UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO *CAMPUS* UNIVERSITÁRIO DE SINOP Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde

EFEITO DO EXTRATO DO QUIABO (*Abelmoschus esculentus L.*) LIPOSSOMAL SOBRE HOMEOSTASE GLICÊMICA E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS PRÉ-DIABÉTICOS

KAROLINE PAIVA DA SILVA

Sinop, Mato Grosso Julho, 2023

KAROLINE PAIVA DA SILVA

EFEITO DO EXTRATO DO QUIABO (*Abelmoschus esculentus L.*) LIPOSSOMAL SOBRE HOMEOSTASE GLICÊMICA E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS PRÉ-DIABÉTICOS

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cezar de Oliveira Coorientadora: Prof.^a Dr. Stela Regina Ferrarini

> Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Sinop, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Saúde.

Sinop, Mato Grosso Julho, 2023

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.



Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

08/11/23, 16:25

SEI/UFMT - 5902703 - MESTRADO - Folha de Aprovação



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS EM SAÚDE

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "Efeito do extrato do quiabo (Abelmoschus esculentus L.) lipossomal sobre homeostase glicêmica e estresse oxidadito em ratos prédiabéticos".

AUTOR (A): MESTRANDO (A) Karoline Paiva da Silva

Dissertação defendida e aprovada em 19/07/2023.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

1. Doutor(a) Júlio Cezar de Oliveira (Presidente Banca / Orientador)

INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de Mato Grosso

2. Doutor(a) Eveline Aparecida Isquierdo Fonseca de Queiroz (Examinador Interno)

INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de Mato Grosso

3. Doutor(a) Rosiane Aparecida Miranda (Examinador Externo)

INSTITUIÇÃO: Universidade do Estado do Rio de Janeiro

4. Doutor(a) Valéria Dornelles Gindri Sinhorin (Examinador Suplente)

INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de Mato Grosso

5. Doutor(a) Veridiana Mota Moreira Lima (Examinador Suplente)

INSTITUIÇÃO: UNEMAT

SINOP, 19/07/2023.

se!	A
assinatura	12

Documento assinado eletronicamente por JULIO CEZAR DE OLIVEIRA, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso, em 19/07/2023, às 14:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

- ail	
ser	0
- I - I -	9
assinatura	_
eletrônica	

Documento assinado eletronicamente por EVELINE APARECIDA ISQUIERDO FONSECA DE QUEIROZ, Servidores Docentes e Técnicos Administrativos do ICS - CUS/UFMT, em 19/07/2023, às 14:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Rosiane Aparecida Miranda, Usuário Externo**, em 19/07/2023, às 20:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do <u>Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020</u>.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <u>http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?</u> acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5902703** e o código CRC **AA31C71F**.

https://sei.ufmt.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=17229095&infra_sistem... 1/2

08/11/23, 16:25

SEI/UFMT - 5902703 - MESTRADO - Folha de Aprovação

Referência: Processo nº 23108.042303/2023-00

SEI nº 5902703

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus pelo dom da vida e que iluminou o meu caminho durante esta jornada.

Aos meus pais, **Roseli e José Sirso**, por nunca medirem esforços ao me ajudarem, sem vocês não teria alcançado este e tantos outros sonhos. Aos meus irmãos **Rafaela e Leonardo**, por todo o apoio, admiração e amizade compartilhada. Vocês são as minhas maiores inspirações.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório, Manoela, Luis Paulo, Aline, Ingridys, Ana Caroline, Suéllen, Maria Eduarda, Sabrina por toda ajuda e conhecimento compartilhado.

Agradeço em especial ao Laboratório NanoFar por todas as oportunidades e pesquisas realizadas. Meu amor pela ciência/pesquisa fundamentou-se em vocês. Agradeço também ao Laboratório de Doenças Metabólicas e Cardiovasculares do Núcleo de Pesquisa e Apoio Didático em Saúde (NUPADS) e ao laboratório Laboratório de Avaliação Biológica de Alimentos (LABA) por toda ajuda no desenvolvimento da pesquisa, vocês fazem parte do meu crescimento profissional.

Agradeço imensamente a todos os professores que me acompanharam durante a pós-graduação, em especial a minha querida coorientadora **Stela Regina Ferrarini**, por todo o companheirismo, ensinamento e amizade compartilhados. E ao meu orientador **Júlio Cezar de Oliveira**, por todo auxílio, conhecimento e pela oportunidade de desenvolver este projeto. Obrigada por abrirem tantos caminhos no mundo acadêmico para mim.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, deixo aqui, meu eterno agradecimento e admiração.

RESUMO

Os glicocorticoides são amplamente usados na clínica médica; contudo seu uso crônico tem sido associado ao desenvolvimento de resistência à insulina. Por outro lado, o uso de compostos bioativos e alimentos funcionais tal como o quiabo (Abelmoschus esculentus L.) aparece como promissor no combate ao diabetes mellitus tipo 2. Objetivamos nesse trabalho fazer uma caracterização físico-química de lipossomas contendo quiabo e testar seu efeito hipoglicemiante em ratos com resistência à insulina induzido polo glicocorticoide sintético, dexametasona (DEX). Aos 60 dias de vida, ratos Wistar, machos e fêmeas, receberam uma injeção diária de DEX (1mg/kg de peso corporal (pc) intraperitoneal (i.p.) por 10 dias, enquanto os ratos controles (CONT) receberam solução salina (NaCl, 0,9% i.p.). Aos 65 dias, parte dos ratos DEX foram tratados, via gavagem por cinco dias consecutivos, com lipossoma contendo quiabo (1,5 mg/kg de pc, grupo DEX-LipoQ) ou extrato de quiabo na forma livre (200 mg/kg de pc, grupo DEX-ExtrL); como controle negativo, ratos DEX receberam lipossoma branco (sem quiabo, DEX-LipoB). Durante o tratamento, avaliou-se a glicemia basal, massa ponderal, ingestão hídrica e alimentar. Ao término, avaliou-se a homeostase glicêmica através de testes de tolerância à glicose, à insulina e ao piruvato. Quanto a caracterização dos lipossomas, desenvolveu-se uma estrutura de diâmetro médio de 280 nm, potencial zeta -31,46±1,48 e pH 6,8. Em relação aos ratos CONT, os ratos DEX, de ambos os sexos, apresentaram-se hiperglicêmicos, intolerantes à glicose e resistentes à insulina (P<0,05), bem como menos responsivos ao teste de tolerância ao piruvato. De modo similar, os ratos DEX-LipoB, de ambos os sexos, se apresentaram hiperglicêmicos, intolerantes à glicose e ao piruvato, e resistentes à insulina em relação aos CONT (P<0,05), não diferindo estatisticamente dos DEX (P>0,05). Os ratos DEX-LipoQ e DEX-ExtrL, em ambos os sexos, apresentaram valores de glicemia basal, tolerância à glicose e responsividade à insulina similares aos observados nos CONT (P>0,05), porém significativamente diferente daqueles observados nos ratos DEX (P<0,05). Quanto ao dimorfismo sexual, a homeostase glicêmica dos machos mostrou-se mais vulnerável ao efeito da dexametasona, bem como apresentou melhora proeminente frente ao efeito do quiabo; por outro lado, a sensibilidade periférica à insulina, em fêmeas, teve melhora com magnitude cerca de 40-vezes maior do que em machos. Em síntese, o tratamento com lipossoma contendo quiabo mesmo em concentração menor, foi eficaz em reverter o quadro de intolerância à glicose e resistência à insulina e de melhorar a responsividade ao piruvato, sendo este resultado também observado no tratamento com quiabo na sua forma livre, mas que a eficácia só foi adquirida mediante uma concentração maior do extrato do quiabo. Além disso, considerando-se a dose aplicada, o lipossoma contendo quiabo foi mais eficaz em promover o controle da glicemia nos animais hiperglicêmicos em ambos os sexos do que o quiabo em forma de extrato livre.

Palavras-chave: Hipoglicemiante; alimento funcional; nanossistemas.

ABSTRACT

Glucocorticoids are widely used in clinical medicine; however, its chronic use has been associated with the development of insulin resistance. On the other hand, bioactive compounds, and functional foods such as okra (Abelmoschus esculentus L.) appear as promising in the fight against type 2 diabetes mellitus. Our study aimed to perform a physicochemical characterization of liposomes containing okra, and to test their hypoglycemic effect in insulin resistant rats induced by synthetic glucocorticoid dexamethasone (DEX). At 60 days-old, male and female Wistar rats underwent a daily injection of dexamethasone (DEX; 1mg/kg body weight, bw) for 10 days, while control rats received saline solution (NaCl, 0.9% i.p., CONT group). At 65 days-old, a batch of DEX rats were treated, via gavage for five consecutive days, with a liposome containing okra (1.5 mg/kg bw, DEX-LipoQ group) or okra extract in the free form (200 mg/kg of pc, DEX-ExtrL), as negative control, DEX rats received white liposome (without okra, DEX-LipoB). During treatment, baseline blood glucose, body mass, water and food intake were evaluated. At the end, glycemic homeostasis through glucose, insulin and pyruvate tolerance tests was evaluated. The physicochemical characterization of the developed liposomes shows a structure with an average diameter of 280 nm, zeta potential -31.46±1.48 and 6.8 as pH. In relation to CONT rats, DEX rats, in both sexes, were hyperglycemic, glucose intolerant and insulin resistant (P<0.05), as well as reduced pyruvate response at pyruvate tolerance test. Similarly, DEX-LipoB rats, in both sexes, were hyperglycemic, glucose and pyruvate intolerant, and insulin resistant compared to CONT rats (P<0.05) but did not statistically different of the DEX rats (P>0.05). DEX-LipoQ and DEX-ExtrL rats, in both sexes, presented basal glycemia, glucose tolerance and inulin responsiveness like those observed in CONT rats (P>0.05), but significantly different of those observed in DEX rats (P<0.05). Regarding sexual dimorphism, glycemic homeostasis of males was more vulnerable to the effect of dexamethasone, as well as showing a more prominent improvement to the effect of okra; on the other hand, peripheral insulin sensitivity in females improved with magnitude around of 40-fold greater than in males. In summary, the treatment with okra, even in a smaller concentration, was effective on reversing glucose and intolerance and insulin resistance, and improving pyruvate responsiveness which was also observed in rats treated with okra in a free form, but only by using a higher okra-extract concentration. Furthermore, considering the applied dose, liposomes containing okra was more effective in promoting glycemic control in hyperglycemic animals, in both sexes, than it was using okra-extract in free form.

Keywords: Hypoglycemiant; functional food; nanosystems.

1 INTRODUÇÃO	
1.1 Papel dos glicocorticoides	
1.2 Resistência à insulina	
1.3 Moléculas bioativas contra DMT2	
1.4 Nanotecnologia	
2 OBJETIVO	221
2.1 Objetivo geral	221
2.2 Objetivos específicos	221
3 MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Obtenção do extrato de quiabo (Abelmoschus esculentus L.)	
3.2 Desenvolvimento e caracterização dos lipossomas	
3.2.1 Desenvolvimento dos lipossomas	
3.2.2 Caracterização físico-química dos lipossomas desenvolvidos	
3.2.2.1 Diâmetro das vesículas	22
3.2.2.2 Determinação de pH, Potência Zeta e aspectos macroscópicos do liposs	soma
3.3 Modelo experimental	
3.4. Avaliação da homeostase glicêmica-insulinêmica e hepática	25
3.5 Avaliação da ingestão alimentar e hídrica e composição corpo	oral dos
animais	26
3.6 Análise do estresse oxidativo	
3.6.1 Superóxido dismutase (SOD)	
3.6.2 Catalase (CAT)	
3.6.3 Glutationa -S-Transferase (GST)	
3.7 Análise estatística	
4 RESULTADOS	
4.1 Caracterização físico-química do extrato do quiabo	
4.2 Caracterização dos lipossomas desenvolvidos	
4.3 Rastreamento de 24 horas em relação à dose-resposta em lipossoma o	ontendo
extrato do quiabo	
4.4 Homeostase glicêmica durante o período de administração da dexame	tasona e
tratamento com quiabo em diferentes formulações	

SUMÁRIO

4.5 Avaliação da homeostase glicêmica-insulinêmica durante o ipGTT	32
4.6 Avaliação da homeostase glicêmica-insulinêmica durante o ipITT	34
4.7 Avaliação da homeostase glicêmica-insulinêmica durante o ipPTT	36
4.8 Peso corporal, ingestão alimentar e consumo hídrico dos animais	38
4.9 Avalição de marcadores de estresse oxidativo	42
4.10 Avalição da composição corporal	43
4.11 Avalição dos órgãos	45
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
8 ARTIGO	62

1 INTRODUÇÃO

1.1. Papel dos glicocorticoides

Os glicocorticoides (GCs) são hormônios esteroidais sintetizados pelo córtex da glândula adrenal sob situação de estresse biológico ou ambiental, sendo controlado pelo eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal (HPA; Figura 1A) (BUSADA; CIDLOWSKI, 2017). Sua concentração endógena apresenta um padrão circadiano, com pico no início da manhã, período de maior atividade (MEIJER; KOORNEEF; KROON, 2018; RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI; HYPERSENSITIVITY, 2013). Quanto ao seu mecanismo de ação, os GCs quando ligados aos seus receptores intracelulares promovem a ligação deste complexo aos elementos de resposta aos glicocorticoides ou promovem associação com outros fatores de transcrição gênica (Figura 1B), como a proteína ativadora-1 (AP1), resultando na ativação ou repressão de genes alvos (FERRIS; KAHN, 2012) O cortisol, em humanos, e a corticosterona, em roedores, atuam regulando diferentes funções celulares, envolvendo homeostase, desenvolvimento, metabolismo, cognição e inflamação (RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI; HYPERSENSITIVITY, 2013).



Em níveis fisiológicos, os GCs promovem a gliconeogênese, aumentando os níveis de glicose circulante e diminuindo a captação e utilização de glicose no músculo esquelético e no tecido adiposo. Os GCs também participam de diversos processos fisiológicos envolvidos no metabolismo energético, débito cardíaco, secreção de insulina por células β-pancreáticas, bem como atuam na regulação da transcrição gênica envolvida em diversos outros processos metabólicos (FACCHI; LIMA; OLIVEIRA; COSTERMANI et al., 2020; MOISIADIS; MATTHEWS, 2014). Na terapêutica os GCs exógenos possuem propriedades anti-inflamatórias, imunossupressoras e antiproliferativas, e têm sido utilizados para tratar diversas doenças, por exemplo, câncer, asma, doença pulmonar, doenças autoimunes e tratamento pós transplante (KAN; HIMES; THERAPEUTICS, 2021; RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI; HYPERSENSITIVITY, 2013). No entanto, a exposição crônica a concentrações elevadas pode levar a efeitos adversos, incluindo acúmulo excessivo e anormal de gordura, intolerância à glicose, diabetes mellitus e suscetibilidade a infecções(KAN; HIMES; THERAPEUTICS, 2021; MEIJER; KOORNEEF; KROON, 2018).

Em estado de jejum, a gliconeogênese é aumentada através da secreção do glucagon (Figura 2) que juntamente ao GC para manter os níveis de glicose no sangue regulados (KAN; HIMES; THERAPEUTICS, 2021). O glucagon desencadeia sua ação no figado através das vias de sinalização promovendo aumento nos níveis de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), o qual ativa a proteína quinase A (PKA) que ativa fatores de transcrição tais como a proteína ligadora do elemento de resposta ao cAMP (CREB) e o coativador transcricional regulado por CREB (CRTC2). O agrupamento CREB/CRTC2 induz a expressão do receptor ativado por PGC1a, coativando fatores de transcrição, como hepatócito 4 α (HNF4α), forkhead box O1 (FOXO1) e receptor do GC (GR), para ativar a gliconeogênese hepática (CUI; FAN; ZHANG; ZHANG et al., 2019). Contudo, o aumento anormal da gliconeogênese hepática pode resultar na hiperglicemia de jejum no diabetes. Já no estado pós-prandial, os níveis de insulina no sangue são aumentados, inibindo a gliconeogênese hepática e promovendo a captação de glicose pelos tecidos periféricos. Desta forma, a insulina inibe a gliconeogênese hepática, diminuindo os reguladores transcricionais gliconeogênicos dentre estes, os FOXO1, PGC1a e CRTC2 (FERRIS; KAHN, 2012; YUEN; CHONG; RIDDLE, 2013).



Os GCs foram descobertos na década de 1940, como extratos do córtex adrenal seguido pelo isolamento do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) dos extratos da glândula pituitária. A cortisona e o ACTH foram considerados benéficos no tratamento da artrite reumatoide. Harvey e colegas mostraram pela primeira vez que o ACTH era benéfico no tratamento de doenças alérgicas em 1949, mas o uso de GCs sistêmicos foi limitado por efeitos colaterais. Os GCs inalatórios foram descobertos a partir de esteróides tópicos desenvolvidos para inflamação da pele e o dipropionato de beclometasona foi introduzido em 1972, inicialmente em doses baixas, mas posteriormente em doses mais altas, tornando-se o tratamento padrão para asma persistente (HARVEY; HOWARD; WINKENWERDER; BORDLEY *et al.*, 1949). Posteriormente, os glicocorticoides inalatórios foram combinados com β 2-agonistas de ação prolongada em inaladores combinados para um benefício terapêutico ainda maior. Diante do exposto, a busca por glicocorticóides ainda mais seguros e com redução de efeitos colaterais se tornava necessário (BARNES, 2014).

Já em 1960 surgiu a primeira cortisona sintética, evoluindo até os dias atuais para a dexametasona (DEX), considerado como o membro mais potente da família dos GCs

(HEITZER; WOLF; SANCHEZ; WITCHEL *et al.*, 2007). Estudos demonstraram que o uso de DEX em baixas concentrações sob condrócitos humanos saudáveis causou morte celular e reduziu proliferação celular, sugerindo potenciais efeitos colaterais citotóxicos e catabólicos. Ainda, tratamentos crônicos com o uso de DEX resultaram em efeitos metabólicos, tal como hiperglicemia, hipertensão, esteatose hepática e síndrome de Cushing iatrogênica, causada pela exposição prolongada a níveis elevados de cortisol (BROOKS; SCHULMAN-ROSENBAUM; GRIFF; LESTER *et al.*, 2022; HOPKINS; LEINUNG, 2005).

1.2. Resistência à insulina

Mundialmente, o diabetes se tornou um sério problema de saúde pública, cujas previsões vêm sendo superadas a cada nova triagem. Um estudo de carga global sobre o diabetes *mellitus*, identificou que, em 1995, havia 135 milhões de pessoas com diabete no mundo, o qual realizou projeções que mostram que em 2025 esse número chegará a 300 milhões (KING; AUBERT; HERMAN, 1998). Estima-se que 2/3 desses pacientes vivem em países em desenvolvimento, sendo que países como Brasil, Índia e China terão duas vezes mais pacientes com diabete do que os Estados Unidos (BARBOSA; BARCELÓ; MACHADO, 2001; YACH; STUCKLER; BROWNELL, 2006).

A insulina é um hormônio anabólico produzido pelas células β -pancreáticas, e atua regulando os níveis de glicose no sangue, bem como modulando a produção e gasto de energia no corpo (OBICI; ZHANG; KARKANIAS; ROSSETTI, 2002). Os principais tecidos-alvos da insulina são o figado, o músculo esquelético e o tecido adiposo branco (TOKARZ; MACDONALD; KLIP, 2018), os quais dependem estritamente da ação da insulina para promover seu papel fisiológico no que tange a homeostase da glicose. A insulina, quando liberada na corrente sanguínea, se liga a seu receptor nas membranas celulares para atuar como regulador metabólico, contudo tanto os processos de secreção quanto de ação da insulina podem ser alterados por fatores fisiológicos e/ou patológicos, os quais podem levar o indivíduo ao desenvolvimento de doenças metabólicas associadas a desregulação da homeostase da glicose. Como exemplo, a insuficiência das células β pancreáticas tanto pela incapacidade de secretar insulina (disfunção das células β e/ou massa insuficiente das células β), bem como devido à ação inadequada da insulina sobre seus receptores contribuem para o surgimento da fisiopatologia conhecida como diabetes,

tanto do diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) quanto do diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (HAEUSLER; MCGRAW; ACCILI, 2018).

