



Universidade Federal do Pampa

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Consumo em excesso de sacarose na forma de açúcar cristal ou açúcar mascavo: Avaliação do estresse oxidativo em *Drosophila melanogaster*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aline Castro Caurio

Uruguaiana, RS, Brasil.

2017

Consumo em excesso de sacarose na forma de açúcar cristal ou açúcar mascavo: Avaliação do estresse oxidativo em *Drosophila melanogaster*

Por

Aline Castro Caurio

Dissertação apresentada como exigência parcial para obtenção de grau de **Mestra em Bioquímica**, pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA.

Orientador: Prof. Dr. Elton Luís GasparattoDenardin

Co-orientadora: Vanusa Manfredini

Uruguaiana, RS, Brasil.

2017

ALINE CASTRO CAURIO

Consumo em excesso de sacarose na forma de açúcar cristal ou açúcar mascavo: Avaliação do estresse oxidativo em *Drosophila melanogaster*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Strictu Sensu em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Área de Concentração: Bioprospecção
Molecular

Dissertação defendida e aprovada em: 10 de agosto de 2017.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Elton Luís Gasparotto Denardin
Orientador
UNIPAMPA

Profa. Dra. Francieli Weber Santos Cibirin
UNIPAMPA

Profa. Dra. Nilda Berenice de Vargas Barbosa
UFSM

“É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.

Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver...”

"Martin Luther King"

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Paulo e Marta principalmente pelo incentivo ao estudo durante toda a minha formação escolar e acadêmica, fazendo o possível e o impossível para me proporcionarem chegar até aqui.

Dedico também este trabalho ao meu noivo Gustavo Griebler pelas incansáveis madrugadas em claro me apoiando e incentivando quando muitas vezes queria desistir, te amo “amor”.

Não menos importante dedico este trabalho também aos meus irmãos Ana Paula e Bruno Caurio e ao famoso “cu” da família Leonardo Pavanatto pela frase de consolo e incentivo tipo: “alguém tem que estudar nesta família né”.

E também ao meu tio Anderson, minha tia Caroline e minha avó Cleia por acreditarem em mim e estarem sempre na torcida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Pampa pela oportunidade oferecida de realizar o mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Elton Luis Gasparatto Denardin, pela confiança depositada em mim ao me aceitar de volta como orientada, pela paciência, pelo paizão que és com todos os orientados.

Ao professor Robson L. Puntel e a Dr. Andréia Caroline Fernandes Salgueiro pela avaliação do projeto e sugestões para o desenvolvimento e melhora do trabalho.

A professora Vanusa Manfredini pela ajuda incansável e disponibilidade de kits e reagentes do laboratório dela.

Aos alunos do laboratório 423 pelo convívio durante o desenvolvimento deste trabalho estabelecendo um carinho, amizade e ajuda de quem estava por ali.

Salientando a participação da graduanda Mayara Batu e do Doutorando Jefferson, famoso “Jeff, o paizão”, assim como a Doutoranda Litiele Bruck pelos conselhos de mãezona principalmente na finaleira sempre contribuindo para uma melhor escrita.

Aos colegas do laboratório 403, em especial, à Monica e a Andréia pela ajuda em alguns experimentos.

Enfim, o meu agradecimento a todos que de alguma forma contribuíram para a realização e finalização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
APRESENTAÇÃO	17
1.INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 CONSUMO DE AÇÚCAR.....	19
2.2 HIPERGLICEMIA CRÔNICA E SUAS COMPLICAÇÕES	20
2.3 METABOLISMO GLICOLÍTICO	22
2.3.1 Glicólise	23
2.3.2 Insulina e Glucagon	25
2.3.3 Glicemia	27
2.4 CARBOIDRATOS.....	27
2.4.1 O consumo em Excesso de Açúcar.....	28
2.4.1.1 Tabela TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos).....	29
2.4.2 Etapas de Produção do Açúcar Mascavo e do Açúcar Cristal.....	30
2.5 <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	30
2.5.1 Ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i>	31
2.5.2 Metabolismo na <i>Drosophilamelanogaster</i>	33
2.6 ESTRESSE OXIDATIVO.....	33
2.6.1 Mecanismos de Geração de Radicais Livres	34
2.6.2 Sistemas de Defesa Antioxidante	36
2.6.3 Marcadores de Estresse Oxidativo	38
2.7 HIPERGLICEMIA E ESTRESSE OXIDATIVO	39
2.7.1 Auto-oxidação da glicose.....	39
2.7.2 Glicação não enzimática.....	40
2.7.3 Ativação da via dos polióis	40
3. OBJETIVOS.....	42
3.1 OBJETIVO GERAL	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42

4. ARTIGO CIENTÍFICO	43
4.1 INTRODUÇÃO	43
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.3 RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	47
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
6. PROPOSTAS FUTURAS.....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs- Advanced glycation end products

Akt – Proteína Quinase

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

cAMP - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

AQP₂ - aquaporina 2

AVE - acidente vascular encefálico

CAT - Catalase

CBD - Consenso Brasileiro de Diabetes

DI - *Diabetes Insipidus*

DIC - *Diabetes Insipidus Central*

DILPs – *Drosophila* peptídeo semelhante à insulina

DIN - *Diabetes Insipidus Nefrogênico*

DM - *Diabetes mellitus*

DM1 - Diabetes mellitus tipo 1 ou insulino dependente

DM2 - Diabetes mellitus tipo 2, insulino resistente ou não insulino dependente

DVP - doença vascular periférica

EO – estresse oxidativo

ERO - espécies reativas de oxigênio

FDA – Food and Drug Administration

FOXO – fator de transcrição

GPx – Glutathione Peroxidase

HC – hiperglicemia crônica

IDF - International Diabetes Federation

ILP – peptídeos de insulina

InR – receptor de insulina

IPC – Células produtoras de insulina

MAC – macroangiopatia diabética

MIC – microangiopatia diabética

Mody - Maturity onset diabetes of the young

NOS - núcleo supraóptico

NPV - núcleo paraventricular

OMS - Organização Mundial da Saúde

PKA - proteína quinase A

RL- radical livre

SOD - Superóxido Dismutase

TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos

TOR – alvo da rapamicina (proteínas quinases)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição centesimal dos açúcares Cristal, Refinado e Mascavo.	29
Tabela 2: Alguns dos marcadores do estresse oxidativo: descrição e fundamento.	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hiperglicemia crônica e suas complicações.....	21
Figura 2: Principais vias de utilização da glicose.	23
Figura 3: As duas fases da glicólise	24
Figura 4: Regulação pela glicose da secreção de insulina pelas células β - pancreáticas.....	26
Figura 5: Estrutura Química de um Açúcar Simples: a) poli-hidroxialdeído e b) poli-hidroxiketona.	28
Figura 6: Fluxograma das Principais Etapas de Produção do Açúcar Mascavo e do Açúcar Cristal	30
Figura 7: Ciclo de vida de <i>D. melanogaster</i> mantidas a 25°C.	32
Figura 8: Formação mitocondrial de radicais livres via cadeia transportadora de elétrons.	35
Figura 9: Integração dos sistemas de defesa enzimáticos.....	37

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Universidade Federal do Pampa

Consumo em excesso de sacarose na forma de açúcar cristal ou açúcar mascavo: Avaliação do estresse oxidativo em *Drosophila melanogaster*

Autora: Aline Castro Caurio

Orientador: Elton Luis Gasparotto Denardin

Co-orientadora: Vanusa Manfredini

Data e Local da Defesa: Uruguaiana, 10 de agosto de 2017.

A mosca da fruta, *Drosophila melanogaster* (DM), tem sido considerada um organismo modelo adequado para estudar disfunções metabólicas, de desenvolvimento, assim como as de saúde humana. Neste trabalho foram utilizadas *Drosophila melanogaster* adulta para avaliar marcadores de estresse oxidativo frente a uma dieta enriquecida com sacarose na forma de açúcar cristal ou açúcar mascavo. Os experimentos foram realizados com moscas adultas recém-eclodidas de larvas (1-5 dias) após um ciclo de 15 dias claro/escuro. As larvas foram tratadas ou não com dietas ricas em sacarose utilizando açúcar mascavo ou açúcar cristal para cada concentração: 5, 10, 20, 30 e 40 %. As larvas recém-eclodidas foram utilizadas para as análises de estresse oxidativo, parâmetro bioquímico e dosagem de ferro no tratamento com açúcar mascavo. O tratamento das duas dietas em altas concentrações de açúcar mascavo ou açúcar cristal elevou a atividade da SOD à medida que aumenta a concentração do açúcar cristal, em maior destaque, em comparação ao controle em machos e fêmeas. Houve uma diminuição na atividade da catalase com o aumento da concentração de açúcar mascavo para os dois gêneros. A ingestão desta dieta causou um aumento nos resultados dos marcadores de estresse oxidativo (TBARS e Carbonilação de Proteínas) em DM macho e fêmea para os dois açúcares. No geral, através destes resultados

obtidos destacamos que a *Drosophila melanogaster* é um modelo efetivo para investigarmos condições relacionadas a desordens metabólicas ligadas ao consumo excessivo de sacarose.

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*, Sacarose, Estresse Oxidativo, Açúcar Mascavo e Açúcar Cristal.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree

Post-Graduate Course in Biochemistry

Federal University of Pampa

Excess consumption of sucrose in the form of crystal sugar or brown sugar: Evaluation of oxidative stress in *Drosophila melanogaster*

Author: Aline Castro Caurio

Advisor: Elton Luis Gasparotto Denardin

Co- Advisor: Vanusa Manfredini

Date and place of defense: Uruguaiana, August, 10th 2017.

The fruit fly, *Drosophila melanogaster* (DM), has been considered a suitable model organism to study metabolic, development, as well as human health dysfunctions. In this work, adult *Drosophila melanogaster* was used to evaluate markers of oxidative stress against a diet enriched with sucrose in the form of crystal sugar or brown sugar. Experiments were performed on adult larvae flies (1-5 days) after a light / dark 15-day cycle. The larvae were treated or not with sucrose-rich diets using brown sugar or crystal sugar for each concentration: 5, 10, 20, 30 and 40%. The newly hatched larvae were used for the analysis of oxidative stress, biochemical parameter and iron dosage in the treatment with brown sugar. The treatment of the two diets in high concentrations of brown sugar or crystal sugar increased SOD activity as crystal sugar concentration increased, in greater prominence, compared to control in males and females. There was a decrease in catalase activity with increased brown sugar concentration for both genders. Ingestion of this diet caused an increase in the results of oxidative stress markers (TBARS and Protein Carbonylation) in male and female DM for both sugars. In general, through these results, we highlight that *Drosophila melanogaster* is an effective model for investigating conditions related to metabolic disorders linked to excessive consumption of sucrose.

