos, todos os grupos apresentaram área sob a curva (AUC) superior ao grupo controle, semelhante ao encontrado no estudo de Fujimoto *et al.*, (2010), onde a AUC foi maior nos animais alimentados com a ração hiperlipídica, em relação aos animais que receberam dieta padrão (saudáveis). Além disso, Khadke *et al.*, (2020) realizaram o teste de tolerância à glicose intraperitoneal (IPGTT) e encontraram que os níveis de glicose foram superiores nos animais diabéticos quando comparados aos animais saudáveis, assim como neste estudo. No modelo de resistência à insulina induzido por Preciado-Saldaña *et al.*, (2023), os picos glicêmicos também ocorreram 30

minutos após a sobrecarga de glicose, e a AUC do grupo induzido ao DM2 foi semelhante aos grupos diabéticos obtidos neste trabalho.

Todos os grupos diabéticos tratados com óleo de baru apresentaram uma queda na área sob a curva em relação ao grupo DMA (sem tratamento) que apresentou AUC de 60.385 ± 1.655 ($p < 0,001$). Além disso, verificou-se que os animais tratados com óleo na dose de 3g/Kg de peso corporal apresentaram menor área sob a curva (52138 ± 2966), se diferenciando significativamente dos animais diabéticos tratados com óleo nas doses de 0,75g/kg e 1,5g/kg que apresentaram área sob a curva de 55.320 ± 1.950 e 58.347 ± 1.699 respectivamente.

Vale destacar que, diferente dos resultados do consumo de água e ração, onde houve uma proporção no aumento da dose e conseqüentemente, elevação dos efeitos do óleo sobre os parâmetros citados, no TTOG não foi observado o melhor efeito na curva glicêmica dos animais tratados com 1,5 g/kg em relação aos animais que receberam 0,75 g/kg do óleo de baru, já que o grupo DMO 1,5 g/kg obteve a AUC maior que o grupo DMO 0,75.

A implementação do óleo de linhaça na dieta de ratos diabéticos durante 16 semanas foi capaz de diminuir a AUC de glicose em 64% em comparação aos animais diabéticos que receberam apenas uma dieta hiperlipídica rico em gordura saturada. Os efeitos dos ácidos graxos insaturados do óleo da linhaça sobre a homeostase da glicose foram associados com a redução de citocinas inflamatórias e com a ativação de GPR 120 (receptor acoplado à proteína G sensível à lipídeos) e subsequente liberação do GLP-1 (Moura-Assis *et al.*, 2018).

A metformina de forma isolada apresentou AUC de 43.410 ± 3.519 , esse valor corresponde a uma queda de 28,11% em relação ao grupo DMA. Além disso, esse hipoglicemiante apresentou uma AUC menor quando comparado aos grupos tratados com óleo nas diferentes doses ($p < 0,001$). Enquanto a gliclazida administrada isoladamente apresentou AUC estatisticamente igual ao grupo diabético tratado com óleo na dose de 0,75g/kg ($p > 0,900$).

Considerando essas diferenças na AUC dos animais tratados somente com o óleo, há indícios do efeito benéfico do óleo de baru, porém, não é possível afirmar que essa melhor responsividade à sobrecarga de glicose seja suficiente

para atingir o controle glicêmico capaz de reduzir os danos causados pela hiperglicemia. Dessa forma a associação do óleo com os hipoglicemiantes é interessante, visando o somatório dos efeitos de cada substância.

Quanto à administração da metformina associada ao óleo na dose de 1,5 g/kg, verificou-se uma AUC de 38.355 ± 3.865 , que representa uma queda de 36,48% em relação ao grupo DMA. Além disso, sua associação com o óleo teve melhor efeito na AUC do TTOG em relação a todos os outros grupos de animais diabéticos, indicando um possível efeito sinérgico entre o óleo e a metformina. Já a associação do óleo de baru com a gliclazida, foi capaz de causar uma redução significativa na AUC, sendo estatisticamente igual ao grupo tratado com óleo na dose de 3,0g/kg.

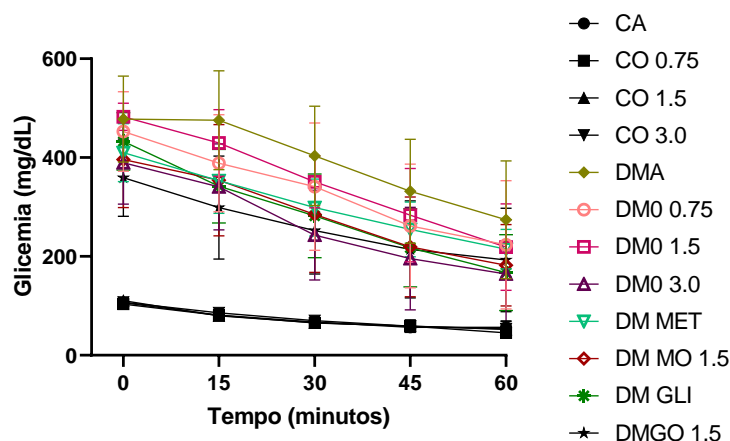
Os dados apresentados até aqui, demonstram um indício no efeito hipoglicemiante do óleo de baru, porém esse efeito é mais bem observado nos grupos onde houve a coadministração dos antidiabéticos com o óleo. O grupo DM MO 1.5, apresentou a maior queda na AUC em relação aos demais grupos, demonstrando uma possível potencialização na ação da metformina quando administrada em conjunto com o óleo na dose de 1.5 g/kg.

5.3.4 Teste de tolerância à insulina

O TTI se trata de um método para avaliação da sensibilidade à insulina por meio da diminuição dos níveis de glicose após a administração de insulina. A AUC obtida a partir da curva glicêmica é usada como indicador dessa sensibilidade, assim, quanto maior a AUC, menor é a capacidade do tecido responder à insulina (Antunes *et al.*, 2016).

O TTI foi realizado a fim de avaliar a responsividade dos níveis glicêmicos dos animais frente a administração de insulina. Os gráficos 9 e 10 representam os resultados da curva glicêmica e área sob a curva do TTI dos grupos experimentais.

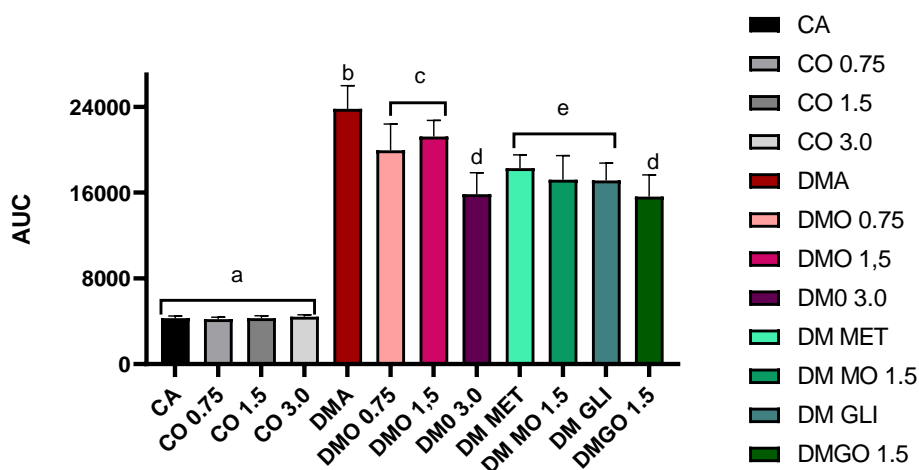
Gráfico 9 - Média ponto a ponto das curvas glicêmicas do TTI



Fonte: Do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Médias glicêmicas \pm DP.

Gráfico 10 - Área sob a curva das curvas glicêmicas dos grupos experimentais



Fonte: Do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,001$) pelo teste de Tukey. O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

No gráfico 9, tem-se representado as curvas do TTI, com cada ponto representando as médias dos valores glicêmicos em cada tempo, já no gráfico 18 tem-se as áreas sob a curva de cada grupo. Nota-se que não houve diferença significativa entre as curvas do grupo controle ($p>0,05$). No entanto, ao comparar as curvas dos animais diabéticos, é evidente a diferença significativa entre os animais tratados com o óleo e o grupo tratado com água ($p<0,001$). Como observado nos estudos de (Moura-Assis *et al.*, 2018) todos os grupos diabéticos apresentaram menor capacidade tecidual em responder à insulina quando comparados ao grupo controle, visto que, os animais diabéticos tiveram valores de AUC maiores, característico do quadro de resistência à insulina no DM2.

Com base nos resultados da AUC, verifica-se que os grupos que receberam o óleo de baru nas três distintas doses, apresentaram AUC menores que o grupo DMA, sugerindo que o óleo pode ser capaz de aumentar a sensibilidade à insulina nos tecidos dos animais diabéticos, ou seja, a administração do óleo contribuiu para que os animais tratados (DMO 0.75, DMO 1.5 e DMO 3.0) apresentassem maior capacidade de responder à insulina quando comparados aos animais diabéticos tratados com água.

O DMO 0,75 e DMO1.5 foram estatisticamente iguais, apresentando AUC de 19.942 ± 2.455 e 21.219 ± 1.520 respectivamente. Já o DMO 3.0 foi o grupo com menor AUC em relação os grupos tratados com óleo, representando uma queda de 33,45% da AUC em relação ao DMA ($p<0,001$). Além disso, o grupo DMO3,0 foi estatisticamente igual ao grupo DMGO 1.5 ($p>0.99$), demonstrando que para o TTI, a maior dose do óleo foi capaz de resultar no mesmo efeito obtido pela combinação do óleo em média dosagem com a gliclazida.

Em relação aos grupos que receberam metformina, nota-se que não houve diferença estatística entre os animais que receberam este fármaco isolado e associado com o óleo, diferente do que foi observado no TTOG ($p= 0,2528$). Além disso, ambos grupos também apresentaram AUC estatisticamente igual ao grupo DM GLI ($p>0,08$), demonstrando que ambos os medicamentos apresentaram o mesmo efeito em relação a responsividade à insulina que foi administrada. Assim, os grupos DM MET, DM MO1.5 e DM GLI, apresentaram menor AUC quando comparados com os DMO 0.75 e DMO 1.5, entretanto, obtiveram AUC maior que os grupos DMO 3.0 e DMGO 1.5.

A metformina é o agente antidiabético oral mais amplamente prescrito no tratamento do DM2, tendo como principal efeito a redução da produção hepática de glicose (Meng *et al.*, 2015). Semelhante aos nossos resultados obtidos no TTI e TTOG, o estudo de Grycel *et al.*, (2019) o tratamento com a metformina na dose de 300 mg/kg durante 8 semanas, levou a redução significativa dos índices glicêmicos nos testes de TTOG e TTI nos animais com síndrome metabólica. De acordo com os autores, a metformina foi capaz de restaurar os níveis de insulina dos animais diabéticos e com isso aumentar a tolerância a glicose e à insulina.

De acordo com as curvas glicêmicas observadas do gráfico 12, verifica-se uma maior distância dos pontos glicêmicos durante a realização do TTI. Na AUC, fica evidente a ação dos hipoglicemiantes no teste, em que os grupos DM MET e DM GLI, reduziram significativamente a AUC em relação ao grupo DMA, como também ao Grupo DMO 3.0 ($p < 0.001$).

Vale ressaltar que diferente do observado no TTOG, em que a coadministração do óleo com a metformina evidenciou o efeito sobre as médias glicêmicas, no TII é evidenciado o sinergismo do óleo com a gliclazida. A metformina e a gliclazida possuem mecanismos de ações diferentes, o que contribuiu para a diferença nos resultados obtidos no TTOG e TTI. Enquanto a metformina melhora a sensibilidade periférica à insulina pelo aumento da captação de glicose (Horakova *et al.*, 2019), a gliclazida estimula a secreção de insulina pelas células β pancreáticas, através da abertura dos canais de cálcio (Mafra, 2019).

O trabalho de Cruz *et al.*, (2023) avaliou o poder insulínico do óleo de baru em modelos de animais com DM2 através da imunomarcagem de insulina no pâncreas desses animais. Os autores demonstraram que o tratamento com o óleo de baru na dose de 1.5 g/kg durante 60 dias, aumentou as áreas marcadas com insulina em relação aos animais sem tratamento, indicando que o óleo auxiliou na liberação deste hormônio.

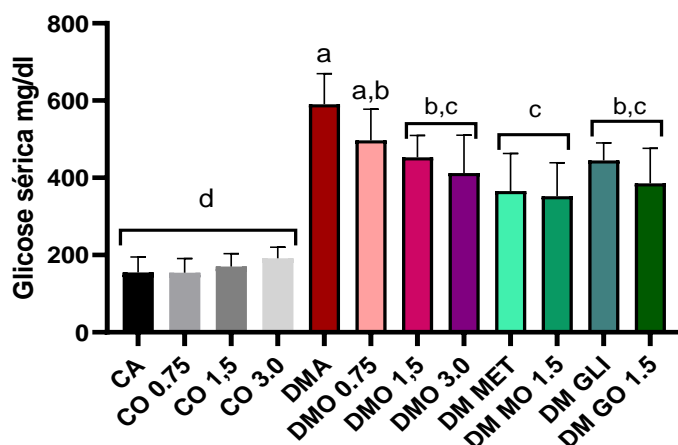
Considerando o mecanismo de ação da gliclazida e a diferença estatística na AUC entre os grupos DM GLI e DMGO 1.5 no TTI, pode-se afirmar que o óleo de baru intensificou ainda mais a liberação de insulina, pelas células beta, junto com a gliclazida, o que contribuiu para maior redução da glicemia do grupo DMGO 1.5 no TTI. Esses resultados reforçam que a ação do óleo de baru no

controle glicêmico de animais diabéticos está relacionada à indução de liberação de insulina.

5.3.5 Avaliação do tratamento do óleo de baru / fármaco sobre os marcadores bioquímicos

No presente estudo foi avaliado se o tratamento do óleo de baru era capaz de alterar os níveis glicêmicos e o índice de glicação das proteínas dos animais diabéticos. O gráfico 11 apresenta os níveis de glicose sérica no soro dos animais.

Gráfico 11 - Glicose sérica dos animais após 8h de jejum



Fonte: Do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Resultados apresentados em Média \pm DP **Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,001$). O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

Como esperado, a glicemia dos animais dos grupos diabéticos foi significativamente maior em relação aos animais dos grupos controle ($p < 0,001$). O Grupo CA apresentou média glicêmica de $154,9 \pm 15,18$ mg/dl, enquanto o DMA teve $590,0 \pm 79,82$ mg/dl. Nos animais controles, é possível notar uma tendência na elevação da glicemia em jejum, de acordo com o aumento da dose do óleo administrada, mas sem significado estatístico.

Em relação aos animais diabéticos, não houve diferença significativa entre os animais tratados com a menor dose do óleo e os animais tratados com água ($p= 0,1156$). O grupo DMO 0,75 apresenta uma tendência na diminuição dos níveis glicêmicos, já que ele apresentou semelhança com os animais que receberam dosagens maiores do óleo de baru, como também dos animais tratados com gliclazida.

Os valores de glicemia em jejum do grupo DMA foram notavelmente aumentados, fator que difere da característica da resistência à insulina onde os níveis de glicêmicos são na maioria das vezes, menores. Os trabalhos que induziram o modelo de DM2 usando a STZ na dose de 35 mg/kg associada a dieta hiperlipídica apresentam em média o nível de glicose em jejum na faixa de 300 a 500mg/dl (Correia-Santos *et al.*, 2012; Guex *et al.*, 2019; Ni *et al.*, 2019; Preciado-Saldaña *et al.*, 2023). Porém, no trabalho de Khadke *et al.*, (2020), usando a mesma dose de STZ, ao longo de 90 dias de experimentação, os animais diabéticos sem tratamento apresentaram os níveis de glicose entre 450 e 600 mg/dL, corroborando com os resultados observados no presente trabalho.

A redução nos níveis séricos de glicose começa a ser observada a partir do grupo DMO 1.5, que apresentou uma redução de 23,2% na glicose sérica comparado com o DMA. O efeito do óleo de baru nas doses de 1,5 g/kg e de 3,0 g/kg foi estatisticamente igual ($p=0,9938$) para o índice glicêmico, demonstrando que as duas doses apresentaram um efeito hipoglicemiante. Ambos os grupos (DMO 1.5 e DMO 3.0) foram semelhantes aos grupos que receberam os antidiabéticos orais associados ou não com a administração do óleo de baru.

Considerando que os ácidos graxos insaturados presentes no óleo de baru possam estimular a liberação de GLP-1 (Hou *et al.*, 2018; Ripken *et al.*, 2014) é possível sugerir que a redução da glicemia em jejum dos animais tratados com o óleo possa estar relacionada à estimulação de GLP-1. Entretanto, vale ressaltar que por se tratar de uma mistura rica em diferentes tipos de ácidos graxos e de outros compostos, não podemos descartar a possibilidade de envolvimento de outros mecanismos.

O uso de óleo obtido de fontes vegetais no estudo do perfil glicêmico de animais diabéticos ainda é raro na literatura, porém o trabalho que aborda o uso do óleo de linhaça em modelos de DM2 mostra que a partir da quinta semana de

tratamento é possível verificar o controle dos níveis glicêmicos em animais tratados (Zhu *et al.*, 2020). Por outro lado, o tratamento com óleo de peixe e linhaça realizado por Khadke *et al.*, (2020) durante 40 dias em ratos diabéticos, não levou a redução da glicemia em jejum. Semelhante ao observado no trabalho de Cruz *et al.*, (2023), em que o óleo de baru também não foi capaz de reduzir os níveis de glicose sérica em relação ao grupo DMA. É importante destacar que as diferenças na composição dos óleos avaliados, na dose e no tempo de tratamento são fatores importante que devem ser considerados.

A proporção dietética do ácido alfa linoleico (ALA) e do ácido linoleico (AL) influenciam na captação e utilização da glicose via sinalização da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK). A elevada razão de ALA / AL melhora os níveis proteína de p-AMPK/ T -AMPK no músculo, envolvidos com a captação de glicose, além de aumentar os níveis de mRNA de GLUT1, transportador de glicose não dependente de insulina (Yao *et al.*, 2023). Embora o tratamento com óleo de linhaça no trabalho de Zhu *et al.*, (2020) tenha apresentado maior proporção do ALA em relação ao óleo de baru, no presente estudo foram obtidos resultados semelhantes em relação à glicemia, sugerindo que o maior tempo de tratamento com o óleo de baru (protocolo de 90 dias) teve influência positiva nos resultados, já que no protocolo de 60 dias, este efeito não foi observado (Cruz *et al.*, 2023).

A incorporação de amêndoas e amendoins na dieta baixa em carboidratos para pacientes diabéticos durante 3 meses, levou a reduções na glicose em jejum e glicose pós-prandial, efeito correlacionado com a composição de gorduras e baixo índice glicêmico desses alimentos. O teor de ácidos graxos e das fibras solúveis presente nas amêndoas e no amendoim foi associado com a capacidade da taxa de esvaziamento gástrico, diminuição da absorção de carboidratos e de secreção de GLP-1 (Hou *et al.*, 2018).

No presente estudo, o tratamento com a metformina nos grupos DM MET e DMMO 1.5 resultou em médias estatisticamente iguais para os níveis de glicose (365.4 ± 97.70 mg/dl e 352.2 ± 86.51 mg/dl), indicando que para este marcador, não foi possível observar o efeito de sinergismo presente no TTOG. Apesar do grupo DMMO 1.5 ser semelhante aos grupos que receberam o óleo de forma isolada, ao comparar todos os grupos diabéticos, nota-se a tendência

na diminuição das médias dos níveis de glicose, sendo que a associação da metformina com o óleo de baru e o grupo DM MET demonstraram os menores níveis de glicose.

A diferença nas médias da glicose do grupo DM MO 1.5 e DMA é de 237.8 mg/dL, representa uma diminuição de 40,3%, o dobro da redução observada no trabalho de Adeyemi *et al.*, (2020), que obtiveram uma queda de 18.87% na média da glicemia em jejum dos animais tratados com metformina (180 mg/kg) associada a ácido graxos ômega 3 (200mg/kg) em relação aos animais sem tratamento.

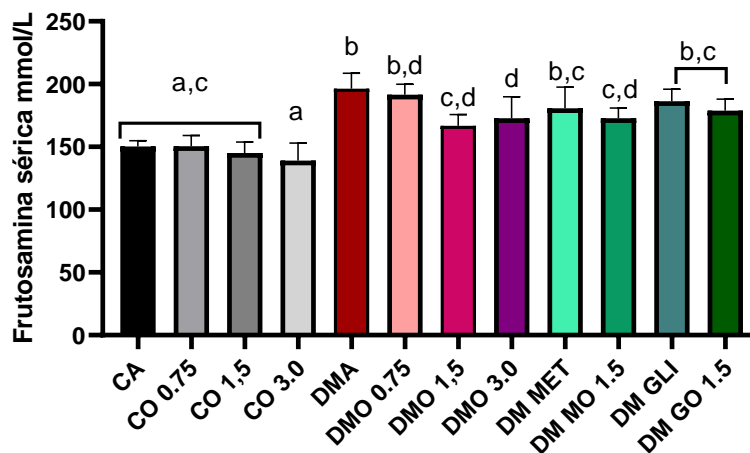
Semelhante aos grupos tratados com metformina, os animais que receberam gliclazida, DM GLI e DMGO 1.5, apresentaram igualdade entre si, como também foram estatisticamente iguais aos grupos DM MET e DMMO 1.5 ($p > 0,90$). Novamente o sinergismo do óleo com a gliclazida não tem significado estatístico nos níveis de glicose, porém observa-se uma tendência na redução deste marcador no grupo DMGO 1.5, já que as médias glicêmicas foram de $445,0 \pm 45,34$ e $385,7 \pm 90,57$, respectivamente.

Em um estudo com a associação da gliclazida (10 mg/kg) e quercetina no tratamento de animais diabéticos foi observada a redução acentuada da glicose, sendo este resultado atribuído aos efeitos intra e extra pancreáticos da gliclazida, como a liberação de insulina e supressão da gliconeogênese hepática, além do aumento da sensibilidade à insulina ocasionado pela quercetina (Abdelkader *et al.*, 2020).

Além da determinação da glicose sérica em jejum, que reflete o controle dos níveis de glicose a curto prazo, no presente trabalho, foram avaliados também os níveis séricos de frutossaminas. As frutossaminas têm um papel importante no monitoramento glicêmico a médio prazo, pois refletem o nível de glicação proteica no período de 20 dias antecedentes à coleta (Salles *et al.*, 2020) .

O gráfico 12 apresenta os níveis de frutossamina no soro dos animais após a eutanásia.

Gráfico 12 - Níveis de frutossamina no soro dos animais após a eutanásia



Fonte: Do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Resultados apresentados em Média \pm DP **Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,001$). O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

Os níveis de frutossamina entre os animais saudáveis foram estatisticamente iguais para todos os grupos, tratado e não tratado com o óleo, demonstrando que a administração do óleo de baru não foi capaz alterar os níveis das proteínas glicadas ($p > 0,900$), o que era esperado já que não houve diferença na glicemia dos animais pertencentes a estes grupos. Já os animais diabéticos, do grupo DMA, apresentaram um aumento de 21.75% dos níveis de frutossamina em relação ao CA ($p < 0,01$), demonstrando que o período de 90 dias foi capaz de reduzir as glicações proteicas nos animais diabéticos.

O tratamento dos animais com o óleo de baru foi capaz de reduzir os níveis de frutossamina somente no grupo DMO 1.5, que apresentou uma média de 166.8 ± 8.95 mmol/L, representando uma queda de 13.30%. O grupo DMO 3.0 também reduziu a frutossamina dos animais, sendo estatisticamente igual ao DMO 1.5 ($p = 0,998$). Esses dados corroboram com o que já havia sido observado no TTOG, TTI e na glicose sérica, onde as doses de 1.5 g/kg e 3.0 g/kg demonstraram apresentar um efeito hipoglicemiante. Já o grupo DMO 0.75

apresentou apenas uma tendência em reduzir os níveis de frutossamina, já que foi estatisticamente igual ao DMA, ao DMO 3,0 e ao DMMO1.5.

O tratamento com os antidiabéticos de forma isolada (DM MET e DM GLI) e o grupo DMGO 1.5 não apresentaram diferença estatística com o DMA, porém estes grupos foram semelhantes ao DMO 1.5 ($p > 0,700$), indicando uma tendência na redução deste marcador. Vale destacar que no grupo tratado com metformina e óleo de baru, houve redução no nível de glicação proteica em relação ao grupo DMA, diferente dos animais que receberam apenas metformina.

A metformina é um fármaco de primeira linha escolhido para o tratamento de DM2, possuindo diversos mecanismos para sua ação antidiabética. Além da supressão da produção de glicose hepática, é descrito que a metformina é capaz de melhorar a sensibilidade periférica à insulina pelo aumento da captação de glicose (Horakova *et al.*, 2019). Por meio da ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) promovido pela metformina, ocorre um aumento na fusão, acoplamento e translocação de GLUT4 para as membranas. Este processo pode ser afetado pelo conteúdo de colesterol e fluidez da membrana, assim, as alterações na composição da membrana plasmática podem aumentar a captação de GLUT4 (Kristensen *et al.*, 2014).

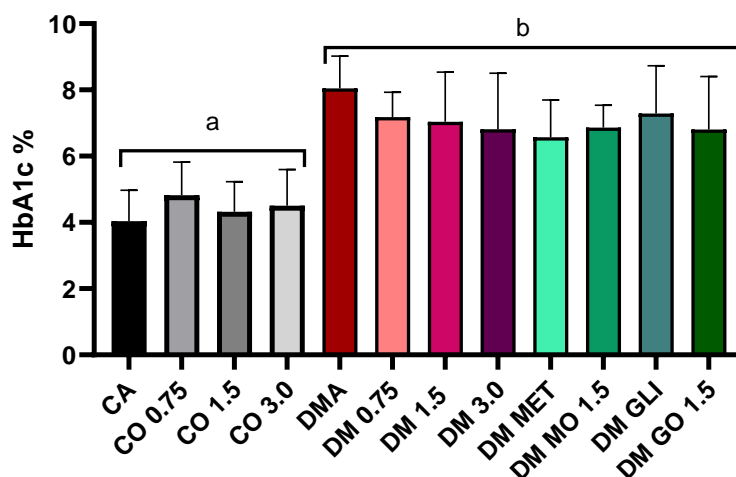
Os AGL da dieta alteram o risco de resistência à insulina e do DM2 considerando que uma maior insaturação dos ácidos graxos na membrana celular contribui para certas propriedades físicas, como a “plasticidade”, facilitando o movimento do receptor de glicose para a superfície da célula (Kien, 2009). Dessa forma, os efeitos observados pela associação da metformina com o óleo de baru no TTOG e marcadores glicêmicos, podem estar correlacionados à ação do óleo sobre a composição da membrana plasmática, o que pode potencializar o efeito da metformina na captação de glicose.

Semelhante a frutossamina que avalia o controle glicêmico a médio prazo, a hemoglobina glicada (HbA1c) é um ótimo marcador para avaliar o controle a longo prazo, tendo em vista o tempo de meia vida da hemácia. Este marcador tem um importante papel na monitorização terapêutica, pois tem como função avaliar a presença de glicose ligada a hemoglobina na corrente sanguínea no

período de 3 a 4 meses em humanos (SBD, 2023). O gráfico 15 apresenta a média dos níveis de HbA1c no final do tratamento.

O gráfico 13 apresenta a média dos níveis de HbA1c no final do tratamento.

Gráfico 13 - Níveis de Hemoglobina glicada (%) no sangue total dos animais



Fonte: Do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Resultados apresentados em Média \pm DP **Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,001$). O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

Conforme esperado, a porcentagem de hemoglobina glicada nos grupos dos animais saudáveis foi menor quando comparado aos grupos de animais diabéticos ($p < 0,001$). Contudo, os resultados demonstram que os grupos dos animais diabéticos tratados com hipoglicemiantes combinados com óleo ou isolados e o grupo diabético tratado com água são estatisticamente iguais ($p = 0,9784$).