A sinalização da insulina ocorre através de uma cascata de sinalização que se ramifica em duas principais vias. A primeira via responsável pela ação da insulina na captação de glicose e supressão da gliconeogênese é a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) -AKT (também chamada de proteína quinase B (PKB). A segunda via é a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) que medeia a expressão gênica, mas também interage com a via PI3K-AKT para controlar o crescimento celular e a diferenciação. O substrato para receptor de insulina (IRS) medeia essas duas vias, através de quatro membros distintos da família, IRS1-4. A fosforilação da tirosina do IRS1 ativada pelo receptor de insulina, inicia a transdução do sinal. Quando o IRS1 é fosforilado na serina 307, sua capacidade de sinalização é diminuída. As serina-quinases que fosforilam a serina tardia 307 incluem I kappa B quinase beta (Ikkb) na via NFjB e C-jun N-terminal quinase 1 (Jnk1) na via JNK/AP-1. A inflamação induz Socs1 e Socs3, promovendo a degradação das proteínas IRS.

Os GCs agem diretamente no músculo, fígado e outros tecidos inibindo uma série de etapas na rede de sinalização de insulina através de diferentes mecanismos resultando na resistência à ação da insulina (FERRIS; KAHN, 2012). A insulina age ligando-se ao seu receptor, levando ao aumento da atividade quinase e à fosforilação da tirosina de várias moléculas sinalizadoras, incluindo IRS-1 a IRS-4. Essas proteínas ativam as vias PI3K e MAPK, levando a uma série de efeitos (THORNTON; WINN; ALPERS; ZAGER, 1989). No músculo esquelético, os GCs diminuem a transcrição de IRS-1, enquanto aumentam a transcrição de duas proteínas que combatem a ação da insulina, a proteína tirosina fosfatase tipo 1B (PTP1B) e p38MAPK (RABB; MENDIOLA; DIETZ; SABA *et al.*, 1994). Um aumento semelhante na transcrição de p38MAPK é observado no figado (KELLY; WILLIAMS; COLVIN; MEEHAN *et al.*, 1996). Os GCs também diminuem os níveis de IRS-1 e IRS-2 no tecido adiposo branco (BURNE; DANIELS; EL GHANDOUR; MAUIYYEDI *et al.*, 2001), enquanto há uma diminuição na fosforilação de IR e IRS-1 em resposta aos GCs no figado (FERRIS; KAHN, 2012).

Fatores secretados pelo tecido adiposo, como adipocinas, também atuam modificando a sensibilidade à insulina dos tecidos, como a adiponectina (Figura 3). Os GCs também promovem proteólise, lipólise, aumentando a produção de ácidos graxos livres e acúmulo de gordura no fígado, o que pode contribuir para a resistência à insulina (MARRON; RAFFEL; GARCHON; JACOB *et al.*, 1997). Além disso, os GCs promovem diretamente a gliconeogênese hepática, aumentando a hiperglicemia. A disfunção das células β pancreáticas permite o desenvolvimento da hiperglicemia, contribuindo para o desenvolvimento de diabetes franca, observada em alguns casos na terapia crônica com glicocorticoides (FERRIS; KAHN, 2012).



Em modelos animais, os GCs reduzem a expressão e fosforilação do IRS-1, da PI3-K e da PKB)/Akt, e a migração do transportador de glicose GLUT-4 para a superfície da célula (TOMLINSON; WALKER; BUJALSKA; DRAPER *et al.*, 2004). Além disso, os GCs mobilizam a deposição de gordura no compartimento visceral enquanto reduzem os estoques de gordura periféricos e induzem a diferenciação pré-adipócita, a atividade da lipoproteína lipase e a síntese de triglicerídeos, levando ao aumento da massa de tecido adiposo (KIM; PHAM; MALONEY; RIZZO *et al.*, 2008).

Estudos anteriores também abordam que a administração de diferentes doses de dexametasona por 5 dias em ratos adultos induz hiperinsulinemia e resistência à insulina de forma dose-dependente e ação diminuída da insulina perifericamente induz adaptações compensatórias no pâncreas endócrino (RAFACHO; CESTARI; TABOGA; BOSCHERO *et al.*, 2009). A maioria dos estudos *in vitro* mostra um efeito negativo dos GCs na secreção, proliferação e sobrevivência das células β-pancreáticas (FICHNA; FICHNA, 2017). Outro estudo realizado em ilhotas humanas e com células Min6 (linhagem de células β de camundongo) mostra que a dexametasona ou prednisolona leva a uma diminuição na viabilidade celular, via ativação da p38 MAPK/TXNIP, além disso, também se sabe que a dexametasona induz degradação pós-traducional de GLUT2 e inibição da secreção de insulina em células β-pancreáticas (GREMLICH; RODUIT; THORENS, 1997; REICH; TAMARY; SIONOV; MELLOUL, 2012). Assim, percebemos que os glicocorticoides interferem na sinalização da insulina e são capazes de modular a sinalização da insulina em nível molecular além de afetar a função das células beta pancreáticas.

1.3. Moléculas bioativas contra DMT2

No caso do DMT2, o uso de alternativas terapêuticas, outras tais como o uso de plantas medicinais que proporcionem efeito hipoglicemiante, assim como também redução dos efeitos colaterais e adversos em relação aos fármacos sintéticos é de grande importância para a saúde do paciente acometido com o DMT2 e tem sido de grande importância para tratar diversas doenças (UNUOFIN; LEBELO, 2020).

Atualmente, o uso das terapias envolvendo plantas medicinais vem trazendo muitas evidências sobre a eficácia destes produtos na prevenção do DMT2, de modo que estudos envolvendo diferentes meios para o tratamento do DMT2 tiveram uma mudança notável entre os medicamentos convencionais e terapias que empregam moléculas bioativas ou fitomoléculas oriundas de fontes naturais (UNUOFIN; LEBELO, 2020). O potencial terapêutico dos produtos naturais, seu baixo custo e efeitos colaterais mínimos, vem revolucionando e aprimorando o gerenciamento de novos medicamentos (TIWARI; AHMAD; BAIG, 2017). Diante disso, sabemos que o DMT2 é uma patologia passível de

prevenção, portanto, reduzir a incidência de novos casos pode ser uma ótima estratégia em minimizar o impacto global dessa fisiopatologia.

Dentre essas plantas medicinais/compostos bioativos, pode-se citar a mangiferina $(2-\beta-D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxi-9H-xanten-9-ona)$, uma xantona de baixo peso molecular, encontrada principalmente em plantas superiores, tais como a manga. A magniferina é um composto bioativo que possui potencial terapêutico antioxidande, hipoglicêmico e antidiabético, além de outros efeitos como ação antimicrobiana, antialérgica e imunomoduladora (ASWAL; KUMAR; CHAUHAN; SEMWAL *et al.*, 2020; IMRAN; ARSHAD; BUTT; KWON *et al.*, 2017).

A curcumina, molécula bioativa presente no rizoma da *Curcuma longa* vem sendo bastante estudada atualmente devido seus diferentes efeitos biológicos e farmacológicos anti-hiperglicêmicos e anti-hiperlipidêmico (OLIVEIRA; MONTEIRO-ALFREDO; SILVA; MATAFOME, 2020). Em um estudo recente com ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, os autores concluíram que a curcumina tem o potencial antidiabético e pode prevenir o desenvolvimento do DMT2, por atuar nas células β-pancreáticas, melhorando sua função secretora, bem como por diminuir a resistência periférica à insulina e reduzir dano hepático (PIVARI; MINGIONE; BRASACCHIO; SOLDATI, 2019).

Outra planta de importância medicinal é a babosa, pertencente à família Asphodelaceae, espécie *Aloe vera* L. Burm. As Asphodelaceae possuem alcalóides, flavonóides, taninos, fenóis, saponinas, carboidratos, vitaminas e minerais. Recentemente estudos científicos têm dado suporte para a ação antidiabética e antioxidante da babosa (SUKSOMBOON; POOLSUP; PUNTHANITISARN, 2016) Se tratando da ação antidiabética em modelo experimental com roedores, o extrato aquoso de *Aloe vera*, via oral, reduziu os níveis glicêmicos de forma significativa, além de promover menores efeitos colaterais comparados a outros fármacos sintéticos (OKYAR; CAN; AKEV; BAKTIR *et al.*, 2001).

No contexto do uso de plantas medicinais que previnem o DMT2, o quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.), planta da família das Malváceas, que se situa entre as hortícolas de alto valor alimentício, de fácil cultivo e rentável devido sua grande utilidade possui capacidade terapêutica para o DMT2, uma vez que esta planta possui fibras dietéticas e polifenóis em abundância, contribuindo no efeito hipoglicemiante, já que estudos apontam que a fibra alimentar, comum em alimentos funcionais, promove efeitos importantes no controle dos níveis glicêmicos pós prandial (ERFANI MAJD;

TABANDEH; SHAHRIARI; SOLEIMANI, 2018). Como previamente demonstrado, em um estudo sobre o uso da porção polar ou fração solúvel em água do extrato de quiabo, quando administrado em ratos, foi possível observar que este ativo permite o controle dos níveis glicêmicos e pode ser uma alternativa para o controle do DMT2 (KHATUN; RAHMAN; BISWAS; ISLAM, 2011).

Através dessa abordagem é considerável que pesquisas adicionais que possam contribuir para gerar mais informações sobre o efeito hipoglicemiante do quiabo, por exemplo, por meio da aplicação da nanotecnologia, com o intuito de aumentar a eficácia do tratamento do DMT2 envolvendo plantas medicinais. Ainda, estes estudos são de grande relevância (DISANTO; SUBRAMANIAN; GU, 2015), uma vez que a maioria dos constituintes biologicamente ativos dos extratos, do quiabo como por exemplo, flavonoides e taninos, são altamente solúveis em água, porém com baixa absorção, sendo incapazes de atravessar as membranas lipídicas das células, além de possuírem tamanho molecular excessivamente alto, resultando em perda de biodisponibilidade e eficácia (BONIFACIO; DA SILVA; RAMOS; NEGRI *et al.*, 2014).

Diante desses obstáculos, tem sido proposto combinar ativos vegetais com nanotecnologia, pois sistemas nanoestruturados podem ser capazes de potencializar a ação de extratos vegetais, reduzindo a dose necessária e efeitos indesejáveis, além de fornecer o constituinte ativo em uma concentração suficiente durante todo o período de tratamento, direcionando-o para o local de ação desejado, uma vez que muitos tratamentos convencionais não proporcionam esses requisitos (ABU LILA; ISHIDA, 2017; BONIFACIO; SILVA; RAMOS; NEGRI *et al.*, 2014).

1.4. Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que vem sendo estudada como uma ferramenta para a liberação e ação de uma substância ativa, conferindo estabilidade, segurança e eficácia (PATRA; DAS; FRACETO; CAMPOS *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, a nanotecnologia tem sido aplicada no desenvolvimento de novos sistemas de liberação, que muitas vezes são estratégias eficientes para veicular os fármacos e/ou ativos ao seu local de ação em aplicações no tratamento de doenças. Entre esses veículos, estão nanopartículas poliméricas, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões, entre outros (BONIFACIO; DA SILVA; RAMOS; NEGRI *et al.*, 2014).

Desta forma, a escolha de um sistema de liberação de fármacos depende principalmente da estrutura química e do alvo a ser atingido. O sistema de liberação incorpora a substância ativa sem que haja perda ou alteração de sua atividade, objetivando-se preferencialmente sua potencialização e/ou redução da toxicidade do mesmo. Ainda, o sistema pode ser composto de componentes biodegradáveis e não apresentar imunogenicidade (MAZAYEN; GHONEIM; ELBATANONY; BASALIOUS *et al.*, 2022).

Os lipossomos são sistemas vesiculares de formato esférico formados por uma ou mais bicamadas lipídicas envolvendo um núcleo aquoso, mimetizando a membrana celular (Figura 4). São compostos em sua maioria por fosfolipídios e colesterol (CASTAÑEDA-REYES; PEREA-FLORES; DAVILA-ORTIZ; LEE *et al.*, 2020). Ainda, a inclusão de polímero sintético polietilenoglicol (PEG) em sua composição permite uma circulação de longa duração do lipossoma (IMMORDINO; DOSIO; CATTEL, 2006). As vesículas apresentam tamanho nano ou micrométrico variando de 50 a 500 nm (SALA; DIAB; ELAISSARI; FESSI, 2018).



As vantagens do uso de lipossomas como um sistema de entrega são reconhecidas na literatura científica, sendo aplicados em diferentes tratamentos como em doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, diabetes, câncer, malária e inflamação (SHAH; DHAWAN; HOLM; NAGARSENKER *et al.*, 2020). Desse modo, os lipossomas têm despertado grande interesse da indústria farmacêutica e cosmética por apresentarem direcionamento aos tecidos/células-alvo, redução da toxicidade, tempo de circulação prolongado e biodisponibilidade (CASTAÑEDA-REYES; GONZALEZ DE MEJIA; ELLER; BERHOW *et al.*, 2021). Um exemplo de formulação disponível no mercado é a Daunoxome[®] (Gilead Sciences), indicada como uma terapia citotóxica de primeira linha para sarcoma de Kaposi em estado avançado relacionado com o HIV, no qual a droga incorporada é a daunorrubicina (ALLEN; K CHENG; HARE; LAGINHA, 2006).

Diante disso, sabe-se que até o presente momento, relatos de estudos utilizando a nanotecnologia para associação de substâncias ativas presentes no quiabo (*Abelmoschus esculentus L.*) são ainda escassos. Portanto buscamos desenvolver e avaliar o efeito do quiabo em um sistema nanoestruturado sobre homeostase glicêmica e estresse oxidativo em um modelo já bem caracterizado de ratos acometidos com resistência à insulina induzidos pela aplicação suprafisiológica de DEX.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia do tratamento do extrato de quiabo (*Abelmoscus esculentus* L.) lipossomal sobre a homeostase glicêmica em ratos machos e fêmeas pré-diabéticos.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e caracterizar físico-quimicamente lipossomas contendo extrato de quiabo (NC);
- ✓ Avaliar tais parâmetros alimentares e composição corporal dos animais;
- ✓ Avaliar a homeostase glicêmica-insulinêmica;
- ✓ Avaliação da ingestão alimentar e hídrica e composição corporal dos animais;
- ✓ Análise do estresse oxidativo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção do extrato de quiabo (Abelmoschus esculentus L.):

O extrato de quiabo foi obtido por decocção e triturado em moinho de facas. Posteriormente o homogenato foi filtrado para a obtenção do extrato aquoso. Parte do extrato obtido foi utilizado para o desenvolvimento de lipossomas e outra porção do extrato aquoso foi armazenada à –20°C, para uso posterior.

Uma porção desse extrato foi desidratada e utilizada para determinação dos constituintes presentes no quiabo através do método físico-químico para análise de alimentos descrito pelo instituto Adolfo Lutz, 2008 (Métodos Físico-químicos para Análises de Alimentos).

3.2. Desenvolvimento e caracterização dos lipossomas

3.2.1. Desenvolvimento dos lipossomas

Lipossomas contendo extrato de quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.) foram preparados através do método de hidratação de filme lipídico (MERTINS; CARDOSO; POHLMANN; DA SILVEIRA, 2006). Primeiramente a fase orgânica foi preparada com fosfatidilcolina, colesterol em solvente orgânico (clorofórmio) com a ajuda de ultrassom por 5 min. Já a fase aquosa foi preparada contendo solução salina tamponada em fosfato (pH 7,4) e polissorbato 80. Quando ambas as fases estavam solúveis, 1 mL da fase aquosa foi adicionada na fase orgânica e retornou ao ultrassom por mais 5 min. Em seguida o solvente orgânico foi removido por evaporação rotatória à 25°C sob pressão reduzida até a formação de um filme fino. Este filme foi hidratado adicionando o restante da fase aquosa e submetido a agitação (280 rpm) por 30 min. Por fim, o lipossoma foi submetido a um processo de extrusão das micelas com 10 ciclos de extrusão utilizando membranas de policarbonato de poros de tamanhos decrescentes.

3.2.2. Caracterização físico-química dos lipossomas desenvolvidos

Os lipossomas foram caracterizados quanto ao diâmetro da partícula, potencial zeta (ζ) e pH. Esse procedimento foi realizado pela equipe da Prof. Dra. Sandra Elisa Haas, da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA, Uruguaiana/RS).

3.2.2.1 Diâmetro das vesículas

Os lipossomas foram caracterizados quanto ao seu diâmetro médio, índice de polidispersão (PDI) por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e eletroforese laser Doppler (LDE), medida à 25°C (NanoBrook 90Plus Zeta[®], Brookhaven Instruments Corportation, USA). As amostras foram diluídas previamente com água MilliQ[®] e 0,01 mol/L de solução aquosa de NaCl. Foram filtrados os meios de diluição (0,45 µm) antes da análise, porém cada amostra foi utilizada diretamente, sem filtração ou qualquer outro tratamento, a fim de evitar a seleção das amostras. Ainda para avaliar o tamanho da partícula, também foi utilizada a técnica de difratometria de laser, utilizando o equipamento Mastersizer[®] 2000 (Malvern Instruments) e o acessório Scirocco[®] 2000. Após obtenção dos dados de 26 difrações de laser, estes foram avaliados utilizando o valor d_{4,3}, o qual representa o diâmetro médio baseado no volume da partícula e ainda os valores de 10% (d10%), 50% (d50%) e 90% (d90%) da distribuição, que indicam a porcentagem de partículas possuindo diâmetro igual ou inferior ao valor determinado. O valor do Span (Equação 1), que indica o valor da polidispersão do sistema, também foi utilizado para a caracterização das formulações.

 $d_{0,1}, d_{0,9} e d_{0,5}.$

$$Span = \frac{d_{0,9} - d_{0,1}}{d_{0,5}} \qquad \qquad \text{Eq. (1)}$$

Onde d $_{0,1}$ é o diâmetro cumulativo em volume de 10% da fase dispersa da nanoestrutura analisada. Do mesmo modo, d $_{0,9}$ é o diâmetro cumulativo em volume de 90% da população total. Finalmente d $_{0,5}$ é o parâmetro que divide a distribuição percentual de volume obtida exatamente na metade, ou seja, 50% do volume total das nanoestruturas da fase dispersa encontra-se abaixo do valor de d $_{50}$ e 50% encontram-se acima dele.

3.2.2.2 Determinação de pH, Potencial Zeta e aspectos macroscópicos dos lipossomas

Para realizar a determinação do pH foi utilizado um potenciômetro (Denver[®] Instrument VB-10, New York, USA) calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas formulações, logo após a preparação. Os resultados representaram a média de três determinações. Os lipossomas foram avaliados segundo a aparência macroscópica, levando em consideração a homogeneidade, aspecto leitoso, branco e opalescente. O potencial zeta foi determinado após diluição das vesículas em 500 vezes em solução de NaCl 10 mM/L, previamente filtrada através de membrana 0,45 µm, sendo

as medidas efetuadas em triplicata analisando a amostra pela sua mobilidade eletroforética.

