

ARTIGOS ORIGINAIS

Disfunção Endotelial na Diabetes Tipo 2: Efeito de Antioxidantes [39]

CRISTINA M. SENA, ELSA NUNES, TERESA LOURO, TERESA PROENÇA, RAQUEL M. SEIÇA

Instituto de Fisiologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal
Hospitais da Universidade de Coimbra, Celas, Coimbra, Portugal.

Rev Port Cardiol 2007; 26 (6): 609-619

RESUMO

Pacientes com resistência à insulina e diabetes *mellitus* têm morbidade e mortalidade cardiovascular aumentadas. A disfunção endotelial tem sido implicada na patogénese da doença vascular diabética. Essa função anormal ocorre precocemente, antes da manifestação da doença cardiovascular, caracterizando-se por redução do vasorrelaxamento dependente do endotélio. O ácido alfa-lipóico (AL) é um antioxidante multifuncional que tem sido descrito como benéfico na neuropatia em pacientes diabéticos e está associado a um decréscimo de marcadores de *stress* oxidativo em vários tecidos. Este estudo teve como principal objectivo investigar os efeitos do ácido alfa-lipóico na função endotelial em modelos animais dislipidémicos com diabetes tipo 2. O metabolismo dos hidratos de carbono e dos lípidos, a função endotelial, os níveis do aldeído malónico no plasma (MDA) e da 8-hidroxi-desoxiguanosina (8-OHdG) na urina foram avaliados em ratos controlo normais (ratos Wistar), animais diabéticos tipo 2 Goto-Kakizaki (GK) basais e ratos GK tratados com dieta aterogénica (DA) (grupo só com dieta, grupo tratado com veículo e grupo tratado com ácido lipóico). A dieta conduziu a um aumento dos níveis de colesterol total e não-HDL, bem como dos níveis de triglicéridos e fosfolípidos e do índice aterogénico. Os níveis de MDA e de 8-OHdG apresentaram-se significativamente mais elevados nos grupos de ratos GK e nos GK hiperlipidémicos e foram completamente revertidos pelo antioxidante. A função endotelial de animais GK e GK hiperlipidémicos apresentou uma diminuição de 50% e melhorou significativamente com o tratamento com ácido lipóico. O ácido lipóico

ABSTRACT**Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes: Effect of Antioxidants**

Individuals with insulin resistance and diabetes mellitus have increased cardiovascular morbidity and mortality, caused in part by vascular complications. Endothelial dysfunction has been implicated in the pathogenesis of vascular diabetic disease. This abnormal function of the vasculature precedes cardiovascular disease and is associated with impaired endothelium-dependent vasorelaxation. The main etiology of the increased mortality and morbidity of type 2 diabetic patients is atherosclerosis. Increased production of free radicals is associated with the pathophysiology of diabetes, resulting in oxidative damage to lipids and proteins. Reduction of oxidative stress in diabetic patients may delay the onset of atherogenesis and the appearance of micro- and macrovascular complications. Alpha-lipoic acid (LA) is a multifunctional antioxidant that has been shown to have beneficial effects on polyneuropathy and on markers of oxidative stress in various tissues. This study was conducted to investigate the effects of LA on endothelial function in diabetic and hyperlipidemic animal models. Carbohydrate and lipid metabolism, endothelial function, plasma malondialdehyde (MDA) and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) were assessed in non-diabetic controls (Wistar rats), untreated diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats and atherogenic diet (AD)-fed GK rats (fed with atherogenic diet only, treated with alpha-lipoic acid and treated with vehicle, for 3 months). AD resulted in a 3-fold increase in both total and non-HDL serum cholesterol levels and in a

reverteu também os níveis lipídicos (colesterol total, colesterol não-HDL, triglicerídeos e fosfolípidos) e o índice aterogénico, sem afectar o colesterol HDL. Suplementos de ácido lipóico poderão assim representar um importante adjuvante na terapêutica de pacientes hiperlipidémicos com diabetes *mellitus* tipo 2, na medida em que conduz a aumentos significativos da função endotelial e a uma importante redução dos níveis de *stress* oxidativo e do índice aterogénico, factores que estão implicados na patogénese da aterosclerose na diabetes.

Palavras-Chave

Disfunção endotelial; Diabetes tipo 2; Aterosclerose; *Stress* oxidativo; Antioxidantes

2-fold increase triglyceride levels while endothelial function was significantly reduced. MDA and 8-OHdG levels were higher in the GK and GK hyperlipidemic groups and were completely reversed by the antioxidant. Hyperlipidemic GK diabetic rats showed significantly reduced endothelial function that was partially improved with LA. Furthermore, lipoic acid significantly reduced serum cholesterol levels, without lowering HDL cholesterol. Alpha-lipoic acid supplementation represents an achievable adjunct therapy to improve endothelial function and reduce oxidative stress, factors that are implicated in the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes.

Key words

Endothelial dysfunction; Type 2 diabetes; Atherosclerosis; Oxidative stress; Antioxidants

INTRODUÇÃO

A dislipidemia e a sua relação com a doença coronária aterosclerótica e a disfunção endotelial tem sido demonstrada em múltiplos ensaios clínicos⁽¹⁻³⁾. Por outro lado, a redução de eventos coronários e a estabilização ou mesmo a regressão da doença aterosclerótica através de drogas redutoras do colesterol plasmático, também têm sido referidas por inúmeros estudos⁽⁴⁻⁹⁾. Os mecanismos envolvidos na redução dos eventos coronários, quando ocorre diminuição do colesterol plasmático, parecem estar relacionados com a reversão da disfunção endotelial e a estabilização da placa de aterosclerose, uma vez que não se observa um aumento significativo do diâmetro vascular ao nível da placa aterosclerótica⁽⁸⁾. Funções importantes são atribuídas ao endotélio vascular, como a manutenção do tónus vascular, o equilíbrio entre a coagulação e a fibrinólise e a modulação da inflamação e da agregação plaquetar⁽⁸⁾. O endotélio tem uma função autócrina/parácrina, reguladora da secreção de múltiplos factores relaxantes (óxido nítrico / NO) e prostaciclina) e constritores (endotelinas).

O factor relaxante melhor caracterizado e mais importante é o NO. O NO tem uma produção e libertação basais, e uma outra dependente da influência de vários agonistas (acetilcolina, bradicinina, substância P e serotonina, entre

INTRODUCTION

The link between dyslipidemia and atherosclerotic coronary disease and endothelial dysfunction has been demonstrated in many clinical trials⁽¹⁻³⁾. At the same time, it has been shown in various studies that the use of cholesterol-lowering drugs leads to a reduction in coronary events and stabilization or even regression of atherosclerotic disease⁽⁴⁻⁹⁾. The mechanisms by which cholesterol lowering reduces coronary events appear to be related to reversal of endothelial dysfunction and to plaque stabilization, since no significant increase in lumen diameter is seen at the plaque site⁽⁸⁾. Vascular endothelium has important functions such as maintenance of vascular tone and coagulation-fibrinolysis balance, and modulation of inflammation and platelet aggregation⁽⁸⁾. The endothelium has both autocrine and paracrine actions, regulating the secretion of various relaxing factors, mainly nitric oxide (NO) and prostacyclin, as well as constrictors such as endothelin.