Em um estudo de ensaio randomizado, a dieta de pacientes diabéticos foi suplementada com amêndoas e amendoim durante 4 meses. Este trabalho demonstrou que a dieta foi capaz de reduzir a glicemia pós prandial e a glicose em jejum, contudo a HbA1c apresentou uma redução de apenas 0,48% no

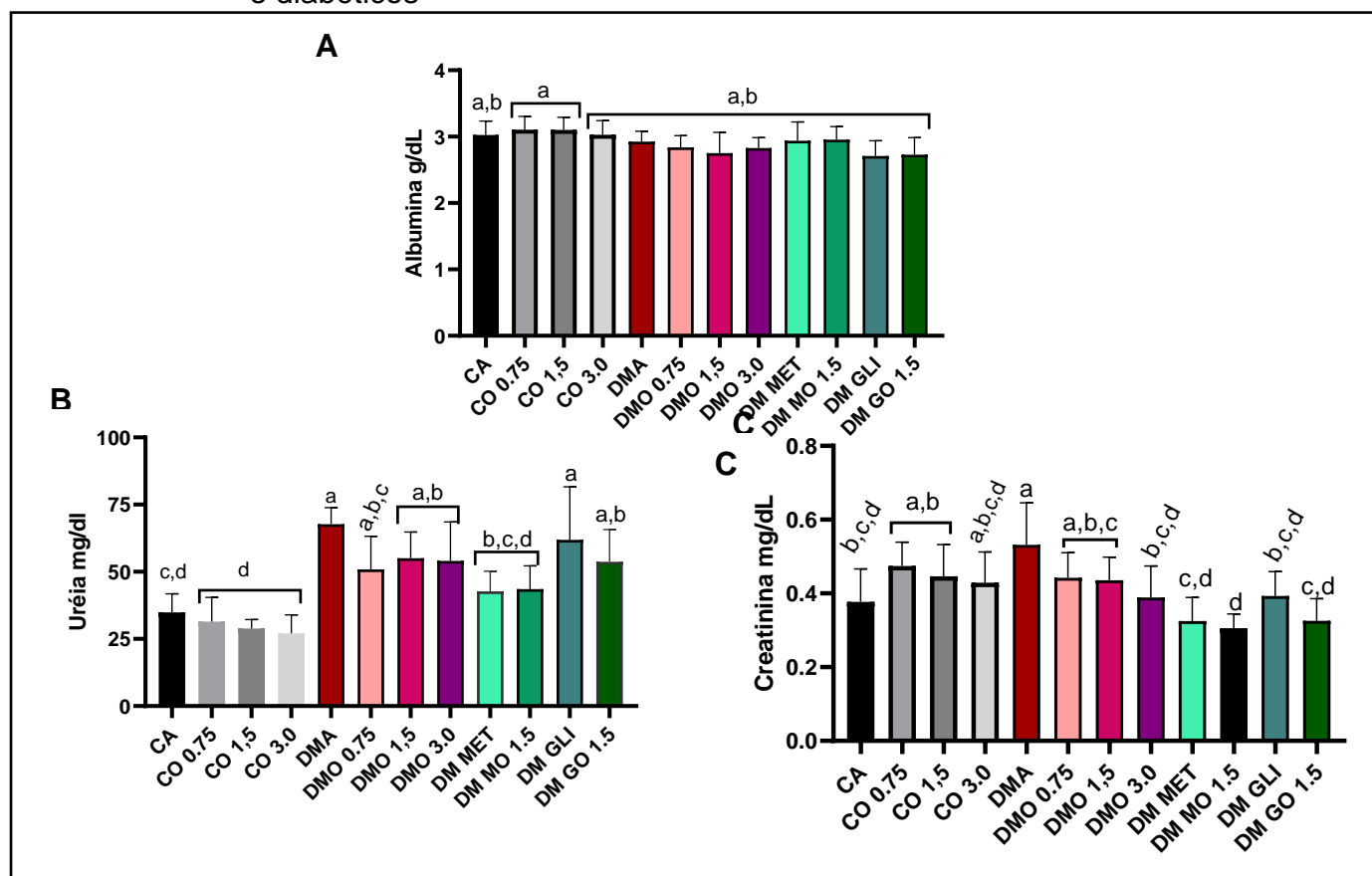
terceiro mês, devido ao curto período de acompanhamento (Hou *et al.*, 2018). Esses registros se assemelham ao que foi observado com o óleo de baru, já que o mesmo demonstrou reduzir os índices glicêmicos na glicose em jejum, no TTOG e TTI. O controle dos níveis da HbA1c, em animais diabéticos tratados com associação de insulina e metformina (100mg/kg) foi observado apenas na 16ª semana após a indução (de Oliveira *et al.*, 2017), demonstrando que até para medicamentos que são referência no tratamento do diabetes, é necessário o monitoramento de um período maior para redução dos níveis de HbA1c após a administração de STZ em ratos wistar.

A avaliação de dois modelos de indução de DM2 em camundongos com oferta de dieta hiperlipídica associada ou não com a administração de STZ levou a alteração dos níveis de HbA1c somente desses animais (Glastras *et al.*, 2016).

O tempo de meia vida das hemácias de ratos wistar ainda não está totalmente elucidado, sendo citado na literatura uma meia vida em torno de 60-70 dias (Derelanko, 1987). Em nosso estudo, o tempo de indução e instalação do DM2 pode ter contribuído para níveis elevados de HbA1C, já que o efeito do uso crônico do óleo de baru, pode não ter compreendido todo o período de renovação das hemácias. É conhecido que em humanos, cerca de 50% das hemoglobinas detectada no sangue é formada no mês precedente à coleta da amostra, sendo que a outra metade é composta por 25% de hemoglobinas formada no terceiro mês antes do exame (SBD, 2023). Assim os resultados obtidos com a determinação da glicose sérica, frutossamina e HbA1c sugerem que na fase inicial do tratamento, o óleo de baru poderia não estar apresentado efeitos significativos sobre o controle glicêmico dos animais, o que pode ser confirmado pelos resultados no protocolo de 60 dias (Cruz *et al.*, 2023). Assim, o efeito hipoglicemiante significativo pode ter sido alcançado somente no período final do tratamento com o óleo.

Diversos estudos buscam o controle glicêmico a fim de reduzir os danos causados pela hiperglicemia em órgãos e tecidos, principalmente das alterações renais (Rao, *et al.*, 2019; Sharma, *et al.*, 2017). A fim de avaliar a função renal dos ratos diabéticos, foram realizadas as determinações séricas de albumina, ureia e creatinina no final do tratamento. A Figura 10 apresenta os gráficos para os respectivos marcadores da função renal.

Figura 10 - Marcadores bioquímicos da função renal no soro de animais controles e diabéticos



Fonte: Do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Resultados apresentados em Média \pm DP **Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,001$). O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

De acordo com a figura 10 A foi observado que a albumina foi estatisticamente igual para todos os animais controles, assim como também não houve diferença entre do grupo CA e os demais grupos com animais diabéticos ($p > 0,05$). A albumina é a proteína mais abundante no plasma, sintetizada no fígado, responsável por transportar substâncias como ácidos graxos, hormônios e bilirrubina. Sua concentração pode ser afetada pela função hepática e pelas proteínas da dieta. Na presença de lesões glomerulares e tubulares graves, ocorre um aumento na filtração glomerular das proteínas plasmáticas, com

elevação da eliminação da albumina na urina (Dusse *et al.*, 2017; Laddha; Kulkarni, 2020).

Em relação aos níveis de ureia, na Figura 10 B, verifica-se que entre os animais saudáveis tratados e não tratados com o óleo, não houve diferença significativa, mas quando comparados com os animais do grupo DMA, os níveis de ureia aumentaram em cerca de 51,5% em comparação com o CA ($p < 0.001$). O tratamento isolado com o óleo nas diferentes doses analisadas, não foi capaz de causar uma queda significativa na ureia em relação ao DMA, no entanto, foi observada uma tendência na diminuição dos níveis de ureia plasmática, já que estes resultados foram estatisticamente iguais aos observados no soro dos animais pertencentes aos grupos DM MET e DMMO 1.5 ($p > 0,80$).

O tratamento com a gliclazida não foi capaz de reduzir a ureia nos animais diabéticos ($p = 0,998$), porém a associação deste medicamento com o óleo de baru foi capaz de atenuar os níveis de ureia plasmática nos animais diabéticos, apresentando o mesmo efeito dos grupos que receberam o óleo de baru. Em contrapartida, ambos grupos que receberam metformina, DM MET e DMMO 1.5, foram capazes de reduzir a ureia plasmática nos animais diabético em 36.9% e 30.6 %, respectivamente.

A ureia é produzida no fígado, a partir do catabolismo de aminoácidos, sendo influenciada pela função hepática e nível nutricional. Na existência de lesões renais, ocorre uma elevação nos níveis séricos de ureia, porém, fatores extra-renais também podem levar ao aumento dos níveis séricos de ureia (Dusse *et al.*, 2017).

Neste sentido, vale lembrar que o catabolismo proteico elevado no diabetes mellitus também poderia contribuir para o aumento da síntese de ureia. Entretanto, comparado com outros trabalhos que utilizaram ratos wistar diabéticos e avaliaram a função renal dos mesmos, nota-se que os níveis de ureia ficam acima de 60 mg/dL na presença da lesão dos rins (Pal; Sinha; Sil, 2014b; Sales *et al.*, 2011).

Com relação aos níveis de creatinina, entre os animais saudáveis com e sem administração do óleo de baru, não houve diferença estatística ($p > 0.10$). Em contrapartida, entre os animais do grupo CA e DMA, houve diferença estatística na dosagem de creatinina ($p = 0,0151$). Dessa forma, a alteração deste

marcador somada com os níveis de ureia aponta para uma alteração da função renal. O grupo DMA apresentou em média 0,53 mg/dL, e o CA teve 0,37 mg/dL, apresentando um aumento de 30% da creatinina sérica.

Ahad *et al.*, (2014) induziram o diabetes em ratos wistar com dieta hiperlipídica e administração de STZ, avaliando marcadores renais em quatro períodos distintos, 4°, 8°, 12° e 16° semana. Os autores relataram que somente na 8° semana houve diferença estatística para ureia e creatinina entre grupos controle e diabético, e que os marcadores continuaram a se elevar nas semanas seguintes. No presente estudo, os níveis de ureia e creatinina foram avaliados na 12ª semana após a indução, sendo possível observar a alteração de ambos os marcadores entre os animais saudáveis e diabéticos. Já no protocolo de 60 dias adotado no estudo piloto, na 8° semana após a administração de STZ, a creatinina ainda permaneceu em níveis semelhantes aos animais saudáveis (Cruz *et al.*, 2023).

A administração do óleo de baru nos animais diabéticos levou a atenuação do aumento da creatinina sérica dos animais diabéticos, tendo em vista que é possível verificar uma diminuição gradual deste marcador, de acordo com o aumento da dose do óleo de baru. Os grupos tratados com os hipoglicemiantes, DM MET, DM MO1.5 e DMGO 1.5 apresentaram uma queda significativa nos níveis de creatinina, sendo iguais ao grupo CA. Apenas o grupo DMO 3.0 apresentou os níveis de ureia estatisticamente menores que o grupo DMA, que foi estatisticamente igual aos grupos dos animais saudáveis e ao DM GLI. Novamente, esses resultados dos marcadores da função renal, demonstram o efeito sinérgico do óleo de baru com a metformina e gliclazida.

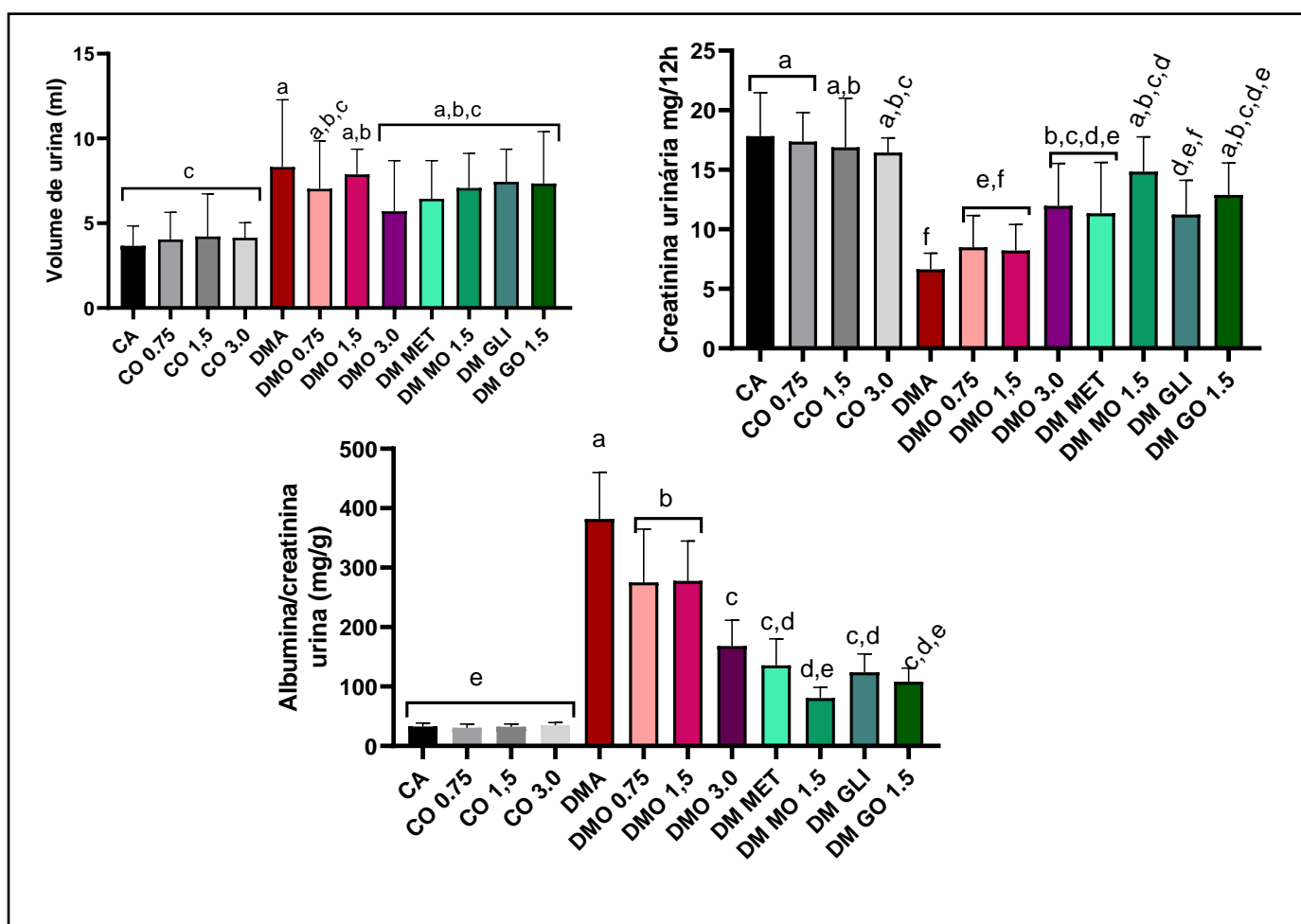
O tratamento de ratos wistar diabéticos com óleo de peixe e linhaça associado com glibenclamida também levou a redução dos níveis séricos de creatinina e ureia, se igualando com o grupo tratado somente com o hipoglicemiante (Khadke *et al.*, 2020). No trabalho de Zaabi *et al.*, (2021) o tratamento da DRC induzida pelo diabetes, com metformina (200mg/kg) reduziu significativamente os níveis de ureia e creatinina plasmática, além de diminuir a atividade de n-acetil-β-d-glucosaminidase (NAG), marcador de lesão renal.

A NAG é uma enzima lisossomal presente nas células dos túbulos proximais do rim, de alto peso molecular. Sendo assim, essa molécula não é

filtrada pelos glomérulos. A elevação da atividade de NAG, assim como a sua concentração urinária, são importante biomarcadores de danos nas células tubulares e comprometimento da função tubular (Novak *et al.*, 2023). A capacidade da metformina atenuar a elevação da atividade de NAG, demonstra o papel protetivo nas lesões renais tubulares, por meio da diminuição dos níveis de glicose plasmática e urinária (Zaabi *et al.*, 2021).

Além dos marcadores de função renal séricos, foi realizada a determinação dos níveis de creatinina urinária e de albuminúria. A figura 11 apresenta o volume urinário e os níveis de creatinina e albuminúria.

Figura 11 - Volume urinário, creatinina urinária e microalbuminúria de animais controles e diabéticos.



Fonte: Do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Resultados apresentados em Média \pm DP **Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,001). O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

O volume de urina dos animais saudáveis tratados com água foi de $3,66 \pm 1,17$ ml/12h, enquanto para os animais diabéticos tratados com água, o volume médio de urina chegou a 8.31 ± 3.96 ml/12h ($p=0,1267$). Observa-se que o grupo DMA apresentou maior volume de urina 12h comparado com os animais saudáveis ($p>0,001$). Contudo, não houve diferença estatística na diurese entre todos os grupos com animais diabéticos, tendo em vista as grandes variações no volume urinário entre os animais e o elevado desvio padrão.

A determinação de creatinina urinária evidencia a diferença entre animais saudáveis e diabéticos. Os animais do grupo DMA apresentaram uma redução significativa na creatinina urinária em relação aos animais controles ($p < 0,001$). Assim como o aumento da creatinina sérica nesses animais, a redução na excreção urinária dessa substância, também é característica da insuficiência renal (Dusse *et al.*, 2017). A elevação da creatinina urinária nos animais diabéticos tratados com o óleo de baru em relação ao grupo DMA se torna evidente a partir do grupo DMO 3.0, sendo que o tratamento com os hipoglicemiantes isolados e associados com o óleo também atenuaram a redução da excreção da creatinina.

Com relação aos níveis de albuminúria, os animais diabéticos apresentaram elevação significativa em relação aos animais controles ($p < 0,001$). A redução deste marcador também é observada nos grupos tratados com o óleo de baru a partir da dose de 0,75 g/kg. A maior taxa de redução da albuminúria é atingida pelos grupos tratados com os hipoglicemiantes, sendo que a associação destes com o óleo não foi capaz de intensificar a ação desses medicamentos ($p > 0,05$).

Os estágios de evolução da nefropatia diabética sempre foram descritos com o início da excreção anormal de albumina na urina, progredindo para uma excreção moderada, seguida da sua elevação acompanhada de alteração da TFG. No entanto, estudos recentes afirmam que os pacientes diabéticos podem apresentar a excreção urinária de albumina normal com a presença de insuficiência renal (Amir; Suhl; Alexander, 2020; Yamazaki *et al.*, 2021).

A avaliação da proteinúria em animais diabéticos durante 4, 8, 12 e 16 semanas de tratamento, demonstrou que a proteína na urina teve aumento significativo entre animais controle e diabéticos apenas na 12ª semana. Os níveis de creatinina e ureia para esses animais já estavam alterados desde a 8ª semana de tratamento, sugerindo que a proteinúria ocorreu no estágio mais desenvolvido da DRD (Ahad *et al.*, 2014). No estudo de Cruz *et al.*, (2023), o protocolo de 60 dias não apresentou diferença nos níveis de creatinina no soro. As alterações dos marcadores renais no soro e na urina obtidas por este trabalho sugere que o protocolo de 60 dias ainda estaria na fase inicial disfunção renal

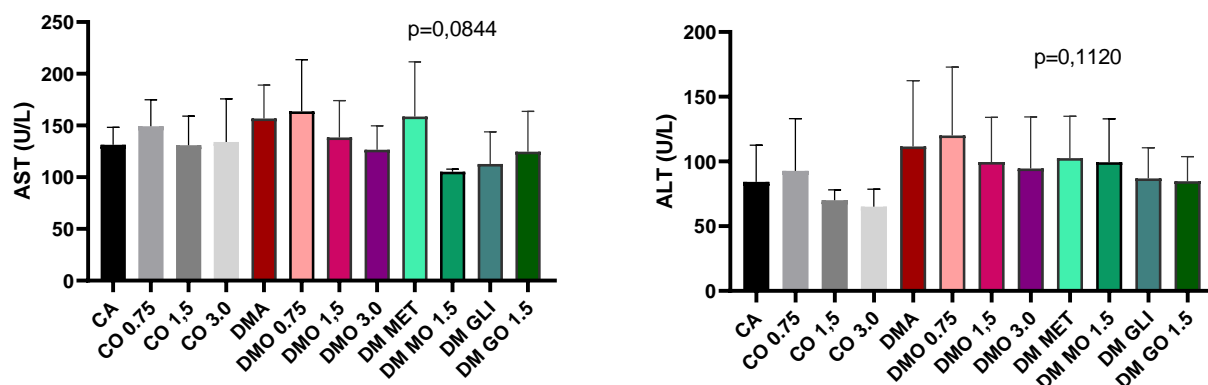
(Cruz *et al.*, 2023), enquanto no protocolo de 90 dias foi possível certificar o desenvolvimento da lesão renal em decorrência ao estado hiperglicêmico.

O trabalho de Glastras *et al.*, (2016) avaliou as alterações renais ocasionadas em modelos de indução com administração de STZ em animais submetidos à dieta hiperlipídica. Os pesquisadores demonstraram que a relação de albumina/ creatinina urinárias (ACR) se correlaciona com as alterações da creatinina plasmática, onde o DM2 levou o aumento da ACR e da creatinina plasmática. A indução da lesão renal com a associação de STZ e adenina levou ao aumento significativo da ACR no período de 35 dias, decorrente a ação da adenina em potencializar os danos nos túbulos renais. O tratamento com a metformina para esses animais levou a redução significativa de ACR, demonstrando que o controle glicêmico foi capaz de reduzir a insuficiência renal (Zaabi *et al.*, 2021).

Os efeitos e mecanismo de ação dos ácidos graxos na doença renal diabética ainda são pouco abordados na literatura. A suplementação da dieta de animais diabéticos com óleo de canola (rico em PUFA ômega-3) e com óleo de milho (rico em PUFA ômega-6) forneceram renoproteção após um período de 30 semanas de intervenção. Ambas as dietas foram capazes de reduzir estatisticamente os níveis de albuminúria nos ratos diabéticos. A comparação entre essas dietas, demonstrou que a ingestão de PUFA n-3 forneceu maior proteção da função renal do que dietas ricas em PUFA n-6 (Garman *et al.*, 2009).

Considerando que tanto o diabetes mellitus como a ingestão de ácidos graxos podem influenciar o perfil lipídico e a função hepática, foi realizada a determinação da atividade das enzimas AST e ALT bem como de colesterol total, triglicerídeos, colesterol HDL e colesterol-não HDL. A figura 12 apresenta a determinação dos marcadores hepáticos.

Figura 12 - Marcadores hepáticos ratos saudáveis e diabéticos



Fonte: Do autor

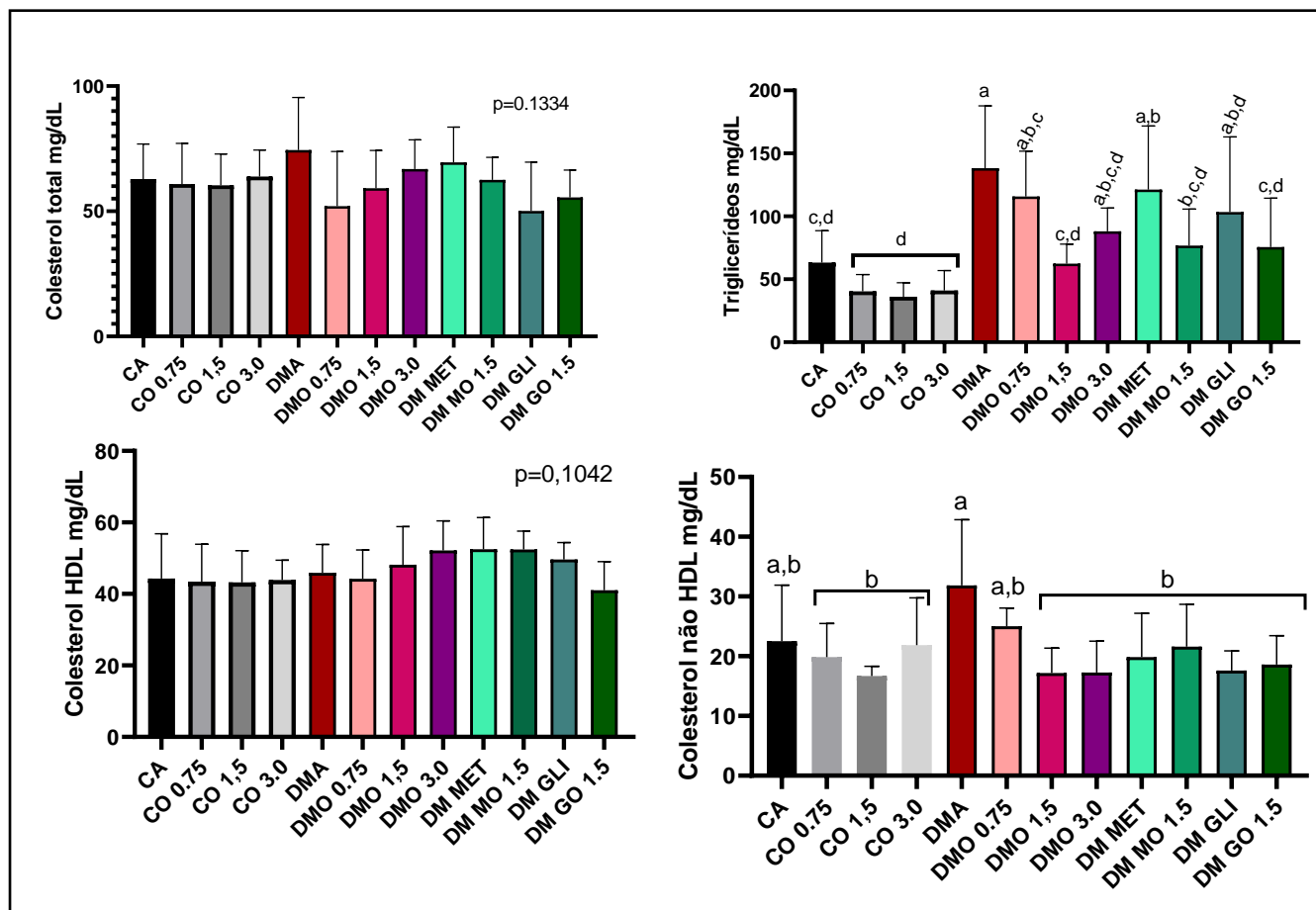
Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Resultados apresentados em Média \pm DP **Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,001$). O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

De acordo com os marcadores hepáticos, verifica-se que o diabetes não alterou as atividades de AST e ALT, já que não houve significado estatístico entre os animais saudáveis e diabéticos. Pode-se notar também, que o óleo de baru não apresentou sinais de toxicidade, mesmo com a administração na dose mais elevada.

A hiperglicemia crônica presente no DM afeta o metabolismo dos lipídios, resultando em alterações nos níveis de colesterol total, triglicerídeos e colesterol LDL e colesterol HDL no soro. Em particular, o diabetes tipo 2 está frequentemente associado a um perfil lipídico desfavorável, incluindo aumento dos níveis de triglicerídeos, diminuição dos níveis de HDL e aumento dos níveis de LDL pequenas e densas, que são mais aterogênicas. A dislipidemia aumenta o risco de doenças cardiovasculares, incluindo doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica (Chang; Wu, 2013).

A figura 13 demonstra os dados obtidos nas determinações dos marcadores do perfil lipídico.

Figura 13 - Marcadores do perfil lipídico ratos saudáveis e diabéticos.



Fonte: Do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Resultados apresentados em Média \pm DP **Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,001). O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

De acordo com a Figura 13 A e C, a indução do diabetes não foi capaz de alterar os níveis de colesterol total e colesterol HDL, assim como o tratamento do óleo de baru nos animais saudáveis e diabéticos não afetou os níveis de ambos os marcadores ($p > 0,1$). A dislipidemia é um fator de risco comum no DM2, devido a perturbação do metabolismo lipídico, os níveis elevados de glicose e insulina contribuem para alterações no perfil lipídico e desenvolvimento de aterosclerose (Yousri *et al.*, 2022). A avaliação do perfil lipídico de animais que receberam ração hiperlipídica com 60% de gordura, levou a elevação do

colesterol total, do colesterol LDL e VLDL em ratos diabéticos (Ahad *et al.*, 2014). Assim, a ausência de alteração no colesterol total nos animais diabéticos desse protocolo pode indicar um tempo insuficiente para alteração deste marcador, como também pode estar associado a concentração da dieta hiperlipídica no protocolo de indução, que foi somente de 30%.

O ambiente metabólico na condição de diabetes mellitus, com a presença de elevados níveis de glicose, AGEs, estresse oxidativo e inflamação, promovem disfunção de HDL, levando a maiores riscos de doenças cardiovasculares. Um dos papéis do HDL é sua capacidade de remover o colesterol das células espumosas dos macrófagos através do transporte reverso do colesterol, o principal mecanismo anti-aterogênico (Marin *et al.*, 2015).

O estresse oxidativo elevado no diabetes mellitus causa modificação oxidativa da partícula de HDL e de seu principal componente proteico, apoA-I, e contribui para a geração de HDL disfuncional. O HDL oxidado perde seu efeito protetor e o transporte reverso do colesterol é inibido (Marin *et al.*, 2015; Srivastava, 2018). Dessa forma, os níveis de HDL não alterados no diabetes, como obtido por este estudo, não predizem sobre a sua funcionalidade, sendo que o controle glicêmico e do estado de estresse oxidativo e inflamação são relevantes para função adequada do HDL.

