



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Estudo da pentoxifilina sobre biomarcadores do estresse
glico-oxidativo e da inflamação em camundongos
submetidos ao modelo de obesidade e resistência à insulina**

Maiara Destro Inácio

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Araraquara, SP

2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Estudo da pentoxifilina sobre biomarcadores do estresse
glico-oxidativo e da inflamação em camundongos
submetidos ao modelo de obesidade e resistência à insulina**

Maiara Destro Inácio

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

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Araraquara, SP

2019

-
- I56e** Inácio, Maiara Destro.
Estudo da pentoxifilina sobre biomarcadores do estresse glico-oxidativo e da inflamação em camundongos submetidos ao modelo de obesidade e resistência à insulina / Maiara Destro Inácio. – Araraquara: [S.n.], 2019.
134 f. : il.
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.
- Orientador: Amanda Martins Baviera.
1. Obesidade. 2. Resistência à insulina. 3. Diabetes mellitus. 4. Estresse glico-oxidativo. 5. Pentoxifilina. I. Baviera, Amanda Martins, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESTUDO DA PENTOXIFILINA SOBRE BIOMARCADORES DO ESTRESSE GLICO-
OXIDATIVO E DA INFLAMAÇÃO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO
DE OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA

AUTORA: MAIARA DESTRO INÁCIO

ORIENTADORA: AMANDA MARTINS BAVIERA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. AMANDA MARTINS BAVIERA
Departamento de Análises Clínicas / FCF/ UNESP Araraquara

Profa. Dra. ISIS DO CARMO KETTELHUT
Departamento de Bioquímica e Imunologia / FMRP - USP Ribeirão Preto

Prof. Dr. LUIS CARLOS SPOLIDORIO
Departamento de Fisiologia e Patologia / Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Prof. Dr. PAULO INACIO DA COSTA
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. CAMILA RENATA CORREA CAMACHO
Departamento de Clínica Médica / Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP

Araraquara, 28 de novembro de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelo dom da vida, por me conceder saúde, por guiar e iluminar meus caminhos, me dando força e sabedoria para superar as dificuldades encontradas e me capacitar para realização deste trabalho.

Ao meu marido Felipe, meu especial agradecimento por ser esse companheiro maravilhoso e peça fundamental para realização deste trabalho. Se cheguei até aqui foi por você acreditar em mim (muito mais que eu mesma). Agradeço por todo zelo, amor, carinho, ajuda, compreensão e apoio.

Aos meus pais, José Valentim e Ester, por todo amor, compreensão e por sempre apoiarem meus objetivos, não medindo esforços para me ajudarem no que fosse necessário.

A minha irmã Raquel, ao meu cunhado Cassiano, aos meus sobrinhos Caio e Davi e a minha sogra Lucilene por todo amor, carinho e apoio.

A Profa. Dra. Amanda Martins Baviera pela paciência e dedicação em me orientar. Por ser uma grande incentivadora e apaixonada à pesquisa que muito me auxiliou para a conclusão deste trabalho. Agradeço também por todas as oportunidades de aprendizado e parcerias em trabalhos, contribuindo de forma relevante na minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti que tive o privilégio em conviver, agradeço pela contribuição neste trabalho com valiosos ensinamentos de bancada e de vida, e por todo carinho e momentos de descontração no laboratório.

Ao Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio e ao José Antônio Sampaio Zuanon do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia da UNESP (Araraquara, SP) pela confecção das lâminas histológicas dos rins, e todo cuidado e atenção nas análises.

A Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado do Departameno de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Araraquara, SP) por gentilmente nos emprestar a gaiola metabólica de camundongo.

Ao técnico Renildo Moreira pela ajuda no biotério durante a realização do piloto deste trabalho.

A todos os amigos e companheiros do laboratório de Bioquímica e Enzimologia Clínicas, Carlos, Monalisa, Megley, Maíra, Anderson, Ingrid, Marcel, Juliana, Bruno, Tassiana, Camila, e em especial a Mariana, Renata e Tayra, cada um contribuindo da sua maneira e de acordo com sua habilidade, mas todos de forma indispensável. Agradeço por tudo que me ensinaram, por toda ajuda, apoio e agradáveis momentos que passamos juntos.

Aos amigos que Deus me presenteou em Araraquara e que me trouxeram conforto, alegria, apoio e carinho nesta trajetória, Leila, Jairo, Bruno, Aline Rigo, André, Aline Galliani, Monalisa e a todos os irmãos/irmãs da Igreja Presbiteriana Vale do Sol (Araraquara, SP) que oraram por mim, em especial a Janaína.

Aos amigos de longa data que mesmo distantes também me trouxeram conforto, alegria, apoio e carinho, Verônica, Fernanda, Egláia, Nathália, Angélica e Ana Célia.

A Universidade Estadual Paulista (UNESP) e ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2016/23644–9, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo número 305936/2017–4, pelo apoio financeiro.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo durante todo o curso de doutorado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A obesidade é considerada um problema de saúde pública devido a sua alta prevalência e incidência mundial, e está entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2, ambos levando à hiperglicemia. A manutenção da hiperglicemia por longos períodos é responsável pelo desenvolvimento de complicações microvasculares e macrovasculares, desencadeadas principalmente pelo estresse glico-oxidativo, caracterizado pelo aumento na formação de produtos finais de glicação avançada (AGE). A pentoxifilina, um derivado de metilxantina que atua como um inibidor não-seletivo de fosfodiesterases, tem sido utilizada para o tratamento da claudicação intermitente. No entanto, estudos pré-clínicos indicam que a pentoxifilina é eficaz na promoção de melhorias na resistência à insulina e complicações associadas à obesidade. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com pentoxifilina em camundongos submetidos ao modelo de obesidade e resistência à insulina, com ênfase nas alterações de parâmetros fisiometabólicos, biomarcadores do estresse glico-oxidativo e da inflamação. Camundongos machos C57BL-6J foram alimentados durante 14 semanas com dieta padrão (P; 3,85 kcal/g, 4% lipídeos) ou com dieta hiperlipídica/hipercalórica (HL; 5,40 kcal/g; 35% de lipídeos). A partir da 7ª semana foram iniciados os tratamentos diários (*i.p.*) com veículo (salina 0,85%; grupos P e HL) ou com pentoxifilina (50 mg/kg; grupo HPTX), durante as próximas 7 semanas. Peso corporal e ingestão alimentar foram monitorados semanalmente. Nas 12ª e 13ª semanas foram realizados o teste de tolerância à glicose oral (TTGO) e o teste de tolerância à insulina (ITT), respectivamente. Na 14ª semana, os animais foram anestesiados, e em seguida, metade dos animais de cada grupo recebeu insulina (3,8 U/kg, *i.p.*) e a outra metade recebeu salina e, após 10 minutos dos respectivos estímulos, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca (obtenção de plasma) e foram removidos, pesados e congelados os tecidos adiposos brancos, o tecido adiposo marrom interescapular (iTAM) e o músculo esquelético *gastrocnemius* para o estudo das alterações na fosforilação de AKT (Ser-473), bem como o fígado e rins para diversas análises: (i) marcadores bioquímicos plasmáticos; (ii) biomarcadores inflamatórios no soro e rim (TNF- α , IL-6 e MCP-1); (iii) hormônios no soro (insulina, leptina e resistina); (iv) atividades das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) em fígado e rim, e paraoxonase 1 (PON 1) no plasma; (v) estimativa dos AGEs fluorescentes e (vi) substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em plasma, fígado e rim; (vii) conteúdo de triacilgliceróis no fígado e rim; (viii) nos rins foram realizadas análises histológicas e determinados os níveis proteicos do receptor de AGEs (RAGE), marcadores de apoptose (BAX e caspase-3), marcador de inflamação (NF- κ B), componentes relacionados à detoxificação de AGEs (GLO 1 e AGE-R1), sensores metabólicos (PGC-1 α e AMPK) e do fator de transcrição de enzimas antioxidantes (NRF 2); (ix) por fim, no iTAM foram analisados componentes do programa termogênico (PGC-1 α , AMPK, NRF 2, SIRT 1, UCP 1) e do marcador de inflamação (NF- κ B). Em comparação aos animais do grupo P, animais HL apresentaram: aumento no ganho de peso corporal e nas massas de tecidos adiposos, fígado e rim; aumento no conteúdo de triacilgliceróis no fígado e rim; aumento nos níveis de marcadores do estresse glico-oxidativo (TBARS e AGEs no plasma, fígado e rim); redução nas defesas antioxidantes endógenas (SOD, CAT, GSH-Px e PON 1); apresentaram intolerância à glicose, redução da sensibilidade à insulina e nos níveis de fosforilação de AKT estimulada por insulina nos tecidos adiposos e no músculo esquelético *gastrocnemius*; aumento nos níveis séricos de insulina, leptina, resistina, MCP-1 e TNF- α . Nos rins de animais HL, houve aumento na área glomerular; aumento nos níveis renais de MCP-1, TNF- α e IL-6; aumento nos níveis proteicos de RAGE, NF- κ B, BAX e caspase-3 clivada; redução nos níveis proteicos de NRF 2, AGE-R1 e nos níveis proteicos/fosforilação de AMPK (Thr 172), mas não observou-se alteração em GLO 1. No iTAM de animais HL, houve diminuição nos níveis de

SIRT 1 e nos níveis de fosforilação de AMPK, e aumento nos níveis de PGC-1 α , UCP 1 e NF- κ B, quando comparados aos animais do grupo P. Animais HPTX apresentaram menor ganho de peso corporal e menores massas dos tecidos adiposos, fígado e rim; redução no conteúdo de triacilgliceróis no fígado de rim; atenuação nas alterações morfológicas renais promovidas pela ingestão de dieta hiperlipídica; redução nos níveis dos biomarcadores do estresse glicoxidativo (TBARS e AGEs no plasma, fígado e rim), bem como aumento nas atividades de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GSH-Px e PON 1). O tratamento com pentoxifilina melhorou a tolerância à glicose, aumentou a sensibilidade à insulina e os níveis de fosforilação de AKT estimulada por insulina nos tecidos adiposos e no músculo esquelético *gastrocnemius*, além de reduzir os níveis séricos de insulina e leptina. Avanços foram conquistados na compreensão das ações protetoras da pentoxifilina nos rins de animais alimentados com dieta hiperlipídica, incluindo a redução de biomarcadores inflamatórios (TNF- α , MCP-1 e IL-6) e nos níveis proteicos de RAGE, BAX, caspase-3 e NF- κ B, e aumento nos níveis de fosforilação de AMPK (Thr 172); e em relação aos componentes de detoxificação de AGEs, animais HPTX apresentaram aumento nos níveis proteicos de GLO 1 e redução de AGE-R1. No iTAM de animais HPTX, houve o aumento nos níveis proteicos de componentes do programa termogênico (NRF 2, SIRT 1, UCP 1) e redução do NF- κ B. Em conjunto, os achados deste estudo apresentam evidências pré-clínicas que podem futuramente contribuir para o reposicionamento da pentoxifilina como uma opção para o tratamento da obesidade, diabetes mellitus e complicações associadas, com ênfase nas complicações renais.

Palavras-chave: obesidade; resistência à insulina; diabetes mellitus; estresse glico-oxidativo; pentoxifilina.

ABSTRACT

Obesity is considered a public health problem due to its increased prevalence and incidence worldwide, and is one main risk factor for the development of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus, both leading to hyperglycemia. The maintenance of hyperglycemia for long periods is responsible for the onset of microvascular and macrovascular complications, mainly triggered by glycoxidative stress, characterized by the increased generation of advanced glycation end products (AGEs). Pentoxifylline, a methylxanthine derivative that acts as a non-selective inhibitor of phosphodiesterases, has been used for the treatment of intermittent claudication. However, preclinical studies indicate that pentoxifylline is effective in promoting improvements in insulin resistance and complications associated with obesity. The objective of this study was to investigate with emphasis in the changes in physiometabolic parameters, biomarkers of glyco-oxidative stress and inflammation of mice under an experimental model of high-fat diet-induced obesity and treated with pentoxifylline. C57BL-6J male mice were fed a standard diet (P; 3.85 kcal/g, 4% lipids) or a high-fat/hypercaloric diet (HFD, 5.40 kcal/g, 35% lipid) for 14 weeks. Daily treatments (*i.p.*) were performed with vehicle (0.85% saline, P and HL groups) or with pentoxifylline (50 mg/kg, HPTX group) from the 7th week, during the next 7 weeks. Body weight and food intake were monitored weekly. At 12th and 13th weeks, the oral glucose tolerance test (OGTT) and the insulin tolerance test (ITT) were performed, respectively. At the 14th week, the animals were anesthetized, and then, half of the animals from each group received insulin (3.8 U/kg, *i.p.*) and the other half received saline and, after 10 minutes of the respective stimulus, blood samples were collected by cardiac puncture (to obtain plasma), white adipose tissues, interscapular brown adipose tissues (iBAT) and skeletal muscles *gastrocnemius* were removed, weighed and frozen for the study of the changes in the phosphorylation of AKT (Ser-473) as well as liver and kidneys for several analyzes: (i) plasma biochemical markers; (ii) serum and renal inflammatory biomarkers (TNF- α , IL-6 and MCP-1); (iii) serum hormonal (insulin, leptin and resistin); (iv) activities of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) in liver and kidney, and paraoxonase 1 (PON 1) in plasma; (v) estimation of fluorescent AGEs and (vi) thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in plasma, liver and kidney; (vii) triacylglycerol content in liver and kidney; (viii) in the kidneys were performed histological analysis and determined the protein levels of the AGE receptor (RAGE), markers of apoptosis (BAX and caspase-3), inflammation marker (NF- κ B), components related to the detoxification of AGEs (GLO 1 and AGE-R1), metabolic sensors (PGC-1 α and AMPK) and transcription factor for antioxidant enzymes and GLO 1 (NRF 2); (ix) finally, in the iBAT were analyzed components of the thermogenic program (PGC-1 α , AMPK, NRF 2, SIRT 1, UCP 1) and the inflammation marker (NF- κ B). In comparison to P animals, HL animals showed: increase in body weight gain and in the weights of adipose tissues, liver and kidney; increased levels of glycoxidative stress markers (TBARS and AGEs in plasma, liver and kidney); increased content of triacylglycerols in liver and kidney; reduction in endogenous antioxidant defenses (SOD, CAT, GSH-Px, and PON 1); HL animals showed glucose intolerance, reduced insulin sensitivity and phosphorylation levels of insulin-stimulated AKT in adipose tissues and skeletal muscle *gastrocnemius*; increased serum insulin, leptin, resistin levels; and increased renal TNF- α and MCP-1 levels. In the kidneys of HL animals, there was an increase in the glomerular area; increased renal levels of MCP-1, TNF- α and IL-6; increase in the protein levels of RAGE, NF- κ B, BAX and cleaved caspase-3, and reduction in the protein levels of NRF 2, AMPK protein levels/phosphorylation (Thr 172) and AGE-R1, however there was no change in GLO 1. In iBAT of HL animals, there was a reduction in the levels of SIRT 1 and in the AMPK phosphorylation, and an increase in the levels of PGC-1 α , UCP 1 and NF- κ B, when compared to P animals. HPTX animals had lower body weight gain, minor weights of adipose tissues,