3.3. Modelo experimental

Foram usados ratos Wistar, criados no biotério setorial do Núcleo de Pesquisa e Apoio Didático em Saúde (NUPADS), da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), *Campus* Universitário de Sinop. Os experimentos foram desenvolvidos de acordo com as normas do Comitê de Ética para uso e Experimentação Animal da Universidade Federal de Mato Grosso (Processo Nº 23108.070797/2021-42). Durante o período experimental, os ratos foram mantidos em condições controladas de temperatura $(22 \pm 2 \text{ °C})$, umidade $(55\pm 5 \text{ %})$ e fotoperíodo (12 h de claro, 06:30 às 18:30 h e 12 h de escuro), com água e comida *ad libitum*.

O modelo experimental foi produzido a partir da administração intraperitoneal de dexametasona (1 mg/kg de peso corporal, uma vez ao dia) em ratos Wistar de ambos os sexos, a partir dos 60 dias de vida, até o término do tratamento, que se deu aos 70 dias de vida dos animais. Durante dez dias de tratamento com DEX foi aferido o peso corporal, bem como a ingestão alimentar e hídrica dos ratos a cada dois dias. Os ratos tratados com dexametasona (grupo DEX, n=80 ratos machos e n=80 ratas fêmea receberam injeção diária de dexametasona intraperitoneal (1 mg/kg de peso corporal, i.p.) por 10 dias consecutivos, enquanto ratos controle (grupo CONT, n=15 ratos machos e n=15 ratas fêmeas) receberam solução salina (NaCl, 0,9%), segundo protocolo adaptado de estudo prévio (RAFACHO; MARROQUI; TABOGA; ABRANTES *et al.*, 2010). A glicemia dos ratos (alimentados) foi avaliada antes (dia zero) e durante (ao quinto e ao oitavo dia) o tratamento com DEX. Ao quinto dia, após o início da indução de resistência à insulina (tratamento com DEX), iniciou-se o tratamento com o extrato do quiabo, seja este em formulação lipossômica (DEX-LipoQ) ou na forma de extrato livre (DEX-ExtAB), além dos lipossomas sem conter o extrato de quiabo (DEX-LipoB).

Dessa forma, além do grupo CONT, em todo o estudo foram formandos cinco grupos experimentais de ambos os sexos:

- Grupo DEX (n=20 ratos machos e n=20 ratas fêmeas), grupo não tratado com quiabo, mas que recebeu água via gavagem;
- Grupo DEX-LipoQ (n=20 ratos machos e n=20 ratas fêmeas), grupo que foi tratado com quiabo em formulação lipossômica (1,5 mg/kg de peso corporal);

- Grupo DEX-LipoB (n=20 ratos machos e n=20 ratas fêmeas), grupo que foi tratado com lipossoma vazio, sem quiabo (1,5 mg/kg de peso corporal);
- Grupo DEX-ExtAB (n=20 ratos machos e n=20 ratas fêmeas), grupo que foi tratado quiabo na forma de extrato aquoso bruto (200 mg/kg de peso corporal).

O rastreamento de 24 horas em relação à dose-resposta foi realizado como forma de confirmar a dose adequada do quiabo em lipossoma que seria utilizada durante o período experimental com ação hipoglicemiante.

3.4. Avaliação da homeostase glicêmica-insulinêmica

A glicemia de ratos alimentados foi avaliada ao quinto, oitavo e décimo dia durante o período experimental.

A avaliação da homeostase glicêmica e insulinêmica foi realizada através do teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT), segundo o método descrito anteriormente (MATHIAS; MIRANDA; BARELLA; MIRANDA *et al.*, 2020). Após jejum de 12 horas (6:00–18:00h) e sem efeito de anestesia, administrou-se uma carga de glicose (2g/kg de peso corporal, ip). Antes da administração de glicose foi realizada uma primeira dosagem da glicemia de jejum, que correspondeu ao tempo zero (0 minutos); em seguida aplicou-se a glicose, e então, após 30, 60, 90 e 120 minutos da aplicação de glicose foram feitas novas dosagens de glicose sanguínea.

Quanto ao teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT), após jejum de 4 horas (07:00–11:00h) e sem efeito de anestesia, foi administrada uma dose de insulina (1 IU/kg de peso corporal, ip). Antes da administração de insulina uma primeira dosagem da glicemia foi obtida, correspondendo ao tempo zero (tempo zero, para obtenção da glicemia de jejum sem efeito da ação da insulina, 0 min); e então após a administração da insulina, nos tempos 15, 30, 45 e 60 min foram feitas novas dosagens de glicose sanguínea.

Após a realização do ipITT, procedeu-se o cálculo para determinação da taxa de captação tecidual de glicose, ou seja, a constante de desaparecimento de glicose no plasma (K_{itt}), a qual foi calculada pela fórmula 0,693/(t_{1/2}), conforme descrito anteriormente (DE OLIVEIRA; SCOMPARIN; ANDREAZZI; BRANCO *et al.*, 2011). Neste caso, a meiavida da glicose plasmática foi calculada a partir da inclinação da análise dos mínimos quadrados das concentrações de glicose plasmática durante a fase linear do declínio da curva (LUNDBAEK, 1962).

Para avaliar a associação entre tolerância à glicose e a função gliconeogênica

hepática foi realizado o teste de tolerância ao piruvato ip (ipPTT). Para tanto, após jejum de 12 horas (6:00–18:00h), os ratos foram submetidos a uma injeção de piruvato (2g/kg de peso corporal, ip). Antes da administração do piruvato foi feita uma primeira dosagem da glicemia, a partir de gota de sangue da ponta da cauda dos animais, através de glicosímetro digital (Accu-Chek[®] Performa, Roche) tal como nos testes anteriores, onde este valor de glicemia correspondeu ao tempo zero (tempo zero, para obtenção da glicemia de jejum de 12 horas, 0 min), em seguida aplicou-se o piruvato. Após a aplicação do piruvato, nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos foram aferidos os valores glicêmicos (BERTASSO; PIETROBON; DA SILVA; MIRANDA *et al.*, 2020).

A dosagem da glicemia em todos os procedimentos, ipGTT, ipITT e ipPTT se deu através de glicosímetro digital (Accu-Chek[®] Performa, Roche).

3.5. Avaliação da ingestão alimentar e hídrica e composição corporal dos animais

Durante todo o período experimental a massa corporal, assim como também a ingestão alimentar e hídrica dos animais foi registrada a cada dois dias. O peso corporal foi realizado através da pesagem dos animais em balança digital (SF-400).

A ingestão alimentar e hídrica foi aferida por meio do cálculo de subtração entre o valor colocado na caixa e o valor restante após dois dias, o qual também foi dividido pelo número de ratos na caixa e pelo número de dias (2). Esse procedimento foi realizado considerando-se a ingestão média de todos os animais na caixa, relativizada pelo peso corporal e apresentado como g/100g de peso corporal.

Após o término dos procedimentos experimentais, os animais de todos os grupos experimentais, sob jejum de 12 horas (19:00–07:00h) foram eutanasiados por decapitação em guilhotina para roedores. Imediatamente após a eutanásia, coletou-se e pesou-se amostras teciduais para análises biométricas.

3.6. Análise do estresse oxidativo

A análise do estresse oxidativo foi realizada por meio da mensuração dos marcadores de defesa antioxidante como superóxido dismutase (SOD), catalase e glutationa-S-transferase (GST). Para a normalização dos ensaios foi determinado a quantidade de proteína total das amostras, por meio do método de Bradford (HE, 2011), a 595 nm, utilizando albumina de soro bovino como padrão.

3.6.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por (MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I., 1972; MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. J. J. O. B. C., 1972), onde a enzima inibe a auto-oxidação do bitartarato de adrenalina. A amostra de fígado foi diluída na proporção 1:30 e homogeneizada com tampão fosfato de potássio mono/dibásico 50 mM, pH 7,8. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm à 4 °C por 20 minutos. Para leitura da atividade da SOD, foram preparados uma solução de bitartarato de adrenalina 60 mM e tampão de carbonato de sódio (Na₂CO₃), 0,057 M. A atividade enzimática foi medida em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 480 nm. As leituras foram realizadas nos volumes de 10 μ L, 25 μ L e 50 μ L, onde os valores das absorbâncias devem abaixar conforme aumenta o volume da amostra. O resultado foi expresso como UI SOD/mg proteína.

3.6.2 Catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada de acordo com (NELSON, D. P.; KIESOW, L. A., 1972; NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. J. A. B., 1972). A amostra de fígado foi homogeneizada na proporção 1:30 com solução resfriada com tampão fosfato 20 mM, pH 7,4, com Triton X-100 e cloreto de sódio (NaCl) foi utilizado um homogeneizador dispersor; as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm à 4 °C por 15 minutos em seguida. Para a leitura da atividade da CAT foram preparados o tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, e H₂O₂ 300 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 240nm. A leitura da atividade da catalase ocorre pela velocidade com que a H₂O₂ é reduzida pela ação da enzima. A diferença na leitura das absorbâncias a 240 nm, em determinado intervalo de tempo (15 segundos), permite estabelecer a velocidade de redução do H₂O₂ à H₂O, o que é proporcional à velocidade da reação enzimática catalisada pela catalase. O resultado foi expresso como μ mol/min/mg proteína.

3.6.3 Glutationa -S-Transferase (GST)

As amostras de fígado foram diluídas na proporção de 1:30. Em seguida, foram homogeneizadas com tampão de fosfato de potássio 20 mM, pH 7,0. Após a homogeneização, foram centrifugadas à 10.000 rpm à 4 °C por 15 minutos. Para leitura, foram preparadas soluções de tampão de fosfato de potássio 20 mM, pH 6,0, GSH 10 mM e CDNB 20 mM. Durante a leitura foi utilizado 1,250 mL de tampão com pH 6,0, mais 150 µL de GSH, 25 µL de plasma e 75 µL de CDNB. O resultado foi expresso como µmol

GS-DNB/min/mg proteína (HABIG; PABST; FLEISCHNER; GATMAITAN et al., 1974; HABIG; PABST; JAKOBY, 1974).

3.7. Análise estatística

Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade para avaliação da distribuição Gaussiana, em assumindo uma distribuição Gaussiana, os dados foram submetidos a análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey, considerando-se valores P<0,05 como estatisticamente significativos.

Todas as avaliações estatísticas foram realizadas através do programa estatístico GraphPad Prism, versão 8.0 (GraPhpad Prism 8.0, Software for Windows, San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização físico-química do extrato do quiabo

A tabela 1 mostra o relatório de ensaio físico-químico dos componentes funcionais presente no fruto do quiabo.

Tal	bela	1.	Caracterizaçã	o físico-q	juímica do) extrato d	lo quiab	0
-----	------	----	---------------	------------	------------	-------------	----------	---

Extrato	Umidade (%)	Cinza (%)	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Açúcares redutores (%)	Fibras (%)	Fenóis totais (mg/100g)	Potencial Antioxidante (DPPH) (µmol/g)
Concentrado	27,160	13,910	14,380	0,00	0,760	45,65	113,140	
Aquoso	98,54	Х	Х	Х	Х	Х	Х	705,50

4.2 Caracterização dos lipossomas desenvolvidos

Na tabela 2 estão apresentados os valores referentes à caracterização físicoquímica dos lipossomas desenvolvidos.

Tał	oela 2	. C	Caracterização	físico-q	uímica	do l	lipossoma
-----	--------	-----	----------------	----------	--------	------	-----------

Formulações	Difração d	e laser	Espectroscopia de fót	de correlação ons	Potencial zeta (mV)	рН
	D4,3 (µm)	Span	Z-Average (nm)	PDI		
LipoB	$0,\!230\pm0,\!030$	$1,21\pm0,10$	$250\pm0,\!12$	$0,\!076\pm0,\!157$	$-28,\!20\pm0,\!10$	7,10
LipoQ	$0{,}280\pm0{,}047$	$1,\!39\pm0,\!54$	$266 \pm 0{,}20$	$0,\!108\pm0,\!200$	$-31,46 \pm 1,48$	6,80

4.3 Rastreamento de 24 horas em relação à dose-resposta em lipossoma contendo extrato do quiabo

As figuras 5A e 5C, mostram os valores de glicemia basal antes e cinco dias depois do tratamento com dexametasona, nas quais é possível observar que cinco dias após o tratamento com dexametasona os ratos de ambos os sexos já estavam hiperglicêmicos (aumento médio de aproximadamente 105,23%, P<0,001).

Em seguida, logo após um período de 4 horas da aplicação da primeira dose do lipossoma contendo quiabo (grupo DEX-LipoQ), pode-se observar redução de 74% nos valores da glicemia em fêmeas DEX-LipoQ, quando comparados aos valores das fêmeas do grupo DEX-LipoB (P<0,01, Figura 5B). Após 24 horas da aplicação do lipossoma

contendo quiabo as fêmeas DEX-LipoQ apresentavam-se normoglicêmicas (P<0,01, Figura 5B).

Quanto aos machos, o decaimento inicial da glicemia se deu somente no período de 24 horas após a aplicação do lipossoma contendo quiabo, com redução glicêmica de 61,6%, (P<0,001, Figura 5D). Neste momento, em relação aos valores glicêmicos anteriores à aplicação do lipossoma, já se observava normoglicemia dos ratos DEX-LipoB (P<0,01, Figura 5D).



Figura 5. Triagem do tempo de ação do quiabo em formulação lipossômica sobre a glicemia basal de fêmeas (A e B) e machos (C e D). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 7-8 animais por grupo experimental, em ambos os sexos. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida de pós teste de Bonferroni (figuras A e C) e teste t de Student (figuras B e D). *P<0,05, **P<0,001 representa diferença estatística pelo teste t de Student entre os grupos DEX-LipoQ *versus* DEX-LipoB. As letras sobre as barras representam diferença estatística pelo *one-way* ANOVA entre os grupos. *a*) DEX-LipoB em situação pré-DEX; grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossomo contendo quiabo; *c*) DEX-LipoB em situação pós-DEX e *d*) DEX-lipoQ em situação pós-DEX.

4.4 Homeostase glicêmica durante o período de administração da dexametasona e tratamento com quiabo em diferentes formulações

Como esperado, antes da aplicação de dexametasona, não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais, em ambos os sexos, em relação aos níveis de glicemia de jejum. (P>0,05, Figura 6A e D).

Como pode ser visto nas figuras 6B e E, a indução do DM2 com dexametasona elevou a glicemia em 47% nas fêmeas do grupo DEX, enquanto nos machos observou-se aumento de 69% (P<0,01), quando comparados aos seus respectivos grupos CONT. A glicemia das fêmeas DEX-LipoB aumentou em 60% em relação às fêmeas do grupo CONT (P<0,05, Figura 6B e C), enquanto em machos esse aumento foi de 68% (P<0,01, Figura 6E e F). Não foram observadas diferença estatística entre os grupos DEX-LipoB e DEX, em ambos os sexos (P>0,05).

Em relação ao tratamento com quiabo na formulação lipossômica (1,5mg/kg peso animal), as fêmeas DEX-lipoQ apresentaram redução de 27% na glicemia, quando comparadas as fêmeas do grupo DEX (P<0,01, Figura 6B e C). Por outro lado, quando comparadas ao grupo CONT, as fêmeas DEX-LipoQ ainda mantiveram a glicemia aumentada em 28% (P<0,05, Figura 6B e C). Quanto aos machos DEX-LipoQ, observou-se redução de 37% em relação ao grupo DEX (P<0,01, Figura 6E e F), os quais mantiveram glicemia aumentada em 23% quando comparados ao grupo CONT (P<0,05, Figura 6E e F).

Em relação ao tratamento com quiabo na forma de extrato livre (200mg/kg peso animal), as fêmeas DEX-ExtrL apresentaram redução de 15% na glicemia, em relação às fêmeas do grupo DEX (P<0,01, Figura 6B e C). Por outro lado, a glicemia desse mesmo grupo, quando comparada à glicemia das ratas CONT, manteve-se aumentada em 29% (P<0,05, Figura 6B e C). Os machos DEX-ExtrL apresentaram glicemia reduzida em 32% quando comparados ao grupo DEX (P<0,01, Figura 6E e F), embora ainda tenha sido observado aumento da glicemia em 28% ao serem comparados com os ratos CONT (P<0,05, Figura 6E e F).

De modo geral, isso significa que o lipossoma contendo quiabo mesmo em concentração muito pequena em relação ao extrato do quiabo livre, também foi capaz de gerar uma resposta positiva em reduzir os níveis glicêmicos de animais fêmeas e machos, de modo com que suas respectivas glicemias se encontrassem próximas ao grupo CONT.



Figura 6. Homeostase glicêmica durante o período experimental de fêmeas (A, B e C) e machos (D, E e F). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 12-18 animais por grupo experimental, em ambos os sexos. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida de pós teste de Bonferroni. As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde *a*) CONT, grupo controle; *b*) DEX, grupo que recebeu dexametasona; *c*) DEX-LipoB, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossomo sem quiabo; *d*) DEX-LipoQ, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma contento quiabo e *e*) DEX-ExtrL, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com extrato livre contendo quiabo.

4.5. Avaliação da homeostase glicêmica-insulinêmica durante o ipGTT

Ao término do período experimental, como mostrado na figura 7A e 7D, quando comparadas ao grupo CONT, as fêmeas DEX mostraram-se hiperglicêmica (97%, P<0,01), bem como os machos, os quais apresentaram aumento de 93% na glicemia de jejum (P<0,01). Quanto aos demais grupos, quando comparados ao grupo CONT, observou-se glicemia basal aumentada em 86% nas fêmeas DEX-LipoB e em 90% nos machos DEX-LipoB (p<0,01, Figura 7). Por outro lado, não foi observada diferença estatística entre os grupos DEX-LipoB e DEX, em ambos os sexos (P>0,05).

Em relação aos animais tratados com quiabo, em formulação lipossômica ou extrato livre, as fêmeas DEX-LipoQ apresentaram redução de 52% na glicemia quando comparadas as fêmeas DEX e DEX-LipoB (P<0,01 Figura 7A). Por outro lado, quando comparadas ao grupo CONT, não diferiram estatisticamente (P>0,05, Figura 7A).

Quanto aos machos DEX-LipoQ, observou-se redução de 58% em relação ao grupo DEX e DEX-LipoB (P<0,01, Figura 3D), enquanto, quando comparados ao grupo CONT, não foram observadas diferenças estatísticas (P>0,05 Figura 7D).

Quanto aos animais DEX-ExtrL, as fêmeas apresentaram redução de 38% na glicemia basal quando comparadas as fêmeas DEX (P<0,01 Figura 7A). Por outro lado, quando comparadas ao grupo CONT, não diferiram estatisticamente (P>0,05, Figura 7A). Quanto aos machos DEX-ExtrL observou-se redução de 37% em relação ao grupo DEX (P<0,01, Figura 3D), enquanto, quando comparados ao grupo CONT, não foram observadas diferenças estatísticas (P>0,05 Figura 7D).

Quanto aos valores glicêmicos durante o ipGTT, como pode ser visto na figura 7B e C (fêmeas) e figuras 7E e F (machos), durante o ipGTT a glicemia das fêmeas DEX se manteve elevada em 76%, enquanto a dos machos se manteve aumentada em 79%, quando comparados aos valores glicêmicos de seus respectivos grupos CONT (P<0,01). De modo similar, quando comparados ao grupo CONT, a glicemia das fêmeas DEX-LipoB, permaneceu elevada em 67% (P<0,01, Figura 7B e 3C), ao passo que a dos machos se manteve aumentada em 63% (P<0,01, Figura 7E e 7F). Por sua vez, não foi observada diferença estatística entre os grupos DEX-LipoB e DEX, em ambos os sexos (P>0,05, Figura 7B, C, E e F).