Key Words: *Drosophila melanogaster*, Sucrose, Oxidative Stress, Brown Sugar and Crystal Sugar.

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho encontra-se dividido em itens. No item **INTRODUÇÃO**, está descrita uma sucinta revisão bibliográfica sobre os temas abordados na dissertação. Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções Materiais e Métodos estão apresentados nesta dissertação. Resultados, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas, encontram-se no respectivo manuscrito científico e poderão ser acessados futuramente no currículo lattes. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** ao final da dissertação se referem somente as citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**.

1. INTRODUÇÃO

Sacarose ou açúcar livre é um dos alimentos mais consumidos do mundo, onde a nutrição humana sofreu mudanças intrigantes ao longo dos últimos dias. O excesso de consumo contribuiu para um desequilíbrio nutricional, causando um aumento acentuado da prevalência de doenças crônicas. Vários estudos referentes aos nutrientes de uma dieta com funções fisiológicas, bem como a eficácia das intervenções nutricionais, aumentaram significativamente. A complexidade da dieta e seu uso estão relacionados a condições crônicas e manifestações de doenças, onde o consumo em excesso de açúcar está associado a um risco aumentado de obesidade, bem como ao aumento das doenças cardiovasculares, incluindo dislipidemia, hipertensão arterial, diabetes, entre outras. Atualmente, diferentes tipos de açúcares são produzidos como, o refinado, o cristal, o demerara e mascavo, entre outros, onde todos são dependentes das etapas do processo de obtenção. Como resultado, algumas questões devem ser avaliadas: qual o melhor tipo de açúcar a ser consumido? Quais são os efeitos do consumo excessivo? No entanto, Sizer e Witney (2014) estudaram o açúcar mascavo e suas potencialidades, onde alguns estudos foram desenvolvidos para avaliar os efeitos adversos e/ou os efeitos benéficos do consumo de açúcar mascavo em relação ao açúcar "branco" do tipo "Crystal", sendo necessário intensificar os estudos para avaliar o consumo de açúcar mascavo e cristal. Alguns estudos mostraram que o alto consumo de açúcar provoca fenótipos resistentes à insulina em *D. melanogaster* que representam a fisiopatologia do DM tipo 2 em seres humanos (Morris et al, 2012 e Pasco; Leopold, 2012). Algumas características deste tipo de diabetes ocorrem através de deposição de gordura, glicose circulante elevada, resistência à insulina, fecundidade reduzida e a duração da DM adulta (Morris et al, 2012 e Pendse, 2013). Devido a estas características, *D. Melanogaster* foi utilizado como modelo para estudar os efeitos causados pelo excesso de consumo de açúcares mascavo e cristal, como defesas antioxidantes e estresse oxidativo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONSUMO DE AÇÚCAR

Um dos alimentos mais consumidos do mundo, é a sacarose ou açúcar livre onde a nutrição humana sofreu mudanças intrigantes ao longo dos últimos dias. O excesso de consumo contribuiu para um desequilíbrio nutricional, causando um aumento acentuado da prevalência de doenças crônicas. Vários estudos referentes aos nutrientes de uma dieta com funções fisiológicas, bem como a eficácia das intervenções nutricionais, aumentaram significativamente (Patterson et al., 1994; Drewnowski et al., 1996). A complexidade da dieta e seu uso estão relacionados a condições crônicas e manifestações de doenças, onde o consumo em excesso de açúcar está associado a um risco aumentado de obesidade (Olsen, Heitmann, 2009), bem como ao aumento das doenças cardiovasculares (DCV) (Bray, 2012), incluindo dislipidemia (Marckmann, 2000), hipertensão arterial, diabetes, fígado gordo não alcoólico e câncer (Cantley, 2014). O açúcar não só satisfaz o sabor de uma pessoa para um doce, mas rapidamente o satisfaz, sendo usado para aumentar o gosto de muitos alimentos. Atualmente, diferentes tipos de açúcares são produzidos como, o refinado, o cristal, o demerara e mascavo, entre outros, onde todos são dependentes das etapas do processo de obtenção. Como resultado, algumas questões devem ser avaliadas: qual o melhor tipo de açúcar a ser consumido? Quais são os efeitos do consumo excessivo? No entanto, Sizer e Witney (2014) estudaram o açúcar mascavo e suas potencialidades, onde alguns estudos foram desenvolvidos para avaliar os efeitos adversos e/ou os efeitos benéficos do consumo de açúcar mascavo em relação ao açúcar "branco" do tipo "Crystal", e é necessário intensificar os estudos para avaliar o consumo de açúcar mascavo e cristal. Com isso, a dieta e o seu uso estão relacionados a condições crônicas e manifestações de doenças, onde o consumo de excesso de açúcar está associado a um risco aumentado de obesidade (Olsen, Heitmann, 2009), bem como ao aumento das doenças cardiovasculares (DCV) (Bray, 2012), incluindo dislipidemia (Marckmann, 2000), hipertensão arterial, diabetes, fígado gordo não alcoólico e câncer (Cantley, 2014).

O Diabetes Mellitus trata-se de uma doença endócrina caracterizada por um grupo de desordens metabólicas, além de incluir elevada glicemia de jejum conhecida como hiperglicemia. Apresenta às vezes considerada elevação das concentrações de glicose sanguínea pós-prandial devido a uma menor sensibilidade insulínica em seus tecidos alvos e/ou por reduzida secreção de insulina (ADA, 2005). Na clínica o primeiro sinal característico na fisiopatologia do DM é a elevação nos níveis glicêmicos (hiperglicemia), pois resultam em uma disfunção no metabolismo de proteínas, glicídeos e lipídeos (WHO, 2012). Conforme a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2015-2016) os níveis aceitáveis atualmente para a glicemia de jejum é de < 100 mg/dL; a tolerância a glicose diminuída entre $\geq 100 \leq 126$ mg/dL e o diabetes ≥ 126 mg/dL, sendo estágios pré-clínicos. ADA (2005) classifica o DM em 4 tipos: DM tipo 1 ou insulino dependente (DM1), DM tipo 2, insulino resistente ou não insulino dependente (DM2), DM gestacional e também um tipo secundário a outras patologias. O DM2 está associado a fenótipos como sedentarismo e a obesidade (ADA, 2005), além da predisposição genética do indivíduo (Timper&Donath, 2012) e o DM1 ocorre destruição das células autoimune β pancreática (SBD, 2016). Outro tipo de diabetes não insulino-dependente com características clínicas e genéticas heterogêneas é o tipo Mody (Maturity onset diabetes of the young) que possui uma transmissão autossômica dominante (determinada em 3 gerações ou mais) e alta penetrância (GOMEZ, C.A.S., 2015). Este tipo de diabetes caracteriza-se por defeito na secreção de insulina sem causar dependência da mesma (FERREIRA, et al., 2011). O *Diabetes Insipidus* (DI) é uma síndrome poliúrica decorrente de dois mecanismos fisiopatológicos principais, como deficiência total ou parcial na síntese da vasopressina ou diminuição da sensibilidade renal a esse hormônio. Levando em conta isso, o DI é classificado, respectivamente, como DI Central (DIC) e DI Nefrogênico (DIN) (FERREIRA, et al 2011).

2.2 HIPERGLICEMIA CRÔNICA E SUAS COMPLICAÇÕES

O fator primário desencadeador das complicações do DM é a hiperglicemia crônica (HC). Através desta HC, é bastante comum o desenvolvimento de macroangiopatia (MACD) e microangiopatia (MICD)

diabética. A MACD refere-se às complicações cardiovasculares no qual constituem a principal causa de morbimortalidade em pacientes com DM comprometendo as artérias coronarianas dos membros inferiores e as cerebrais. Estas complicações estão relacionadas com doença arterial coronariana, doença vascular periférica (DVP) e acidente vascular encefálico (AVE). Denomina-se MICD o termo referente às modificações funcionais dos leitos microvasculares, onde o endotélio e as células associadas são progressivamente danificadas pela hiperglicemia ocasionando oclusão capilar, isquemia e falência de órgãos, comprometendo também a retina, glomérulo e nervos motores e sensitivos FERREIRA, L.T. et al., 2011 & BARBOSA, J.H.P.; OLIVEIRA, S.L., SEARA, L.T.E., (2008) conforme relata a figura abaixo.

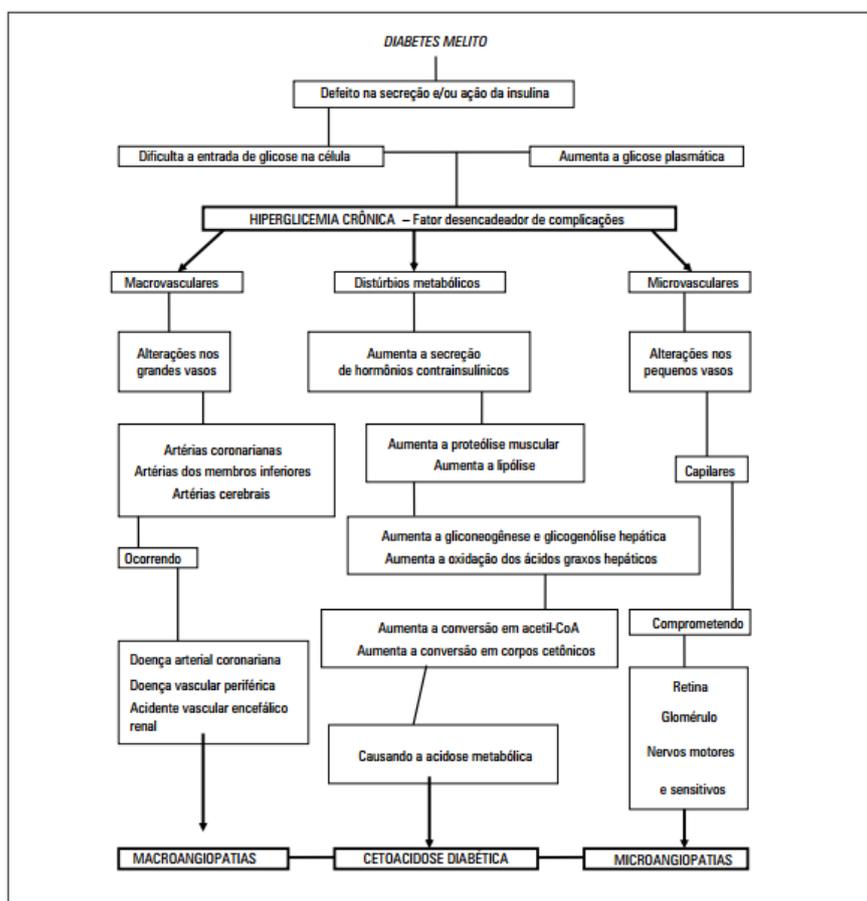


Figura 1: Hiperglicemia crônica e suas complicações.

Fonte: FERREIRA, et al., 2011.