liver and kidney, attenuation in renal morphological alterations caused by the ingestion of high-fat diet, as well as reduction in biomarkers of glycoxidative stress (TBARS and AGEs in plasma, liver and kidney), increases in the activities of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GSH-Px and PON 1). The treatment with pentoxifylline improved the insulin sensitivity, increased glucose tolerance and the phosphorylation levels of insulin-stimulated AKT in adipose tissues and skeletal muscle *gastrocnemius*, as well as reducing serum insulin and leptin levels. Advances were achieved in the understanding of the protective actions of pentoxifylline in kidneys of animals fed a high-fat diet, including reduction of inflammatory biomarkers (TNF- α , MCP-1 and IL-6) and protein levels of the receptor RAGE, BAX, caspase-3 and NF- κ B, and increase in AMPK phosphorylation levels (Thr 172); about AGE detoxification-related components, HPTX animals showed increased GLO 1 protein levels and reduced AGE-R1. There was an increase in the protein levels of NRF 2, SIRT 1 and UCP 1, and reduction of NF- κ B in iBAT of HPTX animals. Taken together, the findings of this study indicate preclinical evidence that may contribute, in the future, to repositioning pentoxifylline as an option for the treatment of obesity, diabetes mellitus and associated complications, with emphasis on renal complications.

Keywords: obesity; insulin resistance; diabetes mellitus; glycoxidative stress; pentoxifylline.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia de um glomérulo renal saudável (A) e glomérulo renal com mudanças estruturais na doença renal crônica (DRC) (B).....	31
Figura 2. Espécies reativas e sistemas antioxidantes.....	35
Figura 3. Formação de compostos dicarbonílicos e produtos finais de glicação avançada (AGEs).....	37
Figura 4. Estruturas moleculares da pentoxifilina e seus metabólitos (M).....	42
Figura 5. Curva de calibração de 1,1'3,3'-tetrametoxipropano em espectrofluorímetro (A) e em espectrofotômetro (B).....	54
Figura 6. Curva de calibração de albumina bovina sérica para dosagem de proteínas totais no plasma e dos sobrenadantes dos tecidos analisados.....	56
Figura 7. Curva de calibração de albumina bovina sérica para dosagem de proteínas totais na urina de 24 horas.....	57
Figura 8. Curva de calibração de triacilglicerol.....	59
Figura 9. Evolução do peso corporal (A), ganho de peso corporal total (B), massa dos tecidos adiposos brancos epididimal (C) e retroperitoneal (D) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....	61
Figura 10. Teste tolerância à glicose oral (A), AUC da glicemia no TTGO (B) e glicemia de jejum de 12 horas (C) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....	63
Figura 11. Níveis de TBARS no plasma (A), fígado (B) e rim (C) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....	65
Figura 12. Estimativa dos AGEs fluorescentes no plasma de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....	66
Figura 13. Atividade da paraoxonase 1 no plasma de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....	66

Figura 14. Evolução do peso corporal (A), ganho de peso corporal total (B), ingestão alimentar (C) e ingestão energética média (D) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....	69
Figura 15. Massas (mg) dos tecidos adiposos branco retroperitoneal (A), epididimal (B), subcutâneo (C) e tecido adiposo marrom interescapular (D) corrigidos pelo comprimento da tibia (mm) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....	70
Figura 16. Conteúdo de triacilgliceróis no rim (A) e no fígado (B) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....	72
Figura 17. Níveis séricos de insulina (A), leptina (B) e resistina (C) de animais alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....	73
Figura 18. Níveis séricos de TNF- α (A), IL-6 (B) e MCP-1 (C) de animais alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....	74
Figura 19. Teste de tolerância à glicose oral (A), AUC da glicemia no TTGO (B), glicemia de jejum de 12 horas (C), teste de tolerância à insulina (D), AUC da glicemia no ITT (E) glicemia de jejum de 6 horas (F) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....	76
Figura 20. Fosforilação da AKT (basal e estimulada por insulina) nos tecidos adiposos brancos epididimal (A), subcutâneo (B) e no tecido adiposo marrom interescapular (C) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....	78
Figura 21. Fosforilação da AKT (basal e estimulada por insulina) no musculo esquelético <i>gastrocnemius</i> de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....	79
Figura 22. Estimativa dos AGEs fluorescentes (A), níveis de frutossamina (B), níveis de TBARS (C) e atividade de PON 1 (D) no plasma de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina	80

Figura 23. Estimativa dos AGEs fluorescentes (A), níveis de TBARS (B) e atividades das enzimas antioxidantes SOD (C), CAT (D) e GSH-Px (E) no fígado de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....**81**

Figura 24. Imagens representativas de cortes histológicos de rins corados em H&E (ampliação de 400x) (A); células tubulares vacuolizadas (setas) (B); glomérulo (C); densidade (%) de túbulos contendo células vacuolizadas (D); área glomerular (E) e relação de proteína total e creatinina urinária (F) de animais alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....**83**

Figura 25. Estimativa dos AGEs fluorescentes (A) e níveis de TBARS (B) nos rins de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....**84**

Figura 26. Níveis de TNF- α (A), IL-6 (B) e MCP-1 (C) nos rins de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....**85**

Figura 27. Atividade das enzimas antioxidantes SOD (A), CAT (B) e GSH-Px (C) nos rins de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....**86**

Figura 28. Efeito da pentoxifilina (1 mM) e aminoguanidina (1 mM) sobre a estimativa da formação de AGEs fluorescentes *in vitro*, nas incubações de BSA na presença de glicose nas concentrações de 160 mM (A) e de 500 mM (B), após 14 dias.....**88**

Figura 29. Níveis proteicos do receptor RAGE (A), do fator de transcrição nuclear NF- κ B (B), dos efetores de apoptose BAX (C) e caspase-3 clivada (D) nos rins de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....**89**

Figura 30. Níveis proteicos de p-AMPK/AMPK (A), PGC-1 α (B), SIRT 1 (B), NRF 2 (C), GLO 1 (D) e AGER-R1 (E) nos rins de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....**91**

Figura 31. Níveis proteicos do receptor do fator de transcrição nuclear NF- κ B (A), SIRT 1 (B), p-AMPK/AMPK (C), PGC-1 α (D), NRF 2 (E) e UCP 1 (F) no tecido adiposo marrom interescapular de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....**93**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas padrão (P) e hiperlipídica (HL).....	48
Tabela 2. Parâmetros bioquímicos plasmáticos de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....	62
Tabela 3. Massas do músculo esquelético <i>gastrocnemius</i> , fígado, coração e rim (mg) corrigidas pelo comprimento da tíbia (mm) de animais alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....	71
Tabela 4. Níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol HDL, triacilgliceróis, ALT, ALP, ácido úrico, creatinina e albumina de animais alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA carboxilase
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
AGE-R1	<i>AGE receptor R1</i>
AGL	Ácidos graxos livres
AKT	Proteína quinase B
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AMP	Adenosina monofosfato
AMPC	Adenosina 3,5-monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
ApoB	Apolipoproteína B
ATGL	<i>Adipose triglyceride lipase</i>
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
BAX	Proteína X associada a bcl-2
BSA	Albumina sérica bovina
CAMKKβ	Proteína quinase dependente de Ca ²⁺ /calmodulina β
CAT	Catalase
CD36	Ácido graxo translocase
CETP	Proteína de transferência de éster de colesterol
CRE	Elemento regulador do AMPC
CREB	Proteína de ligação responsiva ao AMPC
DDOST	<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide</i>
DM	Diabetes mellitus
DRC	Doença renal crônica
EPAC	<i>Exchange Protein Activated by cAMP</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FADH₂	Flavina adenina dinucleotídeo na forma reduzida
FATP	Proteína transportadora de ácidos graxos
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLO 1	Glioxalase 1

GLUT	Transportador de glicose
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GSH	Glutathiona reduzida
GSH-Rd	Glutathiona redutase
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IKK-β	Ikappa quinase beta
IL-1β	Interleucina-1β
IL-6	Interleucina-6
IR	Receptor de insulina
IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
ITT	Teste de tolerância à insulina
JNK	c-Jun N-terminal quinase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LHS	Lipase hormônio sensível
LKB1	Quinase B1 do fígado
MAPK	Proteína ativada por mitogênio p38 quinase
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito do tipo 1
MEC	Matriz extracelular
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida
NAFLD	<i>Nonalcoholic fatty liver disease</i>
NASH	<i>Nonalcoholic steatohepatitis</i>
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NRF 2	Fator nuclear eritróide 2
PDE	Inibidor de fosfodiesterase
PGC-1α	Coativador-1 alfa do receptor ativado por PPAR gama

PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase C
PNPLA3	<i>Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3</i>
PON 1	Paraoxonase 1
PPA2	Proteína fosfatase A2
PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma
QM	Quilomicron
RAGE	<i>Receptor for AGEs</i>
RE	Retículo endoplasmático
SIRT 1	Sirtuína 1
SOD	Superóxido dismutase
SREBP	Proteína 1c ligadora do elemento regulatório de esterol
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TFG	Taxa de filtração glomerular
TGF-β	Fator de crescimento transformador-β
TLR 4	<i>Toll like receptor 4</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
TTGO	Teste de tolerância à glicose oral
UCP 1	Proteína desacopladora 1
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
VEGF-β	Fator de crescimento endotelial-β
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 Tecidos adiposos branco e marrom	24
2.2 Adipocinas.....	25
2.3 Obesidade e resistência à insulina	27
2.4 Lipotoxicidade e disfunção renal.....	30
2.5 Estresse glico-oxidativo no diabetes mellitus e na obesidade	34
2.6 Pentoxifilina.....	41
3. OBJETIVOS	46
3.1 Objetivo Geral	46
3.2 Objetivos Específicos	46
4. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 Animais, dietas e desenho experimental.....	47
4.1.1 Experimento piloto: definição de dose de pentoxifilina (25, 50 ou 100 mg/kg) em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica	47
4.1.2 Experimento definitivo: efeitos do tratamento com pentoxifilina (50 mg/kg) em parâmetros fisiometabólicos e biomarcadores do estresse glico-oxidativo em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.	49
4.2 Análise histológica.....	51
4.3 Biomarcadores do metabolismo de carboidratos, lipídeos e função hepática e renal	51
4.4 Hormônios e biomarcadores inflamatórios.....	53
4.5 Níveis plasmáticos de frutossamina.....	53
4.6 Biomarcador de peroxidação lipídica	53
4.7 Atividades de enzimas antioxidantes.....	54

4.7.1 Preparo das amostras para determinação das atividades das enzimas antioxidantes, SOD, CAT e GSH-Px.....	54
4.7.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD)	54
4.7.3 Atividade da catalase (CAT)	54
4.7.4 Atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px)	55
4.7.5 Atividade da paraoxonase (PON 1)	55
4.8 Estimativa dos produtos finais de glicação avançada (AGEs)	55
4.9 Dosagem de proteínas totais no plasma e dos sobrenadantes dos tecidos analisados	56
4.10 Dosagem de proteínas totais na urina de 24 horas.....	56
4.11 Western blotting.....	57
4.12 Estudo do potencial antiglicação da pentoxifilina via sistema-modelo de glicação <i>in vitro</i>	58
4.13 Conteúdo tecidual de triacilgliceróis.....	58
4.14 Análise estatística	59

5. RESULTADOS 60

5.1 Experimento piloto: Avaliação de parâmetros fisiometabólicos e de biomarcadores do estresse glico-oxidativo em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados pentoxifilina (25, 50 e 100 mg/kg).....	60
5.1.1 Parâmetros fisiológicos.....	60
5.1.2 Parâmetros bioquímicos plasmáticos.....	61
5.1.3 Teste de tolerância à glicose oral	62
5.1.4 Marcadores de estresse glico-oxidativo e atividade da enzima antioxidante PON 1	64
5.2 Experimento definitivo: Avaliação de parâmetros fisiometabólicos e biomarcadores do estresse glico-oxidativo em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com pentoxifilina (50 mg/kg)	68
5.2.1 Parâmetros fisiológicos.....	68
5.2.2 Parâmetros bioquímicos plasmáticos, hormonais e inflamatórios.....	71
5.2.3 Caracterização da intolerância à glicose e sensibilidade à insulina.....	74

5.2.4 Níveis de fosforilação de AKT em tecidos adiposos brancos epididimal e subcutâneo, tecido adiposo marrom interescapular e no músculo esquelético <i>gastrocnemius</i>	77
5.2.5 Parâmetros relacionados a inflamação, estresse glico-oxidativo e potencial antioxidante.....	79
5.2.6 Estudo do potencial antiglicação da pentoxifilina em sistema-modelo de glicação proteica em <i>in vitro</i>	86
5.2.7 Efeito da pentoxifilina nos componentes relacionados à via da sinalização do receptor RAGE em rins de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica	88
5.2.8 Efeito da pentoxifilina em componentes relacionados aos sensores metabólicos e à detoxificação dos AGEs em rins de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica	90
5.2.9 Efeito da pentoxifilina em componentes relacionados ao programa termogênico no tecido adiposo marrom interescapular de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica	92
6. DISCUSSÃO	94
7. CONCLUSÕES.....	112
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
9. ANEXOS	135

1. INTRODUÇÃO

O desequilíbrio energético entre a quantidade de calorias consumidas e a quantidade de calorias gastas em geral contribui para a instalação do excesso de peso corporal e da obesidade (SAMPLE et al., 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Nas últimas décadas houve uma grande mudança no padrão alimentar da população em geral, que substituiu a alimentação tradicional, constituída principalmente por cereais, verduras e carnes, por alimentos ultraprocessados, ricos em energia e gorduras saturadas. Outro componente comportamental é a atividade física, condicionado também por fatores socioeconômicos e culturais, onde adotou-se um estilo de vida sedentário, inclusive nas muitas formas de trabalho, lazer e tipos de transporte (VANDEVIJVERE et al., 2015). Além destes fatores, a obesidade tem outras causas que incluem os fatores genéticos e fisiológicos (ALBUQUERQUE et al., 2017).