Quanto aos animais tratados com quiabo, em formulação lipossômica ou extrato livre, as fêmeas DEX-LipoQ apresentaram redução de 27% na glicemia durante o ipGTT quando comparadas às fêmeas DEX e às fêmeas DEX-LipoB (P<0,01, Figura 7B, C). Por outro lado, quando comparadas ao grupo CONT, as fêmeas DEX-LipoQ ainda mantiveram a glicemia aumentada em 38,4% (P<0,01, Figura 7B, C). Quanto aos machos DEX-LipoQ, observou-se redução de 51% em relação ao grupo DEX e ao grupo DEX-LipoB (P<0,01, Figura 3E, F), já quando comparados ao grupo CONT não foi observada diferença estatística (P>0,05, Figura 7E, F).

Ainda durante o ipGTT, as fêmeas do grupo DEX-ExtrL apresentaram redução da glicemia em 33%, em relação ao grupo DEX (P<0,01, Figura 7B, C) e aumento de 32% em relação ao grupo CONT (P<0,01, Figura 7B, C). Os machos DEX-ExtrL apresentaram redução de 48% da glicemia, quando comparados ao grupo DEX (P<0,01, Figura 7E, F), mas quando comparados aos valores glicêmicos dos ratos CONT, não mostraram diferença estatística (P>0,05, Figura 7E, F).

De modo geral, isso significa que o lipossoma contendo quiabo mesmo com uma concentração muito pequena em relação ao extrato do quiabo livre, também foi capaz de

gerar uma resposta positiva em reduzir os níveis glicêmicos frente ao teste de ipGTT em fêmeas e machos, de modo que houvesse uma redução significativa da intolerância à glicose presente nesses animais.



Figura 7. Homeostase glicêmica durante ipGTT de fêmeas (A, B e C) e machos (D, E e F). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 8-12 animais por grupo experimental, em ambos os sexos. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida de pós teste de Bonferroni. As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde *a*) CONT, grupo controle; *b*) DEX, grupo que recebeu dexametasona; *c*) DEX-LipoB, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossomo sem quiabo; *d*) DEX-LipoQ, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma contento quiabo e *e*) DEX-ExtrL, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com extrato livre contendo quiabo.

4.6 Avaliação da homeostase glicêmica-insulinêmica durante o ipITT

A figura 8A, B, C e D mostra os valores glicêmicos durante o ipITT e a taxa de captação periférica de glicose, representada pelos valores do K_{itt}. Em nosso estudo, observamos que durante ipITT a velocidade de captação periférica de glicose das fêmeas DEX se manteve reduzida em 92%, e nos machos DEX em 84%, quando comparada a

taxa de decaimento glicêmico dos seus respectivos grupos CONT (P<0,01, Figura 8B e D).

Quando comparado aos respectivos grupos CONT, as fêmeas DEX-LipoB apresentaram redução de 99% na taxa de decaimento glicêmico, já os machos DEX-LipoB apresentaram redução de 88% (P<0,01, Figura 8B e D). Por outro lado, ao se comparar com os valores de K_{itt} do grupo DEX, os grupos DEX-LipoB, em ambos os sexos, não diferiram estatisticamente dos de seus respectivos grupos DEX (P>0,05, Figura 8B e D).

Quanto aos animais tratados com quiabo, em formulação lisossômica ou extrato livre, as fêmeas DEX-LipoQ apresentaram aumento de 97% na velocidade de captação periférica de glicose, quando comparadas às fêmeas DEX e às fêmeas DEX-LipoB (P<0,01, Figura 8B). Por outro lado, quando comparada a taxa de decaimento glicêmico das fêmeas do grupo CONT, as fêmeas DEX-LipoQ não apresentaram diferenças estatísticas (P>0,05), Figura 8B). Quanto aos valos de K_{itt} dos machos DEX-LipoQ, estes não diferiram estatisticamente quando comparados aos valores observados nos demais grupos (P>0,05, Figura 8C e D).

Quanto ao K_{itt} observado nas fêmeas DEX-ExtrL, estes valores foram estatisticamente menores (redução média de 64%, P<0,01, Figura 8B) do que os valores observados nas ratas CONT e nas ratas DEX-LipoQ, não diferindo estatisticamente dos demais grupos (P>0,05, Figura 8B).

Quanto aos valores do K_{itt} dos machos DEX-ExtrL, estes não diferiram estatisticamente quando comparados aos demais grupos (P>0,05, Figura 8D).

Isso significa que o lipossoma contendo quiabo mesmo com uma concentração muito inferior em relação ao extrato do quiabo livre, também foi capaz de gerar uma resposta positiva na proteção contra a resistência à insulina, sendo que este efeito foi mais proeminente em fêmeas tratadas com lipossoma.


Figura 8. Homeostase glicêmica durante ipITT de fêmeas (A e B) e machos (C e D). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 8-12 animais por grupo experimental, em ambos os sexos. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida de pós teste de Bonferroni. As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde *a*) CONT, grupo controle; *b*) DEX, grupo que recebeu dexametasona; *c*) DEX-LipoB, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossomo sem quiabo; *d*) DEX-LipoQ, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma contento quiabo e *e*) DEX-ExtrL, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com extrato livre contendo quiabo.

4.7 Avaliação da homeostase glicêmica-insulinêmica durante o ipPTT

Quanto aos valores glicêmicos durante o ipPTT, como pode ser visto na figura 9C e D (fêmeas) e figuras 9A e B (machos), durante o ipPTT a glicemia das fêmeas DEX se manteve aumentada em 38%, enquanto a dos machos se manteve aumentada em 202%, quando comparados aos valores glicêmicos de seus respectivos grupos CONT (P<0,01). De modo similar, quando comparados ao grupo CONT, a glicemia das fêmeas DEX-LipoB, permaneceu elevada em 27% (P<0,01, Figura 9C e 9D), ao passo que a dos machos se manteve aumentada em 251% (P<0,01, Figura 9A e 9B). Por sua vez, quando comparados ao grupo CONT, a glicemia das fêmeas DEX-LipoQ, permaneceu elevada em 62% (P<0,01, Figura 9C e 9D), ao passo que a dos machos se manteve aumentada em 146% (P<0,01, Figura 9A e 9B), o mesmo foi observado em relação ao grupo DEX-extrL,

onde a glicemia das fêmeas DEX-extrL, permaneceu elevada em 13% (P<0,01, Figura 9C e 9D), enquanto a dos machos se manteve aumentada em 131% (P<0,01, Figura 9A e 9B).

Quando comparados aos valores da glicemia do grupo DEX machos, observamos que a glicemia do grupo DEX-LipoQ reduziu em 19% e a do grupo DEX-extrL em 23% (P<0,01, Figura 9A e 9B). Por outro lado, em comparação aos valores da glicemia do grupo DEX fêmeas, tanto a glicemia do grupo DEX-LipoQ (embora 17% maior) quanto a do grupo DEX-extrL (embora 18% menor) não apresentaram diferença estatística (P>0,05, Figura 9C e 9D).



Figura 9. Homeostase glicêmica durante ipPTT de machos (A e B) e fêmeas (C e D). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 8-12 animais por grupo experimental, em ambos os sexos. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida de pós teste de Bonferroni. As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde *a*) CONT, grupo controle; *b*) DEX, grupo que recebeu dexametasona; *c*) DEX-LipoB, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossomo sem quiabo; *d*) DEX-LipoQ, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma contento quiabo e *e*) DEX-ExtrL, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com extrato livre contendo quiabo.

4.8 Peso corporal, ingestão alimentar e consumo hídrico dos animais

A figura 10 mostra o peso corporal de fêmeas e machos durante todo o período experimental. Em relação ao peso corporal durante o período que antecedeu a administração de dexametasona, como esperado, não houve diferença estatística entre os grupos, em ambos os sexos (P>0,05, Figura 10A, B, E e F).

Quanto ao peso corporal durante os cinco primeiros dias da administração de dexametasona, observou-se redução em todos os grupos que receberam dexametasona, em ambos os sexos. Sendo que em comparação ao grupo CONT, o peso corporal das fêmeas DEX reduziu em 9%, enquanto o peso dos machos DEX teve redução de 18% (P<0,01, Figura 10A, C, E e G). Como esperado, não se observou diferença estatística entre os demais grupos (P>0,05). Contudo, estes se mostram diferentes do grupo CONT.

Também quando comparados ao grupo CONT, o peso corporal das fêmeas DEX-LipoB reduziu em 7%, já em machos essa redução foi de 19% (P<0,01, Figura 10A, C, E e G). As fêmeas DEX-LipoQ apresentaram redução do peso corporal em 11%, enquanto os machos DEX-LipoQ tiveram redução em 18% (P<0,01, Figura 10A, C, E e G). De modo similar, as fêmeas DEX-ExtrL obtiveram redução do peso em 12%, ao serem comparadas com fêmeas CONT (P<0,01, Figura 10A, C, E e G) e o os machos DEX-ExtrL tiveram redução de seu peso em 15% (P<0,01, Figura 10A, C, E e G).

Quanto ao período de tratamento com as diferentes formulações de quiabo, representado pela ASC (Figura 10A, D, E e H), observou-se que as fêmeas DEX apresentaram redução do peso corporal em 23% e os machos uma redução de 34% em relação aos seus respectivos grupos CONT (P<0,01, Figura 10A, D, E e H). Nesse mesmo período, o grupo DEX-LipoB, em ambos os sexos, não diferiu estatisticamente em relação ao grupo DEX, mas em relação ao grupo CONT, as fêmeas DEX-LipoB obtiveram redução do peso em 19%, enquanto os machos DEX-LipoB uma redução de 34% (P<0,01, Figura 10A, D, E e H).

As fêmeas DEX-LipoQ, tratadas com lipossoma contendo quiabo, e as ratas DEX-ExtrL, tratadas com quiabo na forma livre, não diferiram estatisticamente entre si e nem em relação ao grupo DEX (P>0,05, Figura 10A, D), o mesmo aconteceu para os machos (P>0,05, Figura 10E, G). Porém, ao serem comparados ao grupo CONT, as fêmeas DEX-LipoQ apresentaram peso corporal reduzido em 21%, enquanto os machos apresentaram redução de 34% (P<0,01, Figura 10A, D, E e H). Quanto às fêmeas DEX-ExtrL, o peso corporal apresentou-se 26% menor em relação ao grupo CONT, assim como os machos, que apresentaram redução em 39% (P<0,01, Figura 10A, D, E e H).

De maneira geral, foi perceptível que todos os grupos experimentais, em ambos os sexos, apresentaram perda de peso corporal magros durante todo período experimental, mesmo diante do tratamento com quiabo em diferentes formulações.



Figura 10. Peso corporal de fêmeas (A, B, C e D) e machos (E, F, G e H). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 10-16 animais por grupo experimental, em ambos os sexos. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida de pós teste de Bonferroni. As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde *a*) CONT, grupo controle; *b*) DEX, grupo que recebeu dexametasona; *c*) DEX-LipoB, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma sem quiabo; *d*) DEX-LipoQ, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma contento quiabo e *e*) DEX-ExtrL, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com extrato livre contendo quiabo.

Quanto à ingestão alimentar, antes da aplicação de dexametasona, como esperado não se observou diferença estatística entre os grupos experimentais, em ambos os sexos (P>0,05, Figura 11A, B, E e F).

Durante o período de indução ao DMT2, a ingestão alimentar das fêmeas DEX diminuiu em 58% quando comparada a ingestão das ratas CONT (P<0,05, Figura 11A e C), já as fêmeas DEX-LipoB, não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo DEX (P>0,05, Figura 11A e C), porém ao serem comparadas ao grupo CONT apresentaram redução alimentar de 42% (P<0,05, Figura 11A e C). Ainda, as fêmeas DEX-LipoQ e DEX-ExtrL não diferiram entre si, bem como não apresentaram diferença estatística quando comparadas ao grupo DEX (P>0,05, Figura 11A e C). Por outro lado, ao serem comparadas ao grupo CONT, as fêmeas DEX-LipoQ apresentaram redução de

56% na ingestão alimentar, ao passo que as fêmeas DEX-ExtrL apresentaram redução de 37% (P<0,05, Figura 11A e C).

Em relação à ingestão alimentar nos machos, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais durante o período de administração de dexametasona (P>0,05, Figura 11E e G).

Quanto à ingestão alimentar observada durante o 5^0 ao 10^0 dia de tratamento com quiabo, as fêmeas DEX apresentaram ingestão reduzida em 35%, quando comparadas as ratas CONT (P<0,05, Figura 11A e D). Porém, o mesmo não foi observado quando comparamos os machos DEX em relação ao grupo CONT (P>0,05, Figura 11E e H).

As fêmeas DEX-LipoB não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo DEX (P>0,05, Figura 11A e D), mas ao serem comparadas com as ratas do grupo CONT, apresentaram redução de 32% na ingestão alimentar (P<0,05, Figura 11A e D). Quanto à ingestão alimentar das fêmeas DEX-LipoQ e das DEX-ExtrL, não apresentaram diferenças aos serem comparadas entre si, bem como não houve diferença estatística quando comparadas a ingestão alimentar das ratas DEX (P>0,05, Figura 11A e D). Por sua vez, as fêmeas DEX-LipoQ, ao serem comparadas às ratas CONT, apresentaram redução de 44% na ingestão alimentar, enquanto as fêmeas DEX-ExtrL tiveram ingestão alimentar reduzida em 35% quando comparadas as ratas CONT (P<0,05, Figura 11A e D).

Quanto à ingestão alimentar dos ratos machos, não observaram diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais (P>0,05, Figura 11E, F, G e H).

Ou seja, a figura 11 nos mostra que o perfil magro dos animais em todos os grupos tratados, em ambos os sexos, ocorreu por uma baixa ingestão alimentar, mesmo diante do tratamento com quiabo em diferentes formulações.



Figura 11. Ingestão alimentar de fêmeas (A, B, C e D) e machos (E, F, G e H). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 10-16 animais por grupo experimental, em ambos os sexos. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida de pós teste de Bonferroni. As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde *a*) CONT, grupo controle; *b*) DEX, grupo que recebeu dexametasona; *c*) DEX-LipoB, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossomo sem quiabo; *d*) DEX-LipoQ, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma contento quiabo e *e*) DEX-ExtrL, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com extrato livre contendo quiabo.

Quanto à ingestão hídrica avaliada ao longo do período experimental, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais, em ambos os sexos (P>0,05, Figuras 12A, B, C, D, E, F, G e H).



Figura 12. Ingestão hídrica de fêmeas (A, B, C e D) e machos (E, F, G e H). Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média de 10-16 animais por grupo experimental, em ambos os sexos. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida de pós teste de Bonferroni. CONT, grupo controle; DEX, grupo que recebeu dexametasona; DEX-LipoB, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma sem quiabo; DEX-lipoQ, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma contento quiabo, DEX-ExtrL, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com extrato livre contendo quiabo.

4.9 Avalição de marcadores de estresse oxidativo

Quanto aos marcadores de estresse oxidativo no fígado, não foi observada diferença estatística entre os valores de SOD dos diferentes grupos experimentais, em ambos os sexos (P>0,05, Figura 13A e D). Da mesma forma, no sexo feminino, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos quanto ao nível hepático das enzimas CAT e GST (P>0,05, Figura 13E e F).

Quanto aos valores de CAT no sexo masculino, observou-se redução de 46,18% no grupo DEX e 45,30% no grupo LIPO-B (P<0,01, Figura 13B). Em relação ao grupo CONT, os grupos LIPO-Q e Ext-Q200 não foram estatisticamente diferentes (P>0,05, Figura 9B). Por outro lado, o grupo Ext-Q200 apresentou aumento de 48,38%, quando comparado ao grupo DEX (P<0,05, Figura 13B).

Quanto aos valores de GST hepática no sexo masculino (Figura 13C), observouse redução de 51,33% no grupo DEX e 48,23% (P<0,01) no grupo LIPO-B (P<0,05). Em relação ao grupo CONT, os grupos LIPO-Q e Ext-Q200 não foram estatisticamente diferentes (P>0,05, Figura 13B). Por outro lado, o grupo Ext-Q200 apresentou aumento de 48,38%, quando comparado ao grupo DEX (P<0,05, Figura 13B).



Figura 13. Marcadores enzimáticos antioxidantes no fígado. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média de 4-8 animais por grupo experimental, em ambos os sexos. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida de pós teste de Tukey. CONT, grupo controle; DEX, grupo que recebeu dexametasona; DEX-LipoB, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma sem quiabo; DEX-lipoQ, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma contento quiabo, DEX-ExtrL, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com extrato livre contendo quiabo.

4.10 Avalição da composição corporal

Independente do tratamento com o quiabo (*em formulação lipossomal ou extrato bruto*), todos os animais, de ambos os sexos, tratados com dexametasona apresentaram redução média do peso corporal variando entre 30,78% e 40,20% (34,79%; P<0,001, Figura 14A e D).

Embora não tenha sido observada diferença estatística entre os valores do índice de massa magra dos diferentes grupos experimentais, em ambos os sexos (P>0,05, Figura 14B e E), observou-se redução de 31,03% no índice de massa gorda dos ratos DEX machos e de 39,64% nas ratas DEX fêmeas, em relação aos respectivos grupos CONT (P<0,05, Figura 14C e F). Da mesma forma, quando comparados aos respectivos grupos CONT, machos e fêmeas, o grupo Lipo-B apresentou redução de 49,53% no índice de massa gorda dos ratos machos (P<0,01, Figura 14C) e de 34,76% nas fêmeas (P<0,05, Figura 14F).

Em comparação aos demais grupos experimentais, em ambos os sexos, não foram observadas diferenças estatísticas entre os valores de massa gorda dos grupos Lipo-Q nem do grupo Ext-Q200, em ambos os sexos (P>0,05, Figura 14C e F).



Figura 14. Composição corporal. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média de 4-8 animais por grupo experimental, em ambos os sexos. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida de pós teste de Tukey. CONT, grupo controle; DEX, grupo que recebeu dexametasona; DEX-LipoB, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma sem quiabo; DEX-lipoQ, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma contento quiabo, DEX-ExtrL, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma contento quiabo.

4.11 Avalição dos órgãos

Em relação ao peso do pâncreas dos ratos CONT machos, observou-se aumento de 70,47% no peso do pâncreas dos ratos DEX e de 76,53% no peso do pâncreas dos ratos Lipo-B (P<0,05, Figura 15A). Quanto ao pâncreas dos ratos Lipo-Q e dos ratos Ext-Q200, não apresentaram diferença estatística em relação aos demais grupos (P>0,05, Figura 15A). Não houve diferença estatística entre o peso do pâncreas dos diferentes grupos no sexo feminino (P>0,05, Figura 15I).

Quanto ao peso do figado, em relação aos ratos CONT machos, observou-se aumento de 51,51% nos ratos DEX, de 68,04% nos ratos Lipo-B, de 65,29% nos ratos Lipo-Q e de 87,05% nos ratos Ext-Q200 (P<0,001, Figura 15B). De modo similar, os mesmos ratos também presentaram aumento no peso do TAM. em relação aos ratos CONT machos, observou-se aumento de 146,13% nos ratos DEX, de 98,28% nos ratos Lipo-B, de 99,14% nos ratos Lipo-Q e de 98,28% nos ratos Ext-Q200 (P<0,001, Figura 15D). Por outro lado, observou-se redução de 42,89% no peso do baço dos ratos DEX e de 43,27% no dos ratos Lipo-B em relação ao baço dos ratos CONT (P<0,01, Figura 15C).