Reação de Maillard é a reação entre a glicose ou outros açúcares redutores com proteínas, e o produto final desta reação resulta na formação irreversível dos chamados 'Produtos Finais de Glicação Avançada' (AGEs de 'AdvancedGlycationEndProducts') (Bierhaus et al., 1998; Mohamed et al., 1999). EROs também são geradas durante a formação dos AGEs e provocam um ciclo de auto perpetuação (Kassab & Piwovar, 2012). Por ser um processo não enzimático, a extensão da glicação de proteínas depende essencialmente da concentração de glicose sanguínea sendo, portanto, mínimo em condições fisiológicas, mas aumentando dramaticamente nos dois tipos de DM (Nguyen et al., 2006).

2.3 METABOLISMO GLICOLÍTICO

A glicose é o principal metabólito no metabolismo de plantas, animais e vários microrganismos, por ser um ótimo combustível rico em energia potencial. Esta glicose é armazenada na forma de polímeros de alta massa molecular, como o amido e o glicogênio. Assim que o organismo necessita aumentar a energia, a glicose pode ser liberada desses polímeros de armazenamento intracelular utilizado para produzir ATP (NELSON; COX, 2014).

A Figura 2 apresenta três dos quatro caminhos principais que a glicose pode ser utilizada, entre os quais citamos:

- Pode ser destinada na síntese de polissacarídeos complexos;
- Pode ser armazenada como polissacarídeo ou polisacarose nas células;
- Pode ser oxidada por meio da glicólise a compostos com três átomos de carbono (piruvato), a fim de fornecer ATP e intermediários metabólicos;
- Ser oxidada pela via das pentoses-fosfato produzindo ribose-5-fosfato.

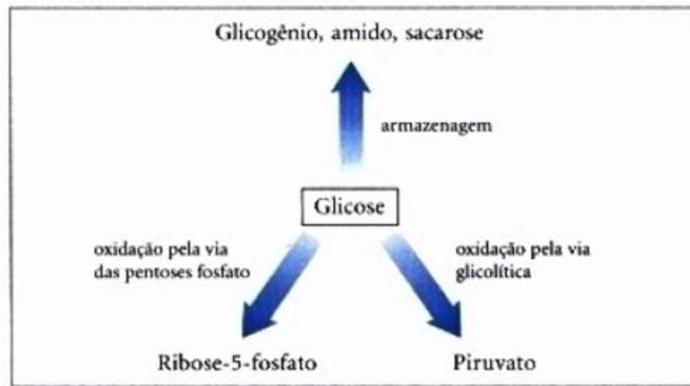


Figura 2: Principais vias de utilização da glicose.

Fonte: NELSON; COX, 2002.

2.3.1 Glicólise

A fragmentação da glicose, que possui seis átomos de carbono, é utilizada em todos os tecidos com o objetivo de fornecer energia na forma de ATP e intermediárias para outras vias metabólicas. O centro do metabolismo dos carboidratos é a glicólise, onde praticamente todos os glicídios (provenientes tanto da dieta como de reações catabólicas) podem ser convertidos em glicose. A figura 3 apresenta a fase preparatória e a fase de pagamento (fases da glicólise), onde cada molécula de glicose que passa pela fase preparatória, duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato é formada, passando para a fase de pagamento. Na fase de pagamento, ocorre a conversão oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato em piruvato e formação acoplada de ATP e NADH.

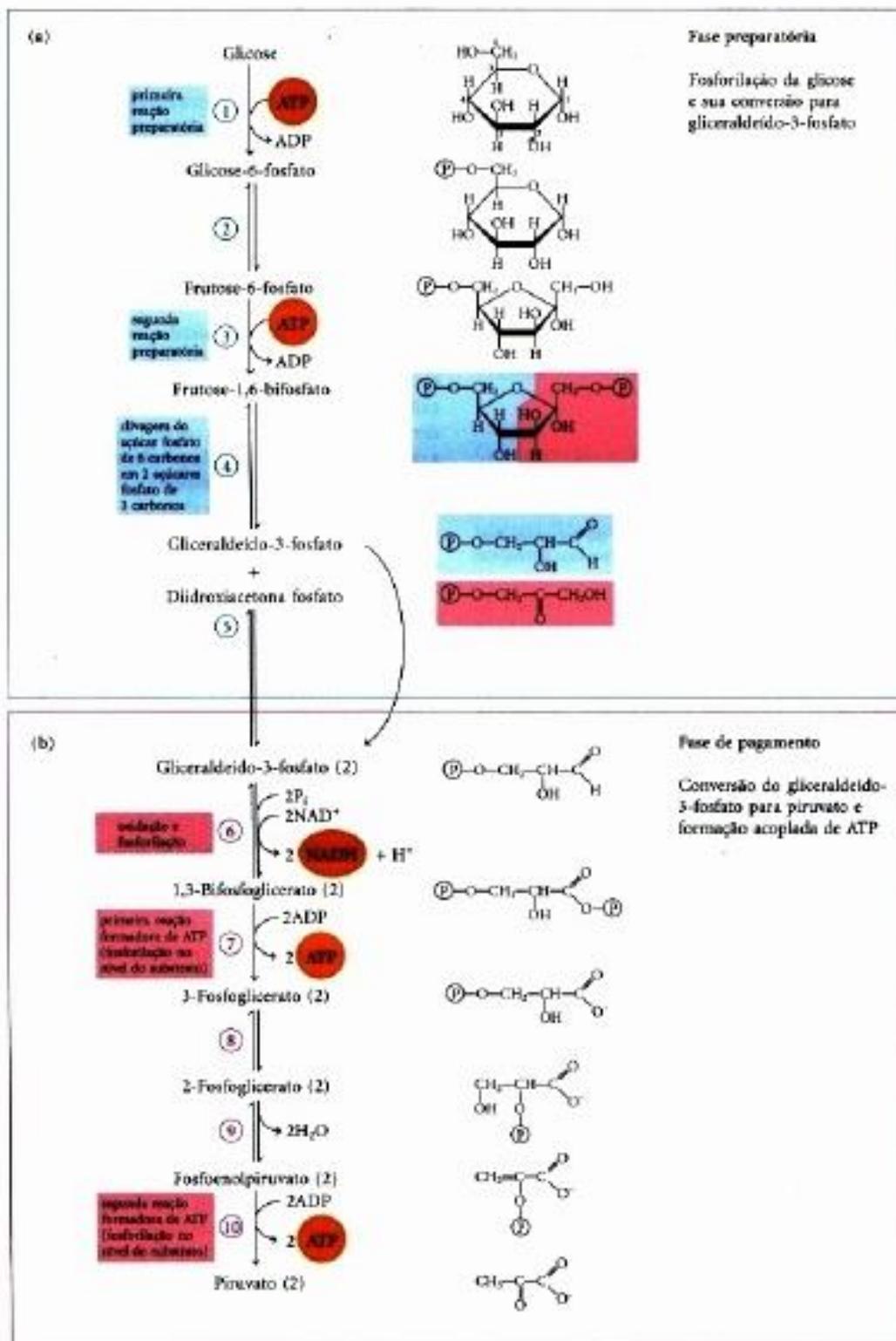


Figura 3: As duas fases da glicólise

Fonte: NELSON; COX, 2002.

2.3.2 Insulina e Glucagon

A integração do metabolismo energético é controlada principalmente pelas ações de dois hormônios peptídicos: a insulina e o glucagon com as catecolaminas adrenalina e noradrenalina exercendo função de apoio. As alterações nos níveis circulantes desses hormônios permitem ao organismo armazenar energia quando o alimento está disponível em abundância ou tornar disponível a energia armazenada, como em períodos de fome (CHAMPE, 2007). A insulina é um hormônio polipeptídico produzido pelas células β das ilhotas de Langerhans, grupo de células que fazem parte da porção endócrina do pâncreas (HARPER, 2006). A partir do momento em que há um aumento de glicose na corrente sanguínea por meio da dieta, acontece o aumento na secreção da insulina pelo pâncreas. Deste modo, a liberação da insulina é regulada pelos níveis de glicose no sangue que irrigam o pâncreas (NELSON; COX, 2014). Normalmente, quando a glicose sanguínea aumenta, os transportadores GLUT2 carregam a glicose para dentro das células β , onde é normalmente convertida em glicose-6-fosfato pela hexoquinase IV e entra na glicólise. Quando a taxa de catabolismo da glicose está mais alta, a concentração de ATP aumenta, causando o fechamento dos canais de K^+ controlados por ATP na membrana plasmática. Deste modo, o efluxo reduzido de K^+ despolariza a membrana causando a abertura dos canais de Ca^{2+} controlados por voltagem e o aumento da concentração do Ca^{2+} citosólico desencadeia a liberação da insulina por exocitose, FIGURA 4 (NELSON; COX, 2014).

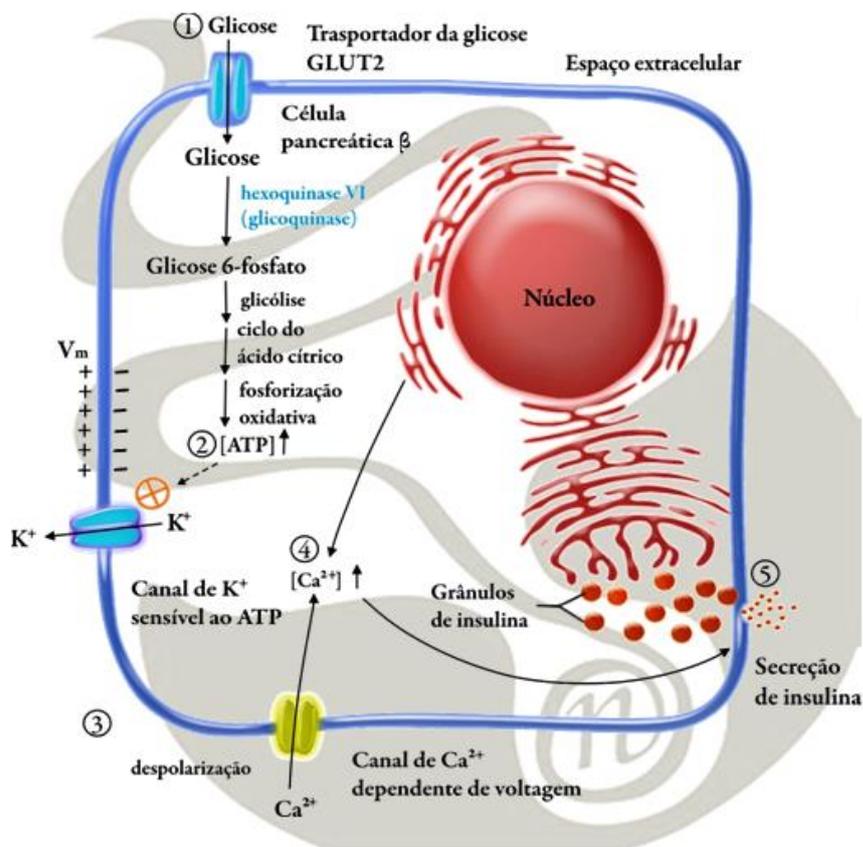


Figura 4: Regulação pela glicose da secreção de insulina pelas células β -pancreáticas.