The most important relaxing factor, and the most thoroughly studied, is NO. NO is constantly being produced and released, but this is affected by various agonists, including acetylcholine, bradykinin, substance P and serotonin. Endothelium-dependent vasodilation is impaired in individuals with coronary atherosclerosis and in

outros). A vasodilatação dependente do endotélio não está íntegra em indivíduos com aterosclerose coronária e em doentes com factores de risco coronários como a hipercolesterolemia, diabetes *mellitus*, hábitos tabágicos e hipertensão arterial⁽⁸⁾.

Mais recentemente, tem-se verificado que as substâncias antioxidantes são capazes de reverter a disfunção endotelial provocada pela diabetes associada a dislipidemia⁽¹⁰⁻¹³⁾ e de reduzir também o número de eventos coronários^(12, 13), embora a sua utilização, na prática médica, necessite, ainda, de informações mais conclusivas.

Perante estas evidências, a redução dos lípidos plasmáticos assume um importante papel no controlo da doença aterosclerótica. O controlo da dieta constitui o ponto fundamental dos distúrbios lipídicos mais frequentes. Estudos como o de Jenkins e colaboradores⁽¹⁴⁾ sugerem que determinadas dietas com antioxidantes poderão por si só reduzir a dislipidemia em determinados pacientes. Considerando o elevado custo dos fármacos hipolipemiantes e a perspectiva do seu uso prolongado, os pacientes têm recorrido a tratamentos alternativos para o controlo da dislipidemia. Estes tratamentos têm sido utilizados de forma empírica pela população, necessitando de uma metodologia de estudo que permita conclusões mais fidedignas. Assim, antioxidantes com as vitaminas C e E têm sido extensamente avaliados.

O ácido α -lipóico é um antioxidante metabólico com características lipo e hidrossolúveis. É um potente sequestrador de radicais livres e recicla outras vitaminas facilitando a sua função antioxidante⁽¹⁵⁾. Em humanos, os efeitos do ácido lipóico, administrado por diferentes vias, já foram avaliados em diferentes estudos, sendo seguros e promissores os benefícios da sua utilização terapêutica nomeadamente na polineuropatia diabética^(31, 32).

O efeito do ácido α -lipóico na dislipidemia e na função endotelial associadas à diabetes tipo 2, representou o principal objectivo deste estudo. A produção aumentada de radicais livres está associada à fisiopatologia da diabetes *mellitus*, resultando em lesão oxidativa das proteínas e lípidos. Assim, também foram avaliados os níveis de *stress* oxidativo nos modelos animais diabéticos.

those with coronary risk factors such as hypercholesterolemia, diabetes, smoking, or hypertension⁽⁸⁾.

It has recently been demonstrated that antioxidants can reverse endothelial dysfunction caused by diabetes associated with dyslipidemia⁽¹⁰⁻¹³⁾ and also reduce the number of coronary events^(12, 13), although there is a need for more conclusive evidence of their usefulness in clinical practice.

Given these facts, reduction of plasma lipids has an important part to play in controlling atherosclerotic disease. Diet is the main factor in the commonest lipid disorders; studies such as those by Jenkins et al.⁽¹⁴⁾ suggest that a diet rich in antioxidants can by itself reduce dyslipidemia in certain patients. The high cost of lipid-lowering drugs and the prospect of their long-term use have led some patients to turn to alternative treatments to control their dyslipidemia. Such treatments have been used empirically, and so there is a need for more rigorous research that will provide reliable information, and antioxidants such as vitamins C and E have been extensively studied in this context.

Alpha-lipoic acid (LA) is a fat- and water-soluble metabolic antioxidant that is a potent free radical scavenger and also recycles other vitamins, strengthening their antioxidant action⁽¹⁵⁾. The effects of LA in humans, administered in different ways, have been assessed in various studies; it appears to be safe and to have promising benefits, especially in the treatment of diabetic polyneuropathy^(31, 32).

The main objective of this study was to investigate the effect of alpha-lipoic acid on dyslipidemia and endothelial function in type 2 diabetes. Increased production of free radicals is associated with the pathophysiology of diabetes, resulting in oxidative damage to proteins and lipids. Levels of oxidative stress were accordingly also measured in the diabetic animal models used.

METHODS

Animals

Fifteen-month-old diabetic rats (Goto-Kakizaki [GK], an animal model of non-obese spontaneous type 2 diabetes) were fed *ad libitum*

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Ratos diabéticos (Goto-Kakizaki -GK; um modelo animal espontâneo de diabetes tipo 2 não obesa) com 15 meses foram alimentados, durante 3 meses, *ad libitum* com ração *standard* (3% gorduras, tipo AO4-Panlab) ou com ração enriquecida em colesterol e gorduras (DA: 7.5% gordura e 1.25% colesterol) e livre acesso a água. Cinco grupos de animais (n=7-10 por grupo) foram estudados: ratos não diabéticos controle (ratos Wistar), ratos diabéticos controle (GK); ratos GK com dieta aterogénica (GK+DA); ratos GK com DA e óleo de soja/veículo (OS) e ratos GK com DA e ácido lipóico (AL). A quantidade de água e ração ingerida foi quantificada antes e no final do tratamento. Amostras de sangue, em animais anestesiados, foram obtidas por punção cardíaca para determinação da bioquímica do sangue e as urinas (24h) recolhidas em caixas metabólicas para determinação da 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG).

Parâmetros bioquímicos e de stress oxidativo

Foram determinados, antes e no final do tratamento, os pesos corporais e a glicemia após um jejum de 16-18 horas. Foi igualmente determinada a glicemia 2 h após administração de soro glicosado a 30%, por via intraperitoneal (1,75g de glicose/Kg peso corporal). As concentrações da glicose no sangue total foram determinadas na veia da cauda pelo método da glicose-oxidase (glicómetro e tiras teste - Bayer, Portugal) e expressas em mg/dl. No final do tratamento foram determinadas as concentrações sanguíneas de colesterol total, colesterol-HDL, triglicérides e fosfolípidos, por analisador automático. O índice aterogénico (AI) foi calculado utilizando a fórmula, colesterol total/colesterol-HDL (CT/C-HDL). O aldeído malónico (MDA) no plasma e a 8-OHdG na urina foram determinados por HPLC e por ELISA, respectivamente, como previamente descrito⁽¹⁶⁾.