Nas fêmeas, o peso do fígado aumentou em 60,35% nas ratas DEX, em 68,95% nas ratas Lipo-B, em 56,26% nas ratas Lipo-Q e em 72,03% nas ratas Ext-Q200 (P<0,001, Figura 15J) em relação às ratas CONT. Da mesma forma, as fêmeas também tiveram aumento no peso do TAM. Quando em comparação às ratas CONT, observouse aumento de 142,63% no peso do TAM das ratas DEX, de 107,92% no das ratas Lipo-B, de 161,75% no das ratas Lipo-Q e de 129,62% no das ratas Ext-Q200 (P<0,001, Figura 15L). Quanto ao peso do baço nas fêmeas, de modo similar ao que foi observado nos machos, também se observou redução somente nos grupos DEX (44,26%) e no grupo Lipo-B (47,27%) em relação às ratas CONT (P<0,05, Figura 15K).

Os pesos das glândulas adrenais direita e esquerda não diferiram entre os grupos experimentais, em ambos os sexos (P>0,05, Figura 15E, F, M e N).

Quanto ao peso dos rins, observou-se um aumento em ambos os rins (direito e esquerdo), em ambos os sexos, apenas no grupo Lipo-B em relação aos seus respectivos grupos CONT (P<0,05, Figura 15G, H, O e P).

Machos

















Н

Fêmeas

G





Figura 15. Efeito do tratamento com dexametasona sobre o peso de órgãos corporais. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média de 4-8 animais por grupo experimental, em ambos os sexos. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida de pós teste de Tukey. CONT, grupo controle; DEX, grupo que recebeu dexametasona; DEX-LipoB, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma sem quiabo; DEX-lipoQ, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma contento quiabo, DEX-ExtrL, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com extrato livre contendo quiabo.

5 DISCUSSÃO

Nosso trabalho compila um conjunto de resultados que juntos demonstram o efeito benéfico do quiabo em formulação lipossômica sobre a homeostase glicêmica em ratos com resistência à insulina induzida pelo tratamento crônico com dexametasona, mostrando ainda o efeito sexo dependente deste tratamento. Em adição, mostramos uma nova possibilidade terapêutica farmacológica para o controle dos níveis glicêmicos em indivíduos acometidos pelo DMT2, através da caracterização deste composto em estrutura lipossômica.

A caracterização do fruto do quiabo permitiu conhecer o perfil físico-químico do material. Além disso, houve uma redução para o teor de água quando o extrato aquoso do quiabo passou por secagem à 45°C. A técnica de secagem do extrato do quiabo se tornou viável para processar o quiabo e obter suas características físico-químicas seguindo os métodos físico-químicos para análise de alimentos de Adolfo Lutz, 2008.

Quanto à caracterização físico-química dos lipossomas aqui desenvolvidos, nossos resultados demonstraram estar de acordo com outros trabalhos, onde foi relatada uma distribuição para lipossoma sem extrato do quiabo (LipoB) de 230 nm e lipossoma contendo extrato do quiabo (LipoQ) 280 nm de tamanho (d_{4,3}), semelhante a 280 nm para lipossomas utilizados no encapsulamento de extratos por (YUSUF; SHARMA; PATHAK, 2014). Os mesmos autores também avaliaram o tamanho médio e índice de polidispersão dos lipossomas obtidos através do processo de homogeneização e sonicação e verificaram que não houve diferenças na obtenção de lipossomas de tamanho nanométrico, no entanto, mostraram que lipossomas produzidos através do processo de sonicação podem apresentar um tamanho médio em alguns casos até menor (280 nm) em comparação com lipossomas que foram submetidos à homogeneização (303,97 nm).

Com relação a polidispersão das vesículas, que fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição de tamanho, de acordo com os dados na tabela 1, os valores de Span e índice de polidispersão demonstraram baixa variação no diâmetro dos lipossomas desenvolvidos, sistema monomodal e homogêneo (MANAIA; ABUCAFY; CHIARI-ANDREO; SILVA *et al.*, 2017). Além disso, em nosso trabalho, através do potencial zeta, mostramos que o potencial de carga superficial das partículas está em conformidade com formação de cargas negativas devido à presença de lecitina (YUSUF; SHARMA; PATHAK, 2014). Além disso, o pH dos lipossomas permaneceu em torno de 7,0 o que manteve a conservação do lipossoma, não sendo afetada pela temperatura ou por possível hidrólise.

Fizemos um comparativo do tratamento com o extrato do quiabo em lipossoma (LipoQ) e lipossoma branco (LipoB), ou seja, não contendo o extrato do quiabo. Esse comparativo teve como intuito demostrar nesse estudo que uma molécula ativa quando associada em lipossoma, facilita a permeação do ativo através das membranas celulares mesmo em concentrações pequenas desse ativo, além disso, promove controle dos níveis glicêmicos em animais que se encontravam hiperglicêmicos. Nesse caso, como já vimos em literatura, os lipossomas por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos são altamente versáteis para pesquisa e terapêutica, nesse caso a molécula ativa é levada até seu sitio de ação sem sofrer alterações que danifiquem a sua função no organismo (ALMEIDA; NAG; ROGERS; DELEHANTY, 2020). Como esperado o lipossoma branco não causou alterações consideráveis na redução dos níveis glicêmicos.

O quiabo na sua forma de extrato livre, apresentado nesse estudo, foi administrado em concentração mais elevada, para promover uma ação positiva em reverter a hiperglicemia presente em machos e fêmeas. Já que dados da literatura mostram que o efeito hipoglicemiante do extrato do quiabo, administrado em ratos Wistar, pode ser visto entre concentrações de 200 e 500 mg/kg (ERFANI MAJD; TABANDEH; SHAHRIARI; SOLEIMANI, 2018; LIAO; ZHANG; LIU; YAN *et al.*, 2019).

Em nosso estudo, optamos por realizar um rastreamento de 24 horas em relação à dose em resposta do tempo do extrato do quiabo em lipossoma, já que na literatura não encontramos trabalhos que abordassem um limiar de concentração desse ativo nesse tipo de nanoestrutura. Por sua vez como se trata de uma estrutura em escala nanométrica logo devemos considerar que a quantidade de ativo utilizada nesse sistema é necessariamente em concentrações menores do que em relação aos ativos utilizados em métodos convencionais de encapsulamento (ALMEIDA; NAG; ROGERS; DELEHANTY, 2020). Consideramos que a administração na concentração de 1,5 mg/kg peso animal do lipossoma contendo extrato do quiabo, foi capaz de reduzir a glicemia das fêmeas consideradas diabéticas a partir de 4 horas após administração e em machos a redução foi detectada em 24 horas.

Aqui nós mostramos que a administração crônica de dexametasona, em dose supra fisiológica já conhecida (RAFACHO; ORTSATER; NADAL; QUESADA, 2014), porém por período mais prolongado (10 dias consecutivos) em ratos Wistar de ambos os sexos, leva-os à hiperglicemia associada a um fenótipo caquético e hipofágico. Quanto à hiperglicemia observada nestes ratos, pode-se atribuir esse efeito como uma possível resultante de defeitos na ação periférica da insulina (RADHAKUTTY; BURT, 2018),

bem como também a um possível efeito hepático, decorrente de uma ação direta deste glicocorticoide sobre a via gliconeogênica ao ativar fatores de transcrição tais como a proteína de ligação do elemento de transcrição básica 1, ou fator 9 semelhante à Krüppel (Klf9) e o coativador do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC- 1α) nos hepatócitos (CUI; FAN; ZHANG; ZHANG *et al.*, 2019). Como mostramos em nosso trabalho, a partir do ipPTT, o uso crônico da dexametasona por 10 dias levou os ratos, de ambos os sexos (embora o efeito tenha sido mais proeminente em machos), a uma disfunção da via gliconeogênica com quadro similar ao observado em ratos obesos diabéticos (GHEIBI; JEDDI; KASHFI; GHASEMI, 2019).

Nesse contexto, embora a glicemia dos ratos DEX-LipoQ machos não tenha sido normalizada para os valores observados nos animais controles, nosso estudo mostra que esse efeito foi amenizado pelo uso do quiabo, em ambas as formulações, embora somente no sexo masculino. Esse efeito positivo do quiabo na via da gliconeogênese nos leva a sugerir algumas possibilidades de mecanismos que devem ser investigadas no futuro. Como já demonstrado, há uma associação entre excesso de GCs e/ou uso da dexametasona com alterações em vias de sinalização da neuregulina (DANG; GUO; ZHANG; CHEN et al., 2016). Considerando que a neuregulina 4, por exemplo, desempenha importante papel na homeostase do metabolismo energético com efeito de proteção contra o diabetes (ATTIQUE; BAIG; ISHTIAQUE; REHMAN et al., 2022; LIU; CHEN, 2022), em especial, por mecanismos regulatórios da via da gliconeogênese (ZHANG; BAI; TANG; ZHOU et al., 2019) é muito provável que o uso do quiabo em nosso estudo esteja também contribuindo para a melhora da homeostase glicêmica por meio da via da gliconeogênese. Nesse âmbito, pontuamos como sendo uma limitação de nosso estudo o fato de não termos realizado análises de marcadores da via gliconeogênica em hepatócitos, bem como de marcadores da ação da insulina em tecidos periféricos como o músculo esquelético e tecido adiposo branco.

No que tange a hiperglicemia, em estado de jejum, observada em ratos tratados com dexametasona, em nosso estudo não observamos dimorfismo sexual quanto a este parâmetro. Interessantemente, frente ao desafiado metabólico, durante o ipGTT, o efeito negativo da ação da dexametasona sobre a capacidade periférica de captação de glicose foi observado no grupo DEX, em ambos os sexos; contudo, esse efeito prejudicial foi significativamente maior, cerca de 1,4 vezes, nos machos do que em fêmeas. Neste mesmo contexto, apesar de termos observado dimorfismo sexual quanto à sensibilidade periférica à insulina, em ratos controles, de modo que os machos se mostram

significativamente mais sensíveis à insulina do que as fêmeas, cerca de 1,7 vezes, não observamos dimorfismo sexual quanto a magnitude do prejuízo induzido pela dexametasona sobre a sensibilidade periférica à ação da insulina, frente ao ipITT. Esses dados são sugestivos de que os machos sejam mais vulneráveis ao efeito danoso da dexametasona em promover intolerância à glicose frente a situações que mimetizam o estado pós-prandial, como é o caso do ipGTT, efeito que pode estar relacionado a uma possível redução da função endócrina pancreática quanto a sua capacidade de produção e/ou de secreção de insulina, uma vez que não se observou diferença de sexo quanto aos dados do K_{itt}. Como previamente mostrado, ratos Wistar machos são mais vulneráveis do que fêmeas ao efeito crônico da dexametasona sobre a homeostase glicêmica (STOPA; DE SOUZA; SANTOS; MARTINS *et al.*, 2019). Embora neste estudo os autores tenham usado uma dose cerca de 2 mil vezes menor do que a que usamos em nosso estudo, porém, mesmo assim eles observaram intolerância à glicose em machos.

Em nosso estudo também mostramos a eficácia do desenvolvimento da estrutura lipossômica como partícula carreadora do princípio de nosso interesse, fato que pode ser constatado a partir dos dados obtidos no grupo LipoB, os quais são muito similares aos dados do grupo DEX. Uma vez que os ratos LipoB, foram tratados com a mesma estrutura lipossômica, porém sem carrear quiabo em seu interior, esperava-se que tal tratamento não induzisse alterações significativas nos parâmetros avaliados.

Durante o experimento a evolução do quadro de hiperglicemia dos machos DEX e DEX-LipoB em relação às fêmeas do mesmo grupo fez com que pudéssemos constatar que os animais machos e fêmeas possuem muitas características biológicas e fisiológicas diferentes, já que o perfil diabetogênico nesses grupos foi mais presente em machos do que em fêmeas. Segundo (GANNON; KULKARNI; TSE; MAUVAIS-JARVIS, 2018) existem evidências crescentes sugerindo que o sexo afeta a homeostase da glicose e a sua fisiopatologia, acarretando prevalência do diabetes, bem como alterações na resposta à terapia e essas diferenças entre sexos masculino e feminino vêm sendo pauta de estudos referentes a homeostase da glicose e DMT2. Neste âmbito, apesar das mulheres serem menos propensas ao desenvolvimento do DMT2 (LI; QUAN; ZHANG; LIN *et al.*, 2021), elas são mais susceptíveis ao desenvolvimento de complicações relacionadas, tais como doenças cardiovasculares e complicações renais (SHEPARD, 2019).

Ao utilizarmos do tratamento com o extrato do quiabo como agente antihiperglicemiante, devemos considerar que o quiabo possui fibras solúveis e compostos fenólicos que atuam retardando o esvaziamento gástrico e a digestão e reduzindo consideravelmente a absorção de glicose, favorecendo diretamente a glicemia pós prandial de portadores de DMT2 (ERFANI MAJD; TABANDEH; SHAHRIARI; SOLEIMANI, 2018). Dessa forma, foi perceptível no grupo DEX-LipoQ, em fêmeas e machos, a redução na glicemia ao longo do experimento quando comparados aos grupos DEX e DEX-LipoB. Em nosso estudo também mostramos que o grupo DEX-ExtrL também foi capaz de reduzir a glicemia, em ambos os sexos. Porém, ressaltamos que para que tal efeito fosse obtido precisou-se administrar uma dose do extrato numa concentração cerca de 130 vezes maior.

Além de avaliar os parâmetros da hiperglicemia causada pela dexametasona e o controle desse estado utilizando quiabo como tratamento em diferentes formulações observou-se que a regulação do peso corporal e tecido adiposo também podem ser influenciados pelos glicocorticoides, embora o efeito metabólico dessa classe de hormônio no tecido adiposo ainda seja pouco claro (PASIEKA; RAFACHO, 2016). Em nosso modelo experimental identificamos que os grupos experimentais tiveram redução do seu peso quando comparados ao CONT.

Nesse caso, ao contrário do que já foi descrito sobre o papel dos glicocorticoides promoverem aumento da massa gorda e síntese de triglicerídeos na gordura visceral (ANAGNOSTIS; ATHYROS; TZIOMALOS; KARAGIANNIS *et al.*, 2009), em nosso estudo observamos uma redução em relação ao peso corporal em animais submetidos à dexametasona.

O fato de os respectivos tratamentos não reverterem o quadro da perca de peso causado pela dexametasona pode ter sido relacionado à presença de fibras solúveis do quiabo. As fibras solúveis uma vez no estômago e no intestino delgado, diminuem a atividade de algumas enzimas digestivas e influenciam na taxa de digestão e absorção de nutrientes, além de influenciar na moderação da glicemia pós-prandial e níveis de insulina, como também realizar a regulação do apetite (ERFANI MAJD; TABANDEH; SHAHRIARI; SOLEIMANI, 2018; FAN; ZHANG; SUN; YU *et al.*, 2014). Além disso, esse estudo corrobora com achados quanto à redução dos estoques de tecido adiposo branco observado em nosso estudo entre os grupos DEX-LipoQ e DEX-ExtrL.

Estudos pré-clínicos e clínicos já demonstram que a administração de dexametasona, em altas doses e/ou por períodos crônicos, promove uma desregulação no metabolismo hepático da glicose que está diretamente relacionada à redução da ação da insulina no fígado, além disso, a dexametasona pode exercer um efeito na expressão, localização e atividade da glicoproteína-P (P-gp) hepática e renal em ratos após 4 dias de

administração oral entre doses de 1 ou 25 mg/kg por dia (MICUDA; FUKSA; MUNDLOVA; OSTERREICHER et al., 2007).

6 CONCLUSÃO

Com esse trabalho, conclui-se que lipossoma contento quiabo como composto bioativo foi preparado com sucesso podendo ser utilizado para a entrega da molécula ativa pela administração via gavagem em ratos de ambos os sexos.

A formulação desenvolvida teve efeitos benéficos em reduzir a intolerância à glicose dos animais considerados diabéticos induzidos por dexametasona, principalmente em ratos machos, protegendo-os contra a resistência à insulina, sendo que este efeito foi mais proeminente em fêmeas.

Também demonstramos que um período de 10 dias de superexposição a dexametasona induziu mudanças duradouras na composição corporal dos animais. Além disso, o efeito positivo dos lipossomas com quiabo se mostrou maior do que em relação ao extrato na sua forma livre.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU LILA, A. S.; ISHIDA, T. Liposomal Delivery Systems: Design Optimization and Current Applications. **Biol Pharm Bull**, 40, n. 1, p. 1-10, 2017.

ALLEN, T. M.; K CHENG, W. W.; HARE, J. I.; LAGINHA, K. M. J. A.-C. A. i. M. C. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lipidic nano-particles in cancer. 6, n. 6, p. 513-523, 2006.

ALMEIDA, B.; NAG, O. K.; ROGERS, K. E.; DELEHANTY, J. B. Recent Progress in Bioconjugation Strategies for Liposome-Mediated Drug Delivery. **Molecules**, 25, n. 23, Dec 1 2020.

ANAGNOSTIS, P.; ATHYROS, V. G.; TZIOMALOS, K.; KARAGIANNIS, A. *et al.* Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. **J Clin Endocrinol Metab**, 94, n. 8, p. 2692-2701, Aug 2009.

ASWAL, S.; KUMAR, A.; CHAUHAN, A.; SEMWAL, R. B. *et al.* A Molecular Approach on the Protective Effects of Mangiferin Against Diabetes and Diabetes-related Complications. **Curr Diabetes Rev**, 16, n. 7, p. 690-698, 2020.

ATTIQUE, H.; BAIG, S.; ISHTIAQUE, S.; REHMAN, R. *et al.* Neuregulin 4 (NRG4) - the hormone with clinical significance in gestational diabetes mellitus. **J Obstet Gynaecol**, 42, n. 6, p. 1931-1936, Aug 2022.

BARBOSA, R. B.; BARCELÓ, A.; MACHADO, C. A. J. R. P. d. S. P. Campanha nacional de detecção de casos suspeitos de diabetes mellitus no Brasil: relatório preliminar. 10, n. 5, p. 324-327, 2001.

BARNES, P. J. J. C. i. c. m. Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. 35, n. 1, p. 71-86, 2014.

BERTASSO, I. M.; PIETROBON, C. B.; DA SILVA, B. S.; MIRANDA, R. A. *et al.* Hepatic lipid metabolism in adult rats using early weaning models: sex-related differences. **J Dev Orig Health Dis**, 11, n. 5, p. 499-508, Oct 2020.

BONIFACIO, B. V.; DA SILVA, P. B.; RAMOS, M. A. d. S.; NEGRI, K. M. S. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. p. 1-15, 2014.

BONIFACIO, B. V.; SILVA, P. B.; RAMOS, M. A.; NEGRI, K. M. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **Int J** Nanomedicine, 9, p. 1-15, 2014.

BROOKS, D.; SCHULMAN-ROSENBAUM, R.; GRIFF, M.; LESTER, J. *et al.* Glucocorticoid-induced hyperglycemia including dexamethasone-associated hyperglycemia in covid-19 infection: a systematic review. 2022.

BURNE, M. J.; DANIELS, F.; EL GHANDOUR, A.; MAUIYYEDI, S. *et al.* Identification of the CD4+ T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. 108, n. 9, p. 1283-1290, 2001.

BUSADA, J. T.; CIDLOWSKI, J. A. J. C. t. i. d. b. Mechanisms of glucocorticoid action during development. 125, p. 147-170, 2017.

CASTAÑEDA-REYES, E. D.; GONZALEZ DE MEJIA, E.; ELLER, F. J.; BERHOW, M. A. *et al.* Liposomes loaded with unsaponifiable matter from Amaranthus hypochondriacus as a source of squalene and carrying soybean lunasin inhibited melanoma cells. 11, n. 8, p. 1960, 2021.

CASTAÑEDA-REYES, E. D.; PEREA-FLORES, M. d. J.; DAVILA-ORTIZ, G.; LEE, Y. *et al.* Development, characterization and use of liposomes as amphipathic transporters of bioactive compounds for melanoma treatment and reduction of skin inflammation: A review. p. 7627-7650, 2020.