Fonte: NELSON; COX, 2014.

A limitação da liberação do hormônio insulina acontece a partir do mecanismo de retroalimentação: a insulina reduz a glicose sanguínea estimulando sua captação pelos tecidos. Sendo assim, esta redução é detectada pelas células β do pâncreas pelo fluxo diminuído na reação da hexoquinase, reduzindo ou interrompendo a liberação de insulina, mantendo constante.

O glucagon é um hormônio polipeptídico secretado pelas células α pancreáticas. Juntamente com a adrenalina, o cortisol e o hormônio do crescimento, se opõem a muitas das ações da insulina (NELSON; COX, 2014). A célula α é responsiva a uma variedade de estímulos que sinalizam hipoglicemia real ou potencial. Sendo assim, uma diminuição na concentração plasmática de glicose é o principal estímulo para a liberação de glucagon. Durante jejum noturno ou prolongado os níveis de glucagon previnem a hipoglicemia (NELSON; COX, 2014). Para realizar sua função, o glucagon

estimula a degradação de glicogênio hepático ativando a glicogênio-fosforilase e inativando a glicogênio-sintase. Ele também inibe no fígado a degradação da glicose pela glicólise e estimula sua síntese pela gliconeogênese. O glucagon também é responsável por inibir a enzima glicolíticapiruvato-cinase, bloqueando a conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato e impedindo a oxidação do piruvato em ácido cítrico. O acúmulo de fosfoenolpiruvato favorece a gliconeogênese. Portanto, o estímulo da degradação o glicogênio, prevenção da glicólise e promoção da gliconeogênese dos hepatócitos, o glucagon permite que o fígado exporte glicose, restaurando seu nível sanguíneo normal (NELSON; COX, 2014).

2.3.3 Glicemia

O termo glicemia é caracterizado pela quantidade de glicose existente no sangue. A ADA (Associação Americana de Diabetes) em 2015 estabeleceu que a glicemia de jejum é de 99 mg/dL e não mais até 110 mg/dL. Valores acima ou abaixo da glicemia de jejum são caracterizados como hiperglicemia ou hipoglicemia, respectivamente.

2.4 CARBOIDRATOS

São poli-hidroxialdeídos ou poli-hidroxicetonas sendo os principais elementos da dieta, com isso sua oxidação é considerada a principal via de produção de energia em células não fotossintéticas. São classificados conforme abaixo como: monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos (NELSON; COX, 2014).

- Monossacarídeos (açúcares simples também chamados de sacarídeos): possuem uma única unidade poli-hidroxicetona ou poli-hidroxialdeído (Figura 5). O mais abundante na natureza é o açúcar de 06 carbonos D-glicose (dextrose). Este açúcar pode ser oxidado por agentes oxidantes, íon cúprico (Cu^{+2}), onde o carbono do carbonil é oxidado a um grupo carboxil, isso acontece com a glicose e outros açúcares, onde são chamados de açúcares redutores (NELSON; COX, 2014).

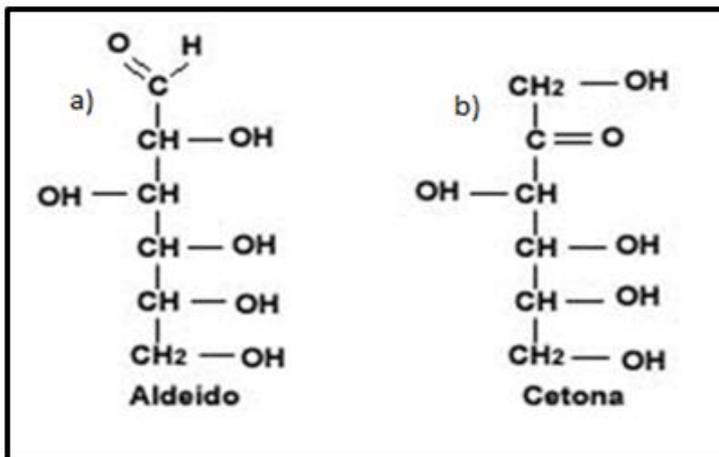


Figura 5: Estrutura Química de um Açúcar Simples: a) poli-hidroxialdeído e b) poli-hidroxicetona.

Fonte: NELSON; COX, 2014.

- **Dissacarídeos (duas unidades de monossacarídeo) como, por exemplo, a maltose, a lactose e a sacarose:** são os mais abundantes entre as três classificações apresentados anteriormente. O típico dissacarídeo é a sacarose, açúcar de cana, constituído pelos açúcares de 06 carbonos D-glicose e D-frutose. Está ligada por 02 monossacarídeos covalentemente pela ligação O-glicosídica (NELSON; COX, 2014).

- **Polissacarídeos (polímeros de açúcar com mais de 20 unidades de monossacarídeos):** são formados por unidades repetidas de D-glicose diferindo no tipo de ligação glicosídica possuindo propriedades e funções biológicas diferentes (NELSON; COX, 2014).

2.4.1 O consumo em Excesso de Açúcar

A ingestão elevada de açúcares livres (monossacarídeos e dissacarídeos) pode estar associada à má qualidade do regime alimentar, à obesidade e ao risco de contração de doenças não transmissíveis como o diabetes. O aumento da ingestão de açúcares livres esteve associado a um aumento equivalente do

peso corporal (OMS, 2014). Na dieta calórica brasileira, é uma substância com termo genérico utilizado para carboidratos cristalizados comestíveis, onde é encontrado na forma de sacarose, lactose e frutose. Esta substância é caracterizada como sendo uma das principais aliadas à epidemia de doenças crônicas, metabólicas e degenerativas; como a obesidade, aterosclerose, assim como doenças cardiovasculares e também o câncer. Estas epidemias são resultados, por exemplo, do alto consumo exagerado de açúcar utilizado pelo ser humano. A OMS (Organização Mundial da Saúde) propõe como limite de consumo diário de açúcar apenas 10% das calorias totais, levando em consideração uma dieta de 2500 kcal diários, o equivalente a uma quantidade de aproximadamente 60 gramas, ou seja, 250 kcal por dia (CARVALHO, 2006).

2.4.1.1 Tabela TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos)

A tabela TACO é bastante utilizada por nutricionistas, onde a composição dos alimentos consumidos no Brasil é fundamental para se alcançar a segurança alimentar e nutricional (Unicamp, 2011). Através das informações descritas de cada alimento com seu número de alimento específico na tabela TACO é possível compararmos a composição dos açúcares cristal, mascavo e refinado conforme a tabela 1.

Tabela 1: Composição centesimal dos açúcares Cristal, Refinado e Mascavo.

Número do	Umidade	Energia		Proteína	Lipídeos	Colesterol	carboidrato	
Alimento	Descrição dos alimentos	(%)	(kcal)	(kJ)	(g)	(g)	(mg)	(g)
492	Açúcar, cristal	0,1	387	1619	0,3	Tr	NA	99,6
493	Açúcar, mascavo	3,3	369	1542	0,8	0,1	NA	94,5
494	Açúcar, refinado	0,1	387	1617	0,3	Tr	NA	99,5
Número do	Manganês	Fósforo	Ferro	Sódio	Potássio	Cobre	Zinco	
Alimento	Descrição dos alimentos	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	
492	Açúcar, cristal		Tr	0,2	Tr	3	Tr	Tr
493	Açúcar, mascavo	2,03	38	8,3	25	522	0,17	0,5
494	Açúcar, refinado		Tr	0,1	12	6	Tr	Tr

2.4.2 Etapas de Produção do Açúcar Mascavo e do Açúcar Cristal

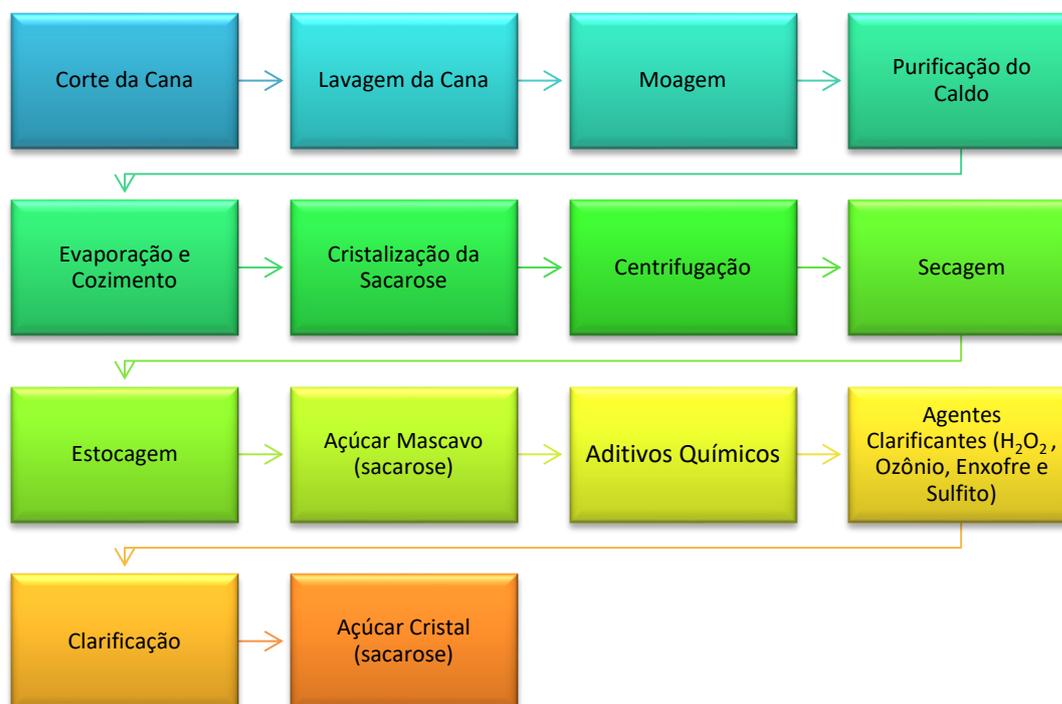


Figura 6: Fluxograma das Principais Etapas de Produção do Açúcar Mascavo e do Açúcar Cristal

2.5 *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Drosophila melanogaster, conhecida como a mosca da fruta, é um inseto holometábolo, realizam metamorfose completa passando por quatro estágios de vida: embrião, larvas, pupa e adulto. A embriogênese é completa em 22-24 horas a temperaturas de incubação padrão de 25 °C, culminando na incubação da larva de primeiro instar (L1). O crescimento larval dura aproximadamente quatro dias e é pontuado por duas mudas entre o primeiro e o segundo instar, ocorrendo aproximadamente 24 horas e 48 horas após a eclosão das larvas, respectivamente. O animal cresce mais de 30 vezes o seu peso corporal de larvas recém-eclodidas para o estágio vagante do terceiro estágio (L3) (Ashburner et al., 2005). Possui características tais como: cor aparentemente amarelada, apresentarem receptáculo ventral relativamente longo, testículos espiralados medianamente longos, as larvas não saltam, pentes sexuais

presentes nos machos. Seu crescimento e reprodução rápida, e o fato de ser barato e fácil de manter em laboratório são características que fazem a *D. melanogaster* um sistema modelo ideal para abordar questões biológicas inovadoras, incluindo as de saúde humana (Muñoz-Soriano e Paricio, 2011; Pandey e Nichols, 2011). Este inseto se desenvolve incluindo a fertilização e a formação do zigoto, pois ocorre dentro das membranas do ovo, onde este ovo é caracterizado como centrolecitais (possui uma pequena gema central, fonte de nutrientes a ser usada pelo embrião em desenvolvimento, rodeada por uma camada de citoplasma periférico, chamada de periplasma). Ovos de *Drosophila melanogaster* são pequenos, medindo aproximadamente, 01 mm ou menos, de comprimento.