Atualmente, a obesidade é considerada um problema de saúde pública devido a sua alta prevalência e incidência mundiais. Pesquisa realizada pela Organização Mundial da Saúde (WHO, *World Health Organization*) indica que o número de casos de obesidade ao redor do mundo quase triplicou nos últimos 40 anos. Em 2016, a WHO estimou que 1,9 bilhão de adultos tinham sobrepeso, sendo que destes mais de 650 milhões eram obesos. Vale ressaltar o drástico aumento de crianças e adolescentes com sobrepeso e obesidade, de 4% em 1975 para cerca de 18% em 2016; 41 milhões de crianças com idade inferior a 5 anos encontram-se neste contexto (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). De acordo com dados do Ministério da Saúde, nos últimos 10 anos no Brasil houve um aumento de 26% nos casos de indivíduos com excesso de peso e de 60% com obesidade (BRASIL, 2018).

A obesidade é um fator de risco para diversas patologias e comorbidades, incluindo síndrome metabólica, doença renal crônica (DRC), doença cardiovascular, diabetes mellitus (DM) tipo 2, certos tipos de câncer, doença hepática gordurosa não alcoólica (*nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD), dentre outros. Além disso, as consequências psicológicas devido ao estigma ou discriminação do elevado peso corporal estão associadas à depressão, ansiedade e bulimia (WILLIAMS et al., 2015). Para a sociedade, estas doenças associadas à obesidade exigem altos gastos com saúde pública, e ainda acarretam na perda de qualidade de vida e redução no crescimento econômico (TREMMELE et al., 2017).

Diante disso, a prevenção e o tratamento da obesidade são cruciais. Na clínica, a terapia nutricional é comumente utilizada (dietas hipocalóricas e atividade física), em conjunto com o uso de fármacos que controlam o apetite e/ou alteram a absorção de nutrientes (MONTEIRO,

2014). Em adição, produtos de origem natural também têm sido utilizados como suplemento alimentar para contribuir na perda de peso; dentre estes, podemos citar as metilxantinas (cafeína, teobromina, teofilina), que tem apresentado um crescente interesse em pesquisas visando a comprovação da sua eficácia na promoção de perda de peso corporal (CARRAGETA et al., 2018).

A pentoxifilina é um derivado de metilxantina e tem sido utilizada na clínica para o tratamento dos sintomas associados à claudicação intermitente (RALL, 1990). No entanto, evidências recentes indicam efeitos benéficos deste fármaco em diversas desordens metabólicas (ZHANG et al., 2004; ACEDO et al., 2015, ARCARO et al., 2018). Diante das diversas propriedades farmacológicas da pentoxifilina em potencial, esta torna-se um interessante candidato para o reposicionamento de fármacos, uma proposta da indústria farmacêutica para a descoberta de novos usos terapêuticos de medicamentos já prescritos, visando redução de riscos, tempo e gastos com o desenvolvimento de pesquisas (KHANAPURE; CHUKI; DE SOUSA, 2014).

Apesar de novos compostos terem sido recentemente identificados para o tratamento da obesidade, as opções farmacológicas permanecem ainda bastante limitadas (MONTEIRO, 2014). Assim, torna-se importante a investigação das ações da pentoxifilina quanto ao seu potencial anti-obesogênico e quanto a sua efetividade na prevenção/tratamento de complicações associadas. Utilizando um modelo experimental de obesidade e resistência à insulina induzido por dieta hiperlipídica em camundongos, podemos contribuir com evidências para o reposicionamento da pentoxifilina. O modelo experimental escolhido tem sido utilizado por muitos estudos pré-clínicos, uma vez que mimetiza a fisiopatologia e as comorbidades da obesidade em humanos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tecidos adiposos branco e marrom

O tecido adiposo é um órgão central na regulação da homeostase energética no organismo. Em comparação a outros órgãos e tecidos do corpo, o tecido adiposo apresenta a capacidade única de armazenamento do excesso de energia na forma de triacilgliceróis nos adipócitos (LUO; LIU, 2016).

Há dois principais tipos de tecidos adiposos. O tecido adiposo branco (TAB) é especializado no armazenamento de energia na forma de triacilgliceróis (GESTA; TSENG; KAHN, 2007), e o tecido adiposo marrom (TAM) tem papel fundamental no controle da temperatura corporal, além de influenciar no peso corporal, pois faz a conversão de energia química de biomoléculas, principalmente ácidos graxos e glicose, em energia térmica (CELI; LE; NI, 2015). O TAB pode diferenciar-se em TAM, formando o tecido adiposo bege pelo processo conhecido como *browning*, e tem como uma das principais características o aumento na expressão da proteína desacopladora 1 (UCP 1) e do coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PGC-1 α) (MONTANARI; POŠĆIĆ; COLITTI, 2017).

Nos seres humanos, o TAB localizado ao redor de órgãos internos é subdividido em dois tipos de depósitos de gordura, o TAB subcutâneo e o TAB visceral. O TAB visceral está localizado preferencialmente na cavidade abdominal e encontra-se intimamente associado às complicações metabólicas, tais como resistência à insulina e DM tipo 2. Extrapolando para a anatomia em roedores, parte do TAB visceral em humanos é considerado o TAB epididimal (eTAB) nos roedores machos, localizado ao redor dos testículos, enquanto que o TAB subcutâneo (sTAB) está localizado na região posterior inguinal (CHOE et al., 2016). Em camundongos, o TAM localiza-se principalmente na região interescapular (iTAM) (CANNON; NEDERGAARD, 2004); já em humanos, é encontrado em maiores quantidades em recém-nascidos, sendo substituído por TAB com o envelhecimento (CHOE et al., 2016).

O TAM possui alta concentração de mitocôndrias que expressam a proteína UCP 1, presente na membrana interna da mitocôndria como componente da cadeia transportadora de elétrons. A UCP 1 tem a função de dissipar, na forma de calor, o gradiente eletroquímico de prótons gerado pela cadeia transportadora de elétrons, via processo denominado termogênese (CANNON; NEDERGAARD, 2004; TOWNSEND; TSENG, 2012). A ativação do TAM após exposição a um ambiente frio, ocorre através do sistema nervoso simpático, com a liberação de

noradrenalina que, ao se ligar nos receptores β -adrenérgicos, ativa vias de sinalização intracelulares que culminam no aumento dos níveis intracelulares de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). Este segundo mensageiro é o responsável por ativar a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), que fosforila e ativa a enzima lipase hormônio sensível (LHS), responsável por hidrolisar os estoques intracelulares de triacilgliceróis em ácidos graxos livres (AGL), os quais são transportados para a matriz mitocondrial e oxidados via β -oxidação. A oxidação destes lipídeos no TAM é um dos principais indutores da termogênese. A ativação de PKA também estimula a transcrição de UCP 1 pela ativação do fator de transcrição CREB (proteína de ligação responsiva ao AMPc) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK p38); CREB liga-se a região promotora do gene UCP 1, denominado de elemento regulador do AMPc (CRE), enquanto a jusante MAPK p38 fosforila PGC-1 α e sua translocação para o núcleo aonde estimulará a expressão de UCP 1 (TOWNSEND; TSENG, 2012).

Outro mecanismo promotor da termogênese ocorre pelo estímulo à biogênese mitocondrial, ativado por estresse celular ou em resposta a estímulos ambientais (BHATTI, BHATTI; REDDY, 2017). A formação de novas mitocôndrias ocorre principalmente via coativador PGC-1 α , pela interação com diversos fatores de transcrição, dentre eles o fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (NRF 2) o responsável pela transcrição de genes cujo produtos proteicos são necessários para a regulação da biogênese mitocondrial, respiração celular, β -oxidação de ácidos graxos, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa (BHARGAVA; SCHNELLMANN, 2017). Em condições de restrição calórica e exercício físico ocorre o aumento do conteúdo de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) nos tecidos, ativando assim a sirtuína 1 (SIRT 1), e o aumento na relação AMP/ATP (adenosina monofosfato/adenosina trifosfato) ativando a proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK). AMPK e SIRT 1 são dois importantes sensores metabólicos reguladores da biogênese mitocondrial e da termogênese, via fosforilação e desacetilação do PGC-1 α , respectivamente (BHATTI; BHATTI; REDDY, 2017).

2.2 Adipocinas

O tecido adiposo também desempenha função endócrina e moduladora da resposta imune, uma vez que produz e secreta moléculas bioativas denominadas adipocinas. As adipocinas são classificadas como hormônios, fatores de crescimento, fatores angiogênicos e citocinas (PEREIRA; ALVAREZ-LEITE, 2014). A disfunção do tecido adiposo observada na obesidade culmina em desregulação na produção e secreção das adipocinas, podendo contribuir

para a patogênese das complicações relacionadas à obesidade (OUCHI et al., 2011). Dentre as principais adipocinas que tipicamente participam da instalação da obesidade e de doenças metabólicas, podemos citar a leptina, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), resistina e proteína quimiotática de monócito do tipo 1 (MCP-1 ou CCL2). Embora em menor quantidade, o tecido adiposo também produz e secreta adipocinas anti-inflamatórias, tais como adiponectina, IL-10 e SFRP5 (*frizzled-related protein 5*) (OUCHI et al., 2011).

As adipocinas atuam de forma parácrina, autócrina e endócrina, influenciando na secreção de outras citocinas e quimiocinas, fatores hormonais e de crescimento, além de interferir nas ações de insulina e no metabolismo de lipídeos e glicose (PEREIRA; ALVAREZ-LEITE, 2014); suas ações são mediadas principalmente pela ligação aos seus respectivos receptores de membrana, presente nas células-alvo, e desencadeando vias de sinalização intracelulares (LUO; LIU, 2016).

A leptina é um hormônio produzido predominantemente pelo tecido adiposo branco em relação proporcional e direta à massa corporal (PEREIRA; ALVAREZ-LEITE, 2014). Pequenas elevações nos níveis circulantes de leptina promovem redução da ingestão alimentar e conseqüentemente do gasto energético, através da ligação em seu receptor altamente expresso no núcleo arqueado do hipotálamo, um centro primário de controle do apetite (GRUZDEVA et al., 2019; PEREIRA; ALVAREZ-LEITE, 2014). Os receptores de leptina também são expressos em outros tecidos, tais como pulmão, fígado, baço, rins, glândula adrenal e tecidos reprodutivos (HARRIS, 2014). No entanto, na obesidade, apesar do aumento nas concentrações plasmáticas de leptina (hiperleptinemia), o seu efeito anoréxico está diminuído devido ao desenvolvimento de resistência à leptina (KNIGHT et al., 2010), podendo estar relacionado a defeitos no receptor da leptina, na sinalização intracelular ou à diminuição do transporte de leptina pela barreira hematoencefálica (GRUZDEVA et al., 2019; PEREIRA; ALVAREZ-LEITE, 2014). O tratamento de pacientes obesos com leptina não é capaz de promover a perda de peso corporal, devido a maioria destes indivíduos exibirem resistência à leptina. No entanto, medicamentos que melhoram a sensibilidade à leptina são potenciais alvos de estudo no tratamento da obesidade (PEREIRA; ALVAREZ-LEITE, 2014).

A resistina é um hormônio conhecido por promover resistência à insulina e inflamação (PEREIRA; ALVAREZ-LEITE, 2014). Estudos apontam que a síntese de resistina em roedores ocorre de forma restrita nos adipócitos, enquanto que em humanos é produzida principalmente por macrófagos e monócitos (OUCHI et al., 2011). Os mecanismos de ação da resistina ainda não estão totalmente elucidados. Os prováveis receptores da resistina são um fragmento da decorina e o receptor do tipo *toll-like-4* (TLR-4), sendo os principais órgãos-alvo o fígado, o

tecido adiposo e o músculo esquelético (PEREIRA; ALVAREZ-LEITE, 2014). O tratamento de adipócitos 3T3-L1 com resistina atenuou a ativação de várias proteínas da via de sinalização da insulina, dentre elas a fosforilação do receptor de insulina (IR), a fosforilação do substrato de receptor de insulina 1 (IRS-1), a ativação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e a ativação da proteína quinase B (PKB ou AKT). Além disso, o tratamento com resistina marcadamente estimula a expressão gênica do supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS-3), um conhecido inibidor da sinalização de insulina (STEPPAN et al., 2005). A resistina também induz a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, TNF- α e MCP-1, via ativação de fatores de transcrição, incluindo o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), bem como via ativação da proteína ativada por MAPK p38 (CODONER-FRANCH; ALONSO-IGLESIAS, 2015). Como os níveis de resistina estão elevados em vários modelos animais de obesidade, ela é uma adipocina alvo para os estudos de descoberta de fármacos sensibilizadores das ações da insulina com potencial para o tratamento do DM associado à obesidade (SCHWARTZ; LAZAR, 2011).