O colesterol não-HDL se trata de um conteúdo de colesterol em lipoproteínas ricas em VLDL, LDL e lipoproteína de densidade proporcional, envolvidas no processo aterosclerótico (Marin *et al.*, 2015). Na mensuração do colesterol não-HDL, é possível verificar que a ingestão do óleo de baru na dose de 1.5 g/kg nos animais controles e diabéticos (CO 1.5 e DMO 1.5), foi capaz de diminuir significativamente os níveis de colesterol não-HDL em comparação ao grupo DMA ($p < 0.001$), além de serem iguais ao grupo CA. No entanto vale a pena destacar o comportamento das médias de colesterol total nos grupos DMO 0.75, DMO 1.5 e DMO 3.0, que apresentaram uma tendência no aumento dos níveis de colesterol total de acordo com a elevação da dose de óleo administrada. Esse mesmo comportamento também é apresentado nos níveis de colesterol HDL, o que corrobora com a redução significativa dos níveis de colesterol não-HDL dos grupos DMO 1.5 e DMO 3.0 em relação ao DMO 0.75.

Os efeitos dos antidiabéticos no colesterol não-HDL foram observados em todos os grupos que receberam tratamento, exceto o grupo DMO 0.75. Esses resultados demonstram que os tratamentos atenuaram a elevação do colesterol não-HDL nos animais diabéticos em relação ao grupo DMA. O trabalho de Khadke *et al.* (2020) também demonstrou que os tratamentos com a glibenclamida de forma isolada e associada com o óleo de peixe e linhaça reduziu colesterol total e do colesterol não-HDL em animais diabéticos.

Na dislipidemia diabética, resistência à insulina pode levar a um aumento na produção hepática de VLDL, que são moléculas transportadoras dos triglicerídeos. A produção excessiva de VLDL contribui para o aumento dos níveis de triglicerídeos no sangue (SBD, 2023; Chang; Wu, 2013). Dessa forma, o monitoramento e o controle dos níveis de triglicerídeos no diabetes é essencial para prevenir o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Entre os animais saudáveis, os níveis de triglicerídeos não apresentaram diferença estatística ($p > 0,9316$), indicando que a ingestão do óleo de baru em todas as dosagens, não afetou os níveis de triglicerídeos e, portanto, não representando um risco no seu consumo diário. Ao comparar os animais diabéticos com o grupo controle, nota-se uma elevação significativa dos níveis de triglicerídeos no grupo DMA, representando um aumento de 54,23%, caracterizando o quadro de hipertrigliceridemia.

O efeito do óleo de baru no perfil lipídico é identificado a partir da dose de 1.5 g/kg, já que o grupo DMO 1.5 apresentou uma redução significativa ($p < 0,001$) dos triglicerídeos, sendo estatisticamente igual a todos os grupos controles. Semelhante a ele, o grupo DMO 3.0 também foi estatisticamente igual ao grupo DMO 1.5 e aos grupos controles, demonstrando a tendência em reduzir os níveis de triglicerídeos, porém não foi o suficiente para diferir com a média apresentada pelo grupo DMA.

O uso dos antidiabéticos orais nos grupos DM MET e DM GLI apresentou semelhança nos níveis de triglicerídeos com o DMA e com o CA, isso devido ao elevado desvio padrão presente nos grupos diabéticos. Contudo, a associação desses medicamentos com o óleo de baru na dose de 1,5 g/kg proporcionou a redução significativa dos triglicerídeos em relação aos animais sem tratamento (DMA). Os grupos DMO 1.5, DMMO 1.5 e DMGO 1.5 apresentaram a mesma

capacidade de reduzir os níveis plasmáticos de triglicerídeos, já que foram iguais entre si e semelhantes aos animais saudáveis.

Na literatura, o trabalho que aborda o efeito do óleo de baru sobre o perfil lipídico de ratos wistar, aplicou um modelo de dislipidemia a partir de ingestão de gorduras, onde o óleo de baru na dose de 1,0 g/kg não foi capaz de reverter os marcadores lipídicos no final de 16 semanas (Reis *et al.*, 2018). De acordo com as doses trabalhadas neste trabalho, observa-se o efeito do óleo a partir da dose de 1,5 g/kg administrada por 90 dias.

No trabalho de Khadke *et al.* (2020), foi observado que a suplementação de ácidos graxos ômega-3 reduziu efetivamente o nível de triglicerídeos através da regulação negativa da expressão do gene SREBP (proteína de ligação ao elemento regulador de esterol) e elevação de carnitina palmitoil transferase (CPT-1). SREBP é um fator de transcrição com função na regulação do metabolismo de ácidos graxos e colesterol no fígado, que quando superexpresso indica a elevação do colesterol e triglicerídeo. A CPT-1 se trata de uma enzima que atua no controle da entrada de ácidos graxos mitocondrial para β -oxidação. Tendo esses resultados em vista, sugere-se que o controle da expressão de SREBP e estímulo de CPT-1 pelos ácidos graxos presentes no óleo de baru pode ter contribuído para diminuição dos triglicerídeos. Além disso, a redução da glicemia também é um fator importante no alcance da redução dos níveis de triglicerídeos, principalmente quando há a restauração e regulação da liberação de insulina pelo pâncreas (Zhang *et al.*, 2011), outro efeito também observado pelo óleo de baru.

Em um estudo de ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, foi avaliado o efeito da gliclazida nos níveis séricos de lipídios em pacientes com DM2. Os pacientes tratados com gliclazida apresentaram uma redução significativa nos níveis séricos de triglicerídeos e um aumento na concentração sérica de HDL-colesterol, sugerindo que este antidiabético pode ser uma opção terapêutica útil no controle dos fatores de risco cardiovascular no diabetes (Zhang *et al.*, 2011).

Considerando os resultados do perfil lipídico e das enzimas hepáticas obtidas neste estudo, foi possível demonstrar que as doses avaliadas do óleo de baru não foram prejudiciais aos animais saudáveis e diabéticos. Já que os dados

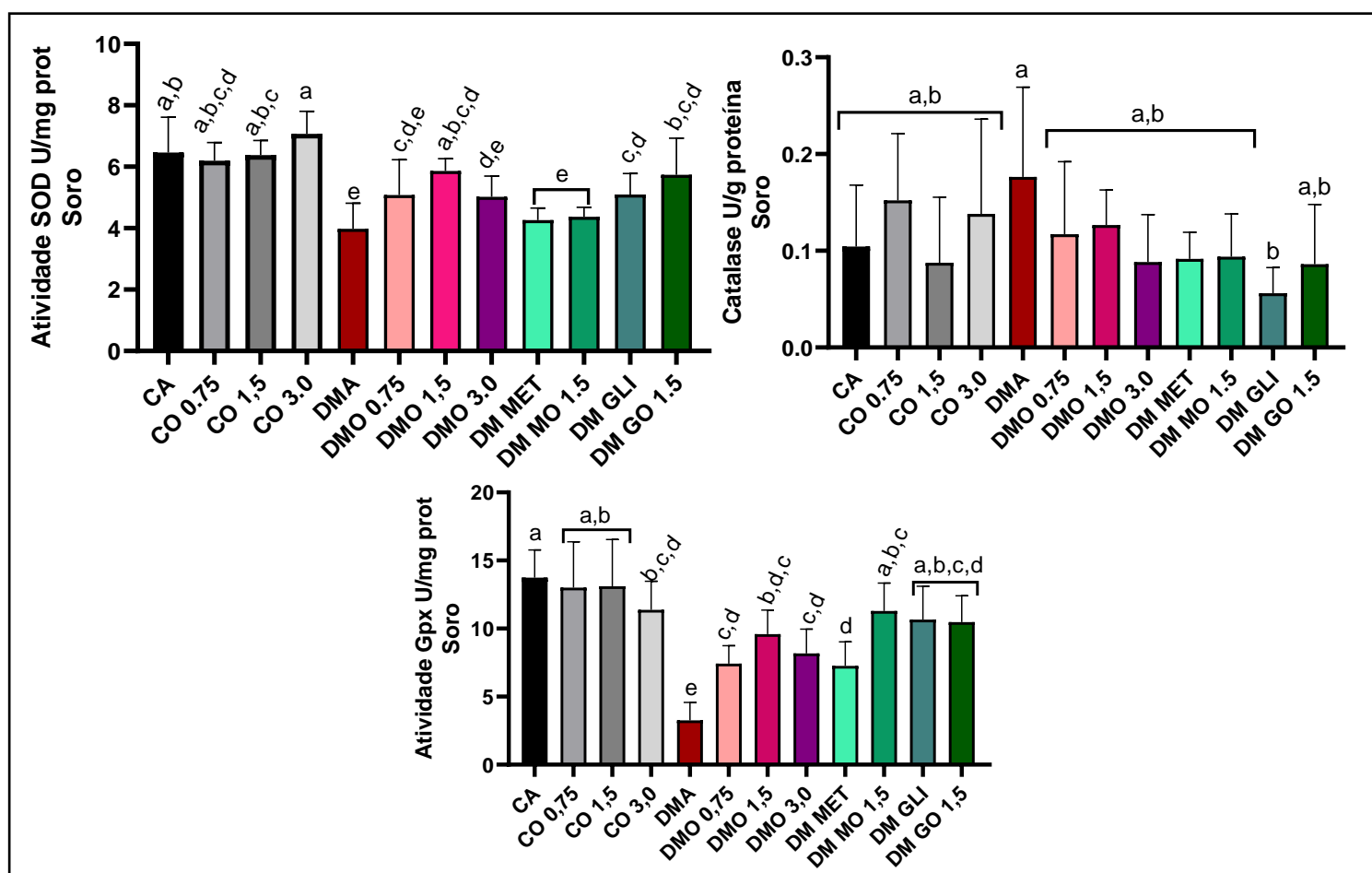
sobre a segurança alimentar do óleo de baru não são descritos na literatura, este estudo evidencia que até a dose de 3.0 g/kg o óleo de baru não alterou as funções hepáticas, além de auxiliar no controle dos níveis de colesterol não- HDL e triglicerídeos nos animais diabéticos.

5.3.6 Avaliação das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica

O estado hiperglicêmico crônico leva a alterações na formação de EROs e de outras espécies oxidantes, que por sua vez gera um desequilíbrio entre a formação e remoção dessas espécies. Como consequência desse processo, os componentes celulares, em especial os lipídios, sofrem o ataque dessas espécies, que levam a peroxidação lipídica e ao dano tecidual (Grotto *et al.*, 2008). Os antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT, Gpx) agem como eliminadores de EROS na tentativa de conter o dano oxidativo e consequentemente diminuir os níveis dos marcadores do estresse oxidativo (Kajal; Singh, 2020).

Inicialmente foi realizada a determinação da atividade da SOD, CAT e Gpx no soro dos animais. A figura 14 demonstra a atividade de SOD e CAT no soro dos animais diabéticos e controle.

Figura 14 - Atividade de SOD, CAT e Gpx no soro dos grupos saudáveis e diabéticos não tratados e tratados com óleo de baru e/ou fármaco.



Fonte: do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Resultados apresentados em Média \pm DP **Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,001$). O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

A determinação da atividade na SOD demonstra que entre os animais saudáveis, não houve significado estatístico entre os grupos CA e os grupos que receberam o óleo de baru, CO 0.75, CO 1.5 e CO 3.0 ($p > 0.900$), demonstrando que o óleo não afetou a atividade desta enzima nos animais saudáveis. Todavia, os animais diabéticos do grupo DMA apresentaram uma redução de 38.45% na atividade da SOD, demonstrando que a patologia presente nesses animais interferiu na atividade desta enzima ($p < 0,001$).

A ingestão do óleo de baru na dose de 1,5 g/kg, nos animais diabéticos contribuiu para atenuação da queda da atividade da SOD observada no grupo DMA, tendo em vista que dentre todas as doses aplicadas nesse estudo, somente a dose mediana do óleo de baru foi estatisticamente maior que os animais diabéticos sem tratamento ($p < 0,001$). O grupo DMO 1.5 foi estatisticamente igual a todos os grupos de animais saudáveis, reforçando o efeito do óleo na atividade desta enzima ($p > 0,08$), porém foi a única dose que elevou a atividade da SOD estatisticamente em relação ao grupo DMA.

Com relação ao efeito dos antidiabéticos, verifica-se que a metformina, nos grupos DM MET e DMMO 1.5 não foi capaz de prevenir a redução da atividade da SOD nos animais diabéticos. Contudo, a gliclazida conseguiu elevar os níveis de atividade da SOD nos grupos DM GLI e DMGO 1.5, apresentando o mesmo efeito obtido pelo DMO 1.5.

Diferente do que foi observado na atividade da SOD, a determinação da atividade da CAT no soro dos animais não demonstrou diferença estatística na maioria dos grupos. O grupo CA foi estatisticamente igual a todos animais saudáveis e diabéticos tratados e não tratados ($p > 0,800$). O grupo DMA também foi estatisticamente semelhante a todos os grupos, com exceção ao DM GLI, que apresentou a redução na atividade da CAT de 68,16% em comparação com o grupo DMA.

Ao observar o comportamento das médias da atividade de CAT na Figura 14, observa-se que o diabetes apresentou a propensão de elevar a atividade enzimática da CAT, já que as médias obtidas pelos grupos CA e DMA foram de 0.1044 ± 0.063 e 0.1765 ± 0.092 U/mg de proteína, respectivamente. Uma possível razão da elevação da atividade desta enzima, seria uma ação compensatória frente à redução da atividade de SOD observada nos animais diabéticos ou por conta da natureza dos agentes indutores do estresse oxidativo e à duração do tratamento (Ononamadu *et al.*, 2019).

Semelhante ao encontrado no trabalho de Tabei *et al.*, (2015), a CAT não diferiu entre animais diabéticos e saudáveis no lisado eritrocitário, porém quando avaliado no órgão alvo, a enzima apresentou diferença entre os grupos. No trabalho de Kopál *et al.*, (2014), o tratamento de animais controle e diabéticos com óleo vegetal rico em ácidos graxos poliinsaturados n-6 durante 7 semanas,

também não apresentou diferenças na atividade de CAT no soro entre diabéticos e controles. Além da catalase, outra enzima que age sobre o peróxido de hidrogênio é a Gpx, também avaliada nesse trabalho.

As Gpx são uma família de enzimas antioxidantes que agem sobre o peróxido de hidrogênio, levando a formação de oxigênio e água. Além de agir sobre hidroperóxidos lipídicos e fosfolipídios, atenuando a peroxidação lipídica (Mohammedi *et al.*, 2016). A avaliação da atividade da Gpx no soro dos animais diabéticos sem tratamento (DMA) demonstrou uma redução significativa em relação aos animais saudáveis, sendo que a defesa antioxidante desempenhada por esta enzima se encontrava menor nos animais sem tratamento.

O tratamento com o óleo de baru nos animais diabéticos para todas as doses, avaliadas nesse estudo, foi capaz de atenuar a queda da atividade da Gpx nos animais do grupo DMO 0,75, DMO 1,5 e DMO3,0 ($p < 0,001$). A atividade da Gpx nesses animais diabéticos foi semelhante estatisticamente aos animais saudáveis que receberam o óleo de baru. Em relação aos animais saudáveis, foi possível notar que o óleo na dose de 3,0 g/kg levou a redução da atividade da Gpx nos animais saudáveis, indicando que altas doses da ingestão do óleo em animais saudáveis pode interferir na resposta antioxidante desta enzima.

A metformina na dose de 200 mg/kg também atenuou a queda da atividade da Gpx nos ratos diabéticos, porém a associação da metformina com o óleo de baru (1,5 g/kg), assim como a gliclazida administrada de forma isolada e associada com o óleo de baru demonstraram a capacidade em impedir a queda da Gpx, mantendo o nível de atividade desta enzima semelhante ao grupo CA ($p > 0,05$).

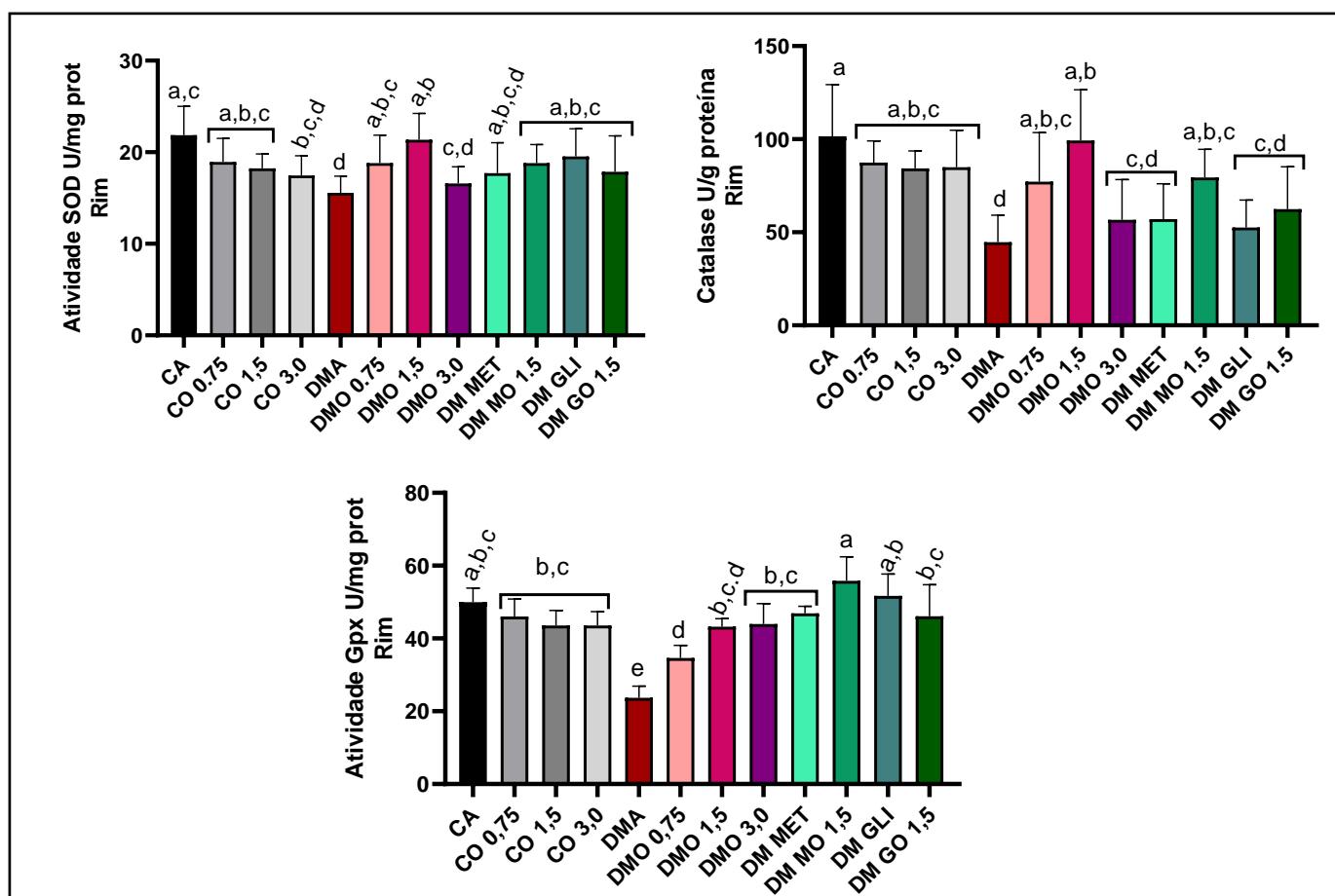
A indução do DM em ratos wistar com estreptozotocina levou a redução significativa de Gpx no plasma dos animais diabéticos em relação aos animais saudáveis (Kopál *et al.*, 2014). Em um estudo com pacientes saudáveis, pré-diabéticos e diabéticos foi demonstrado a redução significativa do status antioxidante total, da atividade da Gpx e dos níveis de GSH no soro e eritrócitos dos pacientes diabéticos em relação aos pré-diabéticos. A redução da resposta antioxidante nesses pacientes foi relacionada aos elevados níveis de HbA1c, sendo que o estado hiperglicêmico mais grave, leva ao comprometimento da regulação das respostas antioxidantes (Jiménez-Osorio *et al.*, 2014)

A elevação de peróxidos orgânicos e dos níveis de colesterol no diabetes, é um contribuinte para elevação da peroxidação, sendo que a ingestão de ácidos graxos ricos em vitamina E tem o potencial protetivo contra essas reações, por meio da elevação da atividade da Gpx (Huang *et al.*, 2018). Em um ensaio clínico randomizado que investigou a suplementação de ácidos graxos ômega-3 e vitamina E em mulheres com diabetes gestacional, demonstrou a redução do estresse oxidativo e peróxidos lipídicos no soro dessas pacientes (Jamilian *et al.*, 2017). A suplementação do óleo de milho, de ratos sprague diabéticos, com vitamina E e selênio levou o aumento significativo da atividade de Gpx e SOD no soro dos animais diabéticos. Além disso, foram notados efeitos hipoglicêmicos e hipolipemiantes, os quais impediram a evolução das complicações diabéticas (Ghaffari *et al.*, 2011).

De acordo com a avaliação das enzimas antioxidantes, observa-se que a redução da atividade de SOD e Gpx no soro dos animais diabéticos aponta para uma possível desregulação na dismutação do ânion superóxido e na remoção do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos lipídicos. Ademais, fica evidente o efeito protetor dos tratamentos com o óleo de baru em reduzir a desregulação dessas espécies oxidantes.

Além da avaliação do estresse oxidativo no soro, foi avaliada as atividades mesmas enzimas em homogeneizado dos rins dos animais. A Figura 15 apresenta a atividade de SOD, CAT e Gpx nos homogeneizado de rim dos animais diabéticos e controle.

Figura 15 - Atividade de SOD, CAT e Gpx nos homogeneizado de rim dos grupos saudáveis e diabéticos não tratados e tratados com óleo de baru e/ou fármaco.



Fonte: do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Resultados apresentados em Média \pm DP **Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,001$). O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

De acordo com o gráfico da atividade da SOD, verifica-se que entre os animais saudáveis tratados e não tratados com óleo, não houve significado estatístico ($p=0,3976$), somente o grupo CO 3,0 teve menor atividade de SOD em relação ao grupo CA ($p<0,05$). Além disso, a atividade desta enzima no grupo CO 3,0 foi estatisticamente igual ao grupo DMA.

Ao comparar o CA com o DMA, nota-se que a presença do diabetes levou a redução significativa da atividade da SOD em relação aos animais saudáveis,

representando uma queda de 28,8%. A redução na atividade desta enzima nos tecidos renais pode estar associada a presença de EROs em maior quantidade nos animais diabéticos, em consequência da hiperglicemia.

Com relação ao tratamento do óleo de baru, observa-se que os grupos DMO 0.75 e DMO 1.5 apresentaram o aumento significativo da SOD em comparação aos animais diabéticos sem tratamento, apresentando média de atividade de $18,82 \pm 3,03$ U/mg de proteína e $21,37 \pm 2,87$ U/mg de proteína, respectivamente. Ambos apresentaram semelhança estatística com a atividade de SOD do grupo CA, com $21,87 \pm 3,18$ U/mg de proteína, como também foram semelhantes aos demais grupos controles tratados com o óleo de baru.

Os grupos que receberam os hipoglicemiantes de forma isolada e associada com o óleo de baru também demonstraram capacidade de atenuar a redução da atividade da SOD nos animais diabéticos. Com exceção dos grupos DM MET e DMO 3.0, nos quais apresentaram atividade de SOD semelhante ao grupo DMA.

A SOD é uma enzima que converte o superóxido (O_2^-) em H_2O_2 , que é uma EROs menos reativa. Em seguida, a CAT, outra enzima antioxidante, converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Dessa forma, a catalase trabalha em conjunto com a SOD para neutralizar completamente as EROs e proteger as células contra danos oxidativos (Mestry *et al.*, 2017).

A atividade da catalase nos animais saudáveis foi estatisticamente igual entre os animais sem tratamento com os animais tratados com o óleo de baru ($p > 0,70$). Os animais diabéticos do grupo DMA apresentaram uma redução significativa da atividade da catalase em relação ao CA, representando uma diminuição de 56,03% da atividade enzimática da CAT ($p < 0,001$). Semelhante ao grupo DMA, os animais pertencentes ao grupo DMO 3.0, DM MET, DMGLI e DMGO apresentaram médias iguais na atividade da catalase.

O tratamento com o óleo de baru nas doses de 0,75 g/kg e 1,5 g/kg foi capaz de controlar a redução da atividade da CAT nos animais diabéticos ($p < 0,001$), assim como a combinação do óleo de baru com a metformina foi capaz de impedir a queda significativa da CAT em relação ao grupo CA ($p = 0,7195$), apresentando melhor efeito do que o grupo que recebeu apenas a metformina.

Com relação a atividade da Gpx nos animais saudáveis, nota-se que não houve diferença estatística entre o grupo controle sem tratamento e dos demais grupos controles tratados com o óleo de baru, para todas as doses ($p > 0,05$). O diabetes ao longo de todo tempo experimental, levou a redução significativa da Gpx no rim dos animais do grupo DMA ($p < 0,001$).

De acordo com o gráfico C da figura 15, observa-se a elevação gradual significativa da atividade de Gpx, conforme aumenta-se a dose de tratamento com o óleo de baru nos animais diabéticos, indicando o efeito protetor do óleo de baru no estresse oxidativo. Os hipoglicemiantes também foram capazes de impedir a queda da atividade da Gpx nos animais diabéticos, sendo que novamente o grupo tratado com a metformina associada com o óleo de baru manteve a atividade da Gpx semelhante aos animais saudáveis ($p > 0,05$).

Já é bem estabelecido que na hiperglicemia crônica a atividade das enzimas antioxidantes, SOD, GPx e CAT, encontram-se reduzidas, enquanto após a normalização glicêmica, as atividades dessas enzimas retornam ao normal (Kajal; Singh, 2020; Mestry *et al.*, 2017). Os dados obtidos nestes testes corroboram com estudos que demonstram a menor atividade da SOD, CAT e Gpx em animais diabéticos em relação ao controle (Adeyemi *et al.*, 2020; Figueiredo *et al.*, 2020; Saha; Ghosh, 2012).

O efeito do óleo de baru nas atividades das enzimas antioxidantes, foi novamente destacado nos grupos DMO 1.5 e DMMO 1.5, que impediram a redução da atividade das enzimas SOD, CAT e GPX no rim dos animais diabéticos. Correlacionando os resultados obtidos de ambos grupos nas enzimas antioxidantes com a glicemia em jejum, é possível sugerir que o efeito antioxidante do óleo de baru na dose de 1.5 g/kg, pode estar associado ao melhor controle glicêmico alcançado nessa respectiva dose.

Jangale *et al.*, (2016) realizou a inclusão do óleo de linhaça (10%) e óleo de peixe (10%) na ração de ratos modelos de DM2. Ele demonstrou que o óleo de linhaça foi capaz de regular positivamente a expressão e atividade de SOD e CAT, além de aumentar a expressão da Gpx, enquanto o óleo de peixe (10%) aumentou somente a expressão do gene CAT em rins de ratos diabéticos. Esses efeitos foram associados ao controle glicêmico promovido pelo óleo presente na ração.

O controle dos níveis glicêmicos auxilia na redução da formação de espécies oxidantes, assim como auxilia na resposta antioxidante (França *et al.*, 2013). Como demonstrado nos resultados anteriores deste trabalho, o óleo de baru foi capaz de reduzir a glicemia de jejum dos animais diabéticos, assim como melhorar a responsividade à glicose no TTOG, fatores contribuintes para atenuação da redução das atividades das enzimas antioxidantes.

O trabalho de Yang *et al.*, (2013), demonstra que a produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio foram maiores nos animais diabéticos, além da variação da expressão de SOD, GPx e CAT em diferentes estágios do DM. Ao avaliar o perfil antioxidante no coração, cérebro e rins de animais diabéticos, Kamalakkannan e Prince (2006) se deparou com diferentes padrões de atividade enzimática, indicando que as atividades das enzimas antioxidantes variam entre os tipos de tecido e gravidade do diabetes.