2.5.1 Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*

O ciclo de vida da *Drosophila melanogaster* (Figura 7) depende das condições ambientais como temperatura e umidade, no entanto, o tempo médio de vida das fêmeas é de 26 dias e de 33 dias para os machos. 24 horas após a fertilização, eclode a primeira forma larvar que, ao fim de um dia, muda de cutícula e se transforma numa larva de segunda fase. Decorrido mais um dia a larva muda novamente de cutícula e transforma-se numa larva de terceira fase que aumenta de tamanho ao longo de 03 dias. Cerca de cinco dias após a fertilização, a larva deixa de se alimentar e começa a ficar imóvel, formando uma espécie de casulo onde sofre um conjunto de alterações designadas de pupação. Após este período eclode uma nova fase larvar: a pupa. Dentro da pupa a larva sofre uma metamorfose durante a qual ocorre a degradação dos tecidos larvares e a proliferação dos discos imaginais (são grupos de células que irão originar as estruturas do adulto). Aproximadamente 10 dias após a fertilização, uma mosca adulta emerge do interior da pupa, atingindo a maturidade sexual ao fim de 12 horas (NATION, 2008).

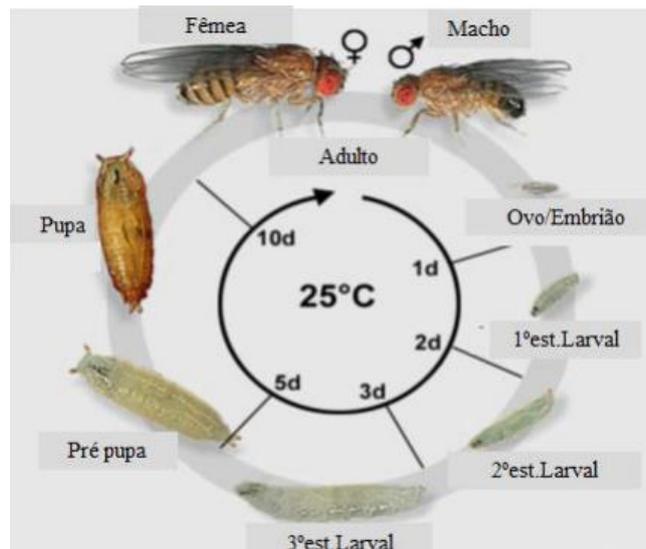


Figura 7: Ciclo de vida de *D. melanogaster* mantidas a 25°C.

Fonte: Adaptado Roote e Prokop 2013.

Por que estudar hiperglicemia em mosca?

A mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*) apresenta-se como um sistema modelo para desvendar quais genes e caminhos de genes está envolvido nas mudanças metabólicas que levam à resistência à insulina e ao diabetes em humanos. Sendo uma alternativa útil na investigação de mecanismos moleculares de resistência à insulina, pois é importante também no desenvolvimento de opções de tratamento farmacológico. Um estudo realizado em março de 2000 pelo National Human Genome Research Institute comparando a mosca da fruta e o genoma humano estimou que cerca de 60% dos genes são conservados entre as duas espécies. Cerca de 80% dos genes conhecidos da doença humana têm uma correspondência reconhecível no genoma das moscas da fruta, e 50% das sequências das proteínas da mosca têm homólogos de mamíferos. *Drosophila* está sendo usado como um modelo para estudar os mecanismos subjacentes do envelhecimento e de estresse oxidativo, imunidade, diabetes (REITER e colaboradores, 2001). Com isso, gerou muito interesse em utilizar este modelo como um sistema modelo para estudar o metabolismo, a fisiologia e o desenvolvimento de doenças metabólicas, como a obesidade e a diabetes (Morris e colaboradores, 2012).

2.5.2 Metabolismo na *Drosophila melanogaster*

A mosca apresenta em seu sistema neuroendócrino uma composição que se assemelha à dos mamíferos, possuindo células semelhantes em função: α e β pancreáticas. As células do tipo β encontram-se como dois aglomerados celulares, cada um com sete células, todos situados na porção anterior do cérebro da mosca. As IPC (células produtoras de insulina) estão cercadas por ortólogos dos neuropeptídios Y e F, relacionando deste modo à liberação de insulina na hemolinfa das moscas com a ingestão de alimentos. As células com função α , estão localizadas em uma glândula em forma de anel, que envolve o coração das mesmas, sendo responsável por secretar o hormônio “adipokinetic”, equivalente ao glucagon no organismo humano (SCHAFFER e colaboradores, 1990). A liberação de insulina resulta na ativação da proteína quinase, que por sua vez, modula a atividade de uma variedade de proteínas e vias de sinalização, por exemplo, o fator de transcrição que controla a síntese de proteínas e a via do cAMP que regula a atividade metabólica. Mecanismos moleculares de sinalização neuroendócrina são igualmente conservados entre moscas e mamíferos. *Drosophila* tem sete *peptídeos tipo* insulina (ILP), quatro dos quais são secretados pela IPC. Os dILPs ligam-se ao único receptor de insulina (InR), que ativa a via de sinalização do fator de crescimento insulino-insulínico (IIS). A estimulação do InR resulta na ativação da proteína quinase Akt, que por sua vez modula a atividade de uma variedade de proteínas e vias de sinalização, por exemplo, o fator de transcrição Foxo, a via TOR que controla a síntese protéica e o cAMP que estabelece a atividade metabólica (MORRIS e colaboradores, 2012).

2.6 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é decorrente de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. A geração de radicais livres constitui em um processo contínuo e fisiológico, principalmente do metabolismo de oxigênio. Durante os processos metabólicos, os radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas. A geração de ATP (energia) foi devido à produção, em

proporções adequadas, de radicais livres, através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, sendo a principal fonte geradora de RL (BARBOSA e colaboradores, 2010). A produção contínua e excessiva de radicais livres durante os processos metabólicos pode conduzir a danos oxidativo, com isso culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante. Estes têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos. O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicais. A progressão do processo de estresse oxidativo é decorrente da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de RL ou também em decorrência da velocidade de remoção dessas substâncias. Isso pode levar à oxidação de biomoléculas com conseqüente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático (WHITEMAN, 2004). A cronicidade do processo em questão podem desencadear implicações sobre o processo etiológico de numerosas enfermidades crônicas não transmissíveis, entre elas a aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (GREEN, BRAND, MURPHY, 2004). Esse sistema, usualmente, é dividido em enzimático (superóxido dismutase, catalase e glutatinoxidase) e não enzimático (é constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética).

2.6.1 Mecanismos de Geração de Radicais Livres

Normalmente ocorre nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma onde os mecanismos podem ser favorecidos pelos íons ferro e cobre. Em condições fisiológicas, os organismos aeróbicos metabolizam 85% a 90% do oxigênio (O_2) consumido na mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons. Os restantes 10% a 15% são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e, ainda, por reações químicas de oxidação direta (SCHNEIDER, OLIVEIRA, 2004).

Na mitocôndria, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (Figura 8). A enzima catalisadora dessa reação é a citocromo oxidase. Na parte terminal da cadeia

transportadora de elétrons, a referida enzima oxida quatro moléculas de citocromo *c* removendo um elétron de cada uma delas. Esses elétrons são adicionados ao O₂ para formar água. A ação da citocromo oxidase controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria. No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

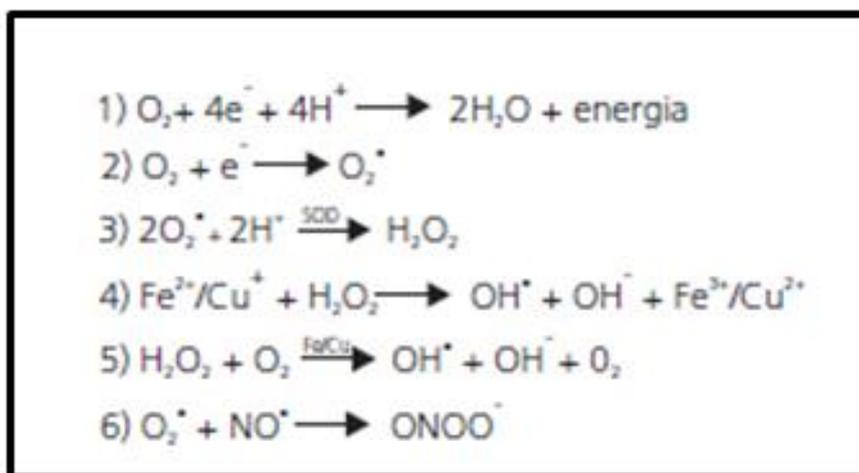


Figura 8: Formação mitocondrial de radicais livres via cadeia transportadora de elétrons.

Fonte: Barbosa et al., 2010.