2.3 Obesidade e resistência à insulina

A obesidade está entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento da resistência à insulina e do DM tipo 2, onde cerca de 90% dos casos de DM é atribuído ao excesso de peso corporal (HOSSAIN; KAWAR; EL NAHAS, 2007). A resistência à insulina caracteriza-se pela redução da capacidade dos tecidos sensíveis à insulina de regularem a homeostase do metabolismo energético quando o hormônio é secretado em níveis normalmente suficientes. A combinação entre dislipidemia e a progressão da hiperglicemia devido ao estabelecimento da resistência à insulina favorece a disfunção das células β pancreáticas, com progressiva deterioração de sua função e promoção de apoptose celular, tornando-as incapazes de secretar quantidades adequadas do hormônio. Diante disso, instala-se definitivamente o quadro de DM tipo 2 (CEFALU, 2001).

O acúmulo de lipídeos nos tecidos adiposos ocorre pela combinação entre a ingestão excessiva de calorias e o estilo de vida sedentário, causando assim a deposição do excesso de energia nos adipócitos na forma de triacilgliceróis, com subsequente hipertrofia adipocítica (SAMPLE et al., 2015). A expansão do tecido adiposo impede o suprimento local de oxigênio de forma adequada, gerando focos de hipóxia e conseqüentemente ocorre a ativação de vias de estresse intracelular e a liberação de fatores proteicos, incluindo MCP-1, que exerce atividade quimioatrativa dos macrófagos M1. Estes macrófagos exibem fenótipo pró-inflamatório,

secretando citocinas, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6 que, por sua vez, desencadeiam resposta inflamatória (LUCA; OLEFSKY, 2008; SALTIEL; OLEFSKY, 2017). Estas citocinas pró-inflamatórias encontram-se associadas a efeitos inibitórios sobre a via de sinalização da insulina (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; REHMAN; AKASH, 2016).

Em adipócitos e células musculares, o disparo da via de sinalização do TNF- α leva à ativação das proteínas quinases Ikappa quinase beta (IKK β) e c-Jun N-terminal quinase (JNK), que promovem a fosforilação de IRS-1 em resíduos de serina, prejudicando a ativação da AKT 2 que, por sua vez, não estimula a translocação das vesículas contendo os transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT 4) para as membranas plasmáticas das células na musculatura esquelética e tecidos adiposos, deste modo prejudicando a captação de glicose. O comprometimento desta via é um importante indicador da instalação de resistência à insulina nos tecidos periféricos, culminando no aumento dos níveis circulantes de glicose (SAMUEL; SHULMAN, 2012; PETERSEN; SHULMAN, 2018). Além disso, o TNF- α estimula a lipólise dos triacilgliceróis nos adipócitos, liberando AGL na circulação. Os AGL saturados podem se ligar ao receptor TLR 4 e assim ativar a via JNK/IKK β /NF- κ B em macrófagos, adipócitos, células musculares e hepatócitos. A ativação da proteína IKK β promove a degradação do I κ B e conseqüentemente a dissociação do complexo I κ B/NF- κ B no citoplasma, permitindo a translocação do fator de transcrição NF- κ B até o núcleo da célula, evento este que culmina no aumento da transcrição de citocinas pró-inflamatórias (SAMUEL; SHULMAN, 2012; PETERSEN; SHULMAN, 2018). Deste modo, estabelece-se um círculo vicioso que agrava o *status* inflamatório sistêmico (MAURY; BRICHARD, 2010).

Os AGL gerados a partir da lipólise dos triacilgliceróis armazenados nos adipócitos ou aqueles provenientes da dieta como produtos da hidrólise de triacilgliceróis presentes em quilomícrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) ou lipoproteína de densidade intermediária (IDL), podem ser esterificados em triacilgliceróis e acumularem-se em outros órgãos e tecidos não adiposos, incluindo rins, músculo esquelético, fígado, coração e pâncreas (MAURY; BRICHARD, 2010; SAMUEL; SHULMAN, 2012). Este acúmulo ectópico de lipídeos, especialmente no músculo esquelético e no fígado, órgãos importantes na manutenção da homeostase da glicose, também contribui para a instalação da resistência insulínica, principalmente via formação de metabólitos de triacilgliceróis, incluindo o diacilglicerol e a ceramida. Diacilglicerol e ceramidas são intermediários lipídicos também conhecidos por atuarem como segundos mensageiros em vias de sinalização intracelulares. Estes metabólitos podem ser provenientes dos depósitos intracelulares de lipídeos, sendo sua concentração modulada pelas enzimas ATGL (*adipose triglyceride lipase*) e PNPLA3 (*patatin-like*

phospholipase domain-containing protein 3), ou podem ainda ser sintetizados a partir dos AGL que, ao alcançarem o citoplasma das células, são rapidamente esterificados com coenzima A, gerando moléculas de acil-CoA graxo. As moléculas de acil-CoA graxo são sucessivamente transferidas para uma molécula de glicerol-3-fosfato para formar os triacilgliceróis, ou também as moléculas de acil-CoA graxo podem ser esterificadas com a esfingosina, tendo como produto final moléculas de ceramida (SAMUEL; SHULMAN, 2012). Diacilglicerol e ceramida atuam como moduladores alostéricos positivos da proteína quinase C (PKC) e/ou IKK β e JNK quinases, e estas quinases ativadas causam inibição da cascata de sinalização de insulina (CASTRO et al., 2014; STINKENS et al., 2015).

A família da PKC compreende um grupo de 10 isoenzimas que são classificadas em três grupos, de acordo com a sua estrutura e característica de ativação. As PKCs convencionais (cPKC: PKC α , PKC β I, PKC β II e PKC γ) requerem para a sua ativação cálcio e diacilglicerol. As PKCs “novas” (nPKC: PKC δ , PKC ϵ , PKC η e PKC θ) requerem apenas o diacilglicerol. As PKCs atípicas (aPKC: PKC ζ e PKC λ) não requerem cálcio, nem o diacilglicerol (MIYAKE et al., 2009).

A ativação de nPKCs, mediada por diacilglicerol, culmina em inibição da sinalização da insulina. Estudos indicam que a resistência à insulina induzida por lipídeos no músculo esquelético conta com a ativação de PKC θ , enquanto que no fígado envolve a participação da isoforma PKC ϵ . A PKC θ está associada com a promoção de aumento na fosforilação inibitória de IRS-1, em resíduo de serina-1101, prejudicando a fosforilação estimulatória em resíduos de tirosina. A PKC ϵ inibe a cascata de sinalização da insulina via fosforilação de IR em resíduo de treonina-1160 (inibitória), presente no domínio tirosina quinase do IR (SAMUEL; SHULMAN, 2012; PETERSEN; SHULMAN, 2018).

Estudos sobre a resistência à insulina induzida por ceramidas no músculo esquelético enfatizam como mecanismo primário sua ação inibitória sobre a proteína quinase AKT 2, seja por aumentar a ativação da proteína fosfatase A2 (PPA2) ou por impedir a ativação da AKT 2 estimulada pela insulina. Normalmente, PKC ζ e AKT 2 encontram-se associadas intracelularmente, mas se dissociam após o estímulo à sinalização da insulina; ceramidas agem prejudicando essa dissociação. Assim, a não ativação da AKT 2 limita a translocação de vesículas contendo GLUT 4 para a membrana plasmática, resultando em menor captação de glicose no músculo esquelético. No fígado, ceramidas também inibem a AKT 2 via PPA2 e PKC ζ . Além disso, também podemos citar que a inibição da AKT 2 no fígado induz o aumento

na expressão de enzimas-chave da gliconeogênese, bem como há uma diminuição na síntese de glicogênio hepático (SAMUEL; SHULMAN, 2012; PETERSEN; SHULMAN, 2018).

Todos estes mecanismos acima descritos promotores de resistência à insulina em músculos esqueléticos e fígado que contam com a participação de lipídeos (triacilglicerol e ácidos graxos) e seus metabólitos é denominado como lipotoxicidade. Porém, a lipotoxicidade, além de causar a resistência à insulina, também contribui para o estabelecimento da disfunção de vários órgãos, tal como será descrito no item seguinte (SCHAFFER, 2003; VAN HERPEN; SCHRAUWEN-HINDERLING, 2008; STINKENS et al., 2015).

2.4 Lipotoxicidade e disfunção renal

A lipotoxicidade tem sido associada a diversas doenças ou complicações metabólicas, tais como NAFLD, doenças cardiovasculares, disfunção das células β pancreáticas e resistência à insulina (STINKENS et al., 2015). Dentre elas também podemos citar a DRC, principal causa de morte devido às complicações diabéticas (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017); sabe-se que a obesidade tem papel fundamental e um fator de risco independente na instalação desta doença (WANG et al., 2008; SCHWEITZER et al., 2019).

A DRC é definida como uma anormalidade da estrutura ou da função renal, presente por um período igual ou superior a três meses (ISAKOVA et al., 2017). Clinicamente, a DRC é caracterizada pela diminuição na velocidade (taxa) de filtração glomerular (TFG; < 60 mL/min/1,73m) e/ou pelo aumento na excreção urinária de albumina (EUA; > 30 mg/24h) (ISAKOVA et al., 2017; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Alterações na estrutura renal são caracterizadas pelo acúmulo de componentes de matriz extracelular (MEC), tais como colágeno e fibronectina, resultando no espessamento da membrana basal glomerular e dos capilares, perda de fenestrações endoteliais, expansão das células mesangiais, hipertrofia e perda de podócitos, e esclerose e fibrose glomerulares, levando ao declínio progressivo da TGF e aumento da proteinúria, e conseqüentemente instalação da disfunção renal (Figura 1) (MENG et al., 2015; ALICIC; ROONEY; TUTTLE, 2017).

A fibrose renal é caracterizada pelo acúmulo excessivo de MEC. Estudos indicam que os processos iniciais para o estabelecimento de fibrose no rim incluem inflamação e lesões nas células do epitélio renal, induzidas principalmente por altos níveis de glicose e AGL circulantes. Com a lesão das células epiteliais, ocorre o influxo de células do sistema imune para a regeneração dos danos celulares; quando a lesão não pode ser reparada, as células epiteliais entram em apoptose celular. No processo de fibrose, as células epiteliais também podem liberar

fatores parácrinos, incluindo fator de crescimento transformador- β (TGF- β), fator de crescimento de tecido conjuntivo, fator de crescimento fibroblástico, fator de crescimento derivado de plaquetas, IL-1, TNF- α , angiotensina II e aldosterona, que são responsáveis por ativar os fibroblastos, células responsáveis pela produção de componentes de MEC. O TGF- β age em diferentes tipos de células renais, promovendo a proliferação de células mesangiais, aumento na produção de MEC ou induzindo a eliminação de células epiteliais tubulares e podócitos. Acredita-se que o TGF- β é o principal responsável pela promoção de fibrose no rim, principalmente via sinalização da proteína Smad (MENG et al., 2015).

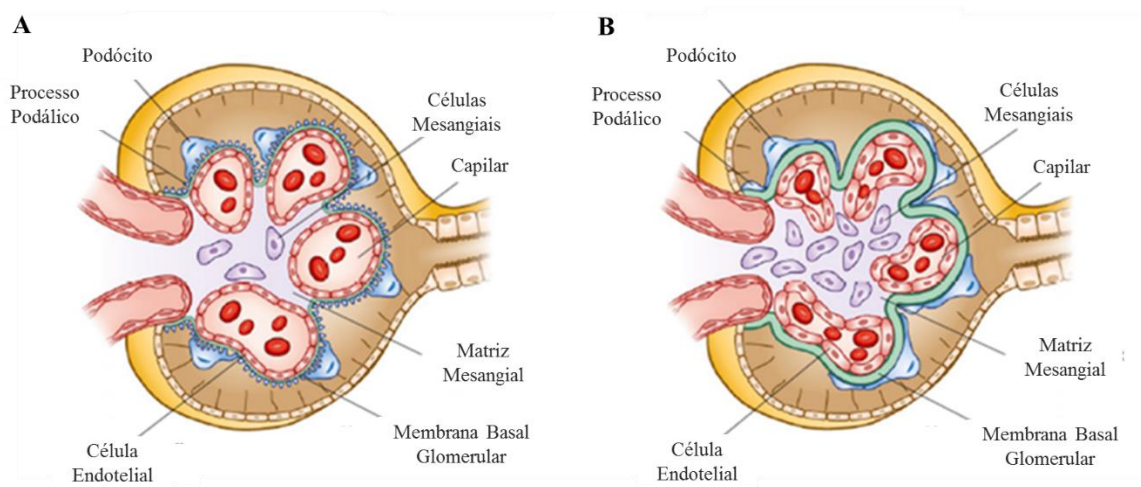


Figura 1. Morfologia de um glomérulo renal saudável (A) e glomérulo renal com mudanças estruturais na doença renal crônica (DRC) (B). Fonte: ALICIC; ROONEY; TUTTLE, (2017), modificado.

Dentre os principais fatores responsáveis pelo estabelecimento das alterações em nível glomerular em condições de disfunção metabólica estão a hiperglicemia e a hipertensão arterial, características comumente observadas no DM tipo 2, e que interagem sinergicamente na progressão da DRC (REIDY et al., 2014). Em células renais que captam glicose de maneira independente de insulina, via transportadores de glicose GLUT 1 e GLUT 2, a hiperglicemia crônica induz a formação de lesões glomerulares pela ativação de diversas rotas metabólicas e aumento na geração de produtos de glicação avançada (AMORIM et al., 2019). No entanto, apesar de a hiperglicemia ser frequentemente associada ao desenvolvimento da DRC, o uso de fármacos antihiperglicemiantes não é completamente eficaz na redução da prevalência de DRC em indivíduos diabéticos, ou seja, outros mecanismos além da hiperglicemia devem contribuir para a DRC (DE BOER et al., 2011).