Para a determinação da peroxidação lipídica da parede arterial utilizou-se o método de Cassini e colaboradores⁽¹⁷⁾. Segmentos da aorta torácica foram homogeneizados com ácido tricloroacético (mg de tecido por ml de TCA a 10%). Após centrifugação, foi adicionado um volume de ácido tiobarbitúrico 0,67% sendo a mistura aquecida a 100°C durante 20min. A concentração de MDA

for 3 months on standard chow (Panlab AO4, 3% fat) or high cholesterol and fat chow (atherogenic diet [AD], 7.5% fat and 1.25% cholesterol), with free access to water. Five groups (n=7-10 per group) were studied: non-diabetic controls (Wistar rats), diabetic controls (GK), GK rats on the atherogenic diet (GK+AD), GK rats on AD and soya oil vehicle (SO), and GK rats on AD and lipoic acid (AL). The quantity of water and food ingested was measured before and at the end of the treatment. Blood samples were taken from anesthetized animals by cardiac puncture to analyze blood biochemistry, and 24-hour urine samples were obtained in metabolic cages to measure 8- hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG).

Biochemical and oxidative stress parameters

Body weight and 16-18-hour fasting glycemia were measured before and at the end of the treatment, as was glycemia after intraperitoneal administration of 30% glucose solution (1.75 g glucose/kg). Whole blood glucose was measured in the caudal vein using the glucose oxidase method (glucometer and test strips from Bayer, Portugal) and expressed in mg/dl. At the end of the treatment blood concentrations of total and HDL cholesterol, triglycerides and phospholipids were determined using an automatic analyzer. The atherogenic index was calculated using the formula: total cholesterol/HDL cholesterol. Plasma malondialdehyde (MDA) and urinary 8-OHdG were assessed by HPLC and ELISA respectively, as described previously⁽¹⁶⁾.

The method of Cassini et al.⁽¹⁷⁾ was used to determine lipid peroxidation in the arterial wall. Segments of the thoracic aorta were homogenized with trichloroacetic acid (TCA) (1 mg of tissue per ml of 10% TCA). Following centrifugation, one volume of 0.67% TCA was added and the mixture was heated to 100°C for 20min. The concentration of MDA was calculated by absorbance at 532 nm, using an extinction coefficient of 1.49×10^{-5} expressed in nmol/mg of tissue $\times 10^{-7}$.

Vascular function

Rings 3-4 mm in length were carefully cut from the thoracic aorta of each animal and cleaned of connective tissue, preserving the endothelium⁽¹⁸⁾. The latter was mechanically removed from separate segments of the thoracic aorta of each animal. The rings were suspended

foi calculada pela absorvância de 532nm, utilizando-se um coeficiente de extinção de $1,49 \times 10^5$ expresso em nmol/L/mg de tecido $\times 10^7$.

Função vascular

Anéis vasculares da aorta torácica de cada animal, com aproximadamente 3-4mm, foram cuidadosamente removidos e limpos de tecido conjuntivo, de forma a preservar o endotélio⁽¹⁸⁾. O endotélio foi mecanicamente removido de segmentos distintos da aorta torácica dos mesmos animais. Os anéis foram suspensos em câmara de perfusão com 10ml de capacidade, contendo solução de Krebs-Henseleit a pH 7,4, com a seguinte composição (mmol/L): NaCl, 118,6; KCl, 4,7; CaCl₂, 1,6; NaHCO₃, 25,0; MgSO₄, 1,18; KH₂PO₄, 1,18; glicose, 11,0. A solução foi mantida a 37 °C e oxigenada com uma mistura de gases contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂. Os anéis foram montados em dois ganchos de metal, ligados a um suporte de um lado e a um transdutor de força (*PowerLab*) do outro lado. Os anéis foram distendidos a uma tensão de 2g, estabelecida previamente como tensão ideal, através de curvas de comprimento-tensão. Os anéis de aorta foram perfundidos por um período de 60min. Para prevenir a síntese de prostaglandinas algumas experiências foram realizadas na presença de 10 µM de indometacina. Os resultados foram expressos como percentagem de relaxamento em relação à contração com fenilefrina. Os anéis de aorta, com e sem endotélio, foram contraídos com fenilefrina-PHE (10⁻⁷ M). Após estabilização da contração, foi adicionada acetilcolina-ACh ao banho de forma cumulativa a fim de se obterem concentrações de 10⁻⁸ a 10⁻⁴ M e a serem produzidas as curvas de concentração-efeito na ausência ou presença de N^oNitro-L-arginina metil ester (L-NAME). Em seguida, a solução de Krebs-Henseleit foi substituída por solução fresca e a tensão relaxada até ao valor basal. Depois de um período de 30min os anéis foram contraídos com PHE e novas curvas de concentração-efeito foram obtidas com o dador de óxido nítrico, nitroprussiato-SNP (10⁻⁸ a 10⁻⁴ M).

RESULTADOS

Os valores do peso corporal, da glicemia, do MDA do plasma e da parede da aorta e os níveis

in a 10-ml perfusion chamber containing a Krebs-Henseleit solution at pH 7.4 with the following composition (in mmol/l): NaCl, 118.6; KCl, 4.7; CaCl₂, 1.6; NaHCO₃, 25.0; MgSO₄, 1.18; KH₂PO₄, 1.18; glucose, 11.0. The solution was maintained at 37 °C and oxygenated with a mixture of gases containing 95% O₂ and 5% CO₂. The rings were mounted on two metal hooks connected to a support on one side and a force transducer (*PowerLab*) on the other; they were then stretched at a tension of 2 g, previously established as the ideal tension using length-tension curves, and were perfused for 60 min. Some experiments were performed in the presence of 10 µm of indomethacin to prevent the synthesis of prostaglandins. The results were expressed as a percentage of relaxation compared to contraction with phenylephrine. The aortic rings, with and without endothelium, were subjected to contraction with phenylephrine (10⁻⁷ M). After stabilization of contraction, acetylcholine was progressively added to the bath in order to obtain a concentration of 10⁻⁸ to 10⁻⁴ M and to construct concentration-effect curves in the absence or presence of N-ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). The solution was replaced with fresh Krebs-Henseleit solution and tension relaxed to baseline levels. After 30 min, the rings were contracted with phenylephrine and new concentration-effect curves were obtained using the NO donor sodium nitroprusside (SNP) (10⁻⁸ to 10⁻⁴ M).

RESULTS

Body weight, glycemia, plasma and aortic wall MDA and urinary 8-OhdG values are given in *Table I*.

It can be seen that the diabetic animals' body weight did not change with the treatment. Although there were no significant differences in the quantities of chow consumed by the different groups during the study period (data not presented), a tendency was seen for animals on the high-fat diet to gain weight.