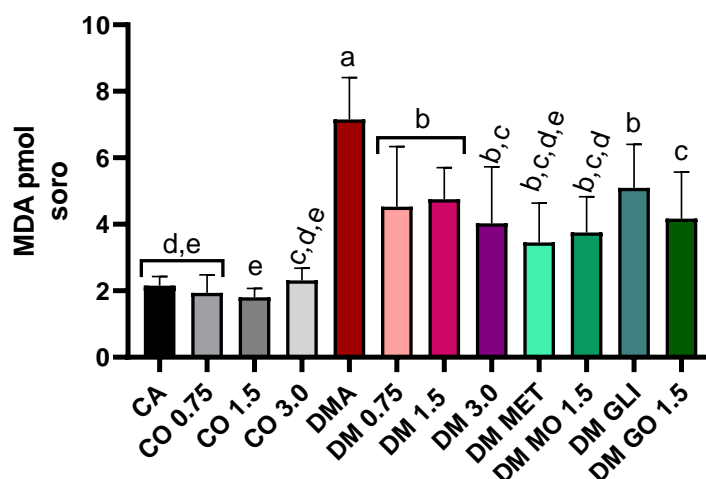
Sani *et al.*, (2006) demonstraram que a catalase apresenta maior atividade no fígado e rins de camundongos do que no cérebro. Essa diferença foi relacionada com a demanda da proteção contra danos causados pelo H₂O₂, já que o fígado e os rins são tecidos metabolicamente ativos e grandes geradores de EROs. A catalase é uma enzima localizada predominantemente no peroxissomo e abundantemente presente no fígado, pulmões e rins, fazendo parte do sistema antioxidante intracelular. Assim, a presença dessa enzima no soro se refere as enzimas remanescentes, de escape intracelular (Hong; Park, 2021). Como observado neste estudo, o nível da atividade da catalase no soro foi bem menor quando comparado com os rins de todos os grupos experimentais

Embora a atuação do radical ânion superóxido como oxidante direto seja pouco relevante, esta EROs tem a habilidade de favorecer a formação de radicais hidroxila, o qual é capaz de iniciar relações de peroxidação lipídica, levando à formação de aldeídos e hidroperóxidos, dentre os quais se destaca o malonaldeído (MDA).

O MDA faz parte das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo o biomarcador mais conhecido da peroxidação lipídica, derivado da β -ruptura de endociclicização de ácidos graxos polinsaturados

(França *et al.*, 2013). O gráfico 14 apresenta a quantificação de MDA no soro de animais saudáveis e diabéticos.

Gráfico 14 - Níveis de MDA no soro dos grupos saudáveis e diabéticos não tratados e tratados com óleo de baru e/ou fármaco



Fonte: do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Resultados apresentados em Média ± DP **Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,001). O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

Os resultados de MDA apresentados no gráfico 14, demonstram que a administração do óleo de baru nos animais saudáveis não foi capaz de alterar significativamente os níveis de MDA entre os diferentes grupos. Esses dados sugerem que a administração do óleo para todas as doses avaliadas nesse estudo, não elevou a formação de peróxidos lipídicos, mesmo com a redução da atividade da Gpx no soro dos animais do grupo CO 3,0 (Figura 14).

Os animais do grupo DMA apresentaram um aumento significativo do MDA em relação aos animais controles ($p < 0,001$). Como consequência da hiperglicemia, a geração de EROs e AGEs leva a exacerbação das reações oxidativas. Assim, como esperado, ao longo dos 90 dias de experimentação foi possível observar o aumento dos níveis de MDA no soro dos animais diabéticos,

sugerindo que houve um aumento da peroxidação lipídica neste grupo (Papachristoforou *et al.*, 2020).

Em relação aos animais tratados com óleo de baru nas três distintas doses, os níveis de MDA foram significativamente reduzidos em comparação com o grupo DMA ($p < 0,001$). Apesar dos grupos DMO 0,75 e DMO 3,0 apresentarem apenas uma tendência na elevação da atividade da SOD no soro, a atividade da Gpx foi estatisticamente maior nesses grupos, em relação ao DMA. Como a Gpx é capaz de proteger os ácidos graxos das reações de oxidação, o nível da atividade dessa enzima nos grupos DMO 0,75 e DMO 3,0, contribuiu para reduzir a formação de MDA.

Zhu *et al.*, (2020) alterou a dieta de ratos modelo DM2 com a adição de milho e óleo de linhaça, ricos em ácidos graxos ômega 3. O óleo de linhaça foi capaz de reduzir os danos do estresse oxidativo, reduzindo os níveis de MDA e elevando a atividade de SOD. A ação antioxidante do óleo de linhaça foi associada a supressão da inflamação e da disbiose intestinal. O acúmulo de AGEs tem como consequência a ativação de NF- κ B e indução da expressão de TNF- α , levando a inflamação crônica (Kang; Yang, 2020). O modelo de DM2 em ratos levou a um aumento significativo em uma série de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-17A. Contudo os níveis dessas citocinas pró-inflamatórias foi drasticamente reduzido após o tratamento com óleo de linhaça (Zhu *et al.*, 2020).

O tratamento com os hipoglicemiantes isolados e associados com o óleo de baru levou a redução significativa dos níveis de MDA no soro em relação ao grupo DMA ($p < 0,001$). Os grupos tratados com metformina (DM MET e DM MO 1.5), não apresentaram diferença entre si ($p > 0,05$), demonstrando que ambos os tratamentos apresentaram o mesmo efeito na proteção das células contra os EROs.

A revisão sistemática com meta-análise de Heshmati *et al.*, (2019) avaliou os efeitos da suplementação de ácidos graxos ômega-3 nos níveis séricos de MDA em humanos. Eles comprovam que os PUFAs n-3 têm o potencial de reduzir o nível plasmático de MDA e aumentar a atividade da GPx em adultos - jovens e idosos. Em outro trabalho, a ingestão do óleo de peixe em ratos hipercolesterolêmicos durante 16 semanas, levou apenas a elevação da

atividade da SOD, sem apresentar diferença nos níveis de MDA entre controle e doente. Essa observação foi explicada por um funcionamento adequado do sistema antioxidante endógeno, capaz de neutralizar os efeitos da hipercolesterolemia (Lima Rocha *et al.*, 2022).

As células eucariotas são constantemente expostas a meios estressores que levam a elevação de EROs e ERNs, essenciais para manter o funcionamento adequado de vias que necessitam dessas espécies como sinalizadoras. Contudo, quando a exposição a esses fatores extrapola os limites, o organismo ativa mecanismo de controle redox (Darenskaya; Kolesnikova; Kolesnikov, 2021). O fator nuclear eritroide relacionado ao fator 2 (Nrf2) atua como chave na regulação do estresse oxidativo, responsável por controlar a expressão de 200 genes citoprotetores que codificam proteínas antioxidantes e moléculas que antagonizam os danos oxidativos e inflamatórios (Zaabi *et al.*, 2021).

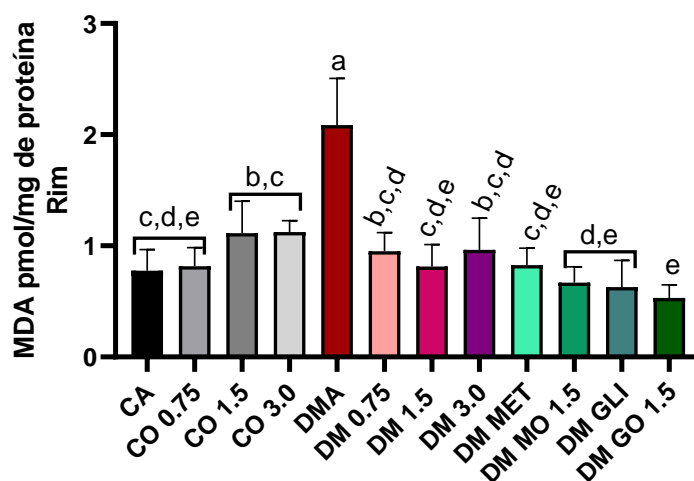
Em ratos modelos de diabetes experimental, foi observada a redução de Nrf2 renal, reduzindo a capacidade da resposta antioxidante desses animais. As atividades da glutatona redutase e SOD foram reduzidas nos ratos diabéticos. O tratamento com metformina (200 mg/kg) foi significativamente eficaz na melhoria da redução do nível de Nrf2, assim como na normalização das atividades de GR e SOD (Zaabi *et al.*, 2021). O trabalho de Jamilian *et al.*, (2017) aborda a correlação da redução de Nrf2, com a redução de GSH, do status antioxidante total e da atividade da Gpx, presente no descontrole glicêmico em pacientes diabéticos. A administração de metformina neste trabalho não foi capaz de elevar a atividade de SOD, mas aumentou a atividade da GPx no soro dos animais diabéticos, podendo ter influenciado nos níveis de GSH, bem como na GR, reduzindo os níveis de MDA.

Um estudo comparativo entre pacientes diabéticos sem e com complicações diabéticas, com acompanhamento farmacêutico durante 4 meses demonstrou que os pacientes com a presença das complicações apresentaram níveis elevados de HbA1c, glicose em jejum e MDA, sem apresentar diferença na atividade da SOD em relação aos pacientes sem complicações. A ação da metformina sobre a peroxidação lipídica nesses pacientes foi correlacionada com a inibição da formação dos intermediários reativos de oxigênio e inibição da

NADPH oxidase (Dries *et al.*, 2017). Esse achado corrobora com aos resultados apresentados, já que a metformina também não atenuou a queda da atividade de SOD.

Nos homogeneizados renais também foi realizada a determinação de MDA. O gráfico 15 apresenta as médias de MDA /mg de proteína obtidas com o homogeneizado dos rins dos animais controles e diabéticos não tratados e tratados com óleo de baru e/ou fármaco.

Gráfico 15 - Níveis de MDA pmol/mg de proteína obtidas com o homogeneizado dos rins dos animais controles e diabéticos não tratados e tratados com óleo de baru e/ou fármaco.



Fonte: do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Resultados apresentados em Média \pm DP **Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,001). O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

Os níveis de MDA entre os animais saudáveis CA e os animais que foram tratados com óleo de baru foi estatisticamente igual ($p > 0,06$), demonstrando que a ingestão do óleo de baru não elevou a formação de peróxidos lipídicos. O grupo CO 3.0 apresentou uma propensão no aumento da peroxidação lipídica, já que apresentou média de $1,224 \pm 0.46$ de MDA pmol/mg de proteína, mas ainda sem se igualar estatisticamente com o DMA. Esses dados indicam que a maior ingestão do óleo de baru pode elevar as concentrações de ácidos graxos

circulantes, e conseqüentemente contribuir para a peroxidação lipídica em animais saudáveis.

Com relação aos animais diabéticos é notória a elevação da peroxidação lipídica no grupo DMA em comparação com os animais saudáveis, com um aumento de 57,52% nos níveis de MDA ($p < 0,001$). Além disso, o efeito do tratamento do óleo de baru e dos fármacos na redução significativa do MDA nos animais diabéticos em relação ao grupo sem tratamento (DMA) foi evidente.

De acordo com os resultados obtidos pelas enzimas antioxidantes, apenas os grupos DMO 1.5 e DM MO 1.5 apresentaram elevação significativa da atividade de CAT e da Gpx em relação aos animais diabéticos sem tratamento. A melhora na atividade dessas enzimas pode ter contribuído para redução dos níveis de MDA presente no rim.

O estado hiperglicêmico é o principal agravante das complicações diabéticas, pois a exposição das células aos altos níveis de glicose, leva ao desenvolvimento de uma memória metabólica, resultando na persistência dos efeitos nocivos da hiperglicemia. Acredita-se que alguns processos moleculares, iniciados durante a exposição ao excesso de glicose, continua a progressão mesmo após a normalização dos níveis glicêmicos (Testa *et al.*, 2017). Dessa forma, os animais diabéticos sem tratamento (DMA) apresentaram uma memória metabólica maior que os animais tratados, já que os picos hiperglicêmicos nestes últimos foram menores, por conta do efeito do tratamento.

Os resultados obtidos na determinação dos níveis de MDA associado com as atividades de SOD e CAT demonstram que o óleo de baru na dose de 3,0 g/kg, além dos fármacos hipoglicemiantes isolados e em associação com o óleo de baru não elevou as atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT. Da mesma forma, o marcador de peroxidação lipídica para esses grupos foi menor, sugerindo que o nível de atividade da Gpx auxiliou na atenuação da formação de peróxidos lipídicos, já que foi a única enzima a não ter os níveis reduzidos nos respectivos grupos.

Além da Gpx ter auxiliado na redução da peroxidação lipídica, existem outros fatores que também influenciam na formação do MDA. Um dos possíveis fatores é de que a formação das EROS em cada grupo pode ter sido diferente, decorrente ao tempo de exposição a hiperglicemia, que pode influenciar na

proporção de EROS formada. Além disso, ao observar a resposta dos tratamentos na peroxidação lipídica e nos níveis de atividade das enzimas antioxidantes, pode-se deduzir a existência de um ou mais fatores adicionais auxiliando na redução dos danos oxidativos, que não envolva a alteração das enzimas.

A inclusão do óleo de linhaça 10% na ração de ratos diabéticos regulou positivamente a expressão dos genes SOD, CAT e GPx, enquanto o óleo de peixe (10%) aumentou somente a expressão do gene CAT em rins de ratos diabéticos. Para ambas as intervenções, foi observado a redução de TBARS nos rins dos animais diabéticos. A regulação das enzimas antioxidantes foi associada pelo fato dos ácidos graxos ω -3 protegerem o rim contra os efeitos patológicos da glicação, principalmente ao interromper a formação de AGEs e seus receptores. Efeito associado com a redução significativa da expressão de AGEs e RAGE pela dieta com óleo de linhaça ou óleo de peixe (Jangale *et al.*, 2016).

A amêndoa de baru contém uma série de compostos bioativos, que abrange a presença de ácidos fenólicos e compostos poliméricos como taninos. Os compostos fenólicos predominantes na castanha de baru torrada são os ácidos elágico e gálico, e derivados do ácido gálico, como ésteres de ácido gálico e galotaninos (Oliveira-Alves *et al.*, 2020). Já na identificação de fenólicos totais presentes na castanha após o processo de torra com a casca, além da predominância do ácido gálico, foram detectados a catequina, ácido ferúlico, epicatequina, ácido elágico e ácido p-cumárico. A presença desses compostos na castanha de baru foi associada a uma maior capacidade antioxidante medida pelo ensaio de eliminação de radicais livres -DPPH (Lemos *et al.*, 2012).

O trabalho de Paulo *et al.*, (2023), realizou a caracterização completa do óleo de baru, bem como a determinação dos compostos bioativos. O teor de compostos fenólicos totais foi maior que de outras fontes alternativas de óleo, como amendoim, nozes e avelã. Ademais, foi avaliado o teor de carotenóides, com $10,8 \pm 2,79 \mu\text{g } \beta\text{-caroteno g}^{-1}$, que também foi superior ao azeite, óleo de linhaça, de amendoim e de girassol. O β -caroteno é um antioxidante lipossolúvel, precursor da vitamina A e capaz de anular os efeitos das espécies oxidantes. Foi relatado que os carotenóides são eficientes na eliminação do oxigênio singlete,

além da redução dos níveis de MDA em tecidos cerebrais e cardíacos (Esrefoglu *et al.*, 2016; Stratton; Schaefer; Liebler, 1993).

O controle do equilíbrio redox é feito a partir de antioxidantes provenientes da dieta e os antioxidantes endógenos. O Nrf2 auxilia nesse controle quando ativado. Na presença do EO, o Nrf2 se dissocia da proteína 1 associada à ECH do tipo Kelch (Keap1) e se transloca para o núcleo, onde inicia a sinalização Nrf2-ARE. Essa sinalização ARE (elemento responsivo a antioxidantes) corresponde a ativação da resposta antioxidante por meio da regulação de genes protetores (Kang; Yang, 2020).

O uso de carotenoides como tratamento (12 semanas) para ratos diabéticos levou a ativação da sinalização Nrf2-ARE, com elevação dos níveis de SOD, heme oxigenase-1 e da proteína nuclear Nrf2 nos tecidos renais. Além disso, foi observado a redução da peroxidação lipídica, associado com a redução de fibronectina e colágeno IV, demonstrando que o papel antioxidante dos carotenoides atrasou o processo patológico da nefropatia diabética (Zhu *et al.*, 2018).

A associação de astaxantina, um carotenoide, com ácidos graxos ômega 3 para o tratamento de uma linhagem celular de hepatoma humano imortalizada HepG2, demonstrou que os PUFAs e a astaxantina sozinhos e em combinação protegem as células do EO, por meio da indução da via de sinalização Nrf2-ARE. As concentrações de GSH, o nível de poder antioxidante total e a expressão de mRNA de Nrf2 foram significativamente maiores nas células tratadas com carotenoide associado aos ácidos graxos ômega 3 em baixas doses (Saw *et al.*, 2013).

Considerando todas essas observações, os resultados nas atividades de SOD, CAT e Gpx, junto com os níveis de MDA observados neste estudo podem ser atribuídos aos compostos fenólicos e ácidos graxos insaturados presentes no óleo de baru, que por meio de diferentes mecanismos, contribuíram melhoria do controle glicêmico e ativação da defesa antioxidante no soro e rins dos animais diabéticos.

5.3.7 Peso absoluto e relativo dos rins.

Considerando alterações nos pesos dos rins podem ser indicativos de lesão renal (Tu *et al.*, 2019), este parâmetro foi avaliado e utilizado para o cálculo do índice renal (peso relativo).

A tabela 8 apresenta os pesos absoluto e relativo dos rins dos grupos saudáveis e diabéticos não tratados e tratados com óleo de baru e/ou fármaco.

Tabela 8 - Peso absoluto e relativo dos rins dos grupos saudáveis e diabéticos não tratados e tratados com óleo de baru e/ou fármaco

	CA	CO 0,75	CO 1,5	CO 3,0	DMA	DMO 0,75	DMO 1,5	DMO 3,0	DM MET	DM MO 1,5	DM GLI	DM GO 1,5	
Peso absoluto do Rim Direito (g)	1.084 ± 0.067 ^a	1.107 ± 0.125 ^a	1.189 ± 0.127 ^{a,c}	1.09 ± 0.132 ^a	1.471 ± 0.289 ^b	1.469 ± 0.171 ^{bc}	1.478 ± 0.136 ^{bc}	1.344 ± 0.164 ^{ab}	1.4 ± 0.171 ^{bc}	1.312 ± 0.176 ^{ab}	1.429 ± 0.159 ^{bc}	1.354 ± 0.171 ^{ab}	
Peso absoluto do Rim Esquerdo (g)	1.063 ± 0.096 ^a	1.157 ± 0.255 ^{ab}	1.183 ± 0.145 ^{ab}	1.061 ± 0.115 ^a	1.4 ± 0.197 ^b	1.42 ± 0.154 ^b	1.428 ± 0.144 ^b	1.284 ± 0.115 ^{a,b}	1.418 ± 0.125 ^b	1.305 ± 0.170 ^{ab}	1.389 ± 0.143 ^b	1.313 ± 0.114 ^{ab}	
Peso relativo dos rins (g)	0.5758 ± 0.052 ^a	0.6144 ± 0.074 ^a	0.6 ± 0.035 ^a	0.5852 ± 0.039 ^a	1.096 ± 0.024 ^b	0.9852 ± 0.093 ^{bc}	1.005 ±	0.8877 ± 0.050 ^{bc}	1.029 ± 0.122 ^c	0.8979 ± 0.121 ^{bc}	1.009 ± 0.1413 ^c	0.991 ± 0.143 ^{bc}	0.991 ± 0.158 ^{bc}

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg.

*Resultados apresentados em Média ± DP **Letras diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey. O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

O peso absoluto dos rins direito e esquerdo, além do peso relativo renal dos animais do grupo CA apresentaram um aumento significativo quando comparados com os animais diabéticos, DMA ($p < 0.01$), indicando a presença de hipertrofia renal. Ao comparar os animais saudáveis tratados com óleo e o controle água, nota-se que os pesos absolutos e relativos para todos os grupos foram estatisticamente iguais ($p > 0,90$), demonstrando novamente que a ingestão do óleo em animais saudáveis não foi capaz de alterar o peso dos rins.

Contudo, entre os animais diabéticos, aqueles que receberam o óleo na dose de 0,75 g/kg e 1,5 g/kg, não apresentaram uma diferença significativa em nenhum dos marcadores, descritos na tabela 5, em relação do DMA. Ambos os grupos foram semelhantes ao grupo DMO 3.0, indicando a tendência na redução peso e do índice renal. O efeito do tratamento do óleo na mudança do índice renal foi observado somente no grupo DMO 3.0, que apresentou uma redução de 19,06% no peso relativo dos rins, em relação ao DMA.

O tratamento com os hipoglicemiantes de forma isolada não reduziu o peso relativo dos rins nos animais diabéticos ($p > 0,05$). O efeito na redução do índice renal foi somente observado na combinação do óleo de baru com a metformina (DMMO1.5).

A hipertrofia renal é uma das primeiras alterações estruturais na nefropatia diabética, processo no qual se inicia com o crescimento das células tubulares e glomerulares. O aumento do espessamento da membrana basal tubular, expansão da cápsula de Bowman e a hiperplasia das células mesangiais e tubulares acompanham o desenvolvimento da hipertrofia renal (Habib, 2018). Essas alterações estão associadas com os níveis elevados de glicose sérica, responsáveis por aumentar a captação basolateral desta molécula por meio de GLUT1, resultando na hipertrofia celular e elevação na massa renal (Thomas, 2021).

Os dados renais obtidos nesse estudo, demonstram que o diabetes promoveu a hipertrofia dos rins durante o período de tratamento, se assemelhando a outros trabalhos que induziram a lesão renal (Tu et al., 2019; Zhu et al., 2018). De Oliveira *et al.*, (2017), afirma que a hiperglicemia leva ao aumento da relação rim/peso corporal, mas após 12 semanas de tratamento com insulina e metformina, essa relação volta ao normal, correlacionando essa

observação após atingir o controle glicêmico pela redução da HbA1c. O controle glicêmico a longo prazo é essencial para redução dos danos renais, incluindo a relação rim/peso corporal.

Tendo em vista que o peso dos rins não apresentou diferença entre os animais diabéticos tratados e não tratados com o óleo e hipoglicemiantes, ao corrigir o peso do órgão com o peso corporal, pode-se observar que o óleo na dose de 3,0 g/kg apresentou o efeito em atenuar a hipertrofia renal causada pelo diabetes.

5.3.8 Análises histológicas e histomorfométricas do rim

O rim do rato é unilobar, possuindo somente uma pirâmide medular e conseqüentemente uma papila, o que facilita a compreensão da arquitetura renal (Junqueira, 2023). Nos animais não diabéticos (controle e tratado) foi observada a zona cortical do rim, com glomérulos renais de forma arredondada, bem delimitados no interior da capsula de Bowman, e ligados a esta por um pedúnculo bem evidente localizado no polo vascular. As células glomerulares apresentam aspectos de normalidade com relação a forma e coloração do núcleo e relação núcleo plasmática.

Os capilares sanguíneos glomerulares foram evidentes e numerosos nos animais saudáveis tratados com água e óleo de baru. As porções parietais e viscerais da capsula de Bowman foram bem evidenciadas, apresentando integridade e espaço capsular mais ampliado no polo urinário e mais reduzido no polo vascular. O glomérulo encontrava-se envolvido por túbulos renais proximais, com células bem coradas e altas e o lúmen estreito, apresentando partes contorcidas e retas, e distais com células pouco coradas e baixas e o lúmen mais amplo, intercalados por vasta rede capilar.

Os túbulos estavam constituídos por células cúbicas simples com núcleos basófilos bem delimitados, arredondados, com coloração mais clara. O citoplasma se apresentava abundante, homogêneo e róseo, sendo raras as células com áreas de eosinofilia aumentada. Nos glomérulos e nos túbulos, não se evidenciou processos degenerativos ou necróticos. No Grupo controle dos animais diabéticos tratados com água (DMA), foi observado um número

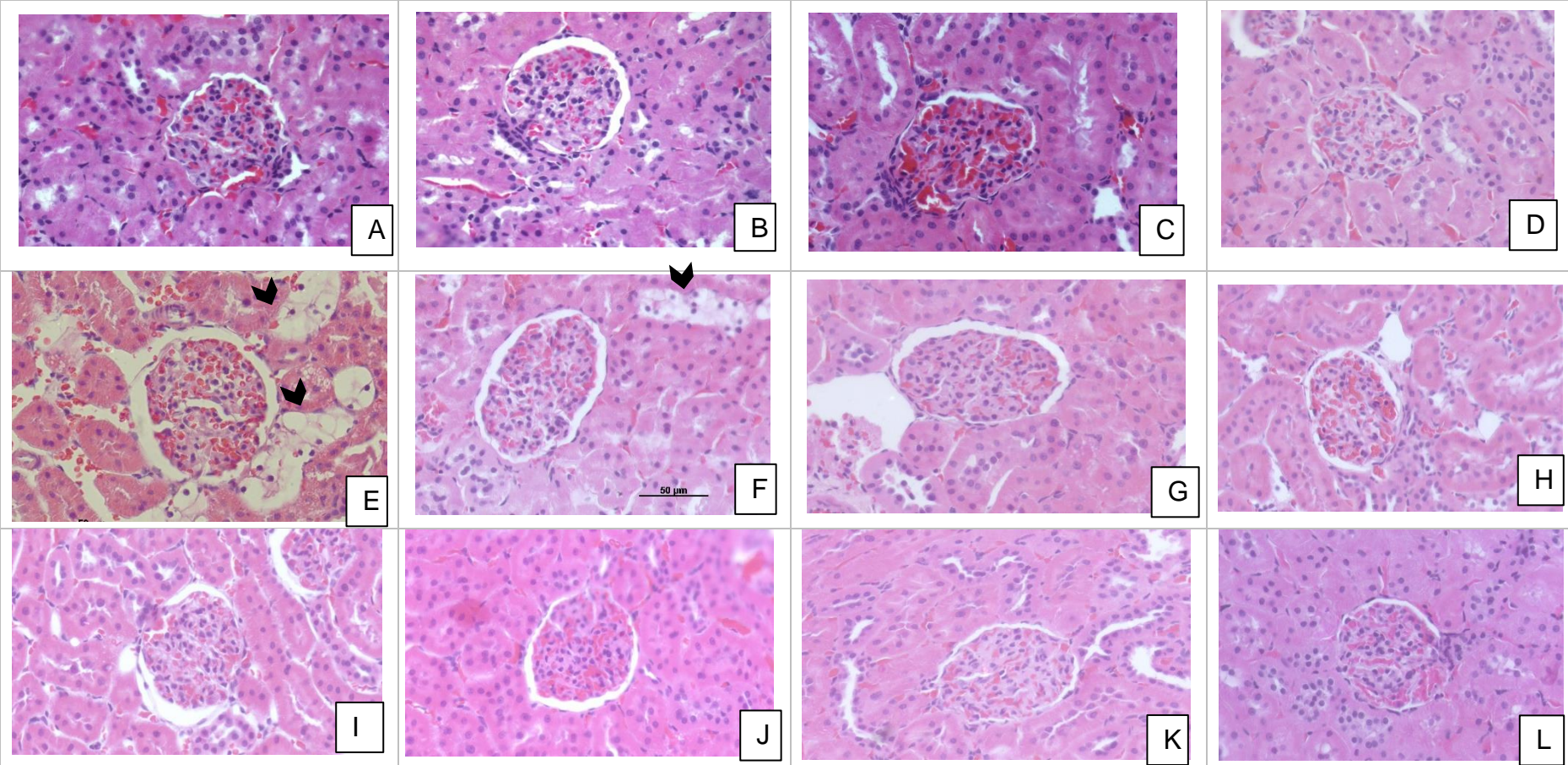
expressivo de células epiteliais tubulares tumefeitas, apresentando citoplasma vacuolizado, com núcleo mais intensamente corado e de proporções reduzidas, mantendo, no entanto, sua forma arredondada e central, as vezes ligeiramente anguloso. Algumas células apresentaram restos de citoplasma com aspecto rendilhado, tornando a célula mais esfumada e dificultando a visualização do núcleo. Alguns túbulos ao redor do glomérulo encontravam-se com luz dilatada, revestido com epitélio todo vacuolizado, com variações de pequenos e grandes vacúolos.

Ainda no grupo DMA a maioria das células com acúmulo de água apresentaram característica baloniforme, e muitas as células com vacúolos múltiplos. Encontramos também células tubulares com aumento da eosinofilia citoplasmática, sendo raro o envolvimento de todo o citoplasma. Nos glomérulos foram observadas alterações na forma, tamanho e nas características das células glomerulares, espessamento do mesângio, com o aumento evidente do espaço capsular de Bowman, glomérulos inchados e vacuolizados e sinais de glomeruloesclerose difusa, caracterizado pelos espessamento hialino do mesângio. O polo vascular de vários glomérulos apresentava a presença de grandes vacúolos. A vacuolização das células do epitélio dos túbulos tornou mais imprecisos os contornos do epitélio tubular e reduzido o lúmen. A área medular apresentou fibrose intersticial e degeneração tubular.