O rim é um órgão com alta e contínua demanda de energia, e sua principal fonte de ATP ocorre pela β -oxidação de ácidos graxos. Para o suprimento adequado, a captação e utilização

de ácidos graxos são intensamente regulados pelas células renais e acredita-se que o desequilíbrio deste processo resulta na sobrecarga lipídica e comprometimento da β -oxidação, com consequente acúmulo de lipídeos nos rins (TANG; CAI; DONG, 2016). O acúmulo ectópico de lipídeos pode causar alterações estruturais e funcionais em todas as células renais, mas principalmente nas células mesangiais, podócitos e células epiteliais do túbulo proximal, contribuindo deste modo para a DRC. Nas células tubulares proximais, que possuem uma alta demanda de energia e uma capacidade glicolítica relativamente baixa, o estoque excessivo de lipídeos favorece a lipotoxicidade, particularmente devido aos danos mitocondriais observados nesta região do rim (GAI et al., 2019). Falkevall e colaboradores (2017) demonstraram em animais com DM tipo 2 (*db/db*) induzidos à obesidade com dieta hiperlipídica e em indivíduos diabéticos, que o acúmulo de lipídeos na DRC ocorre principalmente nos podócitos, células que contribuem na composição da estrutura de filtração glomerular. Os autores demonstraram que o fator de crescimento endotelial (VEGF) β é a proteína responsável por regular o transporte de ácidos graxos para o interior dos podócitos, e pode estar relacionada com o processo de estabelecimento da lipotoxicidade renal.

A relação entre o acúmulo ectópico de lipídeos no rim e a DRC foi sugerida pela primeira vez em 1860, por Rudolf Virchow (VIRCHOW; CHANCE, 1860). Desde então, muitos estudos buscam explicar os mecanismos pelos quais os lipídeos causam a disfunção renal. Atualmente, na literatura cita-se como fatores contribuintes da lipotoxicidade na DRC o aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), a formação exacerbada de produtos finais de glicação avançada (AGEs) (que serão discutimos detalhadamente no item 2.5), disfunção mitocondrial, apoptose e estresse do retículo endoplasmático (RE) (HAUCK; BERNLOHR, 2016).

As células renais apresentam um grande número de mitocôndrias, e desta forma, a integridade e a função destas organelas são essenciais para o correto funcionamento dos rins (TANG; CAI; DONG, 2016). A disfunção mitocondrial desempenha um papel crítico na patogênese das doenças renais (CHE et al., 2013; SZETO et al., 2016), que incluem alterações na dinâmica mitocondrial, aumento do estresse oxidativo, e diminuição na biogênese mitocondrial e na produção de ATP. Dinâmica mitocondrial é o nome dado ao conjunto dos processos de fusão e fissão, através dos quais as mitocôndrias mudam constantemente de forma e tamanho, em resposta aos mais diversos sinais celulares. No caso da DRC, ocorre principalmente a fragmentação ou fissão mitocondrial (GALVAN; GREEN; DANESH, 2017), facilitando a remoção de mitocôndrias danificadas através da sua degradação pelos fagolisossomos (mitofagia) (TREWING; BERRY; WOJTOVICH, 2018).

A apoptose ou morte celular programada é ativada por vias extrínseca ou intrínseca (mitocondrial). A apoptose que ocorre pela via intrínseca pode ser induzida por ERO, óxido nítrico (NO), altas concentrações de cálcio, ceramidas ou ácidos graxos (lipoapoptose). A presença destes sinais de estresse intracelular ativa fatores pró-apoptóticos, incluindo a proteína X associada a bcl-2 (BAX), responsáveis por induzir a formação do poro de transição de permeabilidade, uma estrutura transitória formada na membrana interna da mitocôndria. Enquanto a membrana externa da mitocôndria é seletivamente permeável, a membrana interna mitocondrial é conhecida por ser praticamente impermeável, garantindo assim que o gradiente eletroquímico de prótons seja mantido para a síntese de ATP. A perda dessa impermeabilidade após a formação dos poros de transição resulta na liberação de citocromo c da mitocôndria para o citoplasma, levando à ativação da caspase-9, responsável por clivar e ativar as caspases executoras da apoptose, em particular a caspase-3. A apoptose pela via extrínseca é ativada por receptores apoptóticos localizados na superfície celular, incluindo a proteína transmembrana tipo II (Fas) e o fator de necrose tumoral 1 (TNF-R1). A ativação destes receptores também desencadeia a ativação da caspase-3 e tem como consequência a fragmentação do DNA e a disfunção mitocondrial (BAIG et al., 2016).

O RE é uma organela celular importante para a regulação da homeostase do cálcio, metabolismo lipídico e síntese de proteínas. Entre os diversos fatores que induzem a alteração na homeostase do RE, causando o estresse do RE, está o excesso de lipídeos. A manutenção do funcionamento normal do RE e sobrevivência celular ocorre pela ativação de uma via de sinalização intracelular altamente conservada, denominada UPR (*unfolded protein response*); no entanto, a ativação excessiva de UPR ativa vias pró-apoptóticas. Diversos estudos apontam que o estresse do RE está envolvido na lipotoxicidade em vários órgãos, culminando em apoptose (HAN; KAUFMAN, 2016). Vale ressaltar que o estresse do RE também está relacionado à disfunção mitocondrial; com a liberação de cálcio do lúmen do RE e aumento de seus níveis no citoplasma, ocorre aumento na captação de cálcio pelas mitocôndrias, induzindo a formação de poro de transição de permeabilidade mitocondrial e consequentemente ativação da apoptose (DENIAUD et al., 2008).

2.5 Estresse glico-oxidativo no diabetes mellitus e na obesidade

A hiperglicemia crônica tem um importante papel no estabelecimento e manutenção de lesões em vasos sanguíneos, ocasionando complicações macrovasculares (aterosclerose, disfunção endotelial, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, doença vascular

periférica) ou microvasculares (nefropatia, retinopatia, neuropatia diabéticas) (FOWLER, 2008). As complicações cardiovasculares e renais são as principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes diabéticos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

Elevados níveis circulantes de glicose e de ácidos graxos culminam no aumento da oxidação destes nutrientes, e posteriormente no fluxo das coenzimas transportadoras de elétrons, dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) e dinucleotídeo de flavina e adenina (FADH₂) para cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, aonde pode ocorrer a redução do oxigênio molecular (O₂) de forma univalente, formando o ânion radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), denominado com ERO primária. Este é o principal mecanismo responsáveis pela geração excessiva de ERO nas mitocôndrias (MADONNA; DE CATERINA, 2011; NOWOTNY et al., 2015). O papel das ERO tem destaque no estabelecimento da disfunção endotelial e de outras complicações diabéticas, principalmente em tecidos onde a captação de glicose ocorre de maneira independente da insulina, tais como rins, endotélio vascular, retina, pâncreas e fígado (TABIT et al., 2010).

Dentre as ERO, podemos citar as espécies radicalares, em especial o ânion radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), radical peroxil (ROO \cdot) e radical alcoxil (RO \cdot), e as espécies não radicalares, que incluem o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o ácido hipocloroso (HOCl) (Figura 2). O peroxinitrito (ONOO \cdot) é gerado a partir da reação de $\cdot\text{O}_2^-$ com NO, sendo citado como a principal espécie reativa de nitrogênio. As alterações nas funções moleculares e celulares como consequência do desequilíbrio entre a produção de oxidantes e a capacidade antioxidante culminam em um quadro denominado de estresse oxidativo (SIES, 2015). Os sistemas de defesa antioxidante endógenos são representados principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e glutathiona redutase (GSH-Rd) (Figura 2) (HALLIWELL; GUTTERRIDGE, 2010). Durante o estresse oxidativo e condições inflamatórias, a ativação do fator nuclear NRF 2 é responsável por estimular a expressão gênica de proteínas antioxidantes, tais como heme oxigenase-1, NAD(P)H quinona oxidoreductase-1, SOD2 e CAT (ZHANG; DAVIES; FORMAN, 2015).

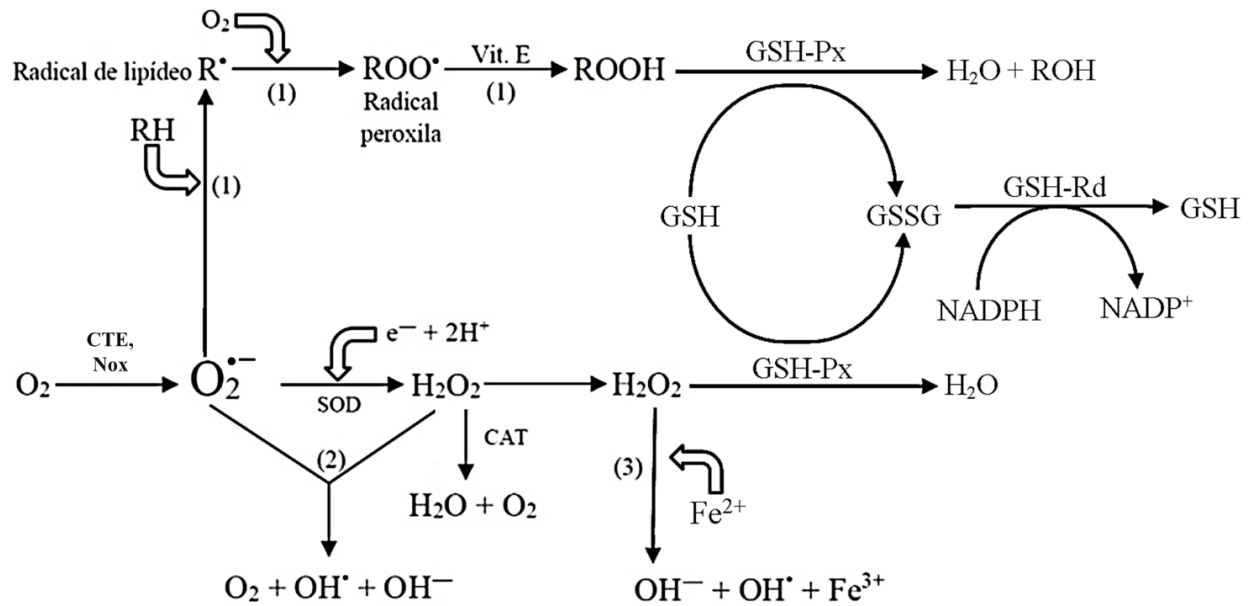


Figura 2. Espécies reativas e sistemas antioxidantes. (1) peroxidação lipídica; (2) reação de Haber-Weiss; (3) reação de Fenton. CTE: cadeia transportadora de elétrons; Nox: NADPH oxidase neutrofílica; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GSH: glutatona reduzida; GSH-Px: glutatona peroxidase; GSH-Rd: glutatona redutase; GSSG: glutatona oxidada; Vit. E: vitamina E. Fonte: ROMÃO (2016), modificado.

A hiperglicemia induz danos teciduais por processos dependentes de aumento intracelular de ERO, associado aos seguintes mecanismos: (i) aumento no fluxo de substratos pela via dos poliois; (ii) aumento no fluxo de substratos pela via da hexosamina; (iii) formação de AGEs; (iv) ativação da PKC via aumento na geração de diacilglicerol (MADONNA; DE CATERINA, 2011).

Com o aumento no fluxo de substratos pela via do poliois, ocorre a redução de glicose em sorbitol, catalisada pela enzima aldose redutase, e ocorre oxidação de nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato (NADPH) à $NADP^+$. O sorbitol, por sua vez, é oxidado em frutose pela enzima sorbitol desidrogenase, e ocorre redução da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) em NADH. O aumento no fluxo de substratos pela via dos poliois contribui para o estresse oxidativo por diminuir a disponibilidade de NADPH, importante coenzima na regeneração da glutatona em sua forma reduzida (GSH), sendo esta um importante antioxidante endógeno (TANG; MARTIN; HWA, 2012; FORBES; COOPER, 2013). Além disso, o excesso de NADH serve como substrato para a enzima NADPH oxidase, levando à produção de $O_2^{\cdot-}$. Podemos citar ainda que o aumento na relação $NADH/NAD^+$ leva à inibição da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), enzima chave da via glicolítica (TANG; MARTIN; HWA, 2012; FORBES; COOPER, 2013).

De acordo com modelo proposto por Brownlee (2005), existe uma integração entre os processos bioquímicos exacerbados em situações de hiperglicemia, tanto em animais em

modelos experimentais de DM quanto em indivíduos diabéticos, bem como em células expostas a elevadas concentrações de glicose; tal integração ocorre devido à diminuição na atividade da enzima GAPDH; a hiperglicemia é a responsável pela inibição de GAPDH, e vale destacar que tal inibição não ocorre quando a superprodução de $\cdot\text{O}_2^-$ na mitocôndria é prevenida pela ação da enzima SOD (DU et al., 2000). Assim, com a inibição de GAPDH, os níveis de todos os intermediários da via glicolítica aumentam, incluindo o gliceraldeído-3-fosfato. Com o aumento nos níveis de gliceraldeído-3-fosfato, ativam-se dois (dos quatro) processos associados a hiperglicemia: ocorre a ativação nos processos que participam da geração de AGEs, uma vez que o metilglioxal, principal precursor intracelular na geração de AGEs, é formado a partir de gliceraldeído-3-fosfato; ocorre ativação da via clássica de PKC, uma vez que o ativador desta proteína é o diacilglicerol, também sintetizado a partir de gliceraldeído-3-fosfato (BROWNLEE, 2005).