CUI, A.; FAN, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y. *et al.* Dexamethasone-induced Kruppellike factor 9 expression promotes hepatic gluconeogenesis and hyperglycemia. J Clin Invest, 129, n. 6, p. 2266-2278, Apr 29 2019.

DANG, R.; GUO, Y.; ZHANG, L.; CHEN, L. *et al.* Chronic stress and excessive glucocorticoid exposure both lead to altered Neuregulin-1/ErbB signaling in rat myocardium. **Steroids**, 112, p. 47-53, Aug 2016.

DE OLIVEIRA, J. C.; SCOMPARIN, D. X.; ANDREAZZI, A. E.; BRANCO, R. C. *et al.* Metabolic imprinting by maternal protein malnourishment impairs vagal activity in adult rats. **J Neuroendocrinol**, 23, n. 2, p. 148-157, Feb 2011.

DISANTO, R. M.; SUBRAMANIAN, V.; GU, Z. Recent advances in nanotechnology for diabetes treatment. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 7, n. 4, p. 548-564, Jul-Aug 2015.

ERFANI MAJD, N.; TABANDEH, M. R.; SHAHRIARI, A.; SOLEIMANI, Z. Okra (Abelmoscus esculentus) Improved Islets Structure, and Down-Regulated PPARs Gene

Expression in Pancreas of High-Fat Diet and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Cell J, 20, n. 1, p. 31-40, Apr 2018.

FACCHI, J. C.; LIMA, T. A. L.; OLIVEIRA, L. R.; COSTERMANI, H. O. *et al.* Perinatal programming of metabolic diseases: The role of glucocorticoids. **Metabolism**, 104, p. 154047, Mar 2020.

FAN, S.; ZHANG, Y.; SUN, Q.; YU, L. *et al.* Extract of okra lowers blood glucose and serum lipids in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mice. **J Nutr Biochem**, 25, n. 7, p. 702-709, Jul 2014.

FERRIS, H. A.; KAHN, C. R. J. T. J. o. c. i. New mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance: make no bones about it. 122, n. 11, p. 3854-3857, 2012.

FICHNA, M.; FICHNA, P. Glucocorticoids and beta-cell function. **Endokrynol Pol**, 68, n. 5, p. 568-573, 2017.

GANNON, M.; KULKARNI, R. N.; TSE, H. M.; MAUVAIS-JARVIS, F. Sex differences underlying pancreatic islet biology and its dysfunction. **Mol Metab**, 15, p. 82-91, Sep 2018.

GHEIBI, S.; JEDDI, S.; KASHFI, K.; GHASEMI, A. Effects of Hydrogen Sulfide on Carbohydrate Metabolism in Obese Type 2 Diabetic Rats. **Molecules**, 24, n. 1, Jan 6 2019.

GREMLICH, S.; RODUIT, R.; THORENS, B. Dexamethasone induces posttranslational degradation of GLUT2 and inhibition of insulin secretion in isolated pancreatic beta cells. Comparison with the effects of fatty acids. **J Biol Chem**, 272, n. 6, p. 3216-3222, Feb 7 1997.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; FLEISCHNER, G.; GATMAITAN, Z. *et al.* The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. 71, n. 10, p. 3879-3882, 1974.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem, 249, n. 22, p. 7130-7139, Nov 25 1974.

HAEUSLER, R. A.; MCGRAW, T. E.; ACCILI, D. J. N. r. M. c. b. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. 19, n. 1, p. 31-44, 2018.

HARVEY, A. M.; HOWARD, J. E.; WINKENWERDER, W. L.; BORDLEY, J. E. *et al.* Observations on the effect of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) on disseminated lupus erythematosus, drug hypersensitivity reactions, and chronic bronchial asthma. 61, p. 221, 1949.

HE, F. J. B.-p. Bradford protein assay. p. e45-e45, 2011.

HEITZER, M. D.; WOLF, I. M.; SANCHEZ, E. R.; WITCHEL, S. F. et al. Glucocorticoid receptor physiology. 8, p. 321-330, 2007.

HOPKINS, R. L.; LEINUNG, M. C. Exogenous Cushing's syndrome and glucocorticoid withdrawal. **Endocrinol Metab Clin North Am**, 34, n. 2, p. 371-384, ix, Jun 2005.

IMMORDINO, M. L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. J. I. j. o. n. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. 1, n. 3, p. 297, 2006.

IMRAN, M.; ARSHAD, M. S.; BUTT, M. S.; KWON, J. H. *et al.* Mangiferin: a natural miracle bioactive compound against lifestyle related disorders. **Lipids Health Dis**, 16, n. 1, p. 84, May 2 2017.

KAN, M.; HIMES, B. E. J. P.; THERAPEUTICS. Insights into glucocorticoid responses derived from omics studies. 218, p. 107674, 2021.

KELLY, K.; WILLIAMS, W.; COLVIN, R. B.; MEEHAN, S. M. *et al.* Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. 97, n. 4, p. 1056-1063, 1996.

KHATUN, H.; RAHMAN, A.; BISWAS, M.; ISLAM, A. U. Water-soluble Fraction of Abelmoschus esculentus L Interacts with Glucose and Metformin Hydrochloride and Alters Their Absorption Kinetics after Coadministration in Rats. **ISRN Pharm**, 2011, p. 260537, 2011.

KIM, F.; PHAM, M.; MALONEY, E.; RIZZO, N. O. *et al.* Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance. 28, n. 11, p. 1982-1988, 2008.

KING, H.; AUBERT, R. E.; HERMAN, W. H. J. D. c. Global burden of diabetes, 1995–2025: prevalence, numerical estimates, and projections. 21, n. 9, p. 1414-1431, 1998.

LI, J. X.; CUMMINS, C. L. Fresh insights into glucocorticoid-induced diabetes mellitus and new therapeutic directions. **Nat Rev Endocrinol**, 18, n. 9, p. 540-557, Sep 2022.

LI, T.; QUAN, H.; ZHANG, H.; LIN, L. *et al.* Type 2 diabetes is more predictable in women than men by multiple anthropometric and biochemical measures. **Sci Rep**, 11, n. 1, p. 6062, Mar 15 2021.

LIAO, Z.; ZHANG, J.; LIU, B.; YAN, T. *et al.* Polysaccharide from Okra (Abelmoschus esculentus (L.) Moench) Improves Antioxidant Capacity via PI3K/AKT Pathways and Nrf2 Translocation in a Type 2 Diabetes Model. **Molecules**, 24, n. 10, May 17 2019.

LIU, Y.; CHEN, M. Neuregulin 4 as a novel adipokine in energy metabolism. Front Physiol, 13, p. 1106380, 2022.

LUNDBAEK, K. Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. **Br Med J**, 1, n. 5291, p. 1507-1513, Jun 2 1962.

MANAIA, E. B.; ABUCAFY, M. P.; CHIARI-ANDREO, B. G.; SILVA, B. L. *et al.* Physicochemical characterization of drug nanocarriers. **Int J Nanomedicine**, 12, p. 4991-5011, 2017.

MARRON, M. P.; RAFFEL, L. J.; GARCHON, H.-J.; JACOB, C. O. *et al.* Insulindependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphisms in multiple ethnic groups. 6, n. 8, p. 1275-1282, 1997.

MATHIAS, P. C. F.; MIRANDA, G. D. S.; BARELLA, L. F.; MIRANDA, R. A. *et al.* Cholinergic-pathway-weakness-associated pancreatic islet dysfunction: a low-proteindiet imprint effect on weaned rat offspring. **J Dev Orig Health Dis**, p. 1-8, Apr 6 2020.

MAZAYEN, Z. M.; GHONEIM, A. M.; ELBATANONY, R. S.; BASALIOUS, E. B. *et al.* Pharmaceutical nanotechnology: From the bench to the market. 8, n. 1, p. 12, 2022.

MEIJER, O. C.; KOORNEEF, L. L.; KROON, J., 2018, Glucocorticoid receptor modulators. Elsevier. 107-111.

MERTINS, O.; CARDOSO, M. B.; POHLMANN, A. R.; DA SILVEIRA, N. P. Structural evaluation of phospholipidic nanovesicles containing small amounts of chitosan. J Nanosci Nanotechnol, 6, n. 8, p. 2425-2431, Aug 2006.

MICUDA, S.; FUKSA, L.; MUNDLOVA, L.; OSTERREICHER, J. *et al.* Morphological and functional changes in p-glycoprotein during dexamethasone-induced hepatomegaly. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 34, n. 4, p. 296-303, Apr 2007.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, 247, n. 10, p. 3170-3175, May 25 1972.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. J. J. o. B. c. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.

MOISIADIS, V. G.; MATTHEWS, S. G. Glucocorticoids and fetal programming part 1: Outcomes. **Nat Rev Endocrinol**, 10, n. 7, p. 391-402, Jul 2014.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H 2 O 2 solutions in the UV). **Anal Biochem**, 49, n. 2, p. 474-478, Oct 1972.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. J. A. b. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 C (with molar extinction coefficients of H2O2 solutions in the UV). 49, n. 2, p. 474-478, 1972.

OBICI, S.; ZHANG, B. B.; KARKANIAS, G.; ROSSETTI, L. J. N. m. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. 8, n. 12, p. 1376-1382, 2002.

OKYAR, A.; CAN, A.; AKEV, N.; BAKTIR, G. *et al.* Effect of Aloe vera leaves on blood glucose level in type I and type II diabetic rat models. **Phytother Res**, 15, n. 2, p. 157-161, Mar 2001.

OLIVEIRA, S.; MONTEIRO-ALFREDO, T.; SILVA, S.; MATAFOME, P. Curcumin derivatives for Type 2 Diabetes management and prevention of complications. Arch Pharm Res, 43, n. 6, p. 567-581, Jun 2020.

PASIEKA, A. M.; RAFACHO, A. Impact of Glucocorticoid Excess on Glucose Tolerance: Clinical and Preclinical Evidence. **Metabolites**, 6, n. 3, Aug 3 2016.

PATRA, J. K.; DAS, G.; FRACETO, L. F.; CAMPOS, E. V. R. *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **J Nanobiotechnology**, 16, n. 1, p. 71, Sep 19 2018.

PIVARI, F.; MINGIONE, A.; BRASACCHIO, C.; SOLDATI, L. Curcumin and Type 2 Diabetes Mellitus: Prevention and Treatment. **Nutrients**, 11, n. 8, Aug 8 2019.

RABB, H.; MENDIOLA, C. C.; DIETZ, J.; SABA, S. R. *et al.* Role of CD11a and CD11b in ischemic acute renal failure in rats. 267, n. 6, p. F1052-F1058, 1994.

RADHAKUTTY, A.; BURT, M. G. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Critical review of the evidence underlying management of glucocorticoid-induced hyperglycaemia. **Eur J Endocrinol**, 179, n. 4, p. R207-R218, Oct 1 2018.

RAFACHO, A.; CESTARI, T. M.; TABOGA, S. R.; BOSCHERO, A. C. *et al.* High doses of dexamethasone induce increased beta-cell proliferation in pancreatic rat islets. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 296, n. 4, p. E681-689, Apr 2009.

RAFACHO, A.; MARROQUI, L.; TABOGA, S. R.; ABRANTES, J. L. *et al.* Glucocorticoids in vivo induce both insulin hypersecretion and enhanced glucose sensitivity of stimulus-secretion coupling in isolated rat islets. **Endocrinology**, 151, n. 1, p. 85-95, Jan 2010.

RAFACHO, A.; ORTSATER, H.; NADAL, A.; QUESADA, I. Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. **J Endocrinol**, 223, n. 3, p. R49-62, Dec 2014.

RAMAMOORTHY, S.; CIDLOWSKI, J. A. J. H. R.; HYPERSENSITIVITY. Exploring the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action from sensitivity to resistance. 24, p. 41-56, 2013.

REICH, E.; TAMARY, A.; SIONOV, R. V.; MELLOUL, D. Involvement of thioredoxininteracting protein (TXNIP) in glucocorticoid-mediated beta cell death. **Diabetologia**, 55, n. 4, p. 1048-1057, Apr 2012.

SALA, M.; DIAB, R.; ELAISSARI, A.; FESSI, H. Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. **Int J Pharm**, 535, n. 1-2, p. 1-17, Jan 15 2018.

SHAH, S.; DHAWAN, V.; HOLM, R.; NAGARSENKER, M. S. *et al.* Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process. 154, p. 102-122, 2020.

SHEPARD, B. D. Sex differences in diabetes and kidney disease: mechanisms and consequences. **Am J Physiol Renal Physiol**, 317, n. 2, p. F456-F462, Aug 1 2019.

STOPA, L. R. S.; DE SOUZA, C. F.; SANTOS, G. F.; MARTINS, A. B. *et al.* Sex differences in glucocorticoids-induced anabolic effects in rats. **Physiol Behav**, 209, p. 112587, Oct 1 2019.

SUKSOMBOON, N.; POOLSUP, N.; PUNTHANITISARN, S. Effect of Aloe vera on glycaemic control in prediabetes and type 2 diabetes: a systematic review and metaanalysis. **J Clin Pharm Ther**, 41, n. 2, p. 180-188, Apr 2016.

THORNTON, M.; WINN, R.; ALPERS, C.; ZAGER, R. J. T. A. j. o. p. An evaluation of the neutrophil as a mediator of in vivo renal ischemic-reperfusion injury. 135, n. 3, p. 509, 1989.

TIWARI, P.; AHMAD, K.; BAIG, M. H. Gymnema sylvestre for Diabetes: From Traditional Herb to Future's Therapeutic. **Curr Pharm Des**, 23, n. 11, p. 1667-1676, 2017.

TOKARZ, V. L.; MACDONALD, P. E.; KLIP, A. J. J. o. C. B. The cell biology of systemic insulin function. 217, n. 7, p. 2273-2289, 2018.

TOMLINSON, J. W.; WALKER, E. A.; BUJALSKA, I. J.; DRAPER, N. *et al.* 11β-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. 25, n. 5, p. 831-866, 2004.

UNUOFIN, J. O.; LEBELO, S. L. Antioxidant Effects and Mechanisms of Medicinal Plants and Their Bioactive Compounds for the Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes: An Updated Review. **Oxid Med Cell Longev**, 2020, p. 1356893, 2020.

YACH, D.; STUCKLER, D.; BROWNELL, K. D. J. N. m. Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes. 12, n. 1, p. 62-66, 2006.

YUEN, K.; CHONG, L.; RIDDLE, M. J. D. M. Influence of glucocorticoids and growth hormone on insulin sensitivity in humans. 30, n. 6, p. 651-663, 2013.

YUSUF, M.; SHARMA, V.; PATHAK, K. Nanovesicles for transdermal delivery of felodipine: Development, characterization, and pharmacokinetics. **Int J Pharm Investig**, 4, n. 3, p. 119-130, Jul 2014.

ZHANG, L.; BAI, M.; TANG, H.; ZHOU, F. *et al.* Role of hepatic neuregulin 4 in the regulation of gluconeogenesis in mice. Life Sci, 217, p. 185-192, Jan 15 2019.

8 ARTIGO

Effectiveness of extract okra as liposome on mitigating insulin resistance in both female and male rats

Karoline Paiva da Silva^{1,2*}, ORCID: <u>0009-0000-7765-8781</u> Suéllen Alves Costa^{1,2*}, ORCID: <u>0000-0002-7237-4277</u> Sabrina Rodrigues Valandro¹, Maria Eduarda Amaral Souza¹, Ana Caroline Schoenberger Kipper¹, ORCID: <u>0009-0004-1549-0521</u> Manoela Fontenele Antunes¹, ORCID: <u>0009-0004-2605-3087</u> Luís Paulo Henriques Rodrigues da Silva¹, ORCID: <u>0009-0004-0270-2767</u> Joskame Saint Paul¹, ORCID: <u>0000-0002-3758-4383</u> Aline Milena Dantas Rodrigues¹, ORCID: <u>0009-0003-5859-952X</u> Stela Regina Ferraini², ORCID: <u>0000-0003-4339-1307</u> Júlio Cezar de Oliveira¹, ORCID: <u>0000-0002-6489-9348</u>

¹Research Group on Perinatal Programming of Metabolic Diseases: DOHaD paradigm; Laboratory of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Health Education and Research Center (NUPADS), Institute of Health Sciences, Federal University of Mato Grosso, University *Campus* of Sinop, Sinop, MT, Brazil.

²Pharmaceutical Nanotechnology Laboratory, Federal University of Mato Grosso, University *Campus* of Sinop, Sinop, MT, Brazil.

Correspondence to: Professor Júlio Cezar de Oliveira, PhD, Research Group on Perinatal Programming of Metabolic Diseases: DOHaD paradigm, Laboratory of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Health Education and Research Center (NUPADS), room 03, Institute of Health Sciences, Federal University of Mato Grosso, University *Campus* of Sinop, Sinop, MT, Brazil, Alexandre Ferronato Avenue 1200, 78557-267, Sinop, MT, Brazil.

Phone: + 55 (66) 9 8142-7316

E-mail address: biojborges@gmail.com or julio.oliveira1@ufmt.br

* These authors contribute equally for the work

Characters count: 42,276

Abstract

Insulin resistance is one of health problems growing day by day in worldwide, which in general culminates for the onset of type 2 diabetes mellitus. On the other hand, habitual ingestion of functional food as well as use of bioactive molecules has been put out as strategic possibilities to fight metabolic diseases. Herein, we aimed to test the hypothesis that okra (Abelmoschus esculentus L.) encapsulated as liposome can revert the insulin resistance more efficiently than it in crude status. At 60-days old, female and male rats underwent dexamethasone administration (1mg/kg body weight, bw, per day) by ten consecutive days. At 65-days old, five days after insulin resistance to be installed, rats were treated with okra extract in liposome (1.5 mg/kg bw, per day) or crude (200mg/kg bw, per day) formulation by five consecutive days, and then submitted to the glucose homeostasis study. Dexamethasone induced insulin resistance, hyperglycemia and glucose intolerance in both sexes (P<0.001), which reverted to the control values by extract of okra in both formulations equally (P<0.001). In summary, extract of okra was able to revert insulin resistance and glucose intolerance in both female and male rats, as well considering the magnitude of concentration the use of liposome is more effective than use of crude extract.

Keyword: glucocorticoids, glucose intolerance, metabolic syndrome, type 2 diabetes, liposome, okra.

Background

The rapid growth of type 2 diabetes mellitus (T2DM) has become a health problem worldwide. Amongst seminal evidence, the role of glucocorticoids addressing the onset of insulin resistance, by different ways, is one of the pivotal factors underlining, direct or indirectly, the causes of T2DM [1-4].

From their discover in the 1940s until nowadays, glucocorticoid hormones are useful as potent anti-inflammatory and immunosuppressive therapeutics for acute and chronic inflammatory diseases. However, their continued long-term use has been directly implicated in the onset of metabolic complications, including insulin resistance and the development of T2DM [4].

Even though indirect, the exposure to high doses of dexamethasone (a synthetic glucocorticoid) or cortisol (a physiological glucocorticoid hormone) both in rodents [1] and humans [5,6] during the fetal life, imprints, as indirect effect, a T2DM phenotype, where hyperglycemia, glucose intolerance, insulin resistance and pancreatic failure on the ability to secrete insulin are major features. In this regard, the use of synthetic glucocorticoid dexamethasone has been useful to study mechanisms involved in the insulin resistance due to direct action of glucocorticoids both in rodent-experimental model [7-11] and human [12,13].

On the field of metabolic diseases therapeutics, it is known that many nutraceutical and bioactive molecules, as nonpharmacological tools fighting metabolic syndrome, have been used [14]. Among them the use of okra (*Abelmoschus esculentus*) has been reported by improves the pancreatic islet's structure and function in streptozotocin-induced diabetic rats [15] and metabolic syndrome symptoms [16].