Já nos grupos diabéticos tratados com o óleo de baru nas três distintas doses (DMO 0,75; DMO 1,5 e DMO 3,0) foi possível observar a redução no número de células baloniformes, porém foi possível observar células tubulares com pequenos vacúolos distribuídos na região cortical. Foi notável a menor presença das alterações na forma, tamanho e contorno dos corpúsculos renais, assim como os glomérulos, e redução no espaço capsular de Bowman. Os grupos tratados com os hipoglicemiantes de forma isolada em combinação com o óleo de baru apresentaram glomérulos com a citoarquitetura mais próxima dos animais controles, possuindo os contornos do corpúsculo renal bem evidente, sendo raros os glomérulos com alteração na forma e tamanho. As células tubulares apresentaram citoplasma abundante e róseo, sem a presença de pequenos vacúolos, núcleos bem delimitados. Raros glomérulos possuíam a presença de vacúolos no polo vascular e nas células dos túbulos proximais.

Na Figura 16 estão as fotomicrografias das secções histológicas dos corpúsculos renais dos doze grupos experimentais coradas com hematoxilina e eosina no aumento de 40x.

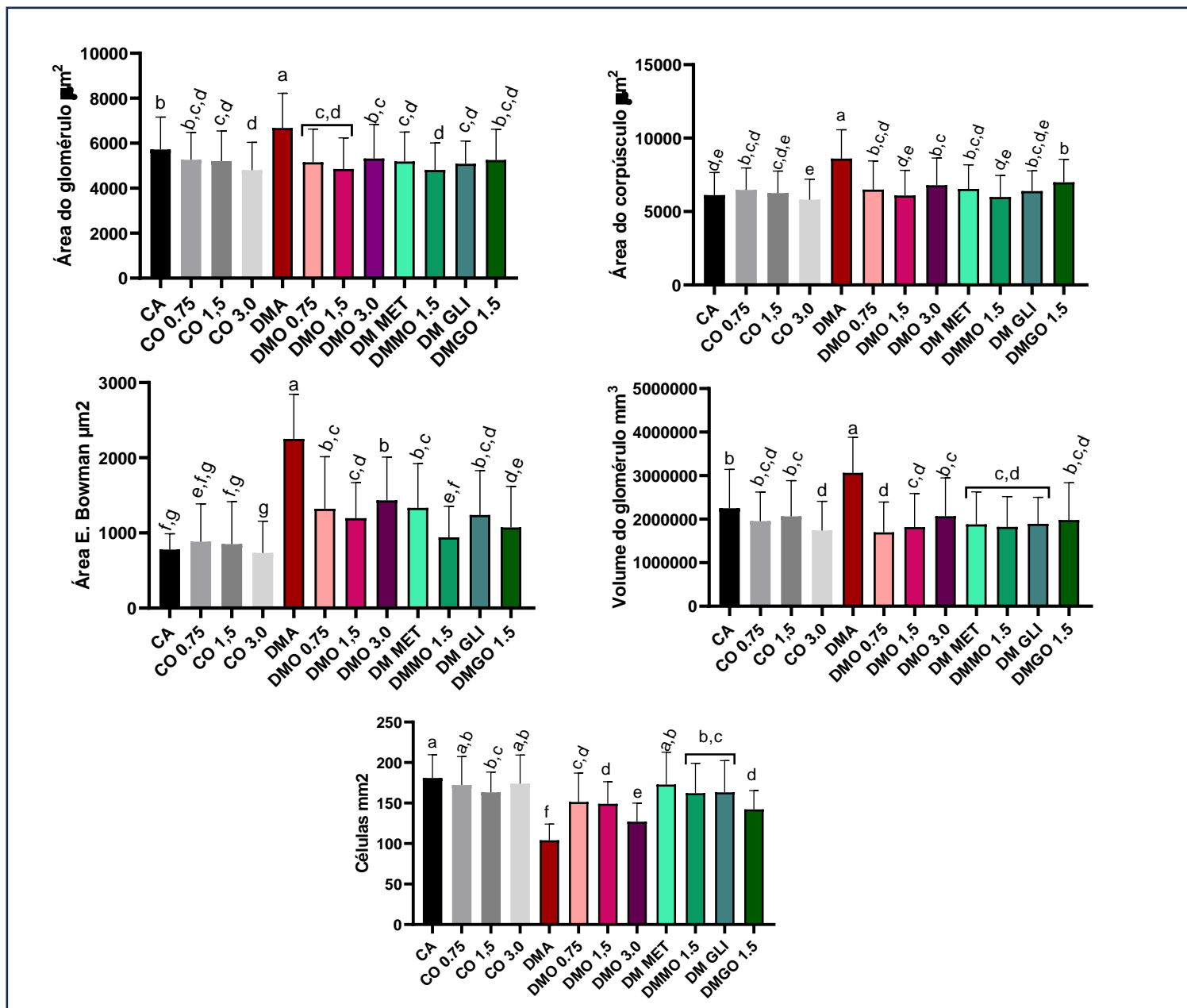
Figura 16 - Fotomicrografias das secções histológicas dos glomérulos dos grupos saudáveis e diabéticos tratados e não tratados com óleo de baru e/ou fármaco coradas com hematoxilina e eosina



Legenda: **(A)** Controle água; **(B)** Controle óleo 0,75g/kg; **(C)** Controle óleo 1,5g/kg; **(D)** Controle óleo 3g/kg; **(E)** Diabético água; **(F)** Diabético óleo 0,75g/kg; **(G)** Diabético óleo 1,5g/kg; **(H)** Diabético óleo 3g/kg; **(I)** Diabético metformina (200mg/kg); **(J)** Diabético metformina + óleo 1,5g/kg; **(K)** Diabético gliclazida (10mg/kg); **(L)** Diabético gliclazida + óleo 1.5 g/kg.
Setas: Presença de vacúolos nas células tubulares

Na figura abaixo tem-se representado as análises morfométricas do glomérulo e corpúsculo renal.

Figura 17 - Medidas morfométricas dos rins de animais saudáveis e diabéticos



Fonte: do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Resultados apresentados em Média ± DP **Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,001). O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

De acordo com as análises morfométricas do rim, observa-se que entre os animais saudáveis tratados e não tratados com o óleo de baru, não houve diferença estatística nas medidas avaliadas ($p > 0,05$). Contudo, ao comparar os animais do grupo DMA em relação ao grupo CA, foi evidente a alteração de todas as medidas glomerulares ($p < 0,001$), ressaltando a presença da lesão renal nos animais diabéticos.

O dano renal demonstrado pelas alterações histológicas dos glomérulos e túbulos renais, assim como nas medidas morfométricas nos animais do grupo DMA estão de acordo com as alterações encontradas nos marcadores bioquímicos de função renal no soro e na urina, evidenciado pela presença de albuminúria e elevação da ACR. Semelhante aos trabalhos na literatura, a elevação dos níveis de creatinina e albuminúria, acompanham as alterações estruturais observadas no rim de animais diabéticos (Glastras *et al.*, 2016; Jangale *et al.*, 2016; Soetikno *et al.*, 2011; Zaabi *et al.*, 2021).

O aumento significativo da área do glomérulo, do volume glomerular, assim como do corpúsculo e área de Bowman evidencia a presença da hipertrofia glomerular. A redução no número de células no interior do glomérulo no grupo DMA, se deve a elevação da área glomerular. A nefropatia diabética é bem caracterizada pelo acúmulo de matriz extracelular no tecido renal, sendo que o primeiro estágio de progressão da lesão tecidual é a hipertrofia glomerular seguida da inflamação dos glomérulos e túbulos renais (Wada; Makino, 2013).

O crescimento renal é muito observado no diabetes experimental, sendo que a fase inicial é caracterizada pela hiperplasia seguida por uma transição para hipertrofia. A ativação da via da PKC pela hiperglicemia, leva ao aumento da expressão da proteína quinase C $\beta 1$ (PKC $\beta 1$), relacionada com a hipertrofia dos glomérulos e túbulos renais (Blantz; Singh, 2014). Um estudo com animais diabéticos demonstrou a elevação na expressão de PKC $\beta 1$ e de TGF- β nos rins, somado as alterações histológicas, sugerindo que a ativação da via de sinalização da isoforma PKC- β no estado diabético contribui diretamente na elevação do TGF- $\beta 1$, citocina profibrótica (Soetikno *et al.*, 2011). Logo, a ativação desses fatores no diabetes contribui para hipertrofia e fibrose tecidual.

A morfologia renal em modelos de DM2 é bem abordada na literatura, dentre as principais alterações na estrutura do tecido renal após a indução do diabetes estão aumento na área e volume glomerular, acúmulo de matriz

mesangial, apagamento dos podócitos, atrofia, degeneração e necrose tubular, presença de núcleos picnóticos, citoplasma das células epiteliais com vacúolos irregulares, espessamento das membranas basais, espessamento da parede vascular, inflamação intersticial (Ayaz *et al.*, 2023; Glastras *et al.*, 2016; Jangale *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2021).

A alteração no metabolismo lipídico de animais diabéticos, com a presença da hiperlipidemia e hipertrigliceridemia foi associada a presença dos vacúolos tubulares renais. O aumento no colesterol total e no colesterol não-HDL em animais diabéticos levou ao aumento da deposição lipídica renal em modelos de DM2 experimental (Glastras *et al.*, 2016). A determinação de triglicerídeos, ácidos graxos, éster de colesterol e fosfolipídios no rim de ratos diabéticos demonstrou que o acúmulo de lipídios no rim é causado por ésteres de colesterol e fosfolipídios (Declèves *et al.*, 2014).

Os animais diabéticos tratados com o óleo de baru em todas as doses, assim como os grupos que receberam os hipoglicemiantes, apresentaram para área do glomérulo, do corpúsculo e da capsula de Bowman e o volume glomerular valores estatisticamente menores em relação ao grupo DMA ($p < 0,001$). O número de células no interior do glomérulo, de todos os grupos diabéticos tratados com o óleo e/ou hipoglicemiantes, também apresentaram uma elevação significativa em relação ao grupo DMA. Esses resultados sugerem a capacidade do óleo de baru e dos hipoglicemiantes em impedir a evolução da hipertrofia nos rins dos ratos diabéticos.

No trabalho de Jangale *et al.*, (2016) a suplementação da dieta de ratos wistar diabéticos com óleo de linhaça e óleo de peixe reduziu significativamente as alterações morfológicas nos rins. A ausência de necrose e redução do espessamento da parede vascular, assim como da inflamação intersticial foi observada nos animais diabéticos com a dieta suplementada. O efeito protetivo do óleo de linhaça e peixe, na redução da progressão da nefropatia diabética foi atribuída a regulação positiva das enzimas antioxidante, SOD, CAT e Gpx, bem como a inibição de NF- κ B p65 e IL-6.

Em um trabalho com a administração do óleo de *Nigella sativa*, para animais diabéticos durante 56 dias, levou a aparência normal das estruturas glomerulares e tubulares renais, sem evidências de atrofia, necrose tubular e ausência de vacúolos no córtex renal. O tratamento com metformina na dose de

100 mg/kg, levou a redução parcial das alterações histológicas, sendo relatado a presença de necrose nas células tubulares, fibrose intersticial e irregularidades nas membranas basais. O efeito renoprotetor do óleo da *Nigella sativa* e metformina foram associados à redução do estresse oxidativo e apoptose celular, através da redução da Bax e caspase 3 e 9 (Ayaz *et al.*, 2023)

Em relação aos tratamentos com o uso dos hipoglicemiantes em isolado e associado com o óleo de baru, nota-se o efeito semelhante entre esses grupos, já que todos apresentaram redução da área do glomérulo e corpúsculo renal, bem como do volume glomerular, comparado com o grupo sem tratamento (DMA). Na área da capsula de Bowman, verifica-se que os grupos DMMO 1,5 e DMGO 1,5 apresentaram maior redução na área do que os grupos que receberam o hipoglicemiante de forma isolada ($p < 0,05$), sendo estatisticamente semelhante ao grupo CA.

O estudo de Sun *et al.*, (2021) demonstra o efeito da metformina (200 mg/kg) em reduzir a hipertrofia glomerular, o acúmulo da matriz mesangial e o espessamento da membrana basal glomerular em camundongos diabéticos. Nesses animais, os níveis de fibronectina, IL-1 β e TNF- α , foram reguladas negativamente nos rins dos camundongos após o tratamento com a metformina. Além disso, os autores observaram a redução da expressão de Bax e da coloração de TUNEL, marcadores de células apoptóticas, como também da coloração de DHE, marcador de oxidação, nos rins dos animais tratados com metformina. Logo, a metformina foi capaz de inibir a apoptose induzida por EROs por controlar as reações de oxidação como também atenuar o estado inflamatório.

Já é bem estabelecido na literatura a ação da metformina na ativação da AMPK (Kristensen *et al.*, 2014). A administração do ativador da AMPK foi capaz de reduzir a área glomerular, os vacúolos tubulares e reestabelecer a estrutura histológica do rim na doença renal induzida pela dieta hiperlipídica. Além disso, a ativação da AMPK reduziu a albuminúria, os níveis de H₂O₂ na urina e a expressão de moléculas pró-inflamatórias no rim, como também modificou a atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGCR), regulando a síntese do colesterol e impedindo o acúmulo de lipídeos (Declèves *et al.*, 2014).

Os grupos que receberam metformina neste estudo, apresentaram redução significativa na albuminúria, assim como no nível de colesterol não HDL,

semelhante ao observado por Declèves *et al.*, (2014). O efeito da metformina na ativação da AMPK, e seu efeito protetor nas lesões renais, também apresentadas neste estudo, contribuiu para o atraso na evolução da doença renal nos animais diabéticos.

O tratamento com gliclazida em ratos modelos de DM2 induzido por dieta rica em colesterol associada a STZ, demonstrou a ação deste medicamento em melhorar a expansão da matriz mesangial e diminuir a infiltração de macrófagos glomerulares em ratos diabéticos. O efeito da gliclazida na nefropatia diabética foi associado a capacidade de eliminação de EROs através de sua estrutura de anel azabicyclo-octil, supressão de NADPH oxidase, regulação positiva de MnSOD e supressão da molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) (Onozato *et al.*, 2004).

A avaliação da gliclazida na nefrotoxicidade em animais com lesão renal aguda, enfatiza a melhoria na ureia, creatinina e principalmente na redução da apoptose via caspase-3, da inflamação, pela determinação de NF- κ B e redução do estresse do retículo endoplasmático, associados com a manutenção da estrutura histológica do rim (Taghizadeh *et al.*, 2020).

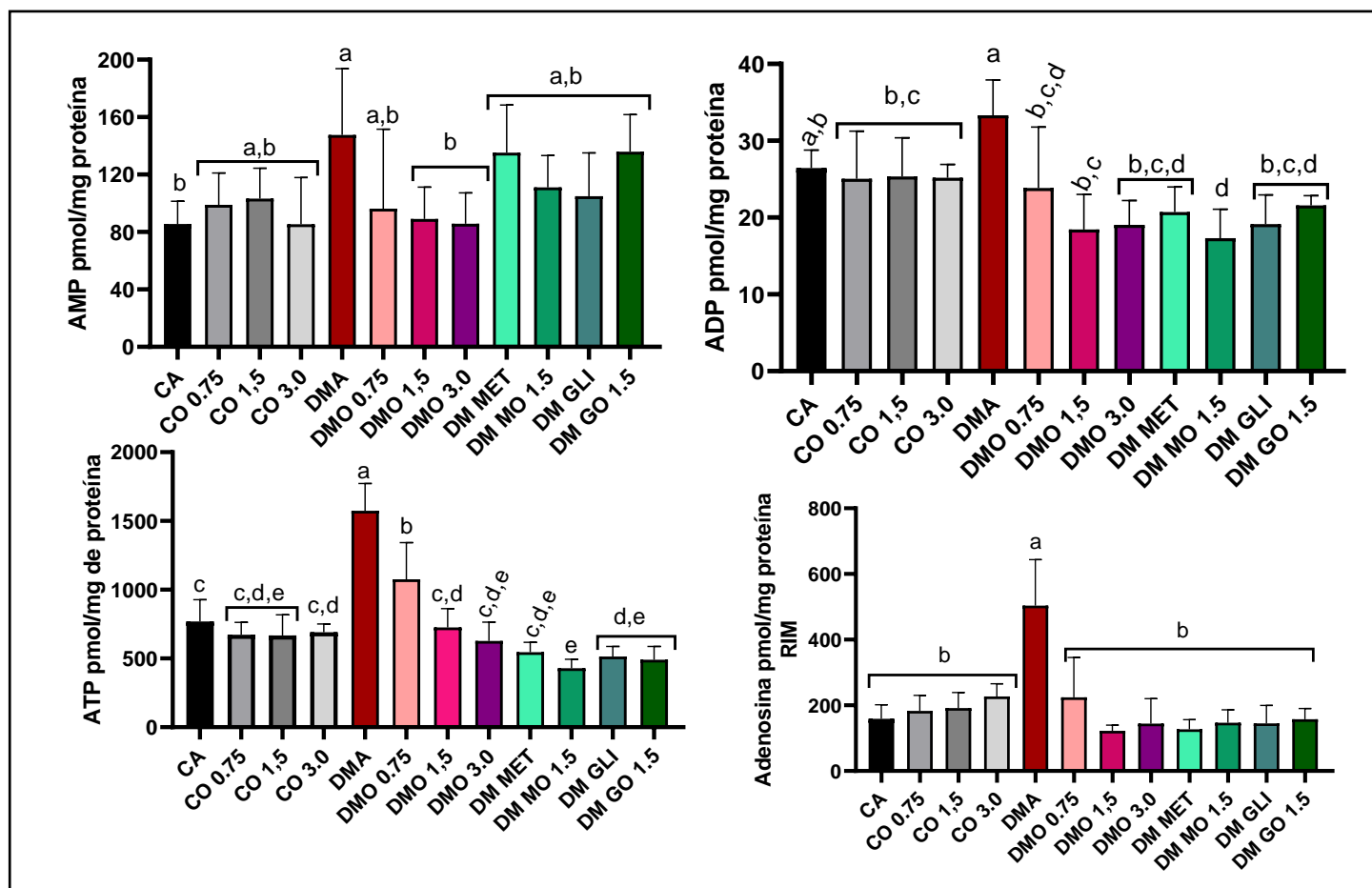
Conforme observado nos resultados deste trabalho, o óleo de baru apresentou efeito protetor na redução das atividades das enzimas antioxidantes, além de reduzir significativamente os níveis de MDA, o que indica a redução do estresse oxidativo.

5.3.9 Efeito do óleo de baru nas vias metabólicas das células renais

Como citado anteriormente, a hiperglicemia leva a alterações nas vias metabólicas, levando as alterações no metabolismo de carboidratos e lipídios, como também promove a ativação de vias alternativas (Ahmad; Draves; Rosca, 2021). Tendo isso em vista, alguns metabólitos intracelulares foram avaliados.

A Figura 18 demonstra a determinação nos níveis de AMP, ADP e ATP nos animais saudáveis e diabéticos.

Figura 18 - Níveis de AMP, ADP e ATP de animais controle e diabéticos tratados e tratados com óleo de baru e/ou fármaco



Fonte: do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Resultados apresentados em Média \pm DP **Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,001). O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

Nota-se na Figura 18, que não houve diferença estatística nos níveis da adenosina isolada e das adenosinas ligadas ao fosfato, do metabolismo energético (AMP, ADP e ATP) entre os animais saudáveis ($p > 0,05$). Entre os animais do grupo CA e DMA, foi observado um aumento significativo de adenosina, AMP e ATP nos animais diabéticos em relação aos saudáveis ($p < 0,001$).

Os tratamentos com o óleo de baru e os hipoglicemiantes isolados e associados com o óleo, reduziram significativamente os níveis de adenosina, ADP e ATP dos animais diabéticos, sendo estatisticamente iguais à média obtida

pelos animais controles. Somente para o AMP, o tratamento com os hipoglicemiantes não reduziu os níveis desse marcador em relação ao grupo DMA, no entanto, eles ainda foram estatisticamente iguais aos animais saudáveis.

A quantificação de AMP, ADP e ATP estão envolvidas no estado energético e no metabolismo de nucleotídeos (Wang *et al.*, 2021). De Oliveira *et al.*, (2017), relataram que os níveis desses metabólitos em isolado não foram diferentes entre animais saudáveis e diabéticos, com tratamento de 12 semanas. Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo, foram semelhantes aos observados por Wang *et al.*, (2021), em que a distribuição da quantificação de AMP, ADP e ATP foram significativamente elevados no córtex renal de animais modelos de DM2.

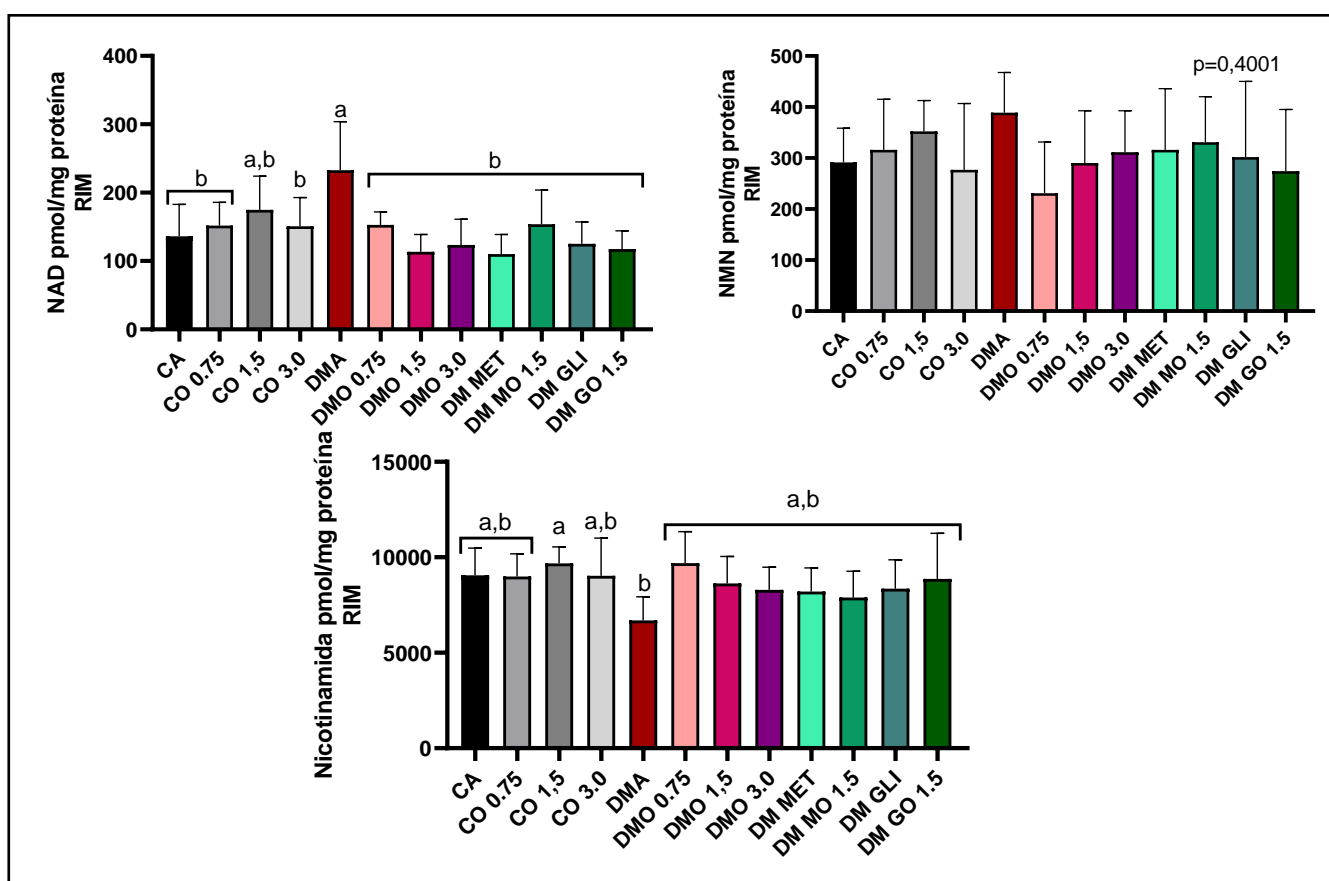
O ATP pode ser hidrolisado em ADP e AMP por CD39 (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase) ou NTPDase1 (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-1), assim como o AMP é convertido em adenosina pela ação da CD73 (5'-ectonucleotidase), todos expressos no rim (Kishore; Robson; Dwyer, 2018). A elevação dos níveis dessas adenosinas está associada a desregulação de ATPases no diabetes não controlado, levando a hiperfunção dos rins, como aumentos na TFG e reabsorção de sódio e água e bem como alteração da atividade da bomba Na + /K + ATPase (Katyare; Satav, 2005).

As adenosinas produzidas desde a geração do ATP até a formação de adenosina, pelo eixo CD39-adenosinérgico, regula o equilíbrio entre a atividade dos receptores purinérgicos nas células renais. Como consequência da alteração dos níveis de adenosina em animais diabéticos, alteram o transporte tubular de água e sódio e a secreção de renina, via ativação do receptor adenosina A1, elevação de Ca^{2+} citosólico nas células mesangiais extraglomerulares, todos esses fatores contribuem para evolução da lesão renal (Kishore; Robson; Dwyer, 2018).

Outra via de lesão tecidual é por meio da ativação crônica dos receptores purinérgicos adenosina A2, capazes de induzir a fibrose nos rins (Roberts *et al.*, 2014). Em um trabalho com animais deficientes de adenosina desaminase, a elevação crônica de adenosina levou ao desenvolvimento de glomérulo esclerose e fibrose intersticial nos tecidos renais. O tratamento com o inibidor seletivo do receptor adenosina A2 atenuou a fibrose renal (Dai *et al.*, 2011).

Semelhante ao observado neste trabalho, os níveis de adenosina em glomérulos de ratos diabéticos foram significativamente elevados em relação aos animais controle. Além da determinação da adenosina, os níveis de albuminúria e a presença de alterações histológicas foram maiores nos ratos diabéticos (Tak *et al.*, 2014). Neste trabalho, verificamos que o tratamento com o óleo de baru e os hipoglicemiantes foram capazes de atenuar os níveis de adenosina, bem como a albuminúria e os demais marcadores de lesão renal. A Figura 19 demonstra a determinação nos níveis da nicotinamida, NAD, NMN de animais controle e diabéticos.

Figura 19 - Níveis de NAD, NMN e nicotinamida no rim de animais saudáveis e diabéticos tratados e tratados com óleo de baru e/ou fármaco



Fonte: do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Resultados apresentados em Média \pm DP **Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,001). O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

Na figura 19, os níveis de nicotinamida mononucleotídeo (NMN) não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais. Contudo, para o NAD, observa-se a elevação significativa dessa molécula nos animais do grupo DMA em relação aos animais saudáveis ($p > 0,001$). Todos os tratamentos, seja com o óleo de baru e/ou hipoglicemiantes foram capazes de impedir a elevação de NAD nos animais diabéticos.

Os níveis de nicotinamida (NAM) entre os animais diabéticos e controle, também não apresentaram diferença estatística. Porém, é importante destacar a tendência na redução da nicotinamida no grupo DMA, já que apresentou média inferior aos demais grupos. Os animais diabéticos tratados apenas com água, apresentaram níveis estatisticamente diminuído em relação ao Grupo CO 1.5.

A nicotinamida, também conhecida como vitamina B3 é um nutriente proveniente da alimentação ou de reações de reciclagem após o consumo de NAD⁺. A Nicotinamida é metabolizada em mononucleotídeo de nicotinamida (NMN), pela nicotinamida fosforibosiltransferase. A NMN, por sua vez é convertida em NAD via mononucleotídeo de nicotinamida adenililtransferase (NMNATs) (Fletcher *et al.*, 2017). O NAD⁺ é um cofator importante nas reações redox, essencial no fornecimento de energia e substrato de enzimas importantes, como Sirtuínas, poli-ADP-ribose-polimerases (PARPs) e CD38. Essas enzimas são grandes consumidoras de NAD⁺, tendo influências no equilíbrio entre consumo e biossíntese desta molécula (Wang *et al.*, 2023).