Em face da redução univalente do O₂ são gerados os radicais superóxido (O₂^{·-}), hidroxila (OH[·]) e, ainda, peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Esse processo se dá mediante reações específicas, catalisadas por enzimas e com a participação dos íons ferro e de cobre. O H₂O₂, apesar de não ser um radical livre, por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, é uma espécie com alto potencial reativo. Por participar da reação de geração de OH[·] tem ação deletéria potencial, uma vez que esse se constitui no mais reativo dos radicais livres, pois pode alterar qualquer estrutura celular que se encontre próxima. Diferente dos radicais livres, o H₂O₂ tem vida longa e é capaz de atravessar as membranas celulares apresentando-se potencialmente tóxico para as células. Esta toxicidade pode ser aumentada em dez mil vezes pela presença de ferro. Além da capacidade do O₂^{·-} em participar de reações de geração de OH[·], pode ainda, por meio da reação com o radical livre óxido

nítrico (NO^{\bullet}), gerar a espécie reativa de nitrogênio, peroxinitrito (ONOO^{\bullet}), também potencialmente reativa. Os íons ferro e cobre são muito ativos em reações de óxido-redução, o que os capacitam como potentes catalisadores das reações de geração de radicais livres. A participação desses metais se dá, especialmente, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss. A primeira diz respeito à geração de radical OH^{\bullet} , por meio da reação do H_2O_2 com os íons em questão, ao passo que, na segunda, estes íons catalisam a reação entre o H_2O_2 e o radical O_2^{\bullet} , a fim de gerar, da mesma forma, o radical OH^{\bullet} (Figura 8) (GREEN, BRAND, MURPHY, 2004).

A ligação do ferro e cobre às proteínas específicas: transferrina, ferritina e ceruloplasmina, estes são transportados, utilizados e estocados, prevenindo e/ou minimizando reações de geração de radicais livres catalisadas por esses metais. No citoplasma de células hepáticas, o ferro livre (não ligado à ferritina) é facilmente dissociado na forma de íon, o que o torna cataliticamente ativo e apto para participar de reações de óxido-redução facilitando a geração de radicais livres (KOURY & DONANGELO, 2003). Os íons ferro agem como catalisadores da conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais LO^{\bullet} e LO_2^{\bullet} , que, por serem potencialmente reativos, iniciam uma nova cadeia de reações, as quais podem ser rápidas ou lentas, de acordo com a valência do ferro (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

2.6.2 Sistemas de Defesa Antioxidante

Este sistema irá inibir e/ou reduzir danos causados pela ação de radicais livres ou das espécies reativas não radicais. Isto ocorrerá através de diferentes mecanismos de ação como:

- sistemas de prevenção – impedir a formação ou radicais livres ou espécies não radicais;
- sistemas varredores – impedir a ação desses;
- sistemas de reparo – favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (KOURY & DONANGELO, 2003).

O sistema antioxidante é dividido em enzimático e nãoenzimático, este constituído por várias substâncias antioxidantes que podem ser de origem

dietética ou endógena como, por exemplo, vitaminas A, C e E. Já o sistema enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathiona Peroxidase (GPx). Elas agem através de mecanismos de prevenção impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não radicais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com desenvolvimento e ampliação do processo ocasionando danos oxidativos. Algumas enzimas como, por exemplo, CAT e GPX atuam com o mesmo propósito, o de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio, onde esta ação é integrada e de grande importância, pois através das reações de Fenton e Haber-Weiss juntamente com a participação dos metais ferro e cobre, ocasiona na geração do radical OH^\bullet (Figura 8) não havendo sistema de defesa enzimático (SCHNEIDER, OLIVEIRA, 2004).

O referido radical (OH^\bullet) é o de maior potencial reativo e com extrema instabilidade (vida média de 10^{-9} segundos). Possui características que os capacitam como o radical livre mais favorável na produção de danos oxidativos. Além de ser o principal iniciador do processo de peroxidação lipídica, tendo como consequência a alteração da função biológica das membranas celulares, esse radical é capaz de agir sobre as proteínas, alterando-as em relação à sua estrutura e/ou função biológica (Welch, Davis, Eden, Aust, 2002). A ação da GPx depende da manutenção do ciclo redox da glutathiona por meio do controle da relação entre glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) conforme a figura 9 (Rover, Hoehr, Vellasco, 2001).

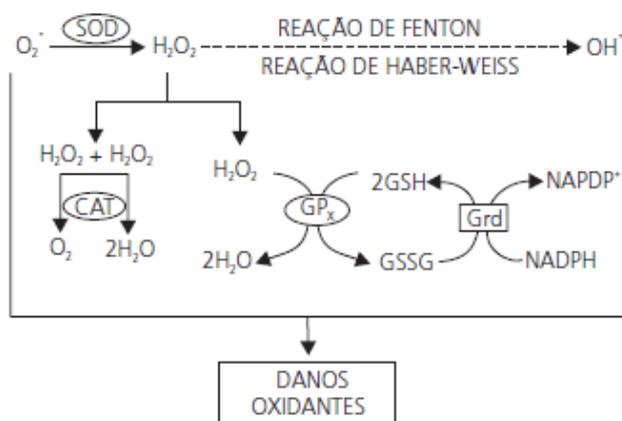


Figura 9: Integração dos sistemas de defesa enzimáticos.

2.6.3 Marcadores de Estresse Oxidativo

Através da produção excessiva de radicais livres e/ou espécies reativas em contrapartida com a capacidade de ação de antioxidantes, é favorecido a oxidação de biomoléculas, gerando metabólitos específicos assim chamados de marcadores de estresse oxidativo que podem ser identificados e quantificados. Estes marcadores são derivados da oxidação de lipídeos, proteínas e Ácido Desoxirribonucléico (DNA) (VINCENT, INNES, VINCENT, 2007). A tabela 2 mostra alguns dos marcadores do estresse oxidativo.

Tabela 2: Alguns dos marcadores do estresse oxidativo: descrição e fundamento.

Marcadores	Descrição/Fundamento	Referências
<i>Derivados da oxidação de lipídeos</i>		
MDA	Aldeídos: produtos da oxidação de lipídeos, o mais abundante, o MDA, resulta da oxidação dos ácidos graxos AA, EPA e DHA	Halliwel & Whiteman ⁴ ; Mayne ²¹
TBARS	Quantificação da formação de MDA	Vincent et al. ¹²
8-epiPGF _{2α}	F2-Isoprostanos: derivados del AA, o mais representativo é o 8-epiPGF _{2α}	Mayne ²¹
Etano e Pentano	Hidrocarbonetos voláteis, produtos da oxidação dos ácidos graxos n-3 e n-6	Mayne ²¹
LDL-ox	Dano oxidativo à molécula transportadora de colesterol	Mayne ²¹
<i>Derivados da oxidação de proteínas</i>		
Carbonílos	Resultado da ação das espécies reativas sobre as cadeias laterais dos aminoácidos	Halliwel & Whiteman ⁴
3-Nitrotirosina	Resultado da ação das ERON's sobre as proteínas	Halliwel & Whiteman ⁴ ; Mayne ²¹
<i>Derivados da oxidação de DNA</i>		
8-OHdG	Resultado da oxidação do ácido nucleico, guanina	Halliwel & Whiteman ⁴ ; Vincent et al. ¹² ; Mayne ²¹
5-HMdU	Resultado da oxidação do ácido nucleico, timina	Mayne ²¹
<i>Capacidade antioxidante</i>		
TAS	Antioxidantes totais presentes na amostra	Vincent et al. ¹²
FRAP	Antioxidantes que não contêm ligações S-H	Vincent et al. ¹²
ORAC	Antioxidante específico, avaliado por meio de provas de fluorescência	Vincent et al. ¹²

5-HMdU: 5-Hidroxy-metil-2'-Desoxyuridine; 8-epiPGF_{2α}: Prostaglandin F2-Alpha-8 Isoprostane; 8-OHdG: 8-Hidroxy-2'-Deoxyguanosine; AA: ácido araquidônico (C20:4); DNA: ácido desoxirribonucléico; DHA: ácido docosahexanóico (C22:6); EPA: ácido eicosapentanoico (C20:5); ERON's: espécies reativas de óxido de nitrogênio; FRAP: ferritin-reducing antioxidant power; LDL-ox: lipoproteína de baixa densidade oxidada; MDA: malondialdeído; n-3: ácidos graxos da série ômega 3; n-6: ácidos graxos da série ômega 6; ORAC: oxygen-radical absorbance capacity; S-H: pontes de hidrogênio; TAS: total antioxidant status; TBARS: thiobarbituric reactive acid substances.

Fonte: Adaptado de Barbosa et al.¹⁶

Fonte: Barbosa et al., 2010.

A interação de ácidos graxos poli-insaturados componentes das membranas celulares com ERO é definida como um processo chamado de Peroxidação Lipídica conforme Reed, 2011. Esta PL resulta em uma desorganização estrutural das membranas com a consequente falência dos mecanismos de trocas iônicas entre os meios intra e extracelular contribuindo para a perda da seletividade das membranas podendo levar à morte celular (Halliwell & Gutteridge, 2000). Entre os produtos finais da PL estão os acetaldeídos tais como o malondialdeído (MDA) (Rosenet al., 1999). O MDA é uma das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) e sua quantificação pode ser realizada através do método conhecido como TBARS (espécies reativas ao TBA) (Ohkawa et al., 1979).

2.7 HIPERGLICEMIA E ESTRESSE OXIDATIVO

A hiperglicemia estimula a produção de radicais livres que conduz ao dano celular. A oxidação em organismos vivos é um processo essencial durante a produção de energia para os processos biológicos (Hemmati et al., 2016). Com isso, o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) contribuem para a fisiopatologia de diversas doenças, como o diabetes e doença cardiovascular (Hemmati et al., 2016). O estresse oxidativo pode desempenhar também um papel importante na síndrome metabólica, onde é indicado pela presença de vários marcadores biológicos oxidativos (Hemmati et al., 2016). Dentre os diversos mecanismos que relacionam diretamente a hiperglicemia e EO estão os processos de auto-oxidação da glicose, glicação não enzimática e ativação da via dos poliois.

2.7.1 Auto-oxidação da glicose

É uma reação auto-oxidativa da glicose com a subsequente produção de EROs. A elevação crônica da glicemia favorece a auto-oxidação da glicose, sendo que os açúcares oxidados reagem com componentes lipoproteicos e receptores de membrana, estimulando a formação de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . Além disso, o excesso de glicose circulante aumenta a taxa de respiração celular

com concomitante aumento da produção de $O_2^{\bullet-}$ (Wajchenberg, 2002; Giacco&Brownlee, 2010).

2.7.2 Glicação não enzimática

Açúcares redutores como a glicose, são capazes de se ligar covalentemente em uma reação não enzimática aos grupos amino livres de proteínas, em um processo chamado de glicação (Nguyen et al., 2006). Este processo resulta em alterações estruturais e funcionais de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. A reação entre a glicose ou outros açúcares redutores com proteínas é conhecida como *reação de Maillard* e o produto final desta reação resulta na formação irreversível dos chamados 'Produtos Finais de Glicação Avançada' (AGEs de 'Advanced Glycation End Products') (Bierhaus et al., 1998; Mohamed et al., 1999). EROs também são geradas durante a formação dos AGEs e provocam um ciclo de auto perpetuação (Kassab & Piwovar, 2012). Por ser um processo não enzimático, a extensão da glicação de proteínas depende essencialmente da concentração de glicose sanguínea sendo, portanto, mínimo em condições fisiológicas, mas aumentando dramaticamente nos dois tipos de DM (Nguyen et al., 2006).