Fasting glycemia worsened with the atherogenic diet (mean rise of 32%) and was significantly improved by LA (19%). Two hours after administration of glucose solution, no significant differences were seen between the diabetic animal groups. Plasma MDA and urinary

de 8-OHdG na urina estão expressos no *quadro I*.

Verificou-se que o peso corporal dos animais diabéticos não sofreu qualquer alteração com os tratamentos. Apesar de não terem sido observadas diferenças na quantidade de ração consumida pelos diferentes grupos durante o período de estudo (dados não apresentados), verificou-se uma tendência para um aumento do peso corporal dos animais tratados com a dieta gorda.

A glicemia em jejum foi agravada pela dieta aterogénica (aumento de 32%) e foi significativamente diminuída pelo AL (19%). A glicemia, 2h após administração de soro glicosado, não apresentou variações significativas entre os grupos de animais diabéticos. Os níveis de MDA do plasma e de 8-OHdG na urina apresentaram-se significativamente mais elevados nos grupos de ratos GK e GK hiperlipidémicos e foram completamente revertidos pelo AL (*Tabela I*). O teor de MDA da parede da aorta aumentou significativamente nos grupos de ratos GK e GK hiperlipidémicos (84% e 282%, respectivamente; $p < 0.001$), quando comparado com o grupo não diabético e diminuiu 68%, em relação ao GK hiperlipidémico, na presença de AL.

Os valores de colesterol total e colesterol não-HDL, os triglicéridos e os fosfolípidos aumentaram significativamente com a dieta aterogénica (*Tabela II*) tal como o índice aterogénico (*Fig. 1*). Os valores do colesterol total, do colesterol não-HDL, dos triglicéridos e dos fosfolípidos foram significativamente mais baixos nos grupos de ratos GK tratados com óleo de soja e com ácido lipóico, quando comparados com o grupo GK+DA (*Tabela II*). O mesmo foi observado no índice aterogénico (*Fig. 1*). A comparação das curvas de concentração efeito com acetilcolina (*Fig. 2*), entre os ratos GK e Wistar, revelou uma redução do relaxamento dependente do endotélio nos ratos GK e GK hiperlipidémicos. Observou-se ainda um aumento do relaxamento dependente do endotélio no grupo de animais tratados com AL, quando comparado com o grupo GK+DA. Não houve diferenças entre os grupos, quando as curvas de concentração-efeito foram obtidas com o nitroprussiato, dador de NO (*Fig. 3*).

Na presença do inibidor das sintetases do óxido nítrico (L-NAME) não ocorreu qualquer relaxamento dependente do endotélio (*Fig. 4*).

8-OHdG levels were significantly higher in the GK and GK+AD groups, and were completely reversed by LA (*Table I*). MDA concentrations in the aortic wall rose significantly in the GK and GK+AD groups, by 84% and 282% respectively ($p < 0.001$) compared to the non-diabetic group, and fell by 68% compared to GK+AD animals in the presence of LA.

Total and non-HDL cholesterol, triglycerides and phospholipids increased significantly with the atherogenic diet (*Table II*), as did the atherogenic index (*Fig. 1*), but were significantly lower in the SO and LA groups (*Table I*), as was the atherogenic index (*Fig. 1*). Comparison of concentration-effect curves with acetylcholine (*Fig. 2*) between GK and Wistar rats showed reduced endothelium-dependent relaxation in the GK and GK+AD groups, but this was improved in the LA-treated animals. There were no differences between the groups in the concentration-effect curves obtained with sodium nitroprusside (*Fig. 3*).

In the presence of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME, there was no endothelium-dependent relaxation (*Fig. 4*).

DISCUSSION

Impaired endothelium-dependent relaxation is an early stage of the development of atherosclerosis⁽¹⁹⁾. In this study, we demonstrated that it is reduced in old diabetic GK rats and that this reduction is not aggravated by an atherogenic diet. We also found that endothelial dysfunction is significantly reversed by LA, almost back to the levels of normal Wistar rats. At the same time, in diabetic rats, a high fat and cholesterol diet for three months led to a marked rise in total cholesterol (357%), non-HDL cholesterol (809%), triglycerides (245%) and phospholipids (96%). LA did not affect body weight, but it significantly reduced fasting glycemia (19%), total cholesterol (87%), non-HDL cholesterol (93%), triglycerides (79%) and phospholipids (65%), and did not alter HDL cholesterol. Lipid profile was also normalized in the presence of vehicle (soya oil). Studies in the literature indicate that soya has a beneficial effect on the lipid profile of adults⁽²⁰⁾. Soya oil is rich in linoleic and linolenic acids and also contains antioxidants such as tocopherols and isoflavones.

Tabela I

Descrição geral dos animais e parâmetros de stress oxidativo avaliados nos diferentes grupos, ratos Wistar controle, ratos diabéticos (GK), ratos diabéticos com dieta aterogénica (GK+DA), tratados com óleo de soja (GK-DA+OS) ou ácido α -lipóico (GK-DA+AL)

	Wistar	GK	GK+DA	GK+DA+OS	GK-DA+AL
Peso corporal (g)	582.7 \pm 28.0	356.53 \pm 8.7***	410.86 \pm 5.1***	428.82 \pm 12.0***	433.96 \pm 10.9***
Glicemia em jejum (mg/dl)	75.57 \pm 1.9	115.3 \pm 5.6***	151.65 \pm 7.9***§§	129.63 \pm 4.5***	122.32 \pm 9.3*** Δ
Glicemia às 2h (mg/dl)	116.3 \pm 4.0	332.5 \pm 47.7***	419.14 \pm 28.5***	338.6 \pm 23.4***	365.57 \pm 9.5***
MDA (μ M)	1.12 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1**	1.8 \pm 0.1***	1.42 \pm 0.2	1.11 \pm 0.1 $\Delta\Delta$
MDA-aorta (nmol/mg tecido x 10 ⁻⁷)	5.2 \pm 0.32	9.56 \pm 0.73***	19.86 \pm 0.43***§§§	12.86 \pm 0.75*** $\Delta\Delta\Delta$	6.35 \pm 0.36 $\Delta\Delta\Delta$
8-OHdG na urina (ng/24h)	191.48 \pm 28.7	609.97 \pm 70.1***	1349.58 \pm 237.9***§§§	877.16 \pm 202.8***	42.28 \pm 12.6 $\Delta\Delta$

p<0.01,*p<0.001 versus ratos Wistar; §§p<0.01,§§§p<0.001 versus grupo GK controle; Δ p<0.05, $\Delta\Delta$ p<0.01, $\Delta\Delta\Delta$ p<0.001 versus grupo GK+DA.