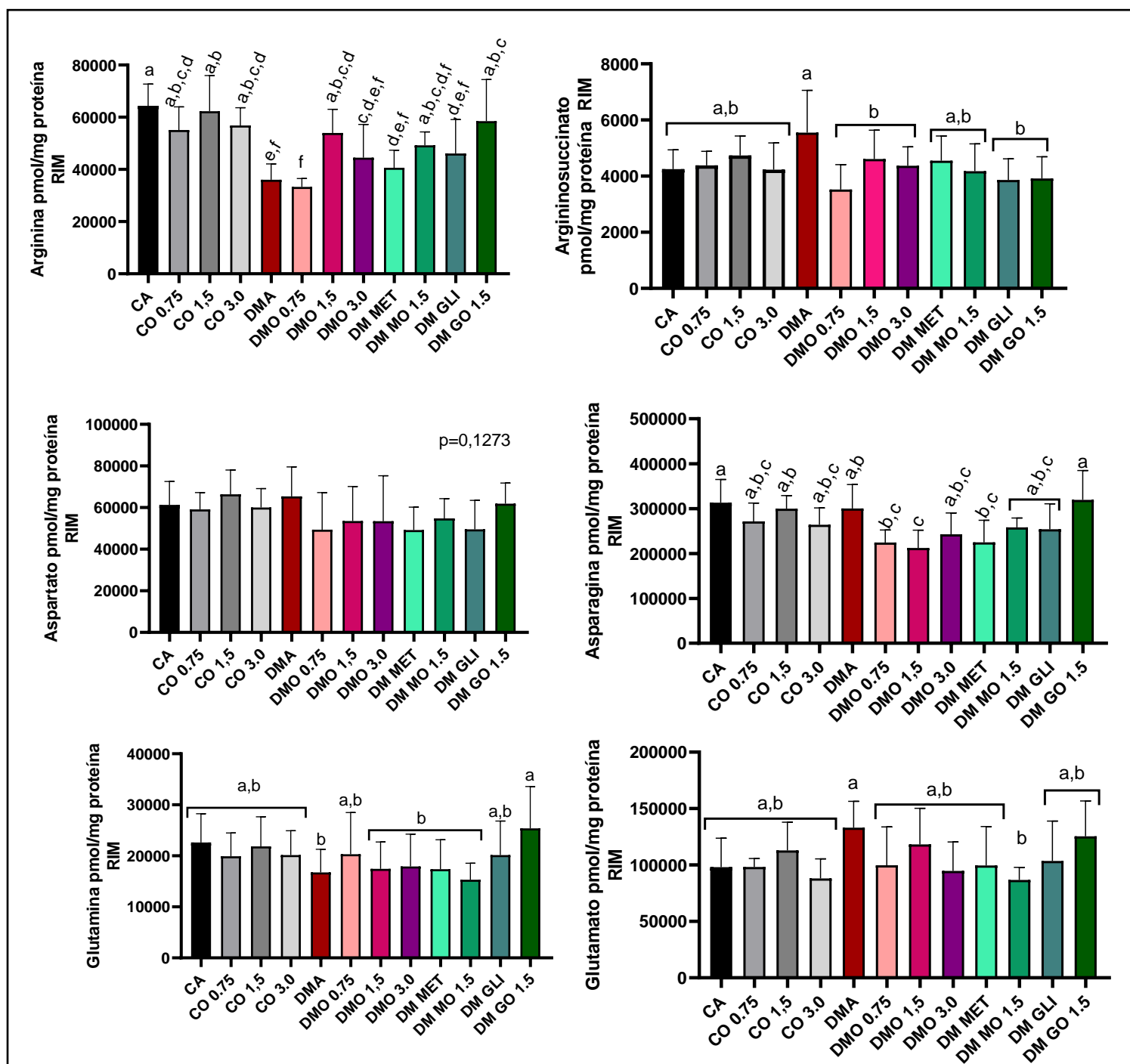
Estudos demonstram que os níveis de NAD⁺ e nicotinamida renal no diabetes apresentam-se reduzidos na lesão renal aguda (Liu *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023). Em camundongos diabéticos, a redução do NAD⁺ renal foi associada a inibição de enzimas renoprotetoras, contribuindo para o início e progressão da lesão renal (Liu *et al.*, 2023). Contudo, um protocolo usando camundongos com nefropatia diabética, durante 24 semanas, demonstrou que a da concentração de NAD, NMN e nicotinamida no rim não diferiu entre camundongos diabéticos e saudáveis (Yasuda *et al.*, 2021).

O NAD⁺ e sua forma reduzida NADH participam de vários processos metabólicos, como a glicólise, complexo piruvato desidrogenase, ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa (Yang; Sauve, 2016). No estado hiperglicêmico, a demanda de NAD⁺ e NADH é elevada, devido a hiperativação de vias metabólicas alternativas, elevando os níveis de aceptores de elétrons na cadeia

transportadora de elétrons (CTE) da mitocôndria (Ahmad; Draves; Rosca, 2021; Darenskaya; Kolesnikova; Kolesnikov, 2021). O excesso de doadores de elétrons gerados (NADH e FADH₂) para a CTE, promove o escape dos elétrons, aumentando a produção de EROs (Sifuentes-Franco *et al.*, 2017). Dessa forma a redução da relação NAD⁺ / NADH está associada ao aumento da produção de EROs (Yang; Sauve, 2016). A fim de regular a demanda por NAD⁺, a enzima NMNATs é regulada positivamente, levando a conversão de NMN à NAD⁺, assim como o NAD é reciclado em diversas reações metabólicas e celulares (Yasuda *et al.*, 2021). Neste trabalho, os níveis de nicotinamida e NMN foram iguais para ratos diabéticos e saudáveis, sendo observado somente o aumento de NAD⁺ nos ratos diabéticos sem tratamento. De acordo com os estudos supracitados, a elevação de NAD⁺ e a tendência na diminuição de NMN no grupo DMA pode ser decorrente a demanda de NAD na CTE e nas vias metabólicas ativadas. A avaliação das enzimas reguladoras das nicotinamidas seria importante para elucidar a variação na concentração dessas moléculas.

Além das nicotinamidas, foram determinados os metabólitos e aminoácidos arginina, asparagina, aspartato, agrininosuccinato, gluamato e glutamina, presentes nas vias metabólicas do ciclo da ureia e no metabolismo de glutamato (Figura 20).

Figura 20 - Níveis da arginina, asparagina, aspartato, agrininosuccinato, gluamato e glutamina de animais controle e diabéticos



Fonte: do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Resultados apresentados em Média \pm DP **Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,001). O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

A determinação de arginina nos rins dos animais saudáveis, não apresentou diferença significativa entre o grupo CA e os demais grupos que receberam o óleo de baru ($p > 0,05$). Porém, o diabetes levou a redução significativa dos níveis de arginina no grupo DMA em relação aos animais saudáveis ($p < 0,01$).

O tratamento do óleo de baru foi capaz de impedir a redução de arginina nos rins dos animais diabéticos somente na dose de 1,5 g/kg. O grupo DMO 3.0 apresentou uma tendência em atenuar a queda de arginina, porém ainda foi estatisticamente igual ao DMA. O mesmo foi observado nos animais diabéticos tratados com metformina e gliclazida isoladamente. A combinação do óleo de baru com a metformina e a gliclazida, respectivamente, foi capaz de elevar os níveis de arginina nos animais diabéticos. Ambos grupos apresentaram níveis de arginina estatisticamente igual ao grupo controle.

Os níveis de aspartato não apresentaram diferença estatística entre os grupos experimentais ($p = 0,1273$). Já os níveis de asparagina, argininosuccinato, glutamato e glutamina não apresentaram diferença estatística entre os animais diabéticos e controles ($p > 0,05$).

A arginina é um aminoácido envolvido no metabolismo do ciclo da ureia, bem como relacionados à via metabólica arginina-creatina e da metilação da arginina (Benito *et al.*, 2016). Nos estudos sobre a relação da arginina na síndrome metabólica, são encontradas diferentes relações entre ela e os seus produtos de metabolização. Cao *et al.*, (2019) observou níveis aumentados de arginina no soro em pacientes DM2 recém-diagnosticado. Wang *et al.*, (2023) também relatou a elevação dos níveis de arginina na saliva em pacientes com DRD em relação aos pacientes saudáveis. Contudo, também há trabalhos que demonstram a redução dos níveis de arginina no soro de pacientes diabéticos, e o aumento de dimetilarginina assimétrica (ADMA), produto da metilação da arginina, ambos associados com as complicações microvasculares no DM2 (Ganz *et al.*, 2017; Menge *et al.*, 2010). A redução nos níveis de arginina foi relacionada ao aumento da atividade da arginase tecidual, enzima responsável pela hidrólise de arginina em ornitina (GANZ *et al.*, 2017).

A arginina está envolvida na síntese de NO, já que é substrato da enzima óxido nítrico sintetase (ciclo Cirtulina-NO) e a ADMA age como inibidor competitivo na síntese de NO, promovendo efeitos aterogênicos e contribuindo

para disfunção endotelial (Luiking *et al.*, 2012). Em animais diabéticos induzidos por STZ, a redução da arginina plasmática foi associada ao aumento da captação hepática de arginina e diminuição da biodisponibilidade de NO na medula renal. A administração de L-arginina aumentou os níveis de NO em ratos diabéticos (Palm *et al.*, 2008).

Ganz *et al.*, (2017) correlaciona os baixos níveis de arginina em pacientes diabéticos, como preditor da nefropatia, devido ao comprometimento microvascular no diabetes decorrente do desbalanço metabólico da arginina e as vias metabólicas as quais ela está envolvida. Foi demonstrando que a inibição de arginase em camundongos diabéticos atenuou significativamente os níveis de creatinina, albuminúria e ureia, como também reduziu os danos vasculares, endoteliais e renais, com a atenuação do estresse oxidativo e redução no bloqueio de eNOS (You *et al.*, 2013). Neste estudo, os níveis de arginina nos rins de animais diabéticos foram menores em relação ao controle, e o tratamento do óleo de baru associado com os hipoglicemiantes foi capaz de atenuar a redução da arginina. Tendo em vista que o estado hiperglicêmico acelera a degradação metabólica da arginina, reduzindo a biodisponibilidade do NO e contribuindo para o insulto microvascular da nefropatia diabética, sugere-se que o óleo de baru foi capaz de regular os níveis de arginina, contribuindo na atenuação dos danos renais como observado nos marcadores bioquímicos da função renal.

Com relação aos níveis de asparagina e aspartato, ambos aminoácidos podem ser convertidos um no outro com a flutuação no metabolismo. Pela ação da asparagina sintetase, o aspartato é convertido em asparagina, enquanto a asparaginase catalisa a conversão de asparagina em aspartato (Luo *et al.*, 2020). A via aspartato / asparagina exerce um papel importante na geração de substratos no ciclo de Krebs, já que o aspartato é transaminado em oxaloacetato e glutamato (Gravina *et al.*, 2022). No diabetes, a homeostase do aspartato e asparagina sofre alterações mais significativas no início do desenvolvimento da síndrome metabólica. A determinação de asparagina no soro de pacientes diabéticos, demonstrou a perturbação do metabolismo da asparagina, isoleucina, valina e L-metionina, com a regulação positiva no início e na progressão do diabetes (Zhu *et al.*, 2022). O desequilíbrio nos níveis de asparagina e aspartato no soro de pacientes normoglicêmicos contribuiu para o risco aumentado de DM2, tendo em vista que a asparagina pode suprimir a

fosforilação da AMPK, contribuindo para o aumento da resistência à insulina (Luo *et al.*, 2020; Wang, Shuangyuan *et al.*, 2022). Não foram encontrados trabalhos que abordam a avaliação do perfil metabólico de aminoácidos da via asparagina e aspartato no tecido renal de animais saudáveis ou diabéticos. De acordo com os dados apresentados, o desequilíbrio das vias metabólicas e níveis dos aminoácidos são avaliados como biomarcadores e preditores do DM2, sendo identificados no período inicial do diabetes (Wang, Shuangyuan *et al.*, 2022; Zhu *et al.*, 2022). Este estudo é o primeiro a determinar os níveis renais de asparagina e aspartato no rim de ratos saudáveis e em modelo de DM2 sem e com tratamento. Foi demonstrado que os níveis de asparagina e aspartato não diferiu entre ratos controles e diabéticos, indicando que a homeostase de ambos metabólitos não se encontra alterada no rim de animais diabéticos, no período mais avançado do diabetes.

A arginina está correlacionada à glutamina, já que a conversão intestinal da glutamina leva à liberação de citrulina pelo intestino, que, após ser captada pela corrente sanguínea, é convertida pelos rins em arginina (Lighthart-Melis *et al.*, 2008). A glutamina é um aminoácido que desempenha um papel crucial como substrato energético na proliferação celular, antioxidante e anti-inflamatório, nas quais podem ser responsáveis pelos seus efeitos nefroprotetores na DKD (Li *et al.*, 2023). Além disso, a glutamina também é precursora do glutamato, por ação da enzima glutaminase no rim, fígado e cérebro. Este último aminoácido está presente em muitas vias metabólicas, também sendo formado na mitocôndria pela aminação redutiva do intermediário α -cetoglutarato (α -KG) do ciclo de Krebs pela glutamato desidrogenase e no citosol pela reação catalisada pela aspartato aminotransferase (AST) entre o aspartato e α -KG para produzir oxaloacetato (Fletcher *et al.*, 2017). A glutamina e o glutamato participam da formação do GSH, através da via glutamina-glutationa, desempenhando um papel significativo no sistema antioxidante (Nasri *et al.*, 2023).

No rim, o transportador de aminoácidos excitatórios (EAAC) está envolvido com a reabsorção de glutamato e glutamina, desempenhando um papel importante no controle dos aminoácidos no tecido renal (Du; Li; Li, 2016). A elevação de glutamato nos rins leva ao aumento da TFG, e da reabsorção tubular de Na, K e água, devido aos receptores e transportadores de glutamato (Mahieu *et al.*, 2016). Danos significativos nos glomérulos renais e o aumento do

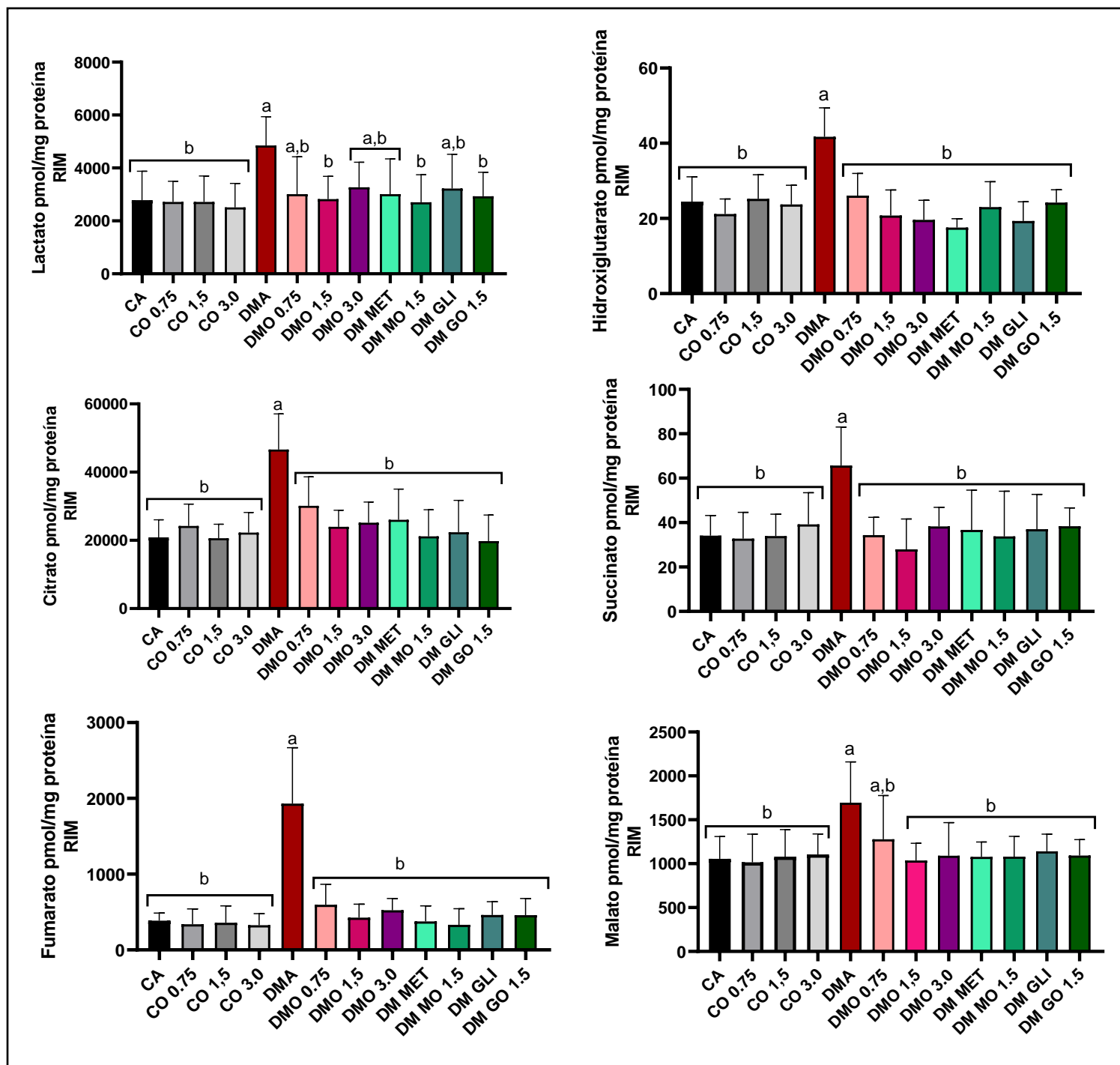
tamanho do espaço de Bowman, são alterações decorrentes do efeito do excesso de glutamato nos rins de ratos wistar (Du; Li; Li, 2016).

A avaliação de aminoácidos no córtex renal de camundongos diabéticos, demonstrou que os níveis de arginina e glutamina foram significativamente reduzidos durante o protocolo com 8 semanas. O tratamento com um medicamento antimalárico foi capaz de restabelecer os níveis dos aminoácidos alterados (Rong *et al.*, 2022). Em indivíduos com risco metabólicos, os níveis de glutamina estão reduzidos no soro dessa população, sendo que o excesso de glutamina em relação ao glutamato na circulação tem sido associado a um risco reduzido de diabetes futuro (Cheng *et al.*, 2012). Em pacientes diabéticos, os níveis de glutamina e glutamato refletem a lesão renal, demonstrando ser um marcador do diagnóstico precoce da DRD, já que a redução da glutamina e aumento de glutamato estavam presente nos indivíduos com a presença da albuminúria (Li *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2019). A reposição de glutamina como tratamento para animais diabéticos demonstrou ser eficaz na melhoria da nefropatia diabética, regulando as atividades e expressão das enzimas antioxidantes renais (Nasri *et al.*, 2023). Todos esses estudos, destacam a propriedade da glutamina na modulação do estado redox do estado inflamatório do DM2 (Cheng *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2023; Rong *et al.*, 2022).

Na literatura, os trabalhos abordam somente a associação das alterações dos aminoácidos no estágio inicial das complicações diabéticas, estando atrelado como marcador precoce da doença renal diabética (Liu *et al.*, 2019). Neste trabalho não foi encontrada diferença nos níveis de glutamina e glutamato entre ratos diabéticos e saudáveis, sendo observada somente uma tendência da redução de glutamina e elevação do glutamato. Contudo essa observação pode estar relacionada ao estágio da lesão renal o diabetes, já que os níveis de creatinina encontram-se alterados, não correspondendo ao estágio inicial da disfunção renal.

Os aminoácidos desempenham importantes papeis por estarem associados a diferentes vias metabólicas, sendo precursores e/ou produtos dos intermediários do ciclo de Krebs (Gravina *et al.*, 2022). Neste trabalho também foi realizado as determinações de alguns intermediários do ciclo de Krebs, hidroxiglutarato e do lactato (Figura 21).

Figura 21 - Níveis de lactato, hidroxiglutarato e dos intermediários do ciclo de Krebs no rim de animais saudáveis e diabéticos



Fonte: do autor

Legenda: CA= controle água, CO 0,75= controle óleo 0,75 g/kg, CO 1,5= controle óleo 1,5 g/kg, CO 3,0= controle óleo 3,0 g/kg, DMA= diabético água, DMO 0,75 =diabético óleo 0,75 g/kg, DMO 1,5= diabético óleo 1,5 g/kg, DMO 3,0= diabético óleo 3,0 g/kg, DM MET= Diabético metformina 200 mg/kg, DM MO 1,5= diabético metformina e óleo 1,5 g/kg, DM GLI: Diabético gliclazida 10 mg/kg, DM GO 1,5= diabético gliclazida e óleo 1,5 g/kg. Resultados apresentados em Média \pm DP **Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,001). O número de animais (n) para cada grupo variou entre seis (6) e oito (8).

Os níveis de hidroxiglutarato e lactato nos animais saudáveis não apresentou diferença estatística entre os grupos tratados com água e com o óleo de baru, demonstrando que o óleo de baru em animais saudáveis não levou a alteração no metabolismo glicolítico dos ratos wistar. Já com relação aos animais do grupo DMA, observasse a elevação significativa nos níveis de hidroxiglutarato e lactato em relação aos animais controle e aos demais tratamento dos animais diabéticos.

O tratamento com o óleo de baru na dose de 1,5 g/kg de forma isolada e em associação com a metformina e gliclazida levou a redução significativa dos níveis de lactato em relação aos animais do grupo DMA. Já para o hidroxiglutarato todos os grupos tratados com o óleo de baru e os hipoglicemiantes apresentaram redução significativa deste metabólito em relação ao grupo DMA ($p < 0,001$).

Os níveis dos intermediários do ciclo de Krebs (citrato, succinato, fumarato e malato) no rim, apresentaram comportamentos semelhantes nos animais controles e diabéticos. O grupo DMA apresentou o aumento significativo dos intermediários do ciclo de Krebs em relação aos animais saudáveis ($p < 0,001$). Os tratamentos com o óleo de baru e os hipoglicemiantes isolados e associados com o óleo, levaram a atenuação significativa dos níveis de citrato, succinato, fumarato e malato nos animais diabéticos, sendo semelhantes aos animais saudáveis. Somente o óleo de baru na dose de 0,75 g/kg não foi capaz de reduzir os níveis de malato em relação ao grupo DMA.

O lactato é produzido pela via da glicólise em condições anaeróbicas, através da redução do piruvato, com a oxidação simultânea de NADH a NAD⁺. O lactado pode ser convertido novamente em piruvato para formação de glicogênio ou dióxido de carbono, como também é eliminado pelos rins, em condições fisiológicas (Wu *et al.*, 2016). Song *et al.*, (2022) relatou que o lactato é capaz de ativar a inflamação crônica, aumentando a produção de citocinas inflamatórias e a liberação de Nf-kB, pelo acúmulo de ácido láctico no rim de camundongos com DRD.

A partir do sistema glioxalase, o metilglioxal é convertido a lactato. O metilglioxal é um oxialdeído tóxico, altamente reativo, responsável por promover a formação de AGEs (Hanssen; Stehouwer; Schalkwijk, 2019). Chou *et al.*, (2015) demonstra que durante o processo de dano e reparo tecidual no rim, as

células renais aumentam o consumo de energia, e o metilglioxal oriundo da metabolização da glicose e dos ácidos graxos, se acumula durante a produção de energia, elevando a produção de lactato nos rins. Assim, a elevação dos níveis teciduais de lactato nos animais diabéticos, reflete nos níveis tóxicos de metilglioxal e o estresse carbonílico no rim. Esses dados corroboram com os resultados encontrados na determinação das atividades das enzimas antioxidantes e do MDA no tecido renal. Os tratamentos com o óleo de baru e os hipoglicemiantes, com destaque a dose de 1,5 g/kg do óleo de baru associado com os hipoglicemiantes que atenuou a redução da resposta antioxidante e dos níveis de lactato, além de reduzir os danos oxidativos e histológicos nos rins de animais diabéticos.

Outro meio o qual o lactato contribui para lesão tecidual, é pela modulação da resposta imuno-inflamatória. Ele inibe a motilidade das células T, atraídas ao local de inflamação pelas altas concentrações de lactato. A perda de motilidade leva ao seu aprisionamento no local, onde, através do aumento da produção de citocinas inflamatórias e da diminuição da capacidade citolítica, contribuem negativamente para a inflamação crônica (Haas *et al.*, 2015).

A avaliação de perfis metabólicos direcionados em um modelo de nefropatia diabética em camundongos, demonstrou a elevação dos níveis de lactato, succinato, malato e fumarato urinários. Essas alterações foram associadas com a redução da TFG aumento do risco de progressão da doença renal. O tratamento com um bloqueador do receptor de angiotensina reduziu a albuminúria, atenuou a patologia renal e corrigiu muitas anormalidades metabólicas, restaurando os níveis de lactato ao normal (Azushima *et al.*, 2023). Neste trabalho, verificamos que o tratamento com o óleo de baru e os hipoglicemiantes também foram capazes de regular os níveis dos metabólitos do ciclo do TCA e do lactato, além de reduzir os marcadores bioquímicos de lesão renal, demonstrando a capacidade do óleo de baru e dos hipoglicemiantes de regular o metabolismo de lactato e dos intermediários do ciclo de Krebs.

No diabetes, ocorre um aumento progressivo na utilização de glicose e ácidos graxos pelas células do córtex renal como substrato de energia ao longo do tempo (Baek; Pennathur, 2021). A expressão de RNA mensageiro de enzimas envolvidas na glicólise e na oxidação de ácidos graxos foi aumentada em camundongos diabéticos com 12 e 24 semanas de idade, indicando o acúmulo

de metabólitos do ciclo de Krebs levam a reprogramação metabólica e a disfunção mitocondrial, associadas as complicações na função renal (Sas *et al.*, 2016).

Alguns intermediários do ciclo de Krebs como o fumarato e o malato, mais alguns enantiômeros do hidroxiglutarato são considerados oncometabólitos, apresentando toxicidade quando encontrados em níveis elevados (Brinkley *et al.*, 2020). O hidroxiglutarato que é derivado do α -cetoglutarato, um intermediário do ciclo de Krebs, sendo gerado sob condições hipóxicas ou ácidas e relacionado com as alterações do succinato (Baek; Pennathur, 2021). Baek; Pennathur (2021) demonstrou que a elevação de hidroxiglutarato em células de câncer renal promove a disfunção do ciclo de Krebs além de elevar a concentração de α -cetoglutarato, cofator das desoxigenases, aumentando a metilação do DNA e das histonas.

A avaliação do perfil metabolômico urinário de camundongos modelo de DRD, demonstrou a elevação na hidroxiglutarato, piruvato e fumarato, sendo que o tratamento com um antagonista de angiotensina reverteu os níveis desses metabólitos nos animais diabéticos. Esse efeito foi associado o aumento da ativação do receptor-cotivador-1 α ativado por proliferador de peroxissoma, responsável por reduzir os efeitos da disfunção mitocondrial (Hyeon *et al.*, 2020). A função mitocondrial é alterada no início do desenvolvimento da DRD, e essas alterações persistem ao longo da doença. Além dos danos oxidativos existentes no diabetes, lesando proteínas e o DNA mitocondrial, a análise de mitocôndrias por meio da microscopia eletrônica demonstrou que essas organelas estão aumentadas nos túbulos proximais do rim diabético em humanos e camundongos (Forbes; Thorburn, 2018).

Sas *et al.*, (2016) afirma que reprogramação metabólica e a disfunção mitocondrial podem estar envolvidas no início das complicações diabéticas, sendo que o acúmulo de EROs nas mitocôndrias gera danos dos complexos da CTE, que por sua vez afeta o metabolismo de carbono, levando o aumento do fluxo de metabólitos do ciclo de Krebs. A avaliação metabólica do rim de animais modelos de nefropatia diabética, induzidos com dieta rica em gordura e administração de STZ, apresentou o aumento do succinato, além dos aminoácidos relacionados com o ciclo de Krebs. Essas alterações foram

associadas a disfunção mitocondrial das células renais, visto o desbalanço nos níveis de AMP e ATP (Wang *et al.*, 2021).

A elevação dos intermediários do ciclo de Krebs tem efeitos tóxicos para células e pode promover a progressão da DRD (Sas *et al.*, 2016). O succinato pode ativar o sistema renina-angiotensina, resultando no dano oxidativo e lesão por meio da ativação da Nox 4 (Lee *et al.*, 2013; Peti-Peterdi, 2010). O citrato pode ser transportado para o citosol e convertido em acetil-CoA, substrato primário da acetilação de enzimas da glicólise, ciclo de Krebs e do metabolismo de aminoácidos, auxiliando no desequilíbrio dessas vias metabólicas. Já o acúmulo de fumarato na urina e no tecido renal foi relatado como potente indutor de TGF- β , contribuindo para lesão tecidual (Sas *et al.*, 2016). A elevação desses metabólitos observada neste trabalho, nos animais diabéticos sem tratamento, reforça as alterações nos marcadores de função renal, do estresse oxidativo e das mudanças estruturais evidenciadas na histomorfometria.