Dentre as várias fontes de ERO descritas sob condições de hiperglicemia, destacam-se os AGEs, um grupo de compostos heterogêneos envolvidos na patogênese e complicações do DM (NOWOTNY et al., 2015). A formação de AGEs ocorre predominantemente pela reação não enzimática entre o grupo carbonil de um carboidrato redutor e o grupo amino de uma proteína (reação de Maillard), gerando uma base de Schiff, que sofre rearranjo espontâneo em uma cetoamina, denominada de produto de Amadori. Entretanto, o produto de Amadori é instável, de modo que reações consecutivas ocorrem, levando eventualmente à formação de AGEs de maneira irreversível. A formação de AGEs pode ocorrer também pela reação de macromoléculas com compostos dicarbonílicos altamente reativos (glioxal, metilglioxal, 3-deoxiglicossina) gerados durante todos os estágios da reação de Maillard, bem como também a partir de intermediários da via glicolítica ou como produtos da auto-oxidação de monossacarídeos (glicose, ribose, frutose, gliceraldeído-3-fosfato), a partir da peroxidação lipídica ou pela via dos poliois (Figura 3). Tais espécies reativas carbonílicas geram o chamado estresse dicarbonílico. A peroxidação lipídica é uma das principais fontes de compostos carbonílicos, produzidos quando ERO atacam os ácidos graxos poli-insaturados nas membranas biológicas. Dentre os produtos gerados pela peroxidação lipídica estão o malondialdeído e 4-hidroxi-trans-2-nonenal (OTT et al., 2014). Por fim, AGEs são gerados por uma combinação de processos oxidativos e glicativos, de modo que a formação exacerbada destes produtos é denominada de estresse glico-oxidativo (NOWOTNY et al., 2015). O potencial prejudicial dos AGEs nas complicações diabéticas pode ser resultado da formação de ligações cruzadas entre proteínas (*crosslinking*), principalmente com proteínas da matriz extracelular e proteínas circulantes, incluindo hemoglobina e albumina. Tais ligações modificam as estruturas das

proteínas e inativam enzimas do metabolismo, contribuindo para a perda de função das biomoléculas (ABBAS et al., 2016). Em longo prazo, o acúmulo de AGEs em tecidos contribui para as complicações diabéticas e outras patologias, incluindo catarata, doença renal e doença de Alzheimer (PASUPULATI; CHITRA; REDDY, 2016). AGEs também podem ser encontrados como adutos livres na circulação e na urina. Nesta última situação, derivam da proteólise de proteínas *in vivo* ou da absorção de AGEs dietéticos (exógenos) (GUILBAUD et al., 2016). De acordo com Koschinsky e colaboradores (1997), os AGEs exógenos são aqueles ingeridos através de alimentos, principalmente alimentos assados e processados. Fatores ambientais que incluem dieta, tabagismo e consumo de álcool também influenciam no acúmulo de AGEs no organismo (PASUPULATI; CHITRA; REDDY, 2016).

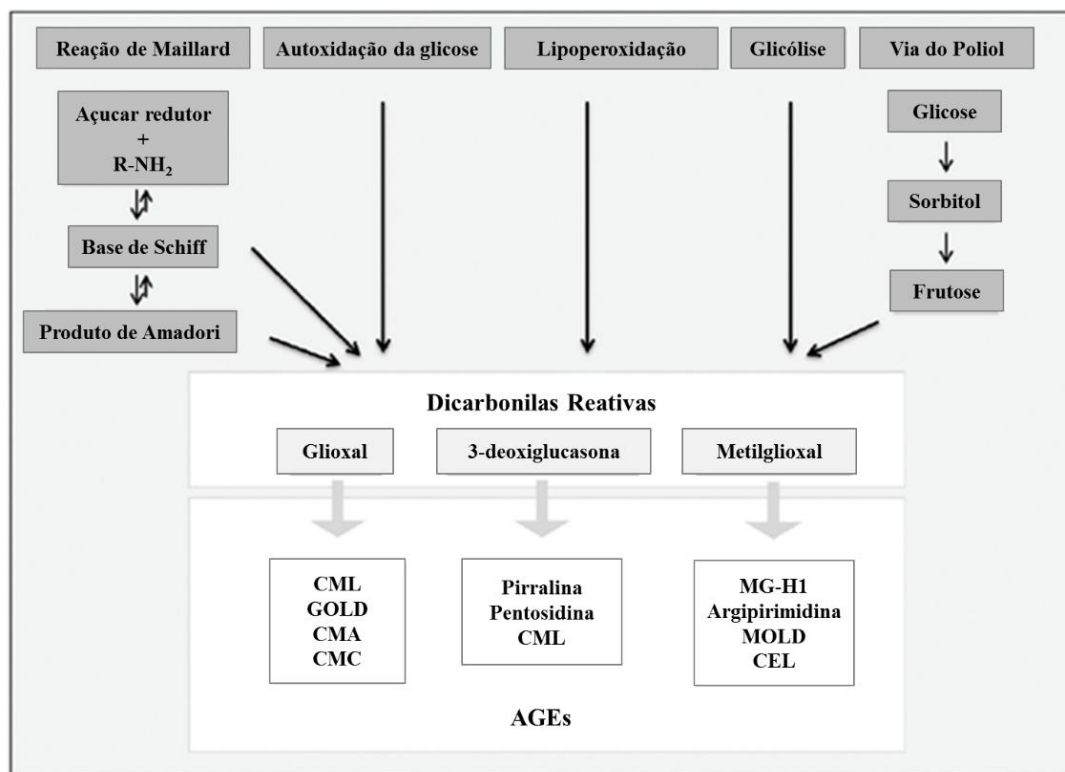


Figura 3. Formação de compostos dicarbonílicos e produtos finais de glicação avançada (AGEs). Fonte: NOWOTNY et al. (2015), modificado.

Dentre as proteínas plasmáticas alvos de glicação, podemos citar a apolipoproteína B (ApoB) que faz parte da constituição da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Macrófagos possuem maior afinidade em capturar LDL glicada, pois estas são mais suscetíveis às modificações oxidativas. Assim, a captação da lipoproteína modificada ocorre via receptores *scavenger* dos macrófagos, culminando na geração das células espumosas, evento fundamental

na formação das placas ateroscleróticas (STIRBAN; GAWLOWSKI; RODEN, 2014). Vale ressaltar ainda a formação da LDL oxidada (LDL-ox) pelo estresse oxidativo como componente importante no desenvolvimento de estágios iniciais da aterosclerose (LEVITAN; VOLKOV; SUBBAIAH, 2010). A paraoxonase 1 (PON 1) é uma enzima com atividades esterase e lactonase; é sintetizada principalmente no fígado e secretada no plasma, onde circula associada a Apo AI e Apo J presentes na lipoproteína de alta densidade (HDL) (MANOLESCU et al., 2015). A PON 1 apresenta atividade antioxidante, protegendo a LDL contra danos oxidativos devido a sua capacidade em hidrolisar peróxidos lipídicos presentes na LDL-ox (MACKNESS; MACKNESS, 2013). A atividade da PON 1 também é suscetível a processos glicativos ou oxidativos; condições onde é observada diminuição da atividade sérica de PON 1 estão associadas ao aumento do estresse oxidativo e maior risco de doenças cardiovasculares (CHISTIakov et al., 2017).

Além dos AGEs provocarem alterações na estrutura/função de proteínas, estes também podem ativar diferentes vias de sinalização intracelulares, culminando em eventos pró-oxidantes, pró-inflamatórios e pró-apoptóticos, via a ativação dos receptores de AGEs (RAGE). Os RAGE pertencem à superfamília das imunoglobulinas, e têm sido os receptores de AGEs mais estudados (OTT et al., 2014). O receptor RAGE consiste em um domínio extracelular e outro citoplasmático, sendo este último essencial para o estímulo de várias cascatas de sinalização após a interação AGE-RAGE. A ativação de RAGE desencadeia a geração de ERO via ativação de NADPH oxidase, exacerbando assim o estresse oxidativo; também aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias (via PKC- ζ), ativando as cascatas de sinalização da proteína MAPK e do NF- κ B; e ativa vias fibrogênicas através da ativação da proteína TGF- β (PASUPULATI; CHITRA; REDDY, 2016). Por fim, estudos demonstram que a ativação de RAGE induz a apoptose via aumento na expressão de BAX, e consequentemente há ativação da caspase-3, levando a danos no DNA e disfunção mitocondrial (MAO et al., 2018).

Em condições fisiológicas, a expressão de RAGE é baixa. No entanto, com a inflamação, ocorre um aumento nos níveis deste receptor, pois sua expressão é controlada por vários fatores de transcrição pró-inflamatórios, incluindo o NF- κ B (BIERHAUS; NAWROTH, 2009; ROJAS et al., 2017). Este mecanismo pode explicar o fato da expressão de RAGE ser maior em tecidos que acumulam AGEs, tais como fígado (YAMAGISHI; MATSUI, 2015) e rins (TOMINO; HAGIWARA; GOHDA, 2011). Quando AGEs ligam-se aos receptores RAGE, culminando em ativação de NF- κ B, há aumento na transcrição não somente das citocinas pró-inflamatórias, mas também de receptores RAGE (BIERHAUS; NAWROTH, 2009; ROJAS et al., 2017).

Os receptores de AGEs pertencentes ao complexo AGE-R estão envolvidos na sinalização e captação endocítica de proteínas modificadas por AGEs. Este complexo consiste em três diferentes componentes, AGE-R1/OST-48, AGE-R2/80K-H, AGE-R3/galactina-3 e estão presentes especialmente em monócitos, macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, células mesangiais, fibroblastos, células musculares lisas e células neuronais (OTT et al., 2014). Juntos, AGE-R1 e AGE-R3 participam na detoxificação de AGEs, via degradação intracelular de proteínas modificadas por AGEs após endocitose, formando peptídeos de baixo peso molecular que podem ingressar na circulação e serem filtrados pelo processo de filtração glomerular. Já a interação de AGEs com AGE-R2 desencadeia efeitos adversos nas células, incluindo a ativação de vias inflamatórias (PASUPULATI; CHITRA; REDDY, 2016).

AGE-R1 foi o primeiro componente do complexo AGE-R isolado de macrófagos/monócitos, e a princípio denominado como p60 (YANG et al., 1991). Estudos posteriores demonstraram que p60 apresentava 95% de similaridade com a proteína OST-48, uma subunidade de 48 KDa que faz parte de um complexo de oligossacariltransferase no lúmen do RE rugoso, responsável pelo processo de N-glicosilação (LI et al., 1996). Desse modo, foi demonstrado que AGE-R1 (ou p60), uma proteína integral de membrana plasmática com um segmento simples transmembrânico é homóloga a OST-48, pois representa o domínio N-terminal desta proteína localizada no RE rugoso (LI et al., 1996). Apesar de AGE-R1 e OST-48 serem decodificados pelo mesmo gene, *DDOST (dolichyl-diphosphooligosaccharide)*, podemos afirmar que OST-48 não é análogo ao AGE-R1 e vice-versa, mas sim a proteína AGE-R1 contém OST-48. Aonde OST-48 pode apresentar funções distintas, como subunidade chave no complexo oligossacariltransferas e também como componente de ligação de AGEs (ZHUANG et al., 2016).

Em adição, além de reduzir os níveis de AGEs circulantes pelo processo de detoxificação, também atua na diminuição de respostas inflamatórias via supressão da fosforilação da proteína p66^{shc}. Em estudo de Cai e colaboradores (2008), demonstrou-se que a inibição da sinalização da proteína p66 em células com alta expressão de AGE-R1 culminou em resistência contra danos oxidativos. Adicionalmente, muitos trabalhos têm demonstrado o papel de AGE-R1 no rim. Em estudo com células mesangiais de ratos, foi relatado que o aumento na expressão de AGE-R1 prejudica a fosforilação de MAPK e a atividade de NF- κ B induzidas pelos AGEs. Portanto, os autores sugerem que AGE-R1 atenua a toxicidade celular induzida pelos AGEs (CAI et al., 2006).

Podemos destacar ainda outro mecanismo endógeno de detoxificação dos AGEs, mais especificamente de eliminação de um dos precursores de AGEs, o metilglioxal, via sistema da

glioxalase. Este sistema compreende a ação de duas enzimas, a glioxalase 1 (GLO 1) e a glioxalase 2 (GLO 2). A partir da reação não enzimática entre o metilglioxal e GSH, forma-se o hemitioacetal. A GLO 1 catalisa a isomerização do hemitioacetal em S-D-lactoilglutathiona, e GLO 2 catalisa a hidrólise da S-D-lactoilglutathiona em D-lactato, restaurando o GSH (SILVA et al., 2013; RABBANI; THORNALLEY, 2018).

Xue e colaboradores (2012) relataram que o fator de transcrição NRF 2, além de atuar na proteção celular durante o estresse oxidativo e condições inflamatórias, também induz a expressão da GLO 1. Estudos sugerem ainda que o aumento na expressão e atividade da GLO 1 reduz o estresse dicarbonílico e inibe o desenvolvimento das complicações associadas à obesidade e DM, incluindo a resistência à insulina e a nefropatia (RABBANI; THORNALLEY, 2018). Enfim, supressão na expressão de GLO 1 foi observada com a ligação AGE-RAGE, sugerindo que o receptor RAGE desencadeia tanto aumento na produção quanto acúmulo de AGEs (LÓPEZ-DÍEZ et al., 2016).

Em estudo com indivíduos obesos, observou-se que o acúmulo de AGEs no tecido adiposo, especificamente da carboximetilisina (um dos produtos avançados de glicação formado especialmente a partir da reação de glioxal com resíduos de lisina), é seguido de aumento na expressão de RAGE e redução nos níveis circulantes de AGEs totais. Embora os mecanismos celulares estejam ainda sob investigação, foi demonstrado que RAGE aprisiona os AGEs no tecido adiposo de indivíduos obesos, sugerindo uma interação direta entre o ligante (AGEs) e o receptor (RAGE) na disfunção metabólica (LÓPEZ-DÍEZ et al., 2016).

Os produtos avançados da glicação afetam todas as estruturas renais, via alteração de componentes da matriz extracelular, e também especialmente via interação com receptores RAGE expressos em podócitos, células mesangiais e tubulares renais. É importante ressaltar que o rim é um órgão alvo para os danos mediados pelos AGEs. Também é um dos principais contribuintes para o aumento nos níveis de AGEs circulantes, uma vez que a eliminação dos AGEs é dependente de manutenção da função renal (TOMINO; HAGIWARA; GOHDA, 2011). Em estudo com camundongos transgênicos que superexpressam receptores RAGE e que foram cruzados com outra linhagem transgênica que desenvolve DM tipo 1 logo após o nascimento, foi observado que este receptor se encontra relacionado com a instalação de lesões renais (YAMAMOTO et al., 2001). Além disso, o aumento do estresse oxidativo em glomérulos também podem favorecer o acúmulo de produtos avançados da glicação no tecido, culminando em estresse glico-oxidativo, disfunção mitocondrial, estresse do RE, com consequente prejuízo na função renal (FRIMAT et al., 2017).