2.7.3 Ativação da via dos polióis

Os aldeídos tóxicos nesta via, para as células, são reduzidos a alcoóis inativos (Brownlee, 2005). Em situações fisiológicas normais as enzimas desta via possuem baixa afinidade pela glicose, porém em concentrações intracelulares elevadas a glicose é desviada e sofre metabolização por esta via (Brownlee, 2005). A via dos polióis ocorre basicamente duas reações, uma catalisada pela enzima aldoserredutase e outra pela sorbitol desidrogenase. A redução da glicose a sorbitol é catalisada pela aldoserredutase, que utiliza nicotinamida adenina dinucleotídio fosfatada reduzida (NADPH) como coenzima (Kassab & Piwovar, 2012). O aumento da atividade desta enzima resulta na depleção dos níveis intracelulares de NADPH e por consequência de glutathiona reduzida (GSH), necessária para manter a atividade da enzima glutathionaperoxidase (Kassab & Piwovar, 2012), reduzindo assim a atividade antioxidante celular.

A oxidação do sorbitol a frutose consiste na segunda etapa da via dos polióis, onde catalisada pela sorbitol desidrogenase, a qual utiliza nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada (NAD) como cofator (Hammeset al., 2003). A depleção intracelular de NAD acaba por interferir na via glicolítica, resultando em uma diminuição dos níveis intracelulares de 2,3 difosfoglicerato, o qual desempenha um importante papel na regulação e ligação do oxigênio aos tecidos devido a sua alta afinidade por hemoglobina (Nakamura *et al.*, 1995). Assim, baixas concentrações de 2,3-difosfoglicerato dificultam o transporte/liberação de oxigênio aos tecidos e levam a um estado de pseudo - hipóxia hiperglicêmica, o que também contribui para aumentar os níveis de radicais livres.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de uma dieta rica em sacarose na forma de açúcar mascavo ou açúcar cristal utilizando modelo de *Drosophilamelanogaster*

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do consumo de dietas ricas em sacarose na forma de açúcar cristal ou açúcar mascavo sobre:

- a atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx) em machos e fêmeas eclodidas das diferentes dietas e concentrações;
- marcadores de estresse oxidativo (TBARS e Carbonilação de Proteínas) em machos e fêmeas eclodidas das diferentes dietas e concentrações;
- os níveis de Glicose em machos e fêmeas eclodidas das diferentes dietas e concentrações;
- quantificação de Ferro em machos e fêmeas eclodidas da dieta com açúcar mascavo nas diferentes concentrações.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções *Materiais e Métodos* serão apresentados nesta dissertação. *Resultados*, discussão e conclusão poderão ser acessados futuramente no endereço:

<http://lattes.cnpq.br/1550824274358660>

4.1 INTRODUÇÃO

Sacarose ou açúcar é um dos alimentos mais consumidos do mundo, onde a nutrição humana sofreu mudanças intrigantes ao longo dos últimos dias. O excesso de consumo contribuiu para um desequilíbrio nutricional causando um aumento acentuado da prevalência de doenças crônicas. Vários estudos referentes aos nutrientes de uma dieta com funções fisiológicas, bem como a eficácia das intervenções nutricionais, aumentaram significativamente (Patterson et al., 1994; Drewnowski et al., 1996). A complexidade da dieta e seu uso estão relacionados a condições crônicas e manifestações de doenças, onde o consumo de excesso de açúcar está associado a um risco aumentado de obesidade (Olsen, Heitmann, 2009), bem como ao aumento das doenças cardiovasculares (DCV) (Bray, 2012), incluindo dislipidemia (Marckmann, 2000), hipertensão arterial, diabetes, fígado gordo não alcoólico e câncer (Cantley, 2014). O açúcar não só satisfaz o sabor de uma pessoa para um doce, mas rapidamente o satisfaz, sendo usado para aumentar o gosto de muitos alimentos. Atualmente, diferentes tipos de açúcares são produzidos, cristal refinado, cristal branco, demerara e mascavo, entre outros, todos dependentes das etapas do processo de obtenção. Como resultado, algumas questões devem ser avaliadas: qual o melhor tipo de açúcar a ser consumido? Quais são os efeitos do consumo excessivo? Sizer e Witney (2014) estudaram o açúcar mascavo e suas potencialidades. No entanto, alguns estudos foram desenvolvidos para avaliar os efeitos adversos e/ou os efeitos benéficos do

consumo de açúcar mascavo em relação ao açúcar "branco" do tipo "Crystal", e é necessário intensificar os estudos para avaliar o consumo destes açúcares. *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) tem sido utilizado como modelo para estudar várias patologias humanas, como as relacionadas a distúrbios metabólicos, como obesidade e diabetes (Bharucha apud Ecker et al., 2017; Morris et al., Ecker et al. , 2017). Seu crescimento e reprodução é o melhor e mais fácil de manter no laboratório são características que fazem de *D. melanogaster* um sistema modelo ideal para abordar questões biológicas inovadoras, incluindo a saúde humana (Muñoz-Soriano e Paricio, 2011; Pandey e Nichols, 2011). *D. melanogaster* exibe estrutura e mecanismos neuroendócrinos que se assemelham aos encontrados em mamíferos (Nusse, Kim e Rulifson, 2002), como a DM possui células produtoras de insulina (IPC), peptídeos semelhantes a insulina (DILPs) e receptor (InR); Conservando as vias de sinalização molecular do fator de crescimento de insulina-insulina (Musselman et al., 2011). Alguns estudos mostraram que o alto consumo de açúcar provoca fenótipos resistentes à insulina em *D. melanogaster* que representam a fisiopatologia do DM tipo 2 em seres humanos (Morris et al, 2012 e Pasco; Leopold, 2012). Algumas características deste tipo de diabetes ocorrem através de deposição de gordura, glicose circulante elevada, resistência à insulina, fecundidade reduzida e a duração da DM adulta (Morris et al, 2012 e Pendse, 2013). Devido a estas características, *D. Melanogaster* foi utilizado como modelo para estudar os efeitos causados pelo excesso de consumo de açúcares castanhos e cristalinos, como defesas antioxidantes e estresse oxidativo.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes Químicos

Tampão de fosfato 0,05 M pH 7,4, hidrato de sal monossódico do ácido 3- (2-piridil) -5,6 difenil-1, 2, 4-triazina-p, p-disulfônico, hidroperóxido de cumeno, 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), Quercetina, foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Todos os outros reagentes comerciais foram de alto grau analítico.

Amostra

O açúcar cristal e o açúcar mascavo foram comprados na cidade de Uruguaiana (Brasil). O açúcar no estado sólido foi utilizado em todos os experimentos e misturado com farinha de milho média, grossa, leite em pó, sal e germe de trigo.

Estoque de *Drosophila Melanogaster*

Drosophila melanogaster (DM) de tipo selvagem (estirpe Harwich) foram obtidas no National Stock Center (Bowling Green, OH, EUA). As moscas foram mantidas e cultivadas em meio de farinha de milho (fermento de cerveja de 1% p/v, sacarose a 2% p/v, 1% p/v de leite em pó, 1% p/v de ágar e 0,08% p/p de nipagin) a uma temperatura e umidade constantes (22 ± 1 ° C, 60% de umidade relativa, respectivamente), submetidos a um ciclo de 12 h claro/escuro até o tratamento.

Tratamento das *Drosophila Melanogaster*

As moscas masculinas e femininas foram tratadas de acordo com Sudatti et al. com algumas modificações. As moscas foram divididas em grupos de controle, 5% de açúcar, 10% de açúcar, 20% de açúcar, 30% de açúcar e 40% para açúcares de cristal e mascavo, respectivamente. Após o tratamento, as moscas foram anestesiadas no gelo por aproximadamente 1 minuto e separadas em machos e fêmeas para estudos posteriores.

Preparação de homogeneizado

Cerca de 20 moscas de cada grupo (macho e fêmea) foram homogeneizadas em tampão de fosfato, trituradas e centrifugadas a 3000xg durante 10 minutos em equipamentos centrífugos refrigerados a 4° C. Após centrifugação das amostras, o sobrenadante foi utilizado para os testes. Todas as experiências foram realizadas em triplicata.

Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com o método proposto por Misra & Fridovich (1972). A análise cinética de SOD foi medida a 480 nm e os resultados foram expressos como unidades/mg de proteína.

Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da Catalase (CAT) foi medida por espectrofotometria de acordo com o método proposto por Aebi (1984). A análise cinética da catalase foi iniciada após a adição de H₂O₂ e a reação foi determinada a 240 nm. Os resultados foram calculados utilizando o coeficiente de extinção de H₂O₂, corrigido pelo teor de proteína expresso em nmol H₂O₂/mg de proteína/min.

Atividade da glutatona peroxidase (GPx)

A Glutaciona Peroxidase (GPx) foi medida de acordo com Pinto e Bartley (Pinto RE & Bartley W, 1969) usando um kit Ransel Randox®.

Determinação de proteínas

A determinação da proteína foi medida pelo método de Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi medida de acordo com Ohkawa et al. [OHKAWA et al., 1979]. Em resumo, adicionando amostras de S1 (100 µL) a um meio contendo 8,1% de dodecilsulfato de sódio, tampão de ácido acético (pH 3,5) e solução aquosa a 0,8% de ácido tiobarbitúrico. O meio estava aquecendo a 95 °C durante 60 minutos e o pigmento vermelho produzido foi medido por espectrofotometria a 532 nm. Os resultados foram calculados utilizando uma curva padrão construída com malondialdeído (MDA) em concentrações

conhecidas e corrigida pelo teor de proteína. Os resultados foram expressos como nanomoles de MDA por miligrama de proteína.

Níveis de proteína carbonil

Os níveis de proteína de carbonilada foram determinados de acordo com o método proposto por Levine et al. (1990). Os grupos carbonil nas cadeias laterais da proteína foram derivatizados, a 2,4-dinitrofenil-hidrazona (DNPH) por reação com 2,4-dinitrofenil-hidrazina. Os resultados foram expressos como nanomoles de carbonil por miligrama de proteína.

Nível de ferro no açúcar mascavo

A determinação do ferro no açúcar mascavo foi feita de acordo com o kit de análise colorimétrica de ferro (métodos Ferrozine) (kit Vida Biotecnologia - Belo Horizonte/Brasil) onde o ferro é liberado da transferrina em meio ácido tamponado e reduzido a íons ferrosos por tioglicol ação. O ácido 3- (2-piridil) - 5,6-bis (4-fenilsulfônico) -1,2,4-triazina reage com estes íons para formar um complexo de coloração rosa, com intensidade proporcional à concentração de íons Fe presentes em a amostra. O seu pico de absorção no espectrofotômetro UV / VIS é de 565 nm.