As perturbações metabólicas no diabetes são correlacionadas as anormalidades e disfunção mitocondriais, aumento da inflamação, alteração nas respostas antioxidantes e indução do estresse oxidativo, fatores que intensificam o desenvolvimento da lesão renal (Azushima *et al.*, 2023; Rong *et al.*, 2022). O óleo de baru, assim como os demais tratamentos com os hipoglicemiantes isolados e associados com o óleo, preveniram as alterações dos metabólitos, regulando os níveis dessas moléculas, chegando a níveis semelhantes aos animais saudáveis. Essas observações sugerem o efeito protetor do óleo de baru e dos hipoglicemiantes em controlar o avanço da DRD, por meio da regulação do perfil metabólico nas células renais.

Tendo em vista os trabalhos que avaliam o perfil metabólico no diabetes, vários trabalhos focam as análises na urina e soro de pacientes e animais diabéticos (Wang, Shuangyuan *et al.*, 2022; Zhu *et al.*, 2022; Azushima *et al.*, 2023). Poucos são os estudos na literatura que avaliam os metabólitos renais em animais diabéticos e principalmente o efeito de diferentes fármacos e bioativos. A avaliação dos níveis dos metabólitos do metabolismo da glicose, dos aminoácidos e dos ácidos graxos são direcionados a biomarcadores de risco no desenvolvimento da DRD, ou seja, em prever a disfunção renal no diabetes diabéticos (Li *et al.*, 2023; Wang, Shuangyuan *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2021). Contudo, as elevações dos intermediários do ciclo de Krebs e das adenosinas

resultantes do metabolismo energético abre possibilidades para serem utilizados no monitoramento do tratamento da DRD.

Este é o primeiro trabalho a avaliar os efeitos do óleo de baru e da sua associação com a metformina e gliclazida, respectivamente, sobre o perfil metabólico em rim de animais diabéticos. Os dados obtidos por este estudo demonstram o efeito protetor do óleo de baru e dos hipoglicemiantes em restaurar os níveis dos metabólitos, mantendo-os em níveis semelhantes aos animais saudáveis, efeito que pode estar associado ao controle glicêmico. Entretanto pode existir algum outro mecanismo que promova o equilíbrio do metabolismo renal dos animais diabéticos, já que nem todas as doses avaliadas nesse trabalho foram capazes de reduzir a hiperglicemia. Assim, mais estudos são necessários para estabelecer a relação específica de cada metabólito na lesão renal e a via de atuação do óleo de baru no metabolismo das células renais.

6 CONCLUSÃO

Tendo em vista todos os resultados obtidos nos grupos com animais diabéticos, os tratamentos com o óleo de baru nas doses de 1,5 g/kg e 3,0 g/kg, nos animais diabéticos, obtiveram respostas semelhantes na maioria dos parâmetros avaliados, desde o consumo de ração e água, curvas glicêmicas, marcadores bioquímicos de função renal e perfil lipídico. Para os marcadores urinários e índice renal, o óleo na dose de 3,0 g/kg se sobressaiu na atenuação dos danos renais, e em muitos casos apresentando o mesmo efeito que o grupo DMMO 1.5. No entanto, quando avaliado o estresse oxidativo no tecido renal, o óleo na dose 1,5 g/kg foi capaz de atenuar a redução das atividades das enzimas SOD, CAT e GPx em relação aos demais tratamentos com o óleo de baru.

Com relação a associação do óleo de baru com os antidiabéticos orais, foi possível verificar um efeito adicional na ação desses medicamentos na estimativa de consumo de água, ração, no TTOG e TTI, na determinação de frutossamina, creatinina urinária e no índice renal, quando comparados com o tratamento em isolado destes fármacos.

A associação da metformina com o óleo de baru apresentou melhor capacidade no controle glicêmico, já que reduziu a glicose sérica e a frutossamina. O sinergismo da gliclazida com o óleo de baru, foi destacado nos marcadores de função renal, mas ainda foram semelhantes ao grupo DMMO 1.5.

Os marcadores do estresse oxidativo no rim, apontam que além do controle glicêmico ter sido essencial para a redução de MDA, o óleo na dose de 1.5 g/kg isolado ou associado com os hipoglicemiantes foi capaz de atenuar a queda da atividade da CAT e GPx. Todos tratamentos foram efetivos na redução da peroxidação lipídica, na minimização nos danos renais histológicos e na normalização dos níveis dos metabólitos e adenosinas do metabolismo energético, atenuando a progressão da DRD.

Os nossos resultados demonstram que óleo de baru apresentou um efeito benéfico na DRD, tanto na administração de forma isolada, como também em associação com a metformina. Esse efeito foi evidenciado pela redução dos danos renais histológicos, bem como restauração dos marcadores bioquímicos de função renal e regulação do metabolismo oxidativo e energético. As doses do óleo de baru que se mostraram mais eficazes foram as de 1,5 g/kg e 3,0 g/kg.

A administração do óleo aos animais saudáveis, em todas as doses trabalhadas neste estudo, não indicam efeitos adversos ou tóxicos de acordo com os marcadores hepáticos e lipídicos avaliados. Contudo os efeitos do consumo elevado do óleo de baru a longo prazo sobre o estado inflamatório, ainda é desconhecido, tendo em vista a presença de ácidos graxos saturados em sua composição.

Assim, este trabalho sugere uma possível ação do óleo de baru no controle glicêmico e na prevenção da nefropatia diabética, abrindo perspectiva para novos estudos visando a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nos efeitos deste óleo e de sua eficácia no tratamento complementar do diabetes mellitus.

REFERÊNCIAS

ABDELKADER, Noha F. *et al.* New combination therapy of gliclazide and quercetin for protection against STZ-induced diabetic rats. **Life Sciences**, [S. l.], v. 247, p. 117458, 2020.

ADA. Microvascular complications and foot care: Standards of medical care in diabetes—2021. **Diabetes Care**, [S. l.], v. 44, n. January, p. S151–S167, 2021.

ADEYEMI, Wale Johnson *et al.* Co-administration of omega-3 fatty acids and metformin showed more desirable effects than the single therapy on indices of bone mineralisation but not gluco-regulatory and antioxidant markers in diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 121, p. 109631, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332219352539>.

AEBI, Hugo. **Catalase in vitro**. [S. l.: s. n.], 1984. p. 121–126.

AFROZ, Afsana *et al.* Macro- and micro-vascular complications and their determinants among people with type 2 diabetes in Bangladesh. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 2939–2946, 2019.

AHAD, Amjid *et al.* Ellagic acid, an NF- κ B inhibitor, ameliorates renal function in experimental diabetic nephropathy. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 219, p. 64–75, 2014.

AHMAD, Amna Ayesha; DRAVES, Shayna Odeal; ROSCA, Mariana. Mitochondria in Diabetic Kidney Disease. **Cells**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. 2945, 2021a.

AHMAD, Amna Ayesha; DRAVES, Shayna Odeal; ROSCA, Mariana. Mitochondria in Diabetic Kidney Disease. **Cells**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. 2945, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/11/2945>.

AMIR, Rawan; SUHL, Sara; ALEXANDER, Charles M. Renal Evaluation and Protection. **Clinics in Geriatric Medicine**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 431–445, 2020.

ARAS, Mohini; TCHANG, Beverly G.; PAPE, Joy. Obesity and Diabetes. **Nursing Clinics of North America**, [S. l.], v. 56, n. 4, p. 527–541, 2021.

ASCASO, Juan F. Diabetes mellitus tipo 2: nuevos tratamientos. **Medicina Clínica**, [S. l.], v. 143, n. 3, p. 117–123, 2014.

ATTIA, Hanan Naeim *et al.* Protective effects of combined therapy of gliclazide with curcumin in experimental diabetic neuropathy in rats. **Behavioural Pharmacology**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 153–161, 2012.

AVOGARO, Angelo; FADINI, Gian Paolo. Microvascular complications in diabetes: A growing concern for cardiologists. **International Journal of Cardiology**, [S. l.], v. 291, p. 29–35, 2019.

AYAZ, Hayat *et al.* Comparison of the anti-diabetic and nephroprotective activities of vitamin E, metformin, and Nigella sativa oil on kidney in experimental diabetic rats. **Iranian journal of basic medical sciences**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 395–399, 2023.

AZUSHIMA, Kengo *et al.* Abnormal lactate metabolism is linked to albuminuria and kidney injury in diabetic nephropathy. **Kidney International**, [S. l.], v. 104, n. 6, p. 1135–1149, 2023.

BAEK, Judy; PENNATHUR, Subramaniam. Urinary 2-Hydroxyglutarate Enantiomers Are Markedly Elevated in a Murine Model of Type 2 Diabetic Kidney Disease. **Metabolites**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 469, 2021.

BASTOS, Deborah H. M.; ROGERO, Marcelo M.; ARÊAS, José Alfredo G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [S. l.], v. 53, n. 5, p. 646–656, 2009.

BENITO, Sandra *et al.* LC-QTOF-MS-based targeted metabolomics of arginine-creatine metabolic pathway-related compounds in plasma: application to identify potential biomarkers in pediatric chronic kidney disease. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 408, n. 3, p. 747–760, 2016.

BHATTI, Jasvinder Singh *et al.* Oxidative stress in the pathophysiology of type 2 diabetes and related complications: Current therapeutics strategies and future perspectives. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 184, p. 114–134, 2022.

BLANTZ, Roland C.; SINGH, Prabhleen. Glomerular and Tubular Function in the Diabetic Kidney. **Advances in Chronic Kidney Disease**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 297–303, 2014.

BRINKLEY, Garrett *et al.* Teleological Role of L-2-Hydroxyglutarate Dehydrogenase in the Kidney. **Disease Models & Mechanisms**, [S. l.], 2020.

CAMILLERI, Michael. Gastrointestinal hormones and regulation of gastric emptying. **Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 3–10, 2019.

CAO, Yun-Feng *et al.* Plasma Levels of Amino Acids Related to Urea Cycle and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus in Chinese Adults. **Frontiers in Endocrinology**, [S. l.], v. 10, 2019.

CASTRO, Bárbara Bruna Abreu de *et al.* Standardization of renal function evaluation in Wistar rats (*Rattus norvegicus*) from the Federal University of Juiz de Fora's colony. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 139–149, 2014.

CHANG, Yo-Chen; WU, Wen-Chuan. Dyslipidemia and Diabetic Retinopathy. **The Review of Diabetic Studies**, [S. l.], v. 10, n. 2–3, p. 121–132, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4063092/>. Acesso em: 21 abr. 2024.

CHENG, Susan *et al.* Metabolite Profiling Identifies Pathways Associated With Metabolic Risk in Humans. **Circulation**, [S. l.], v. 125, n. 18, p. 2222–2231, 2012.

CHOU, Chu-Kuang *et al.* Elevated urinary d-lactate levels in patients with diabetes and microalbuminuria. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 116, p. 65–70, 2015.

CLARA, Rosmarie; LANGHANS, Wolfgang; MANSOURI, Abdelhak. Oleic acid stimulates glucagon-like peptide-1 release from enteroendocrine cells by modulating cell respiration and glycolysis. **Metabolism**, [S. l.], v. 65, n. 3, p. 8–17, 2016.

CORREIA-SANTOS, André M. *et al.* Indução de Diabetes Tipo 2 por dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina em ratas wistar. **Medicina (Brazil)**, [S. l.], v. 45, n. 4, p. 432–440, 2012.

CRAJOINAS, Renato O. *et al.* Mechanisms mediating the diuretic and natriuretic actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, [S. l.], v. 301, n. 2, p. F355–F363, 2011. Disponível em: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajprenal.00729.2010>.

CRAJOINAS, Renato O. *et al.* Mechanisms mediating the diuretic and natriuretic actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, [S. l.], v. 301, n. 2, p. F355–F363, 2011.

DAI, Yingbo *et al.* A2B Adenosine Receptor–Mediated Induction of IL-6 Promotes CKD. **Journal of the American Society of Nephrology**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 890–901, 2011.

DARENKAYA, M. A.; KOLESNIKOVA, L. I.; KOLESNIKOV, S. I. Oxidative Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and Therapeutic Approaches to Correction. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 171, n. 2, p. 179–189, 2021a.

DARENKAYA, M. A.; KOLESNIKOVA, L. I.; KOLESNIKOV, S. I. Oxidative Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and

Therapeutic Approaches to Correction. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 171, n. 2, p. 179–189, 2021b. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s10517-021-05191-7>.

DE OLIVEIRA, Antonio Anax F. *et al.* Sustained kidney biochemical derangement in treated experimental diabetes: a clue to metabolic memory. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 40544, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep40544>.

DE OLIVEIRA, Antonio Anax F. *et al.* Sustained kidney biochemical derangement in treated experimental diabetes: a clue to metabolic memory. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 40544, 2017.

DECLÈVES, Anne-Emilie *et al.* Regulation of lipid accumulation by AMK-activated kinase in high fat diet-induced kidney injury. **Kidney International**, [S. l.], v. 85, n. 3, p. 611–623, 2014.

DJURICIC, Ivana; CALDER, Philip C. Beneficial Outcomes of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Human Health: An Update for 2021. **Nutrients**, [S. l.], v. 13, n. 7, p. 2421, 2021.

DRIES, Samuel Selbach *et al.* Oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus treated with metformin. **Scientia Medica**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 25857, 2017.

DU, Jie; LI, Xiao-Hui; LI, Yuan-Jian. Glutamate in peripheral organs: Biology and pharmacology. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 784, p. 42–48, 2016.

DUSSE, Luci Maria SantAna *et al.* BIOMARKERS OF RENAL FUNCTION: WHAT IS CURRENTLY AVAILABLE?. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [S. l.], v. 49, n. 1, 2017.

ESREFOGLU, M *et al.* Ascorbic acid and beta-carotene reduce stress-induced oxidative organ damage in rats. **Biotechnic & Histochemistry**, [S. l.], v. 91, n. 7, p. 455–464, 2016.

FERREIRA, E. de S. *et al.* Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos graxos majoritários do óleo bruto da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* HBK). **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 17, n. 2, p. 203-208, 2009. FETZER, Damian L. *et al.* Extraction of baru (*Dipteryx alata* vogel) seed oil using compressed solvents technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S. l.], v. 137, p. 23–33, 2018.

FIGUEIREDO, Ingrid Delbone *et al.* Lycopene Improves the Metformin Effects on Glycemic Control and Decreases Biomarkers of Glycoxidative Stress

in Diabetic Rats

. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, [S. I.], v. Volume 13, p. 3117–3135, 2020.

FLETCHER, Rachel S. *et al.* Nicotinamide riboside kinases display redundancy in mediating nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in skeletal muscle cells. **Molecular Metabolism**, [S. I.], v. 6, n. 8, p. 819–832, 2017.

FLOEGEL, Anna *et al.* Identification of Serum Metabolites Associated With Risk of Type 2 Diabetes Using a Targeted Metabolomic Approach. **Diabetes**, [S. I.], v. 62, n. 2, p. 639–648, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3554384/>. Acesso em: 25 abr. 2024.

FORBES, Josephine M.; THORBURN, David R. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. **Nature Reviews Nephrology**, [S. I.], v. 14, n. 5, p. 291–312, 2018.

FRANÇA, Bruna Karoline *et al.* Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE Jornal Português de Gastrenterologia**, [S. I.], v. 20, n. 5, p. 199–206, 2013.

FUJIMOTO, Saki *et al.* Insulin resistance induced by a high-fat diet is associated with the induction of genes related to leukocyte activation in rat peripheral leukocytes. **Life Sciences**, [S. I.], v. 87, n. 23–26, p. 679–685, 2010.

GANZ, Tali *et al.* Serum asymmetric dimethylarginine and arginine levels predict microvascular and macrovascular complications in type 2 diabetes mellitus. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, [S. I.], v. 33, n. 2, 2017.

GARMAN, Joseph H. *et al.* Omega-3 fatty acid rich diet prevents diabetic renal disease. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, [S. I.], v. 296, n. 2, p. F306–F316, 2009.

GHAFFARI, Tayibeh *et al.* Effect of vitamin e and selenium supplement on paraoxonase-1 activity, oxidized low density lipoprotein and antioxidant defense in diabetic rats. **BioImpacts : BI**, [S. I.], v. 1, n. 2, p. 121–8, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3648954/>. Acesso em: 24 maio 2024.

GLASTRAS, Sarah J. *et al.* Mouse Models of Diabetes, Obesity and Related Kidney Disease. **PLOS ONE**, [S. I.], v. 11, n. 8, p. e0162131, 2016a.

GLASTRAS, Sarah J. *et al.* Mouse Models of Diabetes, Obesity and Related Kidney Disease. **PLOS ONE**, [S. I.], v. 11, n. 8, p. e0162131, 2016b. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0162131>.

GRANADO-CASAS, Minerva; MAURICIO, Didac. Oleic Acid in the Diet and What It Does: Implications for Diabetes and Its Complications. *In: BIOACTIVE FOOD AS DIETARY INTERVENTIONS FOR DIABETES*. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 211–229. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012813822900014X>.

GRAVINA, Giacomo *et al.* Association of N-Acetyl Asparagine with QTc in Diabetes: A Metabolomics Study. **Biomedicines**, [S. l.], v. 10, n. 8, p. 1955, 2022.

GROTTO, Denise *et al.* Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo: malondialdeído. **Química Nova**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 275–279, 2008.

GRYCEL, Sławomir *et al.* Metformin treatment affects adipocytokine secretion and lipid composition in adipose tissues of diet-induced insulin-resistant rats. **Nutrition**, [S. l.], v. 63–64, p. 126–133, 2019.

GUEx, Camille Gaube *et al.* Antidiabetic effects of *Olea europaea* L. leaves in diabetic rats induced by high-fat diet and low-dose streptozotocin. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 235, p. 1–7, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874118318968>.

GURUMALLU, Sunil Chikkalakshmi *et al.* Synergistic hypoglycemic and hypolipidemic effects of ω -3 and ω -6 fatty acids from Indian flax and sesame seed oils in streptozotocin-induced diabetic rats. **Phytomedicine Plus**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 100284, 2022.

HAAS, Robert *et al.* Lactate Regulates Metabolic and Pro-inflammatory Circuits in Control of T Cell Migration and Effector Functions. **PLOS Biology**, [S. l.], v. 13, n. 7, p. e1002202, 2015.

HABIB, Samy L. Kidney atrophy vs hypertrophy in diabetes: which cells are involved?. **Cell Cycle**, [S. l.], v. 17, n. 14, p. 1683–1687, 2018.

HANKE, Danielle *et al.* A diet high in α -linolenic acid and monounsaturated fatty acids attenuates hepatic steatosis and alters hepatic phospholipid fatty acid profile in diet-induced obese rats. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, [S. l.], v. 89, n. 6, p. 391–401, 2013.

HANSEN, Nordin M.J.; STEHOUWER, Coen D.A.; SCHALKWIJK, Casper G. Methylglyoxal stress, the glyoxalase system, and diabetic chronic kidney disease. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 26–33, 2019.

HARTMAN, L.; LAGO, R C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory practice**, [S. l.], v. 22, n. 6, p. 475–6 passim, 1973.

HESHMATI, Javad *et al.* Omega-3 fatty acids supplementation and oxidative stress parameters: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. **Pharmacological Research**, [S. l.], v. 149, p. 104462, 2019.

HONG, Yu Ah; PARK, Cheol Whee. Catalytic Antioxidants in the Kidney. **Antioxidants**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 130, 2021.

HORAKOVA, Olga *et al.* Metformin acutely lowers blood glucose levels by inhibition of intestinal glucose transport. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 6156, 2019.

HOU, Yun-Ying *et al.* A Randomized Controlled Trial to Compare the Effect of Peanuts and Almonds on the Cardio-Metabolic and Inflammatory Parameters in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **Nutrients**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. 1565, 2018. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2072-6643/10/11/1565>.

HUANG, Jia-Qiang *et al.* Role of glutathione peroxidase 1 in glucose and lipid metabolism-related diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 127, p. 108–115, 2018.

HYEON, Jin Seong *et al.* Urinary Metabolomic Profiling in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice after Treatment with Losartan. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 23, p. 8969, 2020.

IFD. **International Diabetes Federation**. [S. l.: s. n.], 2021a-. ISSN 18728227.v. 102

IGARASHI, Miki *et al.* Dietary oleic acid contributes to the regulation of food intake through the synthesis of intestinal oleoylethanolamide. **Frontiers in Endocrinology**, [S. l.], v. 13, 2023.

INÁCIO, Maiara Destro *et al.* Prevention of Elevation in Plasma Triacylglycerol with High-Dose Bezafibrate Treatment Abolishes Insulin Resistance and Attenuates Glucose Intolerance Induced by Short-Term Treatment with Dexamethasone in Rats. **International Journal of Endocrinology**, [S. l.], v. 2018, p. 1–12, 2018.

JAMILIAN, Mehri *et al.* A Randomized Controlled Clinical Trial Investigating the Effects of Omega-3 Fatty Acids and Vitamin E Co-Supplementation on Biomarkers of Oxidative Stress, Inflammation and Pregnancy Outcomes in Gestational Diabetes. **Canadian Journal of Diabetes**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 143–149, 2017.

JANGALE, Nivedita M. *et al.* Dietary flaxseed oil and fish oil ameliorates renal oxidative stress, protein glycation, and inflammation in streptozotocin–nicotinamide-induced diabetic rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**,

[S. I.], v. 72, n. 2, p. 327–336, 2016a. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s13105-016-0482-8>.

JANGALE, Nivedita M. *et al.* Dietary flaxseed oil and fish oil ameliorates renal oxidative stress, protein glycation, and inflammation in streptozotocin–nicotinamide-induced diabetic rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, [S. I.], v. 72, n. 2, p. 327–336, 2016b.

JENSEN, Elisa P. *et al.* Activation of GLP-1 receptors on vascular smooth muscle cells reduces the autoregulatory response in afferent arterioles and increases renal blood flow. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, [S. I.], v. 308, n. 8, p. F867–F877, 2015a. Disponível em: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajprenal.00527.2014>.

JENSEN, Elisa P. *et al.* Activation of GLP-1 receptors on vascular smooth muscle cells reduces the autoregulatory response in afferent arterioles and increases renal blood flow. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, [S. I.], v. 308, n. 8, p. F867–F877, 2015b.

JIMÉNEZ-OSORIO, Angélica *et al.* Nrf2 and Redox Status in Prediabetic and Diabetic Patients. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. I.], v. 15, n. 11, p. 20290–20305, 2014.

JOHN, Sharon. Complication in diabetic nephropathy. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, [S. I.], v. 10, n. 4, p. 247–249, 2016.

JOHNSON, Caroline H.; IVANISEVIC, Julijana; SIUZDAK, Gary. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. I.], v. 17, n. 7, p. 451–459, 2016.

KAJAL, Anu; SINGH, Randhir. Coriandrum sativum improve neuronal function via inhibition of oxidative/nitrosative stress and TNF- α in diabetic neuropathic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. I.], v. 263, p. 112959, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874119352110>.

KAMALAKKANNAN, N; PRINCE, P Stanely Mainzen. Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [S. I.], v. 293, n. 1–2, p. 211–219, 2006.

KANG, Qingzheng; YANG, Chunxue. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. **Redox Biology**, [S. I.], v. 37, p. 101799, 2020.

KAPADIA, Pritam *et al.* Extraction of High-Value Chemicals from Plants for Technical and Medical Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. I.], v. 23, n. 18, p. 10334, 2022.

KATYARE, S. S.; SATAV, J. G. Effect of streptozotocin-induced diabetes on oxidative energy metabolism in rat kidney mitochondria. A comparative study of early and late effects. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. 555–562, 2005.

KERI, Krishna C.; SAMJI, Naga S.; BLUMENTHAL, Samuel. Diabetic nephropathy: newer therapeutic perspectives. **Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 200–207, 2018. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20009666.2018.1500423>.

KHADKE, Suresh *et al.* Synergistic Effect of Omega-3 Fatty Acids and Oral-Hypoglycemic Drug on Lipid Normalization through Modulation of Hepatic Gene Expression in High Fat Diet with Low Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Nutrients**, [S. l.], v. 12, n. 12, p. 3652, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/12/3652>.

KIEN, Craig Lawrence. Dietary interventions for metabolic syndrome: Role of modifying dietary fats. **Current Diabetes Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 43–50, 2009.

KISHORE, Bellamkonda K.; ROBSON, Simon C.; DWYER, Karen M. CD39-adenosinergic axis in renal pathophysiology and therapeutics. **Purinergic Signalling**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 109–120, 2018.

KOPÁL, Martin *et al.* Effect of PUFA-rich plant oil on risk factors of STZ-induced diabetes in Wistar rats. **Redox Report**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 161–169, 2014.

KRISTENSEN, Jonas Møller *et al.* Two weeks of metformin treatment induces AMPK-dependent enhancement of insulin-stimulated glucose uptake in mouse soleus muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 306, n. 10, p. E1099–E1109, 2014a.

KRISTENSEN, Jonas Møller *et al.* Two weeks of metformin treatment induces AMPK-dependent enhancement of insulin-stimulated glucose uptake in mouse soleus muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 306, n. 10, p. E1099–E1109, 2014b. Disponível em: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.00417.2013>.

LADDHA, Ankit P.; KULKARNI, Yogesh A. NADPH oxidase: A membrane-bound enzyme and its inhibitors in diabetic complications. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 881, p. 173206, 2020.

LATTIBEAUDIÈRE, K. G.; ALEXANDER-LINDO, R. L. Oleic Acid and Succinic Acid Synergistically Mitigate Symptoms of Type 2 Diabetes in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **International Journal of Endocrinology**, [S. l.], v. 2022, p. 1–10, 2022.

LEE, Doug-Yoon *et al.* Nox4 NADPH Oxidase Mediates Peroxynitrite-dependent Uncoupling of Endothelial Nitric-oxide Synthase and Fibronectin Expression in Response to Angiotensin II. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 288, n. 40, p. 28668–28686, 2013.

LEMOS, Miriam Rejane Bonilla. Caracterização e Estabilidade dos Compostos Bioativos em Amêndoas de Baru (*Dipteryx alata* Vog.), Submetidas a Processo de Torrefação. [S. l.], p. 145 p., 2012.

LEMOS, Miriam Rejane Bonilla *et al.* The effect of roasting on the phenolic compounds and antioxidant potential of baru nuts [*Dipteryx alata* Vog.]. **Food Research International**, [S. l.], v. 48, n. 2, p. 592–597, 2012.

LERCO, Mauro Masson *et al.* Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos: estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirurgica Brasileira**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 132–142, 2003.

LI, Chenming *et al.* Active role of amino acid metabolism in early diagnosis and treatment of diabetic kidney disease. **Frontiers in Nutrition**, [S. l.], v. 10, 2023.

LIGHTHART-MELIS, Gerdien C *et al.* Glutamine is an important precursor for de novo synthesis of arginine in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [S. l.], v. 87, n. 5, p. 1282–1289, 2008.

LIMA ROCHA, Joana Érica *et al.* Effects of Fish Oil Supplementation on Oxidative Stress Biomarkers and Liver Damage in Hypercholesterolemic Rats. **Nutrients**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 426, 2022.

LIU, Xiaoran *et al.* High plasma glutamate and low glutamine-to-glutamate ratio are associated with type 2 diabetes: Case-cohort study within the PREDIMED trial. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, [S. l.], v. 29, n. 10, p. 1040–1049, 2019.

LIU, Xinhui *et al.* Huangqi-Danshen decoction protects against cisplatin-induced acute kidney injury in mice. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 14, 2023.

LU, Huimin *et al.* Elevated circulating stearic acid leads to a major lipotoxic effect on mouse pancreatic beta cells in hyperlipidaemia via a miR-34a-5p-mediated PERK/p53-dependent pathway. **Diabetologia**, [S. l.], v. 59, n. 6, p. 1247–1257, 2016.

LUIKING, Yvette C. *et al.* Arginine de novo and nitric oxide production in disease states. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 303, n. 10, p. E1177–E1189, 2012.

LUO, Xiaoting *et al.* Hyperglycemic stress and carbon stress in diabetic glucotoxicity. **Aging and Disease**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 90–110, 2016.

LUO, Hui-Huan *et al.* Interactive effects of asparagine and aspartate homeostasis with sex and age for the risk of type 2 diabetes risk. **Biology of Sex Differences**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 58, 2020.

MA, Xiaoju *et al.* Advances in oxidative stress in pathogenesis of diabetic kidney disease and efficacy of TCM intervention. **Renal Failure**, [S. l.], v. 45, n. 1, 2023. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/0886022X.2022.2146512>.

MAHIEU, Stella *et al.* Monosodium glutamate intake affect the function of the kidney through NMDA receptor. **Life Sciences**, [S. l.], v. 149, p. 114–119, 2016.

MARIN, Monica T. *et al.* Oxidized HDL and LDL in adolescents with type 2 diabetes compared to normal weight and obese peers. **Journal of Diabetes and its Complications**, [S. l.], v. 29, n. 5, p. 679–685, 2015.

MARKMAN, Brivaldo *et al.* Posicionamento Gordura. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S. l.], v. 109, n. 6, p. 618–619, 2021.