Table I

General description of experimental animals and oxidative stress parameters in the different groups: control Wistar rats, diabetic rats (GK), diabetic rats on atherogenic diet (GK+AD), and treated with soya oil (GK+AD+SO) or α -lipoic acid (GK+AD+LA)

	Wistar	GK	GK+DA	GK+DA+OS	GK-DA+AL
Body weight (g)	582.7 \pm 28.0	356.53 \pm 8.7***	410.86 \pm 5.1***	428.82 \pm 12.0***	433.96 \pm 10.9***
Fasting glycemia (mg/dl)	75.57 \pm 1.9	115.3 \pm 5.6***	151.65 \pm 7.9***§§	129.63 \pm 4.5***	122.32 \pm 9.3*** Δ
2-h glycemia (mg/dl)	116.3 \pm 4.0	332.5 \pm 47.7***	419.14 \pm 28.5***	338.6 \pm 23.4***	365.57 \pm 9.5***
MDA (μ M)	1.12 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1**	1.8 \pm 0.1***	1.42 \pm 0.2	1.11 \pm 0.1 $\Delta\Delta$
MDA-aorta (nmol/mg tissue x 10 ⁻⁷)	5.2 \pm 0.32	9.56 \pm 0.73***	19.86 \pm 0.43***§§§	12.86 \pm 0.75*** $\Delta\Delta\Delta$	6.35 \pm 0.36 $\Delta\Delta\Delta$
Urinary 8-OHdG (ng/24h)	191.48 \pm 28.7	609.97 \pm 70.1***	1349.58 \pm 237.9***§§§	877.16 \pm 202.8***	42.28 \pm 12.6 $\Delta\Delta$

p<0.01,*p<0.001 vs. Wistar; §§p<0.01,§§§p<0.001 vs. control GK group; Δ p<0.05, $\Delta\Delta$ p<0.01, $\Delta\Delta\Delta$ p<0.001 vs. GK+DA group.

Tabela II

Descrição geral dos animais e parâmetros de stress oxidativo avaliados nos diferentes grupos, ratos Wistar controle, ratos diabéticos (GK), ratos diabéticos com dieta aterogénica (GK+DA), tratados com óleo de soja (GK-DA+OS) ou ácido α -lipóico (GK-DA+AL)

	Wistar	GK	GK+DA	GK+DA+OS	GK-DA+AL
Colesterol Total (mg/dl)	93.6 \pm 8.1	154.3 \pm 25.6	705.4 \pm 118.3***§§§	145.6 \pm 21.5 $\Delta\Delta\Delta$	92.4 \pm 10.4 $\Delta\Delta\Delta$
Colesterol não-HDL (mg/dl)	23.5 \pm 3.5	68.0 \pm 19.7	618.14 \pm 115.7***§§§	86.0 \pm 18.6 $\Delta\Delta\Delta$	42.71 \pm 6.2 $\Delta\Delta\Delta$
Triglicéridos (mg/dl)	102.1 \pm 14.6	159.9 \pm 69.5	551.7 \pm 85.4***§§§	196.6 \pm 37.1 $\Delta\Delta$	116.9 \pm 14.0 $\Delta\Delta\Delta$
Fosfolípidos (mg/dl)	171.1 \pm 20.5	233.9 \pm 42.9	457.6 \pm 45.8***§§§	194.6 \pm 19.0 $\Delta\Delta\Delta$	162.0 \pm 11.8 $\Delta\Delta\Delta$

***p<0.001 versus ratos Wistar; §§§p<0.001 versus grupo GK controle; $\Delta\Delta\Delta$ p<0.01, $\Delta\Delta\Delta\Delta$ p<0.001 versus grupo GK+DA.

Table II

Lipid parameters in the different groups: control Wistar rats, diabetic rats (GK), diabetic rats on atherogenic diet (GK+AD), and treated with soya oil (GK+AD+SO) or α -lipoic acid (GK+AD+LA)

	Wistar	GK	GK+DA	GK+DA+OS	GK-DA+AL
Colesterol Total (mg/dl)	93.6 \pm 8.1	154.3 \pm 25.6	705.4 \pm 118.3***§§§	145.6 \pm 21.5 $\Delta\Delta\Delta$	92.4 \pm 10.4 $\Delta\Delta\Delta$
Colesterol não-HDL (mg/dl)	23.5 \pm 3.5	68.0 \pm 19.7	618.14 \pm 115.7***§§§	86.0 \pm 18.6 $\Delta\Delta\Delta$	42.71 \pm 6.2 $\Delta\Delta\Delta$
Triglicéridos (mg/dl)	102.1 \pm 14.6	159.9 \pm 69.5	551.7 \pm 85.4***§§§	196.6 \pm 37.1 $\Delta\Delta$	116.9 \pm 14.0 $\Delta\Delta\Delta$
Fosfolípidos (mg/dl)	171.1 \pm 20.5	233.9 \pm 42.9	457.6 \pm 45.8***§§§	194.6 \pm 19.0 $\Delta\Delta\Delta$	162.0 \pm 11.8 $\Delta\Delta\Delta$

***p<0.001 vs. Wistar rats; §§§p<0.001 vs. control GK group; $\Delta\Delta\Delta$ p<0.01, $\Delta\Delta\Delta\Delta$ p<0.001 vs. GK+DA group

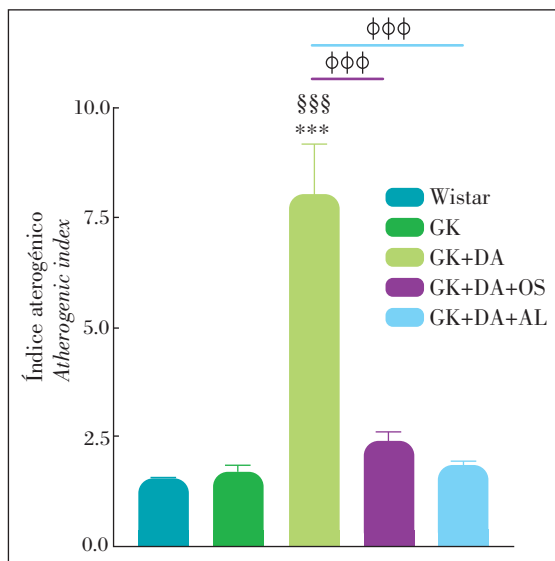


Figura 1. Índice aterogénico (CT/C-HDL) em ratos controlo (Wistar), ratos diabéticos (GK), ratos diabéticos com hiperlipidemia (GK+DA), tratados com veículo (GK+DA+OS) ou com ácido α -lipóico (GK+DA+AL). Média \pm epm de 10 experiências. §§§ p<0.001 versus GK controlo; φφφ p<0.001 versus grupo GK+DA.