Nos rins, AGEs estimulam diferentes vias de sinalização, mediando inflamação e fibrogênese. Nas células mesangiais, AGEs afetam o ciclo celular, proliferação, hipertrofia e induzem a apoptose, além de estimular a expressão de MCP 1, desencadeando processo inflamatório (FRIMAT et al., 2017). Entre as ações deletérias dos AGEs nos podócitos, podemos citar desprendimento da membrana basal glomerular e indução de apoptose. Por fim, a interação AGE/RAGE induz a expressão de TGF- β , que atua como um fator pró-fibrótico, aumentando a produção de colágeno, laminina e fibronectina em podócitos, células tubulares e mesangiais, culminando em fibrose renal (NOWOTNY et al., 2015; PASUPULATI; CHITRA; REDDY, 2016; FRIMAT et al., 2017).

2.5 Pentoxifilina

A pentoxifilina [3,7-dimetil-1-(5-oxohexil)-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona] é um derivado de metilxantina. Após sua biotransformação, principalmente no fígado, foram identificados sete metabólitos da pentoxifilina; três metabólitos do tipo hidroxilado (M1, M2, M3a e M3b), dois metabólitos tipo carboxilado (M4 e M5) e dois metabólitos demetilados (M6 e M7). No entanto, sugere-se que o principal local para a conversão da pentoxifilina em metabólito M1 ocorra em eritrócitos (Figura 4) (NICKLASSON et al., 2002).

Quando a pentoxifilina foi administrada em humanos saudáveis por via intravenosa (300 ou 500 mg), após 3 horas foram observadas elevações nas concentrações plasmáticas dos metabólitos M5 e M1, sendo M1 o metabólito mais ativo, conhecido como lisofilina (LILLIBRIDGE; KALHORN; SLATTERY, 1996). Os principais metabólitos da pentoxifilina excretados na urina são M5, M3 e M4, enquanto que a excreção de pentoxifilina não metabolizada ou do metabólito M1 ocorre em fração menor que 1% (NICKLASSON et al., 2002).

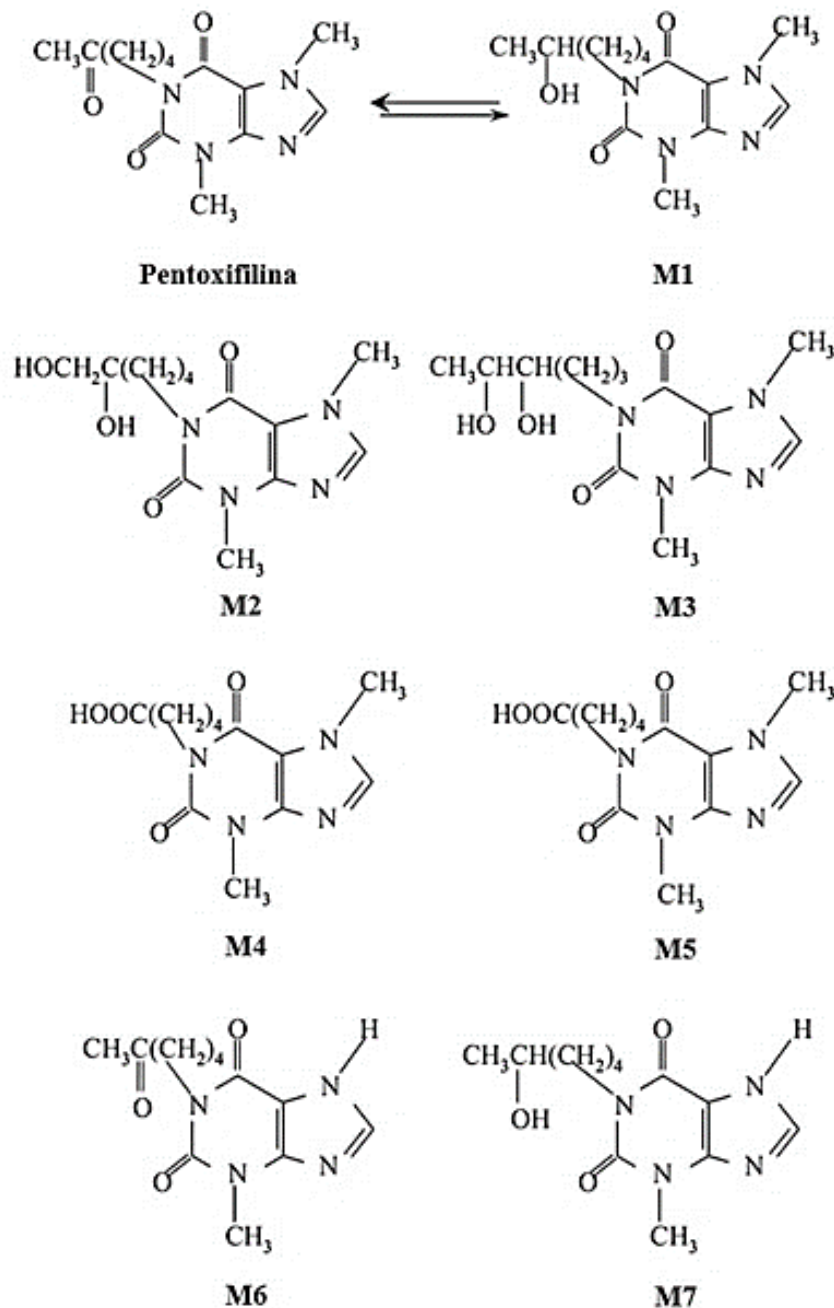


Figura 4. Estruturas moleculares da pentoxifilina e seus metabólitos (M). M1: 1-(5-hidroxi-hexil)-3,7-dimetilxantina; M2: 1-(5,6-dihidroxi-hexil)-3,7-dimetilxantina; M3: 1-(4,5-dihidroxi-hexil)-3,7-dimetilxantina; M4: 1-(4-carboxibutil)-3,7-dimetilxantina; M5: 1-(3-carboxipropil)-3,7-dimetilxantina; M6: 1-(5-ketohexil)-3-dimetilxantina; M7: 1-(5-hidroxi-hexil)-3-dimetilxantina. Fonte: ZHANG et al. (2004), modificado.

Alterações nas propriedades reológicas do sangue provocadas pela pentoxifilina foram relatadas pela primeira vez em 1981 (MULLER, 1981). Logo em seguida, o fármaco foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento de sintomas associados à claudicação intermitente, comum em pacientes com doença arterial periférica crônica (RALL, 1990). Estudos demonstraram que a pentoxifilina atua diminuindo a viscosidade do plasma e

do sangue total, especialmente via redução dos níveis de fibrinogênio plasmático, diminuindo a agregação plaquetária e eritrocitária, além de suprimir a ativação de neutrófilos por diminuir a polimerização dos filamentos de actina, tornando-os menos distensíveis. Assim, a pentoxifilina melhora a eficiência com a qual os neutrófilos podem fluir através dos vasos sanguíneos, bem como outras células e componentes sanguíneos. Tais efeitos são importantes para a melhoria do fluxo sanguíneo, sendo clinicamente útil para amenizar os sintomas de claudicação intermitente (MCCARTY et al., 2016).

Outro mecanismo de ação da pentoxifilina é como inibidor não seletivo de enzimas do tipo fosfodiesterases (PDE), responsáveis pela degradação e regulação dos níveis intracelulares de AMPc e guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (WINDMEIER; GRESSNER, 1997). AMPc e GMPc são segundos mensageiros envolvidos na transdução de sinais intracelulares que regulam vários processos fisiológicos no organismo (NEWTON; BOOTMAN; SCOTT, 2016). Em monócitos e linfócitos, o aumento nos níveis de AMPc culmina em ativação da PKA, responsável por inibir NF- κ B, e conseqüentemente promove a diminuição na síntese de citocinas pró-inflamatórias (TAKAHASHI et al., 2002). O potencial anti-inflamatório da pentoxifilina tem sido uma das suas ações mais estudadas (GARCIA et al., 2015).

Além de seu uso nos distúrbios circulatórios, estudos apontam evidências de outros efeitos benéficos da pentoxifilina, seja em diversos modelos experimentais que mimetizam desordens metabólicas ou em estudos pré-clínicos, demonstrando os benefícios da pentoxifilina associados à NAFLD (ACEDO et al., 2015), distúrbios cardiovasculares (ZHANG et al., 2004), retinopatia diabética (BAYKARA et al., 2013) e atenuação na perda de massa muscular esquelética em condição catabólica promovida pela deficiência de insulina (BAVIERA et al. 2007, ARCARO et al., 2018). Tais ações da pentoxifilina parecem estar associadas ao seu potencial antioxidante (RADFAR et al., 2005), antiglicação (RAHBAR et al., 2000), anti-inflamatório (GARCIA et al., 2015), anti-fibrótico (NG et al., 2009) e via inibição de PDE (BAVIERA et al. 2007, ARCARO et al., 2018).

A NAFLD é a forma mais comum de doença hepática crônica que ocorre em associação à obesidade, e é considerada um problema de saúde pública (YOUNOSSI, 2018). A evolução da doença hepática envolve inicialmente a ocorrência de esteatose hepática (acúmulo de gordura no fígado), a qual evolui para uma esteatohepatite não alcoólica (*nonalcoholic steatohepatitis*, NASH), a forma mais agressiva de NAFLD, podendo progredir para fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular. A progressão para NASH tem sido relatada ser um evento multifatorial. No entanto, o acúmulo de gordura, principalmente de triacilgliceróis, é o ponto crucial para o desenvolvimento da NAFLD (DUARTE; STEFANO; OLIVEIRA, 2019).

Diversos estudos apontam a pentoxifilina como uma terapia promissora para o tratamento de NASH em modelos experimentais de obesidade induzido por oferta de dieta hiperlipídica (ACEDO et al., 2015; YE et al., 2016) e dieta deficiente em colina e metionina (KOPPE et al., 2004), bem como em estudo com humanos com NAFLD ou NASH (DU et al., 2014).

A pentoxifilina é um derivado sintético da teobromina (3,7-dimetilxantina), uma metilxantina encontrada principalmente no cacau (*Theobroma cacao* L.) (MONTEIRO et al., 2016). Metilxantinas são amplamente conhecidas por apresentarem múltiplos efeitos farmacológicos, incluindo estimulação do sistema nervoso central, sistema respiratório, sistema cardiovascular e função renal (OSSWALD; SCHNERMANN, 2011; SINGH et al., 2018). Além disso, podemos observar em diversos trabalhos a indicação do potencial anti-obesogênico das metilxantinas (INOUE et al., 2006; ARÇARI et al. 2009; LIU et al., 2015). Em revisão recente de Carragetta e colaboradores (2018), os autores abordaram os efeitos das metilxantinas na estimulação da lipólise nos tecidos adiposos, via antagonismo dos receptores de adenosina ou pelo aumento dos efeitos das catecolaminas, e também suas ações inibitórias da adipogênese que, em conjunto, promovem a redução dos depósitos de gordura. Diante disso, os autores ressaltam a importância das metilxantinas como uma opção farmacológica interessante para o tratamento da obesidade, e/ou como adjuvantes ou complementares às intervenções no estilo de vida (CARRAGETTA et al., 2018). No entanto, os mecanismos pelos quais as metilxantinas agem nestas vias que culminam em menores massas de tecidos adiposos ainda não estão totalmente elucidados, sendo necessários mais estudos para total compreensão.

Os efeitos das metilxantinas na função renal estão relacionadas com sua ação sobre a diurese, natriurese e secreção de renina (OSSWALD; SCHNERMANN, 2011). No entanto, em estudos de Tofovic e colaboradores, demonstrou-se em ratos obesos e diabéticos (ZSF1) que o consumo de cafeína por longos períodos exacerbou a insuficiência renal. O tratamento com cafeína, além de prejudicar a função renal, também foi capaz de promover aumento da proteinúria, e nos glomérulos foram observadas fibrose, proliferação da MEC e inflamação com infiltração de macrófagos (TOFOVIC et al. 2002; TOFOVIC et al. 2007). Apesar destas evidências sugerirem que a cafeína seja promotora de prejuízos aos rins, os tratamentos com pentoxifilina têm demonstrado resultados opostos (BADRI et al., 2011).

Evidências apontam efeitos atenuadores de prejuízos renais da pentoxifilina na DRC, e tais efeitos têm sido extensivamente revisados tanto em triagens clínicas, bem como em estudos *in vivo* e *in vitro* (BADRI et al., 2011; BHANOT; LEEHEY, 2016; LAI; CHIANG; CHEN, 2016; LEPORINI et al., 2016; LIU et al., 2017). Em recente revisão de Chen e colaboradores (2017), os autores propuseram os possíveis mecanismos envolvidos nas ações protetoras da

pentoxifilina aos rins. A pentoxifilina, via inibição de PDE 3 e 4, promove aumento nos níveis de AMPc e conseqüentemente ativação da PKA, levando à fosforilação do fator de transcrição CREB, responsável por diminuir a transcrição do gene para TGF- β . Além disso, a ativação do efetor intracelular EPAC (*Exchange Protein Activated by cAMP*), também pode reduzir a transcrição gênica de TGF- β mediada por Smad. Portanto, com a redução nos níveis de TGF- β , é possível inibir as vias de sinalização envolvidas na fibrose renal e conseqüentemente o surgimento de proteinúria.

Em vários modelos experimentais de doença renal não diabética, a pentoxifilina atenua a proteinúria modulando componentes de diferentes vias: (i) citocinas, tais como TNF- α , NF- κ B, molécula de adesão intercelular-1 e MCP-1; (ii) fatores mitogênicos, tais como o fator de crescimento derivado de plaquetas, MAPK, AKT, ciclina D1 e fosfatidilinositol 3-quinase (IP3-K); (iii) moléculas fibrogênicas, tais como o TGF- β e Smad3/4 (CHEN et al., 2017).

O modelo de glomerulonefrite em ratos induzida por anticorpos monoclonais anti-Thy1 é caracterizado por lesão glomerular, com danos à morfologia dos podócitos e das células mesangiais, resultando em proteinúria (YU et al., 2005). Neste modelo experimental, Chen e colaboradores (2015) demonstraram que o tratamento com pentoxifilina atenuou a proteinúria, via regulação negativa das vias de sinalização do NF- κ B e Smad2/3, restaurando nos podócitos a expressão de nefrina, sinaptodina e podocina, importantes proteínas que constituem a ligação entre os podócitos, ou seja, responsáveis pela formação da estrutura de filtração glomerular.