MARQUES, Fernanda G. *et al.* Identification of terpenes and phytosterols in *Dipteryx alata* (baru) oil seeds obtained through pressing. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 25, n. 5, p. 522–525, 2015.

MENG, Shumei *et al.* Metformin Activates AMP-activated Protein Kinase by Promoting Formation of the $\alpha\beta\gamma$ Heterotrimeric Complex. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 290, n. 6, p. 3793–3802, 2015.

MENGE, Bjoern A. *et al.* Selective amino acid deficiency in patients with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. **Regulatory Peptides**, [S. l.], v. 160, n. 1–3, p. 75–80, 2010.

MESTRY, Snehal Nitin *et al.* Attenuation of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats by *Punica granatum* Linn. leaves extract. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 273–280, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5506633/>. Acesso em: 4 fev. 2024.

MOHAMMEDI, Kamel *et al.* Glutathione peroxidase-1 gene (GPX1) variants, oxidative stress and risk of kidney complications in people with type 1 diabetes. **Metabolism**, [S. l.], v. 65, n. 2, p. 12–19, 2016.

MOURA-ASSIS, Alexandre *et al.* Flaxseed oil rich in omega-3 protects aorta against inflammation and endoplasmic reticulum stress partially mediated by GPR120 receptor in obese, diabetic and dyslipidemic mice models. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [S. l.], v. 53, p. 9–19, 2018.

MOURYA, Ashish *et al.* Synergistic action of ursolic acid and metformin in experimental model of insulin resistance and related behavioral alterations. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 835, p. 31–40, 2018.

NASRI, Maryam *et al.* Exogenous glutamine ameliorates diabetic nephropathy in a rat model of type 2 diabetes mellitus through its antioxidant and anti-inflammatory activities. **Archives of Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 129, n. 2, p. 363–372, 2023.

NI, Ziyuan *et al.* *Allium tuberosum* alleviates diabetic nephropathy by suppressing hyperglycemia-induced oxidative stress and inflammation in high fat diet/streptozotocin treated rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 112, p. 108678, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332218385123>.

NOVAK, Ruder *et al.* Revisiting the Role of NAG across the Continuum of Kidney Disease. **Bioengineering**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 444, 2023.

OLIVEIRA-ALVES, Sheila C. *et al.* Identification of functional compounds in baru (*Dipteryx alata* Vog.) nuts: Nutritional value, volatile and phenolic composition, antioxidant activity and antiproliferative effect. **Food Research International**, [S. l.], v. 131, n. January, 2020.

ONONAMADU, Chimaobi J. *et al.* Methanol-Extract/Fractions of *Dacryodes edulis* Leaves Ameliorate Hyperglycemia and Associated Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rats. **Journal of Evidence-Based Integrative Medicine**, [S. l.], v. 24, p. 2515690X1984383, 2019.

ONOZATO, Maristela Lika *et al.* Radical scavenging effect of gliclazide in diabetic rats fed with a high cholesterol diet. **Kidney International**, [S. l.], v. 65, n. 3, p. 951–960, 2004.

ŌYANAGUI, Yoshihiko. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 142, n. 2, p. 290–296, 1984.

PAL, Pabitra Bikash; SINHA, Krishnendu; SIL, Parames C. Mangiferin Attenuates Diabetic Nephropathy by Inhibiting Oxidative Stress Mediated Signaling Cascade, TNF α Related and Mitochondrial Dependent Apoptotic Pathways in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. e107220, 2014. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0107220>.

PALM, Fredrik *et al.* Reduced nitric oxide in diabetic kidneys due to increased hepatic arginine metabolism: implications for renomedullary oxygen availability. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, [S. l.], v. 294, n. 1, p. F30–F37, 2008.

PAPACHRISTOFOROU, Eleftheria *et al.* Association of Glycemic Indices (Hyperglycemia, Glucose Variability, and Hypoglycemia) with Oxidative Stress and Diabetic Complications. **Journal of Diabetes Research**, [S. l.], v. 2020, p. 1–17, 2020.

PAULO, Linamarys *et al.* Baru Seed Extracted Oil (*Dipteryx alata* Vog.): Chemical Composition and Thermal and Oxidative Stability. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], 2023. Disponível em: http://jbcs.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=11406&nomeArquivo=2022-0099AR.pdf.

PERREAULT, Maude *et al.* Plasma Levels of 14:0, 16:0, 16:1n-7, and 20:3n-6 are Positively Associated, but 18:0 and 18:2n-6 are Inversely Associated with Markers of Inflammation in Young Healthy Adults. **Lipids**, [S. l.], v. 49, n. 3, p. 255–263, 2014.

PETI-PETERDI, János. High glucose and renin release: the role of succinate and GPR91. **Kidney International**, [S. l.], v. 78, n. 12, p. 1214–1217, 2010.

PRECIADO-SALDAÑA, Alejandra M. *et al.* Revisiting the high-fat diet/low streptozotocin prediabetic rat model: A bioanalytical adjustment. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, [S. l.], v. 120, p. 107252, 2023.

PUNTHAKEE, Zubin; GOLDENBERG, Ronald; KATZ, Pamela. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. **Canadian Journal of Diabetes**, [S. l.], v. 42, p. S10–S15, 2018.

RAO, Vasanth Vikram Rao *et al.* Diabetic nephropathy: An update on pathogenesis and drug development. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 754–762, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871402118305277>.

RAWAT, Atul *et al.* ¹H NMR based serum metabolic profiling reveals differentiating biomarkers in patients with diabetes and diabetes-related complication. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 290–298, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1871402118303977?via%3Dihub>. Acesso em: 2 maio 2024.

REIS, Mayara Áthina *et al.* Hepatoprotective and Antioxidant Activities of Oil from Baru Almonds (*Dipteryx alata* Vog.) in a Preclinical Model of Lipotoxicity and

Dyslipidemia. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2018, p. 1–11, 2018. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2018/8376081/>.

RIPKEN, Dina *et al.* Steviol Glycoside Rebaudioside A Induces Glucagon-like Peptide-1 and Peptide YY Release in a Porcine ex Vivo Intestinal Model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 62, n. 33, p. 8365–8370, 2014. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf501105w>.

ROBERTS, Veena S. *et al.* The role of adenosine receptors A2A and A2B signaling in renal fibrosis. **Kidney International**, [S. l.], v. 86, n. 4, p. 685–692, 2014.

RONG, Guangli *et al.* Artemether Alleviates Diabetic Kidney Disease by Modulating Amino Acid Metabolism. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2022, p. 1–18, 2022. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2022/7339611/>. Acesso em: 2 maio 2024.

SAHA, Siddhartha S.; GHOSH, Mahua. Antioxidant and anti-inflammatory effect of conjugated linolenic acid isomers against streptozotocin-induced diabetes. **British Journal of Nutrition**, [S. l.], v. 108, n. 6, p. 974–983, 2012.

SALES, A. L. C. C. *et al.* Dieta Enriquecida Em Fibras E Ácidos Graxos Poli-Insaturados: Efeitos No Controle Glicêmico E Perfil Lipídico De Ratos Diabéticos. **Ars Veterinaria**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 138–146, 2011.

SALLES, Bruno Cesar Correa *et al.* Passiflora edulis Leaf Extract: Evidence of Antidiabetic and Antiplatelet Effects in Rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 169–174, 2020.

SANI, Mamane *et al.* Catalase activity and rhythmic patterns in mouse brain, kidney and liver. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 145, n. 3–4, p. 331–337, 2006.

SAS, Kelli M. *et al.* Tissue-specific metabolic reprogramming drives nutrient flux in diabetic complications. **JCI Insight**, [S. l.], v. 1, n. 15, 2016.

SAW, Constance Lay Lay *et al.* Astaxanthin and omega-3 fatty acids individually and in combination protect against oxidative stress via the Nrf2–ARE pathway. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 62, p. 869–875, 2013.

SEKAR, Vidhushini *et al.* Antidiabetic effect of mangiferin in combination with oral hypoglycemic agents metformin and gliclazide. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 59, p. 152901, 2019.

SENA, C. M. *et al.* Antioxidant and vascular effects of gliclazide in type 2 diabetic rats fed high-fat diet. **Physiological Research**, [S. I.], v. 58, n. 2, p. 203–209, 2009.

SHARMA, Dilip *et al.* Diabetic nephropathy: New insights into established therapeutic paradigms and novel molecular targets. **Diabetes Research and Clinical Practice**, [S. I.], v. 128, p. 91–108, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168822717301262>.

SHEN, Qing *et al.* Triacylglycerols are preferentially oxidized over free fatty acids in heated soybean oil. **npj Science of Food**, [S. I.], v. 5, n. 1, p. 7, 2021.

SIFUENTES-FRANCO, Sonia *et al.* The Role of Oxidative Stress, Mitochondrial Function, and Autophagy in Diabetic Polyneuropathy. **Journal of Diabetes Research**, [S. I.], v. 2017, n. c, 2017.

SIMANENKOVA, Anna *et al.* Comparative evaluation of metformin and liraglutide cardioprotective effect in rats with impaired glucose tolerance. **Scientific Reports**, [S. I.], v. 11, n. 1, p. 1–12, 2021.

SKOVSRØ, Søs. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. **Journal of Diabetes Investigation**, [S. I.], v. 5, n. 4, p. 349–358, 2014.

SOETIKNO, Vivian *et al.* Curcumin attenuates diabetic nephropathy by inhibiting PKC- α and PKC- β ₁ activity in streptozotocin-induced type I diabetic rats. **Molecular Nutrition & Food Research**, [S. I.], v. 55, n. 11, p. 1655–1665, 2011.

SONG, Chengcheng *et al.* IGFBP5 promotes diabetic kidney disease progression by enhancing PFKFB3-mediated endothelial glycolysis. **Cell Death & Disease**, [S. I.], v. 13, n. 4, p. 340, 2022.

SOUZA, Rávila Graziany Machado *et al.* Baru Almonds Increase the Activity of Glutathione Peroxidase in Overweight and Obese Women: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. **Nutrients**, [S. I.], v. 11, n. 8, p. 1750, 2019.

SRIVASTAVA, Rai Ajit K. Dysfunctional HDL in diabetes mellitus and its role in the pathogenesis of cardiovascular disease. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [S. I.], v. 440, n. 1–2, p. 167–187, 2018.

STEFANO, Turolo *et al.* Adherence to the Mediterranean Diet Improves Fatty Acids Profile in Pediatric Patients with Idiopathic Nephrotic Syndrome. **Nutrients**, [S. I.], v. 13, n. 11, p. 4110, 2021.

STRATTON, Steven P.; SCHAEFER, William H.; LIEBLER, Daniel C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of .beta.-carotene. **Chemical Research in Toxicology**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 542–547, 1993.

SUN, Tingli *et al.* Metformin attenuates diabetic renal injury via the AMPK-autophagy axis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [S. l.], v. 21, n. 6, p. 578, 2021.

SURWIT, Richard S *et al.* Diet-Induced Type II Diabetes in C57BL/6J Mice. **Diabetes**, [S. l.], v. 37, n. 9, p. 1163–1167, 1988.

TABEL, S. M. *et al.* Effect of vitamins A, E, C and omega-3 fatty acids supplementation on the level of catalase and superoxide dismutase activities in streptozotocin-induced diabetic rats. **Bratislava Medical Journal**, [S. l.], v. 116, n. 02, p. 115–118, 2015.

TAGHIZADEH, Fatemeh *et al.* Gliclazide attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity through inhibiting $\text{NF-}\kappa\text{B}$ and caspase-3 activity. **IUBMB Life**, [S. l.], v. 72, n. 9, p. 2024–2033, 2020.

TAK, Eunyoung *et al.* CD73-Dependent Generation of Adenosine and Endothelial Adora2b Signaling Attenuate Diabetic Nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 547–563, 2014.

TANASE, Daniela Maria *et al.* Oxidative Stress and NRF2/KEAP1/ARE Pathway in Diabetic Kidney Disease (DKD): New Perspectives. **Biomolecules**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 1227, 2022.

TESTA, Roberto *et al.* The “Metabolic Memory” Theory and the Early Treatment of Hyperglycemia in Prevention of Diabetic Complications. **Nutrients**, [S. l.], v. 9, n. 5, 2017.

THIJSSSEN, Myriam A.M.A.; HORNSTRA, Gerard; MENSINK, Ronald P. Stearic, Oleic, and Linoleic Acids Have Comparable Effects on Markers of Thrombotic Tendency in Healthy Human Subjects. **The Journal of Nutrition**, [S. l.], v. 135, n. 12, p. 2805–2811, 2005.

THOMAS, Merlin C. Targeting the Pathobiology of Diabetic Kidney Disease. **Advances in Chronic Kidney Disease**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 282–289, 2021.

TINAJERO, Maria G.; MALIK, Vasanti S. An Update on the Epidemiology of Type 2 Diabetes. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, [S. l.], v. 50, n. 3, p. 337–355, 2021.

TSUCHIYA, Ayako; KANNO, Takeshi; NISHIZAKI, Tomoyuki. Stearic Acid Serves as a Potent Inhibitor of Protein Tyrosine Phosphatase 1B. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 32, n. 5, p. 1451–1459, 2013.

TU, Qiudi *et al.* Curcumin alleviates diabetic nephropathy via inhibiting podocyte mesenchymal transdifferentiation and inducing autophagy in rats and MPC5 cells. **Pharmaceutical Biology**, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 778–786, 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13880209.2019.1688843>.

TUROLLO, Stefano *et al.* Fatty Acids in Nephrotic Syndrome and Chronic Kidney Disease. **Journal of Renal Nutrition**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 145–155, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1051227617301930>.

VALAIYAPATHI, Badhma; GOWER, Barbara; ASHRAF, Ambika P. Pathophysiology of Type 2 Diabetes in Children and Adolescents. **Current Diabetes Reviews**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 220–229, 2020.

WADA, Jun; MAKINO, Hirofumi. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Clinical Science**, [S. l.], v. 124, n. 3, p. 139–152, 2013.

WANG, Shuangyuan *et al.* Amino acids, microbiota-related metabolites, and the risk of incident diabetes among normoglycemic Chinese adults: Findings from the 4C study. **Cell Reports Medicine**, [S. l.], v. 3, n. 9, p. 100727, 2022.

WANG, Jiao *et al.* Metabolomic profiling of amino acids study reveals a distinct diagnostic model for diabetic kidney disease. **Amino Acids**, [S. l.], v. 55, n. 11, p. 1563–1572, 2023.

WANG, Zhonghua *et al.* Spatial-resolved metabolomics reveals tissue-specific metabolic reprogramming in diabetic nephropathy by using mass spectrometry imaging. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 3665–3677, 2021.

WANG, Yujia *et al.* The metabolites of *de novo* NAD⁺ synthesis are a valuable predictor of acute kidney injury. **Clinical Kidney Journal**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 711–721, 2023.

WANG, Chunliu *et al.* Ultra-Performance Liquid Chromatography-Q-Exactive Orbitrap-Mass Spectrometry Analysis for Metabolic Communication between Heart and Kidney in Adriamycin-Induced Nephropathy Rats. **Kidney and Blood Pressure Research**, [S. l.], v. 47, n. 1, p. 31–42, 2022. Disponível em: <https://karger.com/kbr/article/47/1/31/824376/Ultra-Performance-Liquid-Chromatography-Q-Exactive>. Acesso em: 25 abr. 2024.

WELCH, Andrew; VELLA, Adrian. What is type 2 diabetes?. **Medicine**, [S. l.], v. 50, n. 10, p. 625–631, 2022.

WU, Yong *et al.* Lactate, a Neglected Factor for Diabetes and Cancer Interaction. **Mediators of Inflammation**, [S. l.], v. 2016, p. 1–12, 2016.

YAMAZAKI, Tomotaka *et al.* Treatment of Diabetic Kidney Disease: Current and Future. **Diabetes & Metabolism Journal**, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 11–26, 2021a. Disponível em: <http://e-dmj.org/journal/view.php?doi=10.4093/dmj.2020.0217>.

YAMAZAKI, Tomotaka *et al.* Treatment of Diabetic Kidney Disease: Current and Future. **Diabetes & Metabolism Journal**, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 11–26, 2021b.

YAN, Hui *et al.* Estrogen improves insulin sensitivity and suppresses gluconeogenesis via the transcription factor Foxo1. **Diabetes**, [S. l.], v. 68, n. 2, p. 291–304, 2019.

YANG, HONGYING *et al.* Long-term streptozotocin-induced diabetes in rats leads to severe damage of brain blood vessels and neurons via enhanced oxidative stress. **Molecular Medicine Reports**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 431–440, 2013.

YANG, Yue; SAUVE, Anthony A. NAD + metabolism: Bioenergetics, signaling and manipulation for therapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, [S. l.], v. 1864, n. 12, p. 1787–1800, 2016.

YAO, Chi-Bei *et al.* Promotion of fatty acid metabolism and glucose metabolism in the muscle of sub-adult grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): The role of alpha-linoleic acid/linoleic acid (ALA/LNA) ratios. **Food Chemistry: X**, [S. l.], v. 19, p. 100752, 2023.

YASUDA, Itaru *et al.* Pre-emptive Short-term Nicotinamide Mononucleotide Treatment in a Mouse Model of Diabetic Nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, [S. l.], v. 32, n. 6, p. 1355–1370, 2021.

YOU, Hanning *et al.* Arginase inhibition mediates renal tissue protection in diabetic nephropathy by a nitric oxide synthase 3-dependent mechanism. **Kidney International**, [S. l.], v. 84, n. 6, p. 1189–1197, 2013.

YOU, Young-Hyun *et al.* Metabolomics Reveals a Key Role for Fumarate in Mediating the Effects of NADPH Oxidase 4 in Diabetic Kidney Disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 466–481, 2016. Disponível em: <https://journals.lww.com/00001751-201602000-00018>.

YOUSRI, Noha A. *et al.* Metabolic and Metabo-Clinical Signatures of Type 2 Diabetes, Obesity, Retinopathy, and Dyslipidemia. **Diabetes**, [S. l.], v. 71, n. 2, p. 184–205, 2022.

ZAABI, Mohammed Al *et al.* The Effect of Metformin in Diabetic and Non-Diabetic Rats with Experimentally-Induced Chronic Kidney Disease. **Biomolecules**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 814, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/6/814>.

ZHANG, Hong *et al.* Effect of repaglinide and gliclazide on glycaemic control, early-phase insulin secretion and lipid profiles in newly diagnosed type 2 diabetics. **Chinese Medical Journal**, [S. l.], v. 124, n. 2, p. 172–176, 2011.

ZHANG, Ming *et al.* The Characterization of High-Fat Diet and Multiple Low-Dose Streptozotocin Induced Type 2 Diabetes Rat Model. **Experimental Diabetes Research**, [S. l.], v. 2008, p. 1–9, 2008.

ZHAO, Tie *et al.* Metabolomic and lipidomic study of the protective effect of Chaihuang-Yishen formula on rats with diabetic nephropathy. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 166, p. 31–41, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874115000975?via%3Dihub>. Acesso em: 25 abr. 2024.

ZHOU, Chunyu *et al.* Metabolomic Profiling of Amino Acids in Human Plasma Distinguishes Diabetic Kidney Disease From Type 2 Diabetes Mellitus. **Frontiers in Medicine**, [S. l.], v. 8, 2021.

ZHU, Xiaoyu *et al.* Astaxanthin Promotes Nrf2/ARE Signaling to Alleviate Renal Fibronectin and Collagen IV Accumulation in Diabetic Rats. **Journal of Diabetes Research**, [S. l.], v. 2018, p. 1–7, 2018.

ZHU, Lili *et al.* Dietary flaxseed oil rich in omega-3 suppresses severity of type 2 diabetes mellitus via anti-inflammation and modulating gut microbiota in rats. **Lipids in Health and Disease**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 20, 2020.

ZHU, Huanhuan *et al.* Impaired Amino Acid Metabolism and Its Correlation with Diabetic Kidney Disease Progression in Type 2 Diabetes Mellitus. **Nutrients**, [s. l.], v. 14, n. 16, p. 3345, 2022.

ANEXO A- Composição da ração comercial padrão nuvilab



NUVILAB CR-1

Especificações Técnicas

24/04/2018

Rev nr 2

DESCRIÇÃO

Ração para animais de laboratório

COMPOSIÇÃO BÁSICA

Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, óleo vegetal, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio (sal comum), vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, sulfato de manganês, sulfato de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina, BHT.

PROPRIEDADES

O produto apresenta a forma física em peletes de coloração bege a marrom. Envasado em sacarias de 10 ou 20 kg.

NÍVEIS DE GARANTIA POR QUILOGRAMA DE PRODUTO:

UMIDADE (máx)	125	g/kg	MATERIAMINERAL (máx)	90	g/kg
CÁLCIO (mín max)	10 14	g/kg	PROTEÍNA BRUTA (mín)	220	g/kg
FIBRA BRUTA (máx)	70	g/kg	FÓSFORO (mín)	8.000	mg/kg
EXTRATO DE TRIGO (mín)	40	g/kg			

VITAMINAS: VITAMINA A (mín) 13.000 UI/kg; VITAMINA D3 (mín) 2.000 UI/kg; VITAMINA E (mín) 34 UI/kg; VITAMINA K3 (mín) 3 mg/kg; VITAMINA B1 (mín) 5 mg/kg; VITAMINA B2 (mín) 6 mg/kg; VITAMINA B6 (mín) 7 mg/kg; VITAMINA B12 (mín) 22 mcg/kg; NIACINA (mín) 60 mg/kg; PANTOTÊNICO DE CÁLCIO (mín) 20 mg/kg; ÁCIDO FÓLICO (mín) 1 mg/kg; BIOTINA (mín) 0,05 mg/kg; COLINA (mín) 1.900 mg/kg. MINERAIS: SÓDIO (mín) 2.700 mg/kg; FERRO (mín) 50 mg/kg; MANGANES (mín) 60 mg/kg; ZINCO (mín) 60 mg/kg; COBRE (mín) 10 mg/kg; IODO (mín) 2 mg/kg; SELENIO (mín) 0,05 mg/kg; COBALTO (mín) 1,5 mg/kg; FLUOR (máx) 00 mg/kg. AMINOÁCIDOS: LISINA (mín) 12 g/kg; METIONINA (mín) 4.000 mg/kg. ADITIVOS: BHT 100 mg/kg.

INDICAÇÃO DE USO

Ração pronta para uso, indicado para a alimentação de camundongos e ratos de laboratório.

DOSAGEM

Administração à vontade, através de comedouros suspensos.

CONSERVAÇÃO

Conservar o produto em ambiente seco e arejado, sobre estrados, evitando-se luz e calor excessivos.

PRAZO DE VALIDADE

06 meses após a data de fabricação.

ATENÇÃO:

Os produtos devem ser armazenados afastados da parede e longe de focos de contaminação. Manter uma higienização eficiente do local, com métodos legais de Controle de Pragas (empresas terceirizadas que sejam registradas no Ministério). Evitar que o produto permaneça exposto ao ambiente, mantendo-o sempre fechado. O empilhamento dos produtos não deve comprometer seu manuseio e conservação.

REGISTRO

PRODUTO ISENTO DE REGISTRO NO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - INDÚSTRIA BRASILEIRA

ANEXO B- Comitê de ética no uso de animais UNIFAL-MG

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
 Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação dos efeitos do óleo de baru (*Dipteryx alata* Vog.) sobre a modulação da função renal e do perfil metabólico em ratos diabéticos**, registrada com o nº **0057/2021**, sob a responsabilidade de **Fernanda Borges de Araújo Paula**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **10/12/2021 a 30/06/2023**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Rato / Wistar	96	96	0	Biotério central da unifal-mg

Alfenas, 22 de Março de 2022

Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira
 Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidadecertificado/> e digite a chave: a82884fec1a32c56f704edf8eb2f191

ANEXO C

Certificado de Análise do cloridrato de Metformina

FC: 1,001


SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA

APROVADO

Data: 05/11/19

Assinatura: [Assinatura]

FARM. DESTA: [Assinatura]



Lim de Estoque: /

Fórmula: /

Arquivar até: /

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Insumo:	Metformina Hcl	Data de Análise:	25-10-2019
Lote interno:	19J15-B016-053947	Lote Fabricante:	MFH190940AFP
Data de Fabricação:	01-07-2019	Data de Validade:	01-06-2024
Origem:	India	Procedência:	India
Condições de Armazenamento:	Temperatura Ambiente	Ordem de Fracionamento:	053947

DCB:	05782	DCI:	-
CAS:	1115-70-4	Peso Molecular:	165,6268
Fórmula Molecular:	C4H11N5.ClH		

Testes	Especificações	Resultados	Unidade	Referências
Descrição *	Cristais, brancos ou quase brancos.	Conforme		EP - 9
Identificação *	A: Ponto de fusão (222 - 226°C)	225,2	°C	EP - 9
Identificação *	B: IV - O espectro da amostra está de acordo com o do padrão.	Conforme		EP - 9
Identificação *	C: CCD - A mancha principal obtida no cromatograma da amostra é similar em posição, cor e tamanho à mancha principal obtida no cromatograma do padrão.	Conforme		EP - 9
Identificação *	D: Colorimétrico - Desenvolve uma coloração rosa.	Conforme		EP - 9
Identificação *	E: Positivo para cloreto.	Conforme		EP - 9
Solubilidade *	Facilmente solúvel água; Pouco solúvel em etanol 96%.	Conforme		EP - 9
Solubilidade *	Praticamente insolúvel em acetona e em cloreto de metileno.	Conforme		EP - 9
Perda por dessecação *	<= 0,5 (1g/ 105°C/ 5 horas)	0,35	%	EP - 9
Aparência da solução *	A solução S é límpida e incolor.	Conforme		EP - 9
Cinzas sulfatadas *	<= 0,1	0,03	%	EP - 9
Substâncias relacionadas(HPLC) *	Impureza A <= 0,02	Não detectado	%	EP - 9
Substâncias relacionadas(HPLC) *	Impurezas não especificadas <= 0,05	0,04	%	EP - 9
Substâncias relacionadas(HPLC) *	Total de impurezas <= 0,2	0,04	%	EP - 9
Impureza F	<= 0,05	0,01	%	EP - 9
Solvente residual (CG) *	Metanol <= 3000	547,76	ppm	EP - 9
Solvente residual (CG) *	Xileno <= 2170	Não detectado	ppm	EP - 9
Teor *	98,5 - 101,0 (Base seca)	100,32	%	EP - 9
Teste adicional				
Densidade aparente *	Informativo (Sem compactação)	0,33	g/mL	MG FB - VI

SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA



CERTIFICADO DE ANÁLISE

Insumo:	Metformina Hcl	Data de Análise:	25-10-2019
Lote Interno:	19J15-B016-053947	Lote Fabricante:	MFH190940AFP
Data de Fabricação:	01-07-2019	Data de Validade:	01-06-2024
Origem:	India	Procedência:	India
Condições de Armazenamento:	Temperatura Ambiente	Ordem de Fracionamento:	053947
DCB:	05782	DCI:	
CAS:	1115-70-4	Peso Molecular:	165,6268
Fórmula Molecular:	C4H11N5.CIH		

* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA. E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

Conclusão:

Aprovado (X)
 Reprovado ()

Farmacêutico Responsável
 João Paulo Sartin Mendes
 CRF-GO: Nº 7.355
 Fagron Services Brasil

Farmacêutico Responsável
 Amanda R. Victorino
 CRF-SP: Nº 50.835
 Fagron Brasil
 SAF: (11) 4765-5600

Farmacêutico Responsável
 Elian Amanda Fibra de Silva
 CRF-SP: Nº 61.431
 Infinity Pharma
 SATEC: (19) 2101-4005

Farmacêutico Responsável
 Bruna Tavares Gomes de Sena
 CRF-SP: Nº 73.801
 Via Farma
 SAC: (11) 4765-5643

Fim do Documento

ANEXO D- Protocolo para coloração com Hematoxilina e Eosina

Acomodar as lâminas em cubas de vidro. Máximo de 18 lâminas por cuba.

1. Xilol I – 5 minutos
2. Xilol II – 5 minutos
3. Álcool Absoluto I – 1 minuto
4. Álcool Absoluto II – 1 minuto
5. Álcool Absoluto III – 1 minuto
6. Álcool 90% – 1 minuto
7. Álcool 70% – 1 minuto
8. Lavar em água – 5 minutos
9. Hematoxilina – 1 minuto
10. Lavar em água – 5 minutos
11. Eosina – 2 minutos
12. Álcool 70% – 2 minutos
13. Álcool 90% – 2 minutos
14. Álcool Absoluto I – 2 minutos
15. Álcool Absoluto II – 2 minutos
16. Álcool Absoluto III – 2 minutos
17. Xilol I – 2 minutos
18. Xilol II – 2 minutos

Colocar a lamínula sobre os cortes utilizando Entellan® para colagem.