Figure 1. Atherogenic index (TC/HDL-C) in control rats (Wistar), diabetic rats (GK), diabetic rats with hyperlipidemia (GK+AD), and treated with vehicle (GK+AD+SO) or with α -lipoic acid (GK+AD+LA). Means \pm SEM of 10 experiments. §§§ p<0.001 vs. control GK group; φφφ p<0.001 vs. GK+AD group.

DISCUSSÃO

Uma diminuição do vasorrelaxamento dependente do endotélio é um estágio precoce no desenvolvimento da aterosclerose ⁽¹⁹⁾. Neste estudo, demonstrámos que há uma diminuição do relaxamento dependente do endotélio em animais diabéticos GK idosos e que esta alteração não é agravada na presença de uma dieta aterogénica. Verificou-se ainda que a disfunção endotelial é significativamente revertida na presença de ácido lipóico para valores próximos dos ratos Wistar normais. Por outro lado, nos ratos diabéticos, a administração da dieta enriquecida em colesterol e gorduras, durante 3 meses, conduziu a um aumento acentuado do colesterol total (357%), do colesterol não-HDL (809%), dos triglicéridos (245%) e dos fosfolípidos (96%). O ácido α -lipóico não afectou o peso corporal, mas diminuiu significativamente a glicemia do jejum (19%), o colesterol total (87%), o colesterol não-HDL (93%), os triglicéridos (79%) e os fosfolípidos (65%) e não afectou o colesterol-HDL. O perfil lipídico foi também normalizado na presença do veículo (o óleo de soja). Estudos na literatura apontam para um

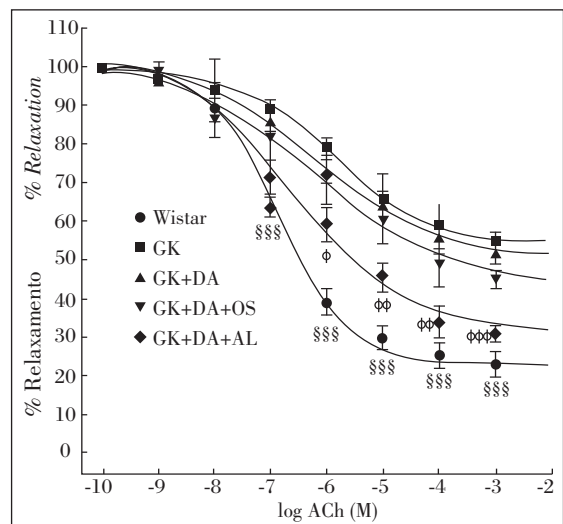


Figura 2. Curvas concentração-efeito com acetilcolina, em ratos controlo (Wistar \bullet), ratos diabéticos (GK \blacksquare), ratos diabéticos com hiperlipidemia (GK+DA \blacktriangle), tratados com veículo (GK+DA+OS \blacktriangledown) ou com ácido α -lipóico (GK+DA+AL \blacklozenge). Média \pm epm de 21 experiências. §§§ p<0.001 versus GK controlo; φ φ p<0.05; φφ φ p<0.01; φφφ φ p<0.001 versus grupo GK+DA.

Figure 2. Concentration-effect curves with acetylcholine in control rats (Wistar \bullet), diabetic rats (GK \blacksquare), diabetic rats with hyperlipidemia (GK+AD \blacktriangle), and treated with vehicle (GK+AD+SO \blacktriangledown) or with α -lipoic acid (GK+AD+LA \blacklozenge). Means \pm SEM of 21 experiments. §§§ p<0.001 vs. control GK group; φ p<0.05; φφ p<0.01; φφφ p<0.001 vs. GK+AD group.

LA significantly reduces lipid profile in hyperlipidemic patients ⁽²¹⁾. Although soya oil normalized the lipid profile, it had no effect on endothelium-dependent relaxation. The effect of LA therefore appears to be mediated by other mechanisms that, as well as lowering lipids, improve endothelial function.

LA has unique characteristics compared to other antioxidants: it distributes to the mitochondria; it has a very low redox potential and can thus recycle other antioxidant redox pairs such as ascorbate; and it is regenerated by increases in nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) induced by a rise in blood glucose and by the action of plasma non-esterified fatty acids via pyruvate dehydrogenase, which establishes a link between antioxidant activity and the increases in metabolic rate ⁽²²⁻²⁴⁾. Lipoic acid directly modulates glucose metabolism in insulin-resistant muscle tissue ⁽²⁵⁾. Chronic treatment of obese insulin-resistant Zucker rats with LA improves glucose tolerance and insulin sensitivity of skeletal muscle ⁽²⁵⁾. This antioxidant also appears to prevent diabetes in certain animal models ⁽²⁶⁾.

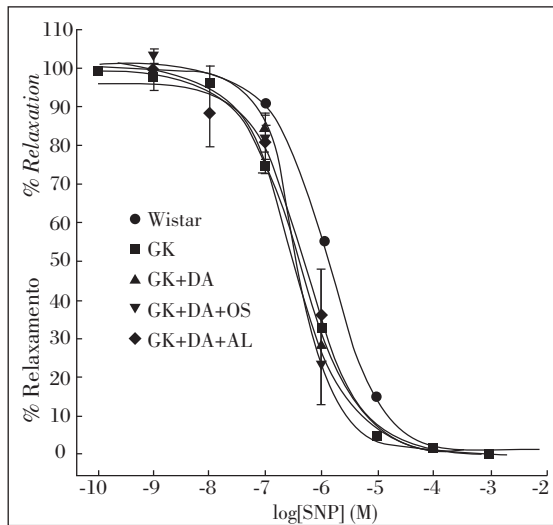


Figura 3. Curvas concentração-efeito com nitroprussiato, em ratos controlo (Wistar \bullet), ratos diabéticos (GK \blacksquare), ratos diabéticos com hiperlipidemia (GK+DA \blacktriangle), tratados com veículo (GK+DA+OS \blacktriangledown) ou com ácido α -lipóico (GK+DA+AL \blacklozenge). Média \pm epm de 21 experiências.

Figure 3. Concentration-effect curves with sodium nitroprusside in control rats (Wistar \bullet), diabetic rats (GK \blacksquare), diabetic rats with hyperlipidemia (GK+DA \blacktriangle), and treated with vehicle (GK+AD+SO \blacktriangledown) or with α -lipoic acid (GK+AD+LA \blacklozenge). Means \pm SEM of 21 experiments.

efeito benéfico da soja no perfil lipídico de indivíduos adultos⁽²⁰⁾. O óleo de soja é rico em ácidos linoleico e linolénico e possui também antioxidantes como tocoferóis e isoflavonas. Em particular, o ácido α -linolénico é um importante redutor do perfil lipídico em pacientes hiperlipidémicos⁽²¹⁾. Embora o óleo de soja tenha normalizado o perfil lipídico não teve qualquer efeito no relaxamento dependente do endotélio. Assim, o efeito do ácido lipóico parece ser mediado por outros mecanismos que, associados ao decréscimo dos lípidos, permitem uma melhoria da função endotelial.