In addition, given the today expansion on the use of nanoparticles into a broad range of clinical application, which can overcome some therapeutic limitations by navigate different biological barriers [17], the use of this nanotechnology might offer mor efficiency on the treatment of metabolic diseases likewise T2DM [18]. In line, we hypothesize that the potential antihyperglycemic of okra is more efficient whether available as nanoparticle. Thus, herein we aimed to evaluate the effect of liposome okra particle on the insulin resistant rats induced by dexamethasone and assess the sex dependent affect.

Material and methods

Ethical Approval

Experimental protocol was approved by the Ethics Committee for the Animal Use and Experiments of the Federal University of Mato Grosso (CEUA/UFMT; process number 23108.709618/2015-21), which adheres to the Brazilian Federal Law number 11.794/2008. Our study complies with the animal ethics checklist as described by [19].

Liposome production and characterization

Liposomes containing okra were prepared using the reversed-phase evaporation method [20]. The organic phase was prepared with phosphatidylcholine, cholesterol and chloroform by ultrasound per 5 min. The aqueous phase was prepared containing phosphate-buffered saline (pH 7.4) and polysorbate 80, and then sonicated for 5 min in ultrasound. After, 1 mL of the aqueous phase was added to the organic phase and returned to ultrasound. Then the organic solvent was removed by rotary evaporation at 25 °C under reduced pressure until a thin film was formed. This film was hydrated by adding the remainder of the aqueous phase and subjected to stirring under reduced pressure for 30 min.

The physicochemical characterization of the liposome developed were carried out regarding particle diameter, zeta potential (ζ) and pH.

Liposomes were characterized in terms of their average diameter, polydispersity index (PDI) and ζ potential, by dynamic light scattering (DLS) and laser Doppler electrophoresis (LDE), measured at 25 °C (NanoBrook 90Plus Zeta[®], Brookhaven Instruments Corportation, USA).

The samples were previously diluted with MilliQ[®] water and 0.01 mol/L of NaCl aqueous solution. The dilution media (0.45 μ m) were filtered before analysis, but each sample was used directly, without filtration or any other treatment, in order to avoid sample selection. Still to evaluate the particle size, the laser diffractometry technique was also used (Mastersizer[®] 2000; Malvern Instruments and Scirocco[®] 2000 accessory).

After obtaining data from 26 laser diffractions, these were evaluated using the value d4.3, which represents the average diameter based on the particle volume and the values of 10% (d10%), 50% (d50%) and 90% (d90%) of the distribution, which indicate the percentage of particles having a diameter equal to or less than the determined value. The

Span value (Equation 1), which indicates the polydispersity value of the system, was also used to characterize the formulations. $d_{0.1}$, $d_{0.9}$ and $d_{0.5}$.

Eq. (1):
$$Span = \frac{d_{0,9} - d_{0,1}}{d_{0,5}}$$

where $d_{0.1}$ depicts cumulative diameter in volume of 10% of the dispersed phase of the analyzed nanostructure. Likewise, $d_{0.9}$ is the cumulative diameter by volume of 90% of the total population and $d_{0.5}$ is the parameter that divides the percentage volume distribution obtained exactly in half, that is, 50% of the total volume of the dispersed phase nanostructures is below the value of d_{50} and 50% is above it.

To determine the pH, a potentiometer (Denver[®] Instrument VB-10, New York, USA) was used, calibrated with buffer solution pH 4.0 and 7.0, directly in the formulations, immediately after preparation. The results represented the average of three determinations. The liposomes were evaluated according to their macroscopic appearance, considering homogeneity, milky, white and opalescent appearance.

Experimental design: induction of insulin resistance

Wistar rats (male, n=60 and females, n=60) were kept under controlled conditions of temperature (23±2°C), humidity (55±5%) and 12 hours light cycle (06:00 AM–06:00 PM), with water and food (rat chow diet (Nuvilab[®], Curitiba, PR, Brazil) *ad libitum* throughout experimental protocol.

At 60-days old, a batch of rats (n=48 rats for each sex, DEXA group) underwent an intraperitoneal (*i.p.*) injection of dexamethasone (1 mg/kg of body weight, once a day) by ten consecutive days, according to a protocol adapted from a previous study [21], until they were 70-days old. At the same period, 60-days old rats (n=12 rats for each sex, CONT group) received saline solution *i.p.* (NaCl, 0.9%).

Throughout experimental period, the rat's fast glycemia was evaluated before (day zero) and fad glycemia during (on the fifth, eighth and tenth day) treatment with dexamethasone.

Experimental design: okra treatment

At 65-days old, on the fifth day after begin insulin resistance induction by dexamethasone, the treatment with okra was started by five consecutive days, until rats were 70-days old.

Rats from DEXA group were randomised to compound a batch of rat treated by gavage with okra extract in a liposomal formulation at a dose of 1.5 mg/kg (n=12 rats for each sex, Okra-Lip group). In addition, as internal control, another randomised batch of rats from DEXA group were treated by gavage with a vehicle in a liposomal formulation without containing okra extract (n=12 rats for each sex) that was named White-Lip group. Comparing to okra extract in a liposomal formulation, the okra crude extract 200 mg/kg was used (n=12 rats for each sex, Okra-Cext group), according to a protocol adapted from a previous study [15].

At 65-days old, before begin okra extract treatment, a 24-hour tracking was carried out to assess the effect of okra extract in liposomal formulation on glucose homeostasis in time response.

Body weight, food intake and water consumption assessment

Since 60- until 70-days old, the body weight and food and water intake were measured every two days. The food and water consumption were performed by consider the average intake of all animals in the cage, which was relativized by the mean of rat's body weight (g/100g of body weight). The area under the curve (AUC) of the entire observation period was calculated for the body weight, and food and water intake measurements [22].

Assessment of glucose-insulin homeostasis

At 70-days old, a batch of rats (n=6) underwent the i.p. glucose (ipGTT) and inulin (ipITT) tolerance test to assess glucose and insulin homeostasis in a metabolic challenge.

After food deprivation for 12 hours (6:00 AM–6:00 PM), with free access to water, a glucose load (2 g/kg body weight) was injected intraperitoneally into the conscious rats. A drop of blood was initially collected from the tip of the tail before the initial glucose load (0 min, basal glycemia) and at 30, 60, 90 and 120 minutes. The glucose concentration was determined by a digital glucometer (Accu-Chek[®] Performa, Roche), as previously reported [23].

Regarding the ipITT, on 4 hours fasting (2:00 PM–6:00 PM) and without the effect of anesthesia, another batch of rats (n=6) received a dose of insulin (1 IU/kg of body weight, i.p.). Before insulin administration, a drop of blood was initially collected from the tip of

the tail, to measurement of blood glucose, corresponding to time zero (blood glucose without the effect of insulin action, 0 min); and then after insulin administration, at 15, 30, 45 and 60 minutes, new blood glucose measurements were taken, which was performed by using a digital glucometer (Accu-Chek[®] Performa, Roche). After performing the ipITT, the calculation was carried out to determine the rate of tissue glucose uptake, that is, the constant for the disappearance of glucose in plasma (Kitt), which was calculated using the formula 0.693/(t1/2), as previously described [24]. In this case, the half-life of plasma glucose was calculated from the slope of the least-squares analysis of plasma glucose concentrations during the linear phase of the decline of the curve [25].

Measurement of the body composition: adipose and lean mass index

At the end of each experimental procedure, rats (n=12, for each sex) were euthanized and a representative white adipose tissue (mesenteric, retroperitoneal and periepididimal for male and periovarian for female fat pad stores) and skeletal muscle sample [soleus and extensor digitorum longus (EDL)] were removed and weighed.

To assess the body mass composition the adiposity index was considered as the sum of the representative white adipose tissues, as well as the lean mass index was considered as the sum of the soleus and ED skeletal muscles, and then divided by the 100 g of each rats' body weight. Data are showed as g per 100 g of body weight.

Statistical analyses

At first, data were submitted to the Shapiro-Wilk normality test to assess the Gaussian distribution. When it assumed normal distribution the statistical analysis among groups were performed by one-way analysis of variance (one-way ANOVA), which were followed by the Tukey's post-hoc test. The significance level considered for all variables was 95%.

All data are given as the mean \pm SEM and were analyzed using the appropriate statistical program GraphPad Prism, version 8 for Windows (GraphPad Prism[®] Software, San Diego, CA, USA) and the values expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM).

Results

Glucose homeostasis assessment through period of insulin resistance induction

Comparing DEXA versus CONT rats at 60-days old, just before dexamethasone administration, glycemia did not differ between groups, in both female (P>0.05, Fig. 1A) and male (P>0.05, Fig. 1D); as well as glycemia from female versus male CONT rats was not statistically different (P>0.05), neither between female versus male DEXA rats (P>0.05).

At the fifth day of dexamethasone administration, fed glycemia of DEXA female-rats were 62.83% higher than CONT female-rats (P<0.001, Fig. 1B) and fed glycemia of DEXA male-rats were 72.52% higher than CONT male-rats (P<0.001, Fig. 1E). Comparing glycemia from female with male DEXA rats, it was 16.02% smaller in female than male DEXA rats (P<0.01); while it did not differ between female *versus* male CONT rats (P>0.05).

On the eighth day, after dexamethasone administration and three days after okra treatment, glycemia of DEXA female-rats were 55.82% higher than CONT female-rats (P<0.001, Fig. 1B) and glycemia of DEXA male-rats were 87.64% higher than CONT male-rats (P<0.001, Fig. 1E). Compared to DEXA female-rats, glycemia of DEXA male-rats were 20.81% high (P<0.05); while glycemia of CONT female-rats was not statistically different from CONT male-rats (P>0.05).

The Whit-Lip female-rats presented glycemia statistically equivalent to DEXA femalerats (P>0.05, Fig. 1B), but it was increased by 70.96% in relation to CONT female-rats (P<0.001, Fig. 1B). By its turn, glycemia of Whit-Lip male-rats was not statistically different from DEXA male-rats (P>0.05, Fig. 1E), but it was increased by 81.02% in relation to CONT male-rats (P<0.001, Fig. 1E). Comparing glycemia of Whit-Lip female-rats with Whit-Lip male-rats, it was not statistically different (P>0.05).

The Okra-Lip female-rats presented glycemia 24.28% smaller than DEXA female-rats (P<0.05, Fig. 1B), while it was statistically equivalent to glycemia observed in CONT female-rats (P>0.05, Fig. 1B). The Okra-Lip male-rats displayed glycemia 34.02% smaller than DEXA male-rats (P<0.001, Fig. 1E), without statistical difference when compared to glycemia of CONT male-rats (P>0.05, Fig. 1E). There were no statistical differences between Okra-Lip female-rats versus Okra-Lip male-rats (P>0.05, Fig. 1B), nor Okra-Lip male-rats versus Okra-Lip female-rats (P>0.05, Fig. 1B), nor Okra-Lip male-rats versus Okra-Cru male-rats (P>0.05, Fig. 1E).

Glycemia of Okra-Cru female-rats was 25.41% smaller than glycemia of DEXA femalerats (P<0.05, Fig. 1B) and did not statistically different from CONT female-rats (P>0.05, Fig. 1B). In male, glycemia of Okra-Cru male-rats was 39.33% smaller than DEXA malerats (P<0.001, Fig. 1E) and did not statistically different from CONT male-rats (P>0.05, Fig. 1E). There were no statistical differences between Okra-Cru female-rats versus Okra-Cru male-rats (P>0.05).

On the tenth day of dexamethasone administration and fifth day of okra treatment, glycemia of DEXA female-rats were 55.39% higher than CONT female-rats (P<0.01, Fig. 1B) and glycemia of DEXA male-rats were 122.64% higher than CONT male-rats (P<0.001, Fig. 1E). While glycemia in DEXA female-rats was 18.28% smaller than DEXA male-rats (P<0.05); it did not differ between CONT female-rats versus CONT male-rats (P>0.05). The Whit-Lip female-rats presented glycemia statistically equivalent to DEXA female-rats (P<0.001, Fig. 1B), but increased by 68.92% when compared to CONT female-rats (P<0.001, Fig. 1B). Similarly, the Whit-Lip male-rats presented glycemia statistically equivalent to DEXA male-rats (P<0.001, Fig. 1B). Similarly, the Whit-Lip male-rats presented glycemia statistically equivalent to DEXA male-rats (P<0.05, Fig. 1B) and increased by 113.42% in relation to CONT male-rats (P<0.001, Fig. 1E). There was no statistical difference between glycemia from Whit-Lip female-rats and Whit-Lip male-rats (P>0.05).

The Okra-Lip did not differ from Okra-Cru nor from CONT rats, in both female and male groups (P>0.05, Fig. 1B-E), but it was reduced by 33.06% in female-rats (P<0.001, Fig. 1B) and by 46.81% in male-rats (P<0.001, Fig. 1E) when compared to its respective counterpart DEXA group. Yet, Okra-Lip female-rats versus Okra-Lip male-rats did not statistically differ (P>0.05).

Assessment of time-dependent effect of liposome on glucose homeostasis

Regarding rats that were used to underwent liposome administration, fed glycemia from Okra-Lip rats did not differ of fed glycemia from Whist-Lip rats, either before and after five days of dexamethasone administration, in both female (P>0.05, Fig. 2A) and male rats (P>0.05, Fig. 2C). By other hand, at fifth day after dexamethasone administration, just before liposome administration, glycemia increased by 121.20% in Whist-Lip female rats (P<0.001, Fig. 2A) and by 95.90% in Whist-Lip male rats (P<0.001, Fig. 2C); as well as it increased by 93.20% in Okra-Lip female rats (P<0.001, Fig. 2A) and by 110.67% in Okra-Lip male rats (P<0.001, Fig. 2C).

Into the Whit-Lip group, glycemia at 24 hours, after liposome administration, was reduced by 28.37% in female (P<0.001, Fig. 2B) and by 17.14% in male (P<0.05, Fig. 2D) when compared to glycemia before liposome administration in its respectively counterparts. In addition, assessing glycemia at 24 hours, after liposome administration, a reduction of 28.47% in glycemia from Whit-Lip female rats (P<0.001, Fig. 2B) and 28.92% in glycemia at 12 hours of liposome administration in its respective counterparts; as well as glycemia at 24 hours after liposome administration was statistically different from all the other assessed times in both of sex (P<0.001, Fig. 2B and 2D). On the other hand, glycemia from Whist-Lip group, assessed in all the other times (1, 2, 4, 8 and 12 hours after liposome administration) did not differ among them in both of sex (P>0.05, Fig. 2B and 2D).

In turn, glycemia from Okra-Lip female rats was reduced by 28.25% at 1 hour (P<0.05, Fig. 2B); by 31.09% at 2 hours (P<0.05, Fig. 2B); by 35.78% at 4 hours (P<0.01, Fig. 2B); by 28.01% at 8 hours (P<0.05, Fig. 2B); by 36.097% at 12 hours (P<0.01, Fig. 2B) and by 54.40% at 24 hours (P<0.001, Fig. 2B), after liposome administration. On the other hand, into the Okra-Lip male rat group, glycemia did not differ among assessed times (at 1, 2, 4, 8 and 12 hours after liposome administration; P<0.05, Fig. 2D), but reduced by 61.69% at 24 hours after liposome administration; P<0.05, Fig. 2D).

Comparing glycemia from Okra-Lip *versus* Whit-Lip female rats during the timedependent test, glycemia from Okra-Lip female rats was reduced by 30.39% at 1 hour (P<0.01, Fig. 2B); by 32.37% at 2 hours (P<0.001, Fig. 2B); by 37.07% at 4 hours (P<0.001, Fig. 2B); by 34.44% at 8 hours (P<0.001, Fig. 2B); by 39.44% at 12 hours (P<0.001, Fig. 2B) and by 39.61% at 24 hours (P<0.01, Fig. 2B), after liposome administration. While, in Okra-Lip male rat group, even glycemia had been reduced by around 20%, it did not differ of glycemia from Whit-Lip male rats at each assessed times (1, 2, 4, 8, 12 and 24 hours after liposome administration; P>0.05, Fig. 2D).

Assessment of glucose homeostasis during the ipGTT

In female rats the 12 hours fasting glycemia of DEXA group was 133.92% higher than glycemia in CONT group (P<0.001, Fig. 3A). Similarly, Whit-Lip group displayed glycemia 121.13% higher than CONT (P<0.001, Fig. 3A). In comparison to CONT group, fasting glycemia was increased by 53.31% in Okra-Lip (P<0.05, Fig. 3A) and by 45.97% in Okra-Cru group, even did not statistically different (P>0.05, Fig. 3A).
Compared to DEXA female-rats, fasting glycemia measured in Whit-Lip group was not statistically different (P>0.05, Fig. 3A); however, it was reduced by 34.46% in Okra-Lip and by 37.60% in Okra-Cru female-rats (P<0.001, Fig. 3A). Fasting glycemia did not differ between Okra-Lip and Okra-Cru female-rats (P>0.05, Fig. 3A).

By its turn, in male rats, fasting glycemia of DEXA were 93.59% higher than CONT group (P<0.001, Fig. 3C), as such Whit-Lip rats displayed glycemia 90.20% higher than CONT rats (P<0.001, Fig. 3D). Even increased by 22.18% in Okra-Lip and by 21.92% in Okra-Cru male-rats, glycemia is these groups did not differ of CONT male-rats (P>0.05, Fig. 3D).

Comparing fasting glycemia of DEXA with Whit-Lip male-rats there was no statistical difference (P>0.05, Fig. 3D). On the other hand, in comparison to DEXA male-rats, fasting glycemia decreased by 36.89% in Okra-Lip and by 37.02% in Okra-Cru male-rats (P<0.01, Fig. 3D), while it did not differ between Okra-Lip and Okra-Cru male-rats (P>0.05, Fig. 3D).

During the ipGTT, in relation to CONT group, DEXA female-rats presented an increment of glycemia, depicted in the AUC, of 76.96% (P<0.001, Fig. 3B); as well as it was increased by 67.47% in Whit-Lip female-rats (P<0.001, Fig. 3B). Compared to CONT female-rats, the increment of glycemia assessed in the AUC was 38.39% in Okra-Lip (P<0.001, Fig. 3B) and 32.47% in Okra-Cru group (P<0.01, Fig. 3B).

In comparison with DEXA female-rats, Whit-Lip group was not statistically different (P>0.05, Fig. 3B), while Okra-Lip group displayed the glycemic AUC reduced by 21.80% and in Okra-Cru female-rats presented it reduced by 25.14% (P<0.001, Fig. 3B). The increment of AUC of Okra-Lip did not differ from Okra-Cru group (P>0.05, Fig. 3B).

In turn, DEXA male-rats displayed increment of glycemia during the ipGTT increased by 150.26% and Whit-Lip male-rats increased by 128.49% when compared to CONT group (P<0.001, Fig. 3D). The glycemic AUC was increased by 66.01% in Okra-Lip and by 69.18% in Okra-Cru group, in comparison to CONT male-rats (P<0.001, Fig. 3D).

Comparing to DEXA male-rats, Whit-Lip group did not differ (P>0.05, Fig. 3D); even though, the Okra-Lip glycemic AUC was reduced by 33.67%, as well the reduction in Okra-Cru was by 32.40% (P<0.001, Fig. 3D). The increment of AUC of Okra-Lip male-rats *versus* Okra-Cru group did not differ (P>0.05, Fig. 3D).