Níveis de glicose

Os níveis de glicose foram medidos com kit comercial (Bioclin®, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

4.3 RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Resultados, discussão e conclusão disponíveis em:

<http://lattes.cnpq.br/1550824274358660>

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo teve como propósito avaliar os efeitos de uma dieta hiperglicêmica com açúcar cristal ou açúcar mascavo em *Drosophila melanogaster* adulta frente a marcadores de estresse oxidativo. Os resultados preliminares demonstram que o açúcar mascavo deve ser consumido com moderação, apesar de ser um produto mais natural (menos processado) em relação ao cristal, pois em altas concentrações pode ocasionar dano oxidativo.

6. PROPOSTAS FUTURAS

Como uma alternativa para reduzir os níveis de marcadores de estresse oxidativo, iremos:

- avaliar a capacidade de um antioxidante com características anti-hiperglicêmica, como o fitol;
- avaliar os efeitos do extrato de *Bougainvillea glabra* com intuito de reduzir os níveis de dano oxidativo e aumentar as defesas antioxidantes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2005; 28: S37-S42.

ARRIBA, A., DOMÍNGUEZ, M., MARTÍN, J., GONZÁLEZ, L.C. Diagnóstico de Diabetes tipo Mody a Raíz de Tratamento com Hormona de Crecimiento. **Revista Atalaya Médica**; 2013. 3: 58 – 60.

Ashburner M, K Golic, Hawley R. *Drosophila: Um manual de laboratório*. 2a ed. Nova Iorque: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**; 2005.

BARBOSA, J.H.P.; OLIVEIRA, S.L., SEARA, L.T.E. O Papel dos Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) no Desencadeamento das Complicações Vasculares do Diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2008;52/6.

BARBOSA, K.B.F et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr. vol. 23 nº. 4. Campinas July/Aug. 2010.**

Bierhaus, A.; Hofmann, M.A.; Ziegler, R.; Nawroth, P.P. The AGE/RAGE pathway in vascular disease and diabetes mellitus. Part I. **The AGE-concept. Cardiovascular Res.** 37, 586-600, 1998.

Brownlee, M. The patho biology of diabetic complications: A unifying mechanism, *Diabetes* 54 (2005) 1615-1625.

CARVALHO, F.; **O Livro Negro do Açúcar**. Rio de Janeiro: s.n, 2006.

Consenso Brasileiro de Diabetes (CBD). **DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES MELLITUS E TRATAMENTO DO DIABETES MELLITUS TIPO 2**. S.I: Sociedade Brasileira de Diabetes, 2000.

CHAMPE, P.C. **Bioquímica Ilustrada**. 3ªed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2007.

Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas: Informe de una Consulta Mixta de Expertos OMS/FAO. OMS, Série de Informes Técnicos, nº 916. Genebra, Organização Mundial da Saúde, 2003 (www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_916_spa.pdf, consultado em 17 de setembro de 2017).

Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas: informe de un Grupo de Estudio de la OMS. OMS Serie de informes técnicos nº. 797. Genebra, Organização Mundial da Saúde, 1990 (http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_797/es/, consultado em 17 de setembro de 2017).

FERREIRA ALA, MATSUBARA LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **RAMB**. 1997; 43(1):61-8.

FERREIRA, L.T. et al. Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v.36, n. 3, p. 182-8, Set/Dez 2011.

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

GOMEZ, C.A.S., **Tratamento ortodôntico em pacientes diabéticos**. Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade do Porto. Porto, 2015.

GREEN K, BRAND MD, MURPHY MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**. 2004; 53(Suppl 1): 110-8.

HARPER: **Bioquímica Ilustrada**. 26 ed. Editora Ateneu, 2006.

HALLIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**. 2004; 142(2): 231-55.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed., **Oxford University Press**: New York, 2000.

Hammes, H.P.; Du, X.; Edelstein, D.; Taguchi, T.; Matsumura, T.; Ju, Q.; Lin, J.; Bierhaus, A.; Nawroth, P.; Hannak, D.; Neumaier, M.; Bergfeld, R.; Giardino, I.; Brownlee, M. Benfotiamine blocks three major path ways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. **Nat. Med.** 9, 294-299, 2003.

HEMMATI, M., SERKI, E., GHOLAMI, M., HOSHYAR, R. Effects of an ethanolic extract of *Berberis vulgaris* fruits on hyperglycemia and related gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. **Clinical Phytoscience** (2016) 2:3.

IBGE. Disponível em:
<http://cidades.ibge.gov.br/v4/brasil/rs/uruguaiana/panorama>. Acesso em:
23/05/2017.

IDF (International Diabetes Federation). About diabetes. URL:
<http://www.idf.org/about-diabetes> (Acessado 20.07.2016).

JOSHI, S.R; PARIKH, R.M; DAS. A.K. Insulin History, Biochemistry, Physiology and Pharmacology. **SUPPLEMENT OF JAPI**, vol. 55, July 2007, p. 19-25.

Koury JC, Donangelo CM. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev Nutr.** 2003; 16(4):433-41. doi: 10.1590/S1415-52732003000400007.

Kassab, A.; Piwovar, A. Celloxidant stress delivery and cell dysfunction on set in type 2 diabetes. **Biochimie.** 94, 1837-1848, 2012.

MASHARANI, U.; KARAM, J.H. Pancreatic Hormones & Diabetes Mellitus. In: **Basic and clinical endocrinology**, 6. ed. Mcgraw Hill, 2002. p. 623 – 641.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **DATASUS. Sistema de Informação da Atenção Básica – Cadastro Familiar.** Disponível em: <http://www.deepask.com/goes?page=Confira-os-numeros-da-diabetes-no-seu-municipio> .Acessadoem: 24/05/2017.

Mohamed, A.K.; Bierhaus, A.; Schiekofer, S.; Tritschler, H.; Ziegler, R.; Nawroth, P.P. The role of oxidative stress and NF- κ B activation in late diabetic complications. **Biofactors**. 10, 157-167, 1999.

MORRIS, S.N.S., COOGAN, C., CHAMSEDDIN, K., KIM, S.O.F., KOLLI, S., KELLER, J.N., BAUER, J.H. Development of diet-induced insulin resistance in adult *Drosophila melanogaster*. **Biochimica et Biophysica Acta**; 2012. 1822 1230–1237.

MUÑOZ-SORIANO, V.; PARICIO, N. *Drosophila* Models of Parkinson's Disease: Discovering Relevant Pathways and Novel Therapeutic Strategies. **Parkinsons Dis**, v. 2011, p.14, 2011.

Nakamura, J.; Koh, N.; Sakakibara, F.S.; Hamada, Y. 2,3 diphospho glycerate in erythrocytes and diabetic neuropathy in rats. **E. J. Pharmacol.** 294, 207-214, 1995.

NATION, J.L. **Insect physiology and biochemistry**. 2.ed.Nova York: Taylor & Francis Group, 2008.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 3.ed. Tradução: Arnaldo Antonio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi. São Paulo: Worth Publishers, 2002.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**.6.ed. Tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga et al. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Nguyen, S.; Pascariu, M.; Ghitescu, L. Early glycation products of endothelial plasma membrane proteins in experimental diabetes. **BBA**, 1762, 94-102, 2006.

Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.** 95, 351-358, 1979.

OLIVEIRA, C.S.V., FURUZAWA, G.K., REIS, A.F. **Diabetes Mellitus do tipo Mody**. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia; 2001. 46(2): 186 - 192.

PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacol Rev**, v. 63, p. 411-436, 2011.

Reed, T.T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Bio. Med.** 51, 1302-1319, 2011.

*REITER, L.T.; POTOCKI, L; CHIEN, S; GRIBSKOV, M; BIER, E (2001). "A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In Drosophila melanogaster". **Pesquisa Genoma.** 11 (6): 1114-1125. Doi : 10.1101/gr.169101. PMC 311089. PMID 11381037.*

ROCHA, F.D., TEIXEIRA, V.L., PEREIRA, R.C., KAPLAN, M.A.C. Diabetes mellitus and oxidative stress: natural products as target of new therapeutic stypes. **Rev. Bras. Farm.** 87(2): 49-54, 2006.

Rosen, G.M.; Britigan, B.E.; Halpern, H.J.; Pou, S. Free Radicals Biology and Detection by Spin Trapping. Chapter 4: Methods for free radicals detection. **Oxford University Press**, USA. 1999.

ROOTE, J.; PROKOP, A. How to design a genetic mating scheme: a basic training package for *Drosophila* genetics. G3 (Bethesda), v. 3, p. 353-358, 2013.

ROVENKO, M.B., PERKHULYN, V.N., GOSPODARYOV, V.D., SANZ, A., LUSHCHAK, V.O., LUSHCHAK, I.V. **High consumption of fructose rather than glucose promotes a diet-induced obese phenotype in *Drosophila melanogaster*. Comparative Biochemistry and Physiology**; 2015. Part A 180, 75 – 85.

ROVER JR L, HOEHR NF, VELLASCO AP. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado à métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím Nova**. 2001; 24(1): 112-9.

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009 / Sociedade brasileira de diabetes. - [3.ed.]. - Itapevi, SP: 2009. URL: http://www.diabetes.org.br/attachments/diretrizes09_final.pdf (Acesso em 25/09/2016).

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes. Perguntas frequentes sobre Diabetes (II). URL: <https://www.endocrino.org.br/perguntas-frequentes-sobre-diabetes-ii/> (Acesso em 09/04/2017).

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes. URL: <http://www.diabetes.org.br/> (Acessado em 20/08/2016).

SCHAFFER, M.H., NOYES, B.E., SLAUGHTER, C.A., THORNE, G.C., GASKELL, S.J. The fruitfly *Drosophila melanogaster* contains a novel charge dadipokinetic-hormone-family peptide. **Biochemistry Journal**; 1990. 269, 315 - 320.

SCHNEIDER CD, OLIVEIRA AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME**. 2004; 10(10):308-13.

Timper, K.; Donath, M.Y. Diabetes mellitus Type 2 – the new face of an old lady. **Swiss Med. Wkly**.142:w13635, 2012.

UNGER, R.H; FOSTER, D.W. Diabetes Mellitus. In: WILSON, J.D.; FOSTER, D.W. **Williams textbook of Endocrinology**, 8. ed. Philadelphia, Pennsylvania: W. B. **Saunders Company**, 1992. p. 1255 – 1333.

VINCENT HK, INNES KE, VINCENT KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes ObesMetab.** 2007; 9(6):813-39.

Wajchenberg, B.L. Disfunção endotelial no diabetes tipo 2. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** 46, 514-519, 2002.

Welch KD, Davis TZ, Eden MEV, Aust SD. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radic Biol Med.** 2002; 32(7): 577-83.

WHO. World Health Organization. URL: http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/en/index.html (Acesso em 02/09/2016).