O ácido α -lipóico tem características muito próprias, relativamente a outros antioxidantes: 1) distribui-se pela mitocôndria; 2) tem um potencial *redox* muito baixo, sendo por isso capaz de reciclar outros pares *redox* antioxidantes, como o ascorbato; e 3) é regenerado por aumentos do dinucleótido de nicotinamida adenina (NADH) induzidos pelo aumento da glicemia e por acção dos ácidos gordos plasmáticos não esterificados (NEFA, via piruvato desidrogenase), estabelecendo uma ligação entre a actividade antioxidante e o grau de aumento do fluxo metabólico⁽²²⁻²⁴⁾. O ácido α -lipóico pode modular directamente o metabolismo da glicose no tecido

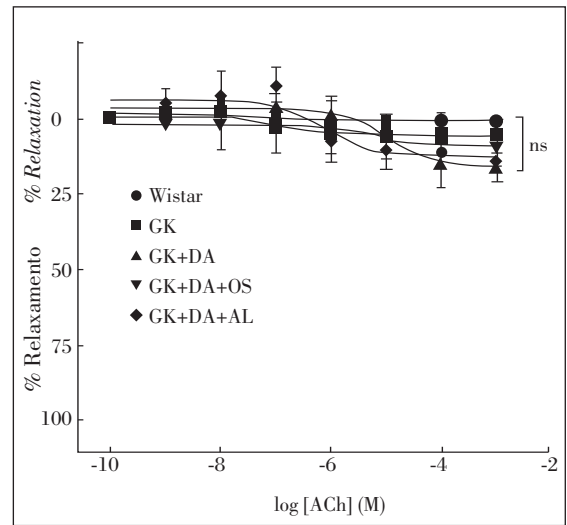


Figura 4. Curvas concentração-efeito com acetilcolina na presença de L-NAME, em ratos controlo (Wistar \bullet), ratos diabéticos (GK \blacksquare), ratos diabéticos com hiperlipidemia (GK+DA \blacktriangle), tratados com veículo (GK+DA+OS \blacktriangledown) ou com ácido α -lipóico (GK+DA+AL \blacklozenge). Média \pm epm de 21 experiências.

Figure 4. Concentration-effect curves with acetylcholine in the presence of L-NAME in control rats (Wistar \bullet), diabetic rats (GK \blacksquare), diabetic rats with hyperlipidemia (GK+AD \blacktriangle), and treated with vehicle (GK+AD+SO \blacktriangledown) or with α -lipoic acid (GK+AD+LA \blacklozenge). Means \pm SEM of 21 experiments.

Levels of plasma MDA, an index of lipid peroxidation, and of urinary 8-OHdG, a marker of oxidative DNA damage, rose by 61% and 605% respectively with the atherogenic diet, while levels of MDA in the aortic wall increased by 77%. These findings are in agreement with the literature, and confirm that dyslipidemia aggravates oxidative damage^(27, 28). Levels of MDA in the aorta and plasma, and levels of 8-OHdG in the urine normalized with LA but not with soya oil (vehicle). Endothelial function, already impaired by age-associated diabetes (GK group), did not worsen with the atherogenic diet (GK+AD group). However, we observed an improvement in endothelium-dependent vasomotor function (maximum relaxation increased by 49%) in the presence of LA, which was not seen in the presence of vehicle (soya oil).

Like soya oil, LA normalizes lipid profile, but it also reverses the long-term endothelial dysfunction seen in old diabetic animals and reduces levels of oxidative stress to those of control animals. Our results are in agreement with previous studies in animal models of type 1 diabetes, which also showed the beneficial effect of LA on endothelial dysfunction⁽²⁹⁾. Lipid

muscular resistente à insulina⁽²⁵⁾. O tratamento crónico de ratos obesos Zucker insulino-resistentes, com ácido lipóico, induz uma melhoria da tolerância à glicose e da sensibilidade do músculo esquelético à insulina⁽²⁵⁾. Por outro lado este antioxidante parece prevenir a diabetes *mellitus* em determinados modelos animais⁽²⁶⁾.

Os valores do MDA (índice de peroxidação lipídica) plasmático e os níveis de 8-OHdG (índice de oxidação do DNA) na urina aumentaram, respectivamente, 61% e 605% com a dieta aterogénica enquanto o teor de MDA da parede da aorta aumentou 77%. Estes resultados estão de acordo com a literatura e reafirmam que a dislipidemia acentua os processos oxidativos⁽²⁷⁻²⁸⁾. Os níveis plasmáticos e aórticos de MDA e os níveis urinários de 8-OHdG normalizaram com o ácido lipóico, mas não com o óleo de soja (veículo). A função endotelial, já comprometida pela diabetes associada ao envelhecimento (grupo GK), não se agrava com a dieta gorda (grupo GK+DA). Contudo observámos uma melhoria da função vasomotora dependente do endotélio (relaxamento máximo aumentou 49%) na presença do ácido lipóico, que não foi observada na presença do veículo (óleo de soja).

O ácido lipóico embora normalize o perfil lipídico, à semelhança do óleo de soja, tem também a capacidade de reverter a disfunção endotelial de longo termo observada nos animais diabéticos idosos e de reduzir os níveis de *stress* oxidativo para os valores dos animais controlo. Os nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores, em modelos animais diabéticos de tipo I, que demonstram também efeitos benéficos do ácido lipóico na disfunção endotelial⁽²⁹⁾. Por si só, uma redução dos lipídios não é suficiente para melhorar a função endotelial. De referir a este propósito, o estudo de Calkin e colaboradores, onde um agonista dos receptores do activador do proliferador peroxissomal- α (PPAR- α) possui actividade anti-aterogénica, independentemente das alterações no metabolismo do colesterol⁽³⁰⁾.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo fornecem evidências para a importância do *stress* oxidativo na patogénese da disfunção endotelial e para os efeitos benéficos do ácido α -lipóico como antioxidante e na reversão da hiperlipidemia e da

reduction is not by itself sufficient to improve endothelial function, as shown in a study by Calkin et al., in which an agonist of peroxysomal proliferator-activator receptor alpha (PPAR- α) demonstrated antiatherogenic activity, independently of alterations in cholesterol metabolism⁽³⁰⁾.