Assessment of insulin homeostasis during the ipITT

The calculation of Kitt for female-rats, showed that the tax of glycemia disappearance was reduced by 92.69% in DEXA (P<0.001, Fig. 4A) and by 85.60% in Whit-Lip (P<0.05, Fig. 4A), in relation to CONT group. Even though the values of Kitt were reduced by 28.05% and by 66.67% in Okra-Lip and Okra-Cru female-rats, respectively, they were not statistically different from the Kitt in CONT group (P>0,05, Fig. 4A).

In relation to DEXA female-rats, Okra-lip group displayed an increase around of 39-fold in the value of Kitt (P<0.001, Fig. 4A); while the Kitt in Whit-Lip and in Okra-Cru groups were not statistically different (P>0.05, Fig. 4A). The Kitt of Okra-Cru versus Okra-Lip female-rats did not differ between them (P>0.05, Fig. 4A).

Assessing the Kitt in male-rats, in relation to CONT group, it was reduced by 82.56% in DEXA (P<0.05, Fig. 4C) and by 88.94% in Whit-Lip (P<0.001, Fig. 4C). The Kitt in Okra-Lip male-rats, even reduced by 67.84%, it was not statistically different when compared to Kitt in CONT group (P>0.05, Fig. 4C). In relation CONT group, the Kitt in Okra-cru male-rats was reduced by 83.35% (P<0.05, Fig. 4C).

Compared to the Kitt in DEXA male-rats, the groups Whit-Lip, Okra-Lip and Okra-Cru were not statistically different (*P*>0.5, Fig. 4C); as well as the Kitt of Okra-Cru *versus* Okra-Lip male-rats did not differ between them (*P*>0.05, Fig. 4C).

Discussion

In the current study, we show the effect of okra extract either in liposomal or crud formulation as capable therapeutic tool to mitigate the negative effects of glucocorticoids on glucose homeostasis in a well-established rat model of insulin resistance and/or type 2 diabetes [7-13].

At fifth day after begin dexamethasone treatment female and male rats were hyperglycemic, without difference between sex; as well the fed and fest hyperglycemic state was maintained until the tenth day of dexamethasone treatment, as similarly way in both sexes. In this regard, as reported previously, the use of dexamethasone in huma, by a couple of days, reduced insulin sensitivity as a similar way in both men and women [26]. Glucocorticoids can elevate glycemia through hepatic glucose production by activating gluconeogenesis signaling pathway [27], as well as by blocking peripheral glucose uptake in skeletal muscle and adipocytes [28]. Interestingly, in the current study it was observed that the daily ingestion of okra in each formulation was able on reducing fed glycemia in both female and male rats, already at third day of treatment, addressing it to the control values at the fifth day of okra ingestion, which was observed in fed and fest status as well as during the metabolic challenge.

Herein we are showing by the first time that peripheral glucose intolerance induced by dexamethasone treatment for ten days was mitigated in both female and male rats, due to daily ingestion of okra. In addition, it is important to highlight that in our study the concentration of okra into the liposome was around 1,500-fold smaller than the concentration in the crude formulation, and the effect on glucose homeostasis was similar. On the other hand, the liposome vehicle, *per se*, did not have effect on the glucose homeostasis as it can be seeing in data showed for Whit-Lip group. The importance of this finding lies in the fact that the extract of okra incorporated into liposome by encapsulates hydrophobic and hydrophilic structures presented in the extract, must be preventing degradation and/or possibly promoting delivery in a specific site [29]. Comparing the similarity between effects observed in the present study, it opens insights for new possibilities for the use of nanotechnology (e.g., liposomal formulation), in which small quantities of compounds are needed to achieve the final objective.

Okra has been reported as functional food that contains benefits against type 2 diabetes *mellitus* [30,31] and other metabolic comorbidities such as obesity and dyslipidemia

[32,33]. Its effects have been associated with improvement of the antioxidant agents [30], pancreatic islets function [15], among other possible mechanism that are not yet known. As known, dexamethasone induces oxidative stress, which can lead to skeletal muscle atrophy [34]. Herein we observed that female and male rats treated with dexamethasone displayed skeletal muscle atrophy in both soleus and extensor digitorum longus, which was around of 38% (*data not shown*). In line, as reported recently, polysaccharide isolated from okra alleviates the type 2 diabetes mellitus negative effects on redox balance by activation of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)/glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) pathway, as well as by enhancing the nuclear factor erythroid-2 (Nrf2) expression and promoted Nrf2-medicated heme oxygenase-1(HO-1) and superoxide dismutase 2 (SOD2) expression and by inhibiting mitochondrial NOX2 activation [30], on this field we did not quantify yet mechanisms and highlight that further studies are needed to explain mechanisms through which okra can improve glucose intolerance, insulin resistance and/or mitigate hepatic glucose production signaling pathways.

In addition, the liposome containing okra, even in a very small concentration in relation to the okra crude extract, was able on reverting the peripheral insulin resistance, chronically induced by excessive action of dexamethasone, which was a response slightly different and more prominent from those observed in rats under the effect of okra crude extract, in both female and male rats. In line, the direct action of glucocorticoids on the β -cell mechanisms underlining insulin secretion, it has been shown that isolated pancreatic-islets chronically incubated for three days with corticosterone show impaired cytosolic flux of Ca²⁺ in responses to glucose, which was observed to be through the action of the glucocorticoid receptor [35], herein we did not quantify the insulinemia neither inulin secretion to access more precisely the effect of liposomal okra on pancreas, which is one of limitation in our study.

In summary, our findings show that okra extract improves glucose homeostasis, reducing it in fed and fast status, in female and male rats under the pre-diabetic condition induced by glucocorticoids excess. In addition, we conclude that low dose of okra offered as liposomal formulation reaches the same effect those find in crude extract.

Concerning the health care and approaches on preventing metabolic diseases, data in the current study reinforce the importance of healthy nutritional habits, like that ingestion of

functional food and nutraceuticals, which can modulate metabolism to fight diabetic status and unbalanced glucose homeostasis.

Funding

This work did not have financial support.

Author contributions

KPS, SAC, SRF and JCO designed the study; KPS, SRF and JCO revised the manuscript; KPS, SAC, SRV, MEAS, ACSK, MFA, PHRS, JSP and AMDR conducted the research; KPS and JCO analyzed the data; JCO wrote the manuscript; JCO acted as the principal investigator, provided support and reviewed the data and manuscript.

Competing interest

The authors declare that there no conflict of interest.

References

- Somm E, Vauthay DM, Guerardel A, Toulotte A, Cettour-Rose P, Klee P, Meda P, Aubert ML, Huppi PS, Schwitzgebel VM (2012) Early metabolic defects in dexamethasone-exposed and undernourished intrauterine growth restricted rats. PLoS One 7 (11):e50131. doi:10.1371/journal.pone.0050131
- Facchi JC, Lima TAL, Oliveira LR, Costermani HO, Miranda GDS, de Oliveira JC (2020) Perinatal programming of metabolic diseases: The role of glucocorticoids. Metabolism: clinical and experimental 104:154047. doi:10.1016/j.metabol.2019.154047
- 3. Sunena, Mishra DN (2022) Stress Etiology of Type 2 Diabetes. Curr Diabetes Rev 18 (9):e240222201413. doi:10.2174/1573399818666220224140934
- 4. Li JX, Cummins CL (2022) Fresh insights into glucocorticoid-induced diabetes mellitus and new therapeutic directions. Nat Rev Endocrinol 18 (9):540-557. doi:10.1038/s41574-022-00683-6
- Riveline JP, Baz B, Nguewa JL, Vidal-Trecan T, Ibrahim F, Boudou P, Vicaut E, Brac de la Perriere A, Fetita S, Breant B, Blondeau B, Tardy-Guidollet V, Morel Y, Gautier JF (2019) Exposure to glucocorticoids in the first part of fetal life is associated with insulin secretory defect in adult human. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. doi:10.1210/clinem/dgz145
- Entringer S, Buss C, Rasmussen JM, Lindsay K, Gillen DL, Cooper DM, Wadhwa PD (2017) Maternal Cortisol During Pregnancy and Infant Adiposity: A Prospective Investigation. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 102 (4):1366-1374. doi:10.1210/jc.2016-3025
- Niwa F, Kawai M, Kanazawa H, Okanoya K, Myowa-Yamakoshi M (2019) The development of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis during infancy may be affected by antenatal glucocorticoid therapy. Journal of neonatal-perinatal medicine. doi:10.3233/NPM-180040
- Rafacho A, Ortsater H, Nadal A, Quesada I (2014) Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. J Endocrinol 223 (3):R49-62. doi:10.1530/JOE-14-0373
- Navarrete M, Nunez H, Ruiz S, Soto-Moyano R, Valladares L, White A, Perez H (2007) Prenatal undernutrition decreases the sensitivity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in rat, as revealed by subcutaneous and intra-paraventricular dexamethasone challenges. Neuroscience letters 419 (2):99-103. doi:10.1016/j.neulet.2007.04.019
- Rafacho A, Cestari TM, Taboga SR, Boschero AC, Bosqueiro JR (2009) High doses of dexamethasone induce increased beta-cell proliferation in pancreatic rat islets. Am J Physiol Endocrinol Metab 296 (4):E681-689. doi:10.1152/ajpendo.90931.2008
- Rafacho A, Roma LP, Taboga SR, Boschero AC, Bosqueiro JR (2007) Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. Can J Physiol Pharmacol 85 (5):536-545. doi:y07-037 [pii]10.1139/y07-037
- 12. Larsson H, Ahren B (1999) Insulin resistant subjects lack islet adaptation to short-term dexamethasoneinduced reduction in insulin sensitivity. Diabetologia 42 (8):936-943

- Fabregat ME, Fernandez-Alvarez J, Franco C, Malaisse WJ, Gomis R (1999) Dexamethasone-induced changes in FAD-glycerophosphate dehydrogenase mRNA, content and activity, and insulin release in human pancreatic islets. Diabetes Nutr Metab 12 (6):388-393
- Petroni ML, Brodosi L, Marchignoli F, Sasdelli AS, Caraceni P, Marchesini G, Ravaioli F (2021) Nutrition in Patients with Type 2 Diabetes: Present Knowledge and Remaining Challenges. Nutrients 13 (8). doi:10.3390/nu13082748
- Erfani Majd N, Tabandeh MR, Shahriari A, Soleimani Z (2018) Okra (Abelmoscus esculentus) Improved Islets Structure, and Down-Regulated PPARs Gene Expression in Pancreas of High-Fat Diet and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Cell journal 20 (1):31-40. doi:10.22074/cellj.2018.4819. 10.22074/cellj.2018.4819
- 16. Esmaeilzadeh D, Razavi BM, Hosseinzadeh H (2020) Effect of Abelmoschus esculentus (okra) on metabolic syndrome: A review. Phytother Res 34 (9):2192-2202. doi:10.1002/ptr.6679
- Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R (2021) Engineering precision nanoparticles for drug delivery. Nat Rev Drug Discov 20 (2):101-124. doi:10.1038/s41573-020-0090-8
- Chai WF, Tang KS (2021) Protective potential of cerium oxide nanoparticles in diabetes mellitus. J Trace Elem Med Biol 66:126742. doi:10.1016/j.jtemb.2021.126742
- Grundy D (2015) Principles and standards for reporting animal experiments in The Journal of Physiology and Experimental Physiology. The Journal of physiology 593 (12):2547-2549. doi:10.1113/JP270818
- Mertins O, Cardoso MB, Pohlmann AR, da Silveira NP (2006) Structural evaluation of phospholipidic nanovesicles containing small amounts of chitosan. Journal of nanoscience and nanotechnology 6 (8):2425-2431. doi:10.1166/jnn.2006.521
- Rafacho A, Marroqui L, Taboga SR, Abrantes JL, Silveira LR, Boschero AC, Carneiro EM, Bosqueiro JR, Nadal A, Quesada I (2010) Glucocorticoids in vivo induce both insulin hypersecretion and enhanced glucose sensitivity of stimulus-secretion coupling in isolated rat islets. Endocrinology 151 (1):85-95. doi:10.1210/en.2009-0704
- 22. de Oliveira JC, Gomes RM, Miranda RA, Barella LF, Malta A, Martins IP, Franco CC, Pavanello A, Torrezan R, Natali MR, Lisboa PC, Mathias PC, de Moura EG (2016) Protein Restriction During the Last Third of Pregnancy Malprograms the Neuroendocrine Axes to Induce Metabolic Syndrome in Adult Male Rat Offspring. Endocrinology 157 (5):1799-1812. doi:10.1210/en.2015-1883
- Mathias PCF, Miranda GDS, Barella LF, Miranda RA, Pavanello A, Martins IP, Facchi JC, Costermani HO, Lima TAL, de Oliveira JC (2020) Cholinergic-pathway-weakness-associated pancreatic islet dysfunction: a low-protein-diet imprint effect on weaned rat offspring. Journal of developmental origins of health and disease 11 (5):484-491. doi:10.1017/S2040174420000215
- 24. de Oliveira JC, Scomparin DX, Andreazzi AE, Branco RC, Martins AG, Gravena C, Grassiolli S, Rinaldi W, Barbosa FB, Mathias PC (2011) Metabolic imprinting by maternal protein malnourishment impairs vagal activity in adult rats. J Neuroendocrinol 23 (2):148-157. doi:10.1111/j.1365-2826.2010.02095.x

- 25. Lundbaek K (1962) Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. British medical journal 1 (5291):1507-1513
- Binnert C, Ruchat S, Nicod N, Tappy L (2004) Dexamethasone-induced insulin resistance shows no gender difference in healthy humans. Diabetes Metab 30 (4):321-326. doi:10.1016/s1262-3636(07)70123-4
- 27. Cui A, Fan H, Zhang Y, Zhang Y, Niu D, Liu S, Liu Q, Ma W, Shen Z, Shen L, Liu Y, Zhang H, Xue Y, Cui Y, Wang Q, Xiao X, Fang F, Yang J, Cui Q, Chang Y (2019) Dexamethasone-induced Kruppel-like factor 9 expression promotes hepatic gluconeogenesis and hyperglycemia. The Journal of clinical investigation 129 (6):2266-2278. doi:10.1172/JCI66062
- Rose AJ, Herzig S (2013) Metabolic control through glucocorticoid hormones: an update. Molecular and cellular endocrinology 380 (1-2):65-78. doi:10.1016/j.mce.2013.03.007
- Kesharwani P, Kumari K, Gururani R, Jain S, Sharma S (2022) Approaches to Address PK-PD Challenges of Conventional Liposome Formulation with Special Reference to Cancer, Alzheimer's, Diabetes, and Glaucoma: An Update on Modified Liposomal Drug Delivery System. Curr Drug Metab 23 (9):678-692. doi:10.2174/1389200223666220609141459
- Liao Z, Zhang J, Liu B, Yan T, Xu F, Xiao F, Wu B, Bi K, Jia Y (2019) Polysaccharide from Okra (Abelmoschus esculentus (L.) Moench) Improves Antioxidant Capacity via PI3K/AKT Pathways and Nrf2 Translocation in a Type 2 Diabetes Model. Molecules 24 (10). doi:10.3390/molecules24101906
- 31. Saatchi A, Aghamohammadzadeh N, Beheshtirouy S, Javadzadeh Y, Afshar FH, Ghaffary S (2022) Anti-hyperglycemic effect of Abelmoschus culentesus (Okra) on patients with diabetes type 2: a randomized clinical trial. Phytotherapy research : PTR 36 (4):1644-1651. doi:10.1002/ptr.7341
- Fan S, Guo L, Zhang Y, Sun Q, Yang B, Huang C (2013) Okra polysaccharide improves metabolic disorders in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mice. Molecular nutrition & food research 57 (11):2075-2078. doi:10.1002/mnfr.201300054
- 33. Moradi A, Tarrahi MJ, Ghasempour S, Shafiepour M, Clark CCT, Safavi SM (2020) The effect of okra (Abelmoschus esculentus) on lipid profiles and glycemic indices in Type 2 diabetic adults: Randomized double blinded trials. Phytotherapy research : PTR 34 (12):3325-3332. doi:10.1002/ptr.6782
- Chen C, Yang JS, Lu CC, Chiu YJ, Chen HC, Chung MI, Wu YT, Chen FA (2020) Effect of Quercetin on Dexamethasone-Induced C2C12 Skeletal Muscle Cell Injury. Molecules 25 (14). doi:10.3390/molecules25143267
- Koizumi M, Yada T (2008) Sub-chronic stimulation of glucocorticoid receptor impairs and mineralocorticoid receptor protects cytosolic Ca2+ responses to glucose in pancreatic beta-cells. J Endocrinol 197 (2):221-229. doi:10.1677/JOE-07-0462

Figure legends

Figure 1. Glycemic homeostasis during the experimental period of female (A, B and C) and male (D, E and F) rats. Data are presented as mean \pm standard deviation of 8-10 rats, in both sexes. Given the Gaussian distribution by Shapiro-Wilk test, data were submitted to one-way analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey's posttest. Symbols upon the lines (Fig. B and E) depict statistical difference, in which *** P<0.001 mean day five *vs* day zero in DEXA rats; ^{###} P<0.001 mean DEXA and Whit-Lip *vs* CONT rats at days five, eight and ten; ^{§§§} P<0.001 mean Okra-Lip and Okra-Cru *vs* DEXA and *vs* Whit-Lip rats at days eight and ten. The letters above the bars represent statistical differences among groups, where a) CONT, control group; b) DEX, group that received dexamethasone; c) Whit-Lip, a batch of DEXA group that received liposome containing okra and e) Okra-Cru, a batch of DEXA group that were treated with a crude extract containing okra.

Figure 2. Screening of the time-dependent effect of liposome with and without okra on glycemia in female (A and B) and male (C and D) rats. Data are presented as mean \pm standard deviation of 5 rats, in both sexes. Given the Gaussian distribution by Shapiro-Wilk test, data were submitted to one-way analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey's post-test. The letters above the bars (Fig. A and B) represent statistical differences among groups, where a) White-Lip before dexamethasone administration; b) Okra-Lip before dexamethasone administration; c) White-Lip five-days after dexamethasone administration; b) Okra-Lip before dexamethasone administration. Symbols upon the lines (Fig. B and D) depict statistical difference, in which * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 mean times 24, 12, 8, 4, 2 and 1 hour after liposome administration *vs* glycemia before liposome administration in Okra-Lip rats; ^{##} P<0.01, ^{###} P<0.001 mean Whit-Okra *vs* White-Lip rats; § P<0.05, §§§ P<0.001 mean time 24 after liposome administration *vs* glycemia before liposome administration in White-Lip rats.

Figure 3. Plasma glucose variation during the intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT). Data are presented as mean \pm standard deviation of 8-10 rats, in both sexes.

Given the Gaussian distribution by Shapiro-Wilk test, data were submitted to one-way analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey's post-test. Insert in the figures B and D depicts the area under the glycemic curve (AUC) during the ipGTT. The letters above the bars represent statistical differences among groups, where a) CONT, control group; b) DEX, group that received dexamethasone; c) Whit-Lip, a batch of DEXA group that received liposome treatment without okra; d) Okra-Lip, a batch of DEXA group that received liposome containing okra and e) Okra-Cru, a batch of DEXA group that were treated with a crude extract containing okra.

Figure 4. Plasma glucose uptake constant (Kitt) during the intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT). Data are presented as mean ± standard deviation of 6-8 rats, in both sexes. Given the non-Gaussian distribution by Shapiro-Wilk test, data were submitted to Kruskal-Walli's test followed by Dunn's post-test. The letters above the bars represent statistical differences among groups, where a) CONT, control group; b) DEX, group that received dexamethasone; c) Whit-Lip, a batch of DEXA group that received liposome treatment without okra; d) Okra-Lip, a batch of DEXA group that received liposome containing okra and e) Okra-Cru, a batch of DEXA group that were treated with a crude extract containing okra.





Figures 2







Figures 4