CONCLUSIONS

The results of the present study demonstrate the importance of oxidative stress in the pathogenesis of endothelial dysfunction and the beneficial properties of alpha-lipoic acid as an antioxidant and in reversing hyperlipidemia and endothelial dysfunction associated with type 2 diabetes. They also suggest that the effects of this antioxidant should be studied in diabetic patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by FMUC and FCT. Some of the research was performed in the Experimental Research Laboratory of Hospitais da Universidade de Coimbra, headed by Prof. João Patrício.

disfunção endotelial associadas à diabetes tipo 2. Sugerem também a avaliação próxima dos efeitos deste antioxidante em doentes diabéticos.

AGRADECIMENTOS

Trabalho financiado por: FMUC e FCT. Parte do trabalho foi efectuado no Laboratório de Investigação experimental-HUC Director Prof. Doutor João Patrício.

Pedidos de separatas para:

Address for reprints:

RAQUEL M. SEIÇA

Instituto de Fisiologia

Faculdade de Medicina

Universidade de Coimbra

Rua Larga

3004-504 Coimbra, PORTUGAL

E-mail: rmseica@ci.uc.pt

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

- 1 - Nam BH, Kannel WB, D'Agostino RB. Search for an optimal atherogenic lipid risk profile: from the Framingham Study. *Am J Cardiol.* 2006; 97: 372-375.
- 2 - National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel, Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), *JAMA* 2001; 285: 2436-2497.
- 3 - Liu J, Sempos C, Donahue RP, Dorn J, Trevisan M, Grundy SM. Joint distribution of non-HDL and LDL cholesterol and coronary heart disease risk prediction among individuals with and without diabetes. *Diabetes Care.* 2005; 28:1916-1921.
- 4 - Costa J, Borges M, David C, Vaz Carneiro A. Efficacy of lipid lowering drug treatment for diabetic and non-diabetic patients: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ.* 2006; 332:1115-1124.
- 5 - Schaefer EJ, McNamara JR, Taylor T, et al. Comparisons of effects of statins (atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, pravastatin, and simvastatin) on fasting and postprandial lipoproteins in patients with coronary heart disease versus control subjects. *Am J Cardiol.* 2004; 93: 31-39.
- 6 - Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF heart protection study of cholesterol lowering with simvastatin in 20 536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 7-22.
- 7 - Ornish D, Brorun SE, Schermitz LW, Billings JH, Armstrong WT, Ports TA. Can lifestyle changes reverse coronary heart disease? The Lifestyle Heart Trial. *Lancet* 1990; 336: 129-33.
- 8 - Libby P, Aikawa M, Kinlay S, Selwyn A, Ganz P. Lipid lowering improves endothelial functions. *Int J Cardiol.* 2000; 74:S3-S10.
- 9 - Hamer M, Steptoe A. Influence of specific nutrients on progression of atherosclerosis, vascular function, haemostasis and inflammation in coronary heart disease patients: a systematic review. *Br J Nutr.* 2006; 95:849-859.
- 10 - Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr.* 2005; 135:969-972
- 11 - Hennig B, Toborek M, McClain CJ. High-energy diets, fatty acids and endothelial cell function: implications for atherosclerosis. *J Am Coll Nutr.* 2001; 20:97-105.
- 12 - Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:816-823.
- 13 - Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willet WC. Vitamin E consumption and risk of coronary disease in men. *N Engl J Med* 1993; 328:145-156.
- 14 - Jenkins DJ, Kendall CW, Marchie A, et al. Effects of a dietary portfolio vs lovastatin on serum lipids and C-reactive protein. *JAMA.* 2003;290:502-510.
- 15 - Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition.* 2001;17:888-895.
- 16 - Santos MS, Santos DL, Palmeira CM, Seica R, Moreno AJ, Oliveira CR. Brain and liver mitochondria isolated from diabetic Goto-Kakizaki rats show different susceptibility to induced oxidative stress. *Diabetes Metab Res Rev.* 2001; 17:223-230.
17. Cassini AF, Ferrali M, Pompella A, Maellaro E, Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissue of bromobenzene-intoxicated mice. *Am J Pathol* 1986;123:520-31.
18. Jayakody L, Seneratne M, Thomson A, Kapagoda T. Endothelium-dependent relaxation in experimental atherosclerosis in the rabbit. *Circ Res* 1987; 50: 251-64.
19. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340:115-126.
20. Insull W Jr., Silvers A, Hicks L, Probstfield JL. Plasma lipid effects of three common vegetable oils in reduced-fat diets of free-living adults. *Am J Clin Nutr.* 1994;60:195-202.
21. Zhao G, Etherton TD, Martin KR, West SG, Gillies PJ, Kris-Etherton PM. Dietary alpha-linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. *J Nutr.* 2004; 134:2991-2997.
22. Liu J, Head E, Gharib AM, et al. Memory loss in old rats is associated with brain mitochondrial decay and RNA/DNA oxidation: partial reversal by feeding acetyl-L-carnitine and/or R-alpha-lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99:2356-2361.
23. Hagen TM, Ingersoll RT, Lykkesfeldt J, et al. (R)-alpha-lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *FASEB J.* 1999;13:411-418.
24. Bustamante J, Lodge JK, Marcocci L, Tritschler HJ, Packer L, Rihm BH. Alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radic Biol Med.* 1998;24:1023-1039.
25. Lee WJ, Song KH, Koh EH, et al. Alpha-lipoic acid increases insulin sensitivity by activating AMPK in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;332:885- 891.
26. Song KH, Lee WJ, Koh JM, et al. alpha-Lipoic acid prevents diabetes mellitus in diabetes-prone obese rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;326:197-202.
27. Nenseter M, Gudmundesen O, Malterud K, Berg T, Drevon C. Effect of cholesterol feeding on the susceptibility of lipoproteins to oxidative modification. *Biochim Biophys Acta* 1994;1213: 207-14.
28. Xu Y, He Z, King GL. Introduction of hyperglycemia and dyslipidemia in the pathogenesis of diabetic vascular complications. *Curr Diab Rep.* 2005;5:91-97.
29. Kocak G, Aktan F, Canbolat O, et al. Alpha-lipoic acid treatment ameliorates metabolic parameters, blood pressure, vascular reactivity and morphology of vessels already damaged by streptozotocin-diabetes. *Diab Nutr Metab* 2000, 13:308-318.
30. Calkin AC, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA, Allen TJ. Gemfibrozil decreases atherosclerosis in experimental diabetes in association with a reduction in oxidative stress and inflammation. *Diabetologia.* 2006;49:766-774.
31. Ziegler D, Hanefeld M, Ruhnu KJ, et al. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a 7-month multicenter randomized controlled trial (ALADIN III Study). *ALADIN III Study Group. Alpha-Lipoic Acid in Diabetic Neuropathy. Diabetes Care* 1999;22:1296-1301.
32. Ziegler D, Reljanovic M, Mehnert H, Gries FA. Alpha-lipoic acid in the treatment of diabetic polyneuropathy in Germany: current evidence from clinical trials. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1999;107:421-430.