Diante dos fatos apresentados, a compreensão dos benefícios da pentoxifilina em modelo experimental de obesidade e resistência à insulina poderia contribuir com evidências para o reposicionamento deste fármaco no tratamento da obesidade e/ou complicações diabéticas, com especial atenção à DRC. Apesar dos diversos estudos abordando o potencial e promissor uso da pentoxifilina para o tratamento de doenças renais, ainda são escassas as informações acerca das ações do fármaco em mecanismos relacionados ao estresse glicoxidativo, como uma estratégia terapêutica para atenuação das complicações renais associadas à obesidade e DM tipo 2.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento de camundongos submetidos ao modelo experimental de obesidade e resistência à insulina com pentoxifilina, sobre parâmetros fisiometabólicos e biomarcadores da inflamação e do estresse glico-oxidativo.

3.2. Objetivos Específicos

Em camundongos submetidos ao modelo experimental de obesidade e resistência à insulina e tratados com 50 mg/kg de pentoxifilina por 7 semanas, avaliar:

- Níveis plasmáticos de biomarcadores relacionados ao metabolismo de carboidratos e lipídeos (glicose, triacilgliceróis, colesterol total, colesterol-HDL), integridade hepática (ALT e ALP), função renal (creatinina), ácido úrico, albumina e frutossamina;
- Tolerância à glicose (via TTGO) e sensibilidade à insulina (via ITT);
- Níveis de biomarcadores de lesão oxidativa (TBARS) em plasma, fígado e rim;
- AGEs fluorescentes em plasma, fígado e rim;
- Atividade de PON 1 em plasma;
- Atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px em fígado e rim;
- Níveis de insulina, leptina, resistina, IL-6, TNF- α e MCP-1 no soro;
- Níveis de IL-6, TNF- α e MCP-1 em rim;
- Alterações estruturais no rim (análise histológica) e quantificação de proteínas totais em urina de 24 horas;
- Potencial antiglicação da pentoxifilina em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro*;
- Conteúdo proteico e níveis de fosforilação de AKT em tecidos adiposos brancos epididimal e subcutâneo, tecido adiposo marrom interescapular e músculo esquelético *gastrocnemius*;
- Conteúdo proteico de componentes de sistemas de detoxificação dos AGEs e estresse glico-oxidativo no rim: NRF 2, AGE-R1 e GLO 1;
- Conteúdo proteico de componentes relacionados a via de sinalização do receptor RAGE no rim: RAGE, NF- κ B, BAX e caspase-3 ativada;

- Conteúdo proteico e/ou os níveis de fosforilação de componentes relacionados aos sensores metabólicos no rim: PGC-1 α e AMPK (níveis proteicos e níveis de fosforilação em resíduo de Thr-172);
- Conteúdo proteico e/ou os níveis de fosforilação de componentes do programa termogênico e da inflamação no tecido adiposo marrom interescapular: AMPK (níveis proteicos e níveis de fosforilação em resíduo de Thr-172), NF- κ B, PGC-1 α , NRF 2, SIRT 1 e UCP 1.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais, dietas e desenho experimental

4.1.1 Experimento piloto: definição de dose de pentoxifilina (25, 50 ou 100 mg/kg) em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

Camundongos *Swiss* machos (*Mus musculus*), com quatro semanas de idade, foram adquiridos do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP, Araraquara). Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno e mantidos no Biotério do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP, sob condições de ciclo luz-escuro de 12 horas, temperatura de 23°C, recebendo dieta e água *ad libitum*. Após 2 semanas de adaptação, os animais foram alimentados durante **8 semanas** com dieta preparada padrão (P; 3,85 kcal/g) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) ou hiperlipídica/hipercalórica (HL; 5,40 kcal/g; 35% de lipídeos) (Tabela 1). As dietas foram preparadas e adquiridas da PragSoluções Comércio e Serviços Ltda - ME (Jaú/SP, Brasil).

Todos os procedimentos experimentais adotados neste estudo foram realizados de acordo com os princípios regulamentados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, Brasil) e receberam aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Câmpus de Araraquara, protocolo CEUA/FCF/CAr nº 45/2016 (ANEXO 1).

Para a definição da dose ideal de pentoxifilina em relação à promoção de efeitos benéficos em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, foi realizado um experimento piloto com as doses de 25, 50 e 100 mg/kg de pentoxifilina, adquirida da Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA – P1784, lote #BCBJ9855V); tais doses foram escolhidas com base na

literatura (YALNIZ et al., 2007; WU et al., 2010; YE et al., 2016). Com o intuito de diminuir o número de animais neste experimento piloto, optou-se por não conduzir grupos de animais em dieta padrão tratados com pentoxifilina em todas as doses estudadas; com o objetivo de verificar os possíveis efeitos tóxicos do fármaco, neste experimento piloto somente um único grupo de animais em dieta padrão e tratados com pentoxifilina foi conduzido, na dose de 100 mg/kg, sendo esta a maior dose estudada.

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

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

⁽¹⁾ Mix de minerais: cálcio, fósforo, potássio, magnésio, ferro, manganês, selênio, zinco, cromo, níquel, lítio, enxofre, cobre, iodo, molibdênio, silício, cloreto, fluoreto, boro, vanádio.

⁽²⁾ Mix de vitaminas: ácido nicotínico, pantotenato de cálcio, piridoxina, tiamina, riboflavina, ácido fólico, vitamina K, D-biotina, vitamina B12, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, colina.

Os camundongos foram divididos em 6 grupos (9 animais/grupo):

- 1. Grupo P:** animais em dieta P tratados com salina;
- 2. Grupo HL:** animais em dieta HL tratados com salina;
- 3. Grupo P100:** animais em dieta P tratados com pentoxifilina na dose de 100 mg/kg;
- 4. Grupo HP25:** animais em dieta HL tratados com pentoxifilina na dose de 25 mg/kg;
- 5. Grupo HP50:** animais em dieta HL tratados com pentoxifilina na dose de 50 mg/kg;
- 6. Grupo HP100:** animais em dieta HL tratados com pentoxifilina na dose de 100 mg/kg.

Após 4 semanas nas respectivas dietas, os tratamentos foram iniciados. Animais dos grupos P100, HP25, HP50 e HP100 receberam pentoxifilina nas doses citadas anteriormente. O fármaco foi preparado em salina (NaCl 0,85%) e administrado por via intraperitoneal (i.p.), diariamente entre 8:00 e 9:00 horas, durante 4 semanas consecutivas. Animais dos grupos P e HL receberam somente salina (NaCl 0,85%), pela mesma via e tempo de tratamento.

Peso corporal e ingestão alimentar foram monitorados três vezes por semana durante todo o período experimental.

Na 7ª semana de experimento, os animais foram jejuados por 12 horas (início do jejum: 23:00h) e submetidos ao teste tolerância à glicose oral (TTGO; 1 g/kg glicose, via oral). A glicemia foi determinada antes (0 min) e depois (15, 30, 60, 90 e 120 min) da sobrecarga de glicose tal como descrito por Xu e colaboradores (2009), com modificações, utilizando fitas reativas e glicosímetro (Abbott, Freestyle Optium).

Na 8ª semana de experimento, os animais foram jejuados por 12 horas (início do jejum: 23:00h), anestesiados (xilazina, 16 mg/kg; quetamina, 90 mg/kg) e, em seguida, amostras de sangue foram coletadas via punção cardíaca, em microtubos heparinizados. Após a eutanásia dos animais por exsanguinação total, os tecidos adiposos brancos epididimal (eTAB) e retroperitoneal (rpTAB), fígado, coração e rins foram retirados, pesados e imediatamente congelados (-80°C) para as análises posteriores.

4.1.2 Experimento definitivo: efeitos do tratamento com pentoxifilina (50 mg/kg) em parâmetros fisiometabólicos e biomarcadores do estresse glico-oxidativo em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

Foram utilizados camundongos machos isogênicos da linhagem C57BL-6J (*Mus musculus*), com quatro semanas de idade e padrão sanitário do tipo SPF (*Specific Pathogen Free*), adquiridos do Biotério da Prefeitura do Câmpus da USP, Ribeirão Preto (PUSP-RP). Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno e mantidos no Biotério do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP, sob condições de ciclo luz-escuro de 12 horas, temperatura de 23°C, recebendo dieta e água *ad libitum*. Após 2 semanas de adaptação, os animais foram alimentados durante **14 semanas** com dietas preparadas padrão (P; 3,85 kcal/g) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) ou hiperlipídica/hipercalórica (HL; 5,40 kcal/g; 35% de lipídeos) (Tabela 1). As dietas foram adquiridas da empresa PragSoluções Comércio e Serviços Ltda - ME (Jaú/SP, Brasil).

Os camundongos foram divididos em 3 grupos experimentais:

- 1. Grupo P:** animais em dieta P tratados com salina;
- 2. Grupo HL:** animais em dieta HL tratados com salina;
- 3. Grupo HPTX:** animais em dieta HL tratados com pentoxifilina na dose de 50 mg/kg.

Após distribuição aleatória, os camundongos foram alimentados com dieta padrão (n=19) ou dieta hiperlipídica (n=38) por 14 semanas. Peso corporal e ingestão alimentar foram monitorados três vezes por semana durante todo o período experimental.

Na 7^a semana de experimento, antes do início do tratamento com a pentoxifilina, com uma pequena amostragem de animais foi realizado o TTGO para a comprovação do estabelecimento de intolerância à glicose (dados não apresentados). Em seguida, os animais em dieta hiperlipídica foram divididos em dois subgrupos, HL e HPTX. Os animais do grupo HPTX receberam pentoxifilina na dose de 50 mg/kg, preparada em salina (NaCl 0,85%), administrada por via intraperitoneal (i.p.), diariamente entre 8:00 e 9:00 horas, durante **7 semanas** consecutivas. Animais dos grupos P e HL receberam somente salina (NaCl 0,85%), pela mesma via e tempo de tratamento.

Os animais foram divididos em dois experimentos, **experimento definitivo 1 e experimento definitivo 2**, realizados concomitantemente.

Para o **experimento definitivo 1** foram separados 14 animais/grupo. Após 12 semanas de experimento (5 semanas de tratamento), todos os animais foram jejuados por 12 horas (início do jejum: 23:00h) e submetidos ao TTGO. A glicemia foi determinada antes (0 min) e após (15, 30, 60, 90 e 120 min) a sobrecarga de glicose (1 g/kg glicose, via oral). O teste tolerância à insulina (ITT) foi realizado após 13 semanas de experimento (6 semanas de tratamento), todos os animais foram jejuados por 6 horas (início do jejum: 7:00h) (PROTZEK et al., 2010 com adaptações). A glicemia foi determinada antes (0 min) e após (15, 30, 45 e 60 min) a administração de insulina (0,65 UI/kg de peso corporal, Novolin R[®], via i.p.). Tanto no TTGO quanto no ITT, a glicemia foi determinada utilizando fitas reativas e glicosímetro (Abbott, Freestyle Optium).

Após 14 semanas de experimento (7 semanas de tratamento), todos os animais foram jejuados por 6 horas (início do jejum: 6:00h), anestesiados (xilazina, 16 mg/kg; quetamina 90 mg/kg) e, em seguida, alguns animais receberam insulina (3,8 UI/kg peso corporal, Novolin R[®], via i.p.) para o estudo dos níveis de fosforilação **estimulada por insulina** de componentes da via de sinalização da insulina nos tecidos adiposos brancos epididimal (eTAB) e subcutâneo (sTAB), no tecido adiposo marrom interescapular (iTAM) e no músculo esquelético

gastrocnemius (CARICILLI et al., 2011). Como controle, outros animais receberam salina (NaCl 0,85%, via i.p.) para o estudo dos níveis de fosforilação **basal** de componentes da via de sinalização da insulina. Após 10 minutos dos respectivos estímulos, amostras de sangue foram coletados por punção cardíaca, em microtubos heparinizados e imediatamente centrifugadas (700 g durante 10 minutos à 25°C) a fim de obter o plasma para análises posteriores. Após a eutanásia dos animais por exsanguinação total, foram retirados os eTAB, rpTAB, sTAB, iTAM, músculos esqueléticos *gastrocnemius*, fígado, coração e rins. Todos os tecidos foram pesados e imediatamente congelados (-80°C) para as análises posteriores.

Para o **experimento definitivo 2** foram separados 5 animais/grupo. Duas semanas antes do sacrifício, os camundongos foram transferidos para gaiolas metabólicas individuais, com acesso a dieta e água *ad libitum*, para coleta de urina durante período de 24 horas (8:00h até às 8:00h do dia seguinte). Ao final deste período, o volume total de urina de um animal foi mensurado e em seguida centrifugado a 420 g durante 5 minutos à 4°C; após a separação do sobrenadante, a urina foi imediatamente congelada (-80°C) para as análises dos níveis de proteína total e creatinina.

Após 14 semanas de experimento (7 semanas de tratamento), os animais foram jejuados por 5 horas (início do jejum: 6:00h), eutanasiados em câmara de dióxido de carbono e, em seguida, amostras de sangue foram coletadas e centrifugadas a 16000 g, durante 10 minutos à 4°C, a fim de se obter o soro.

Destes animais também foram removidos e pesados os rins para análises histológicas. O preparo dos tecidos e realização da análise histológica foram efetuados em colaboração com o Prof. Dr. Luis Carlos Spolidório, do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia UNESP/Araraquara.

4.2 Análise histológica

Os rins foram fixados por imersão em formaldeído a 10% por 24 horas e desidratados com álcool e xilol. Após inclusão do tecido em parafina, foram realizados cortes com espessura de 5 µm, que posteriormente foram aderidos em lâminas de vidro para microscopia, e finalmente corados com hematoxilina e eosina (H&E). As imagens foram obtidas no microscópio óptico (Olympus BX51, Olympus Optical, Tokyo Japan) acoplado a câmera CCD-Iris (Tokyo Japan, Olympus).

Nas secções coradas com H&E, foi realizada análise histológica dos rins, tal como descrito na literatura (DECLÈVES et al., 2011; MARTIN et al., 2018). Resumidamente, 15

glomérulos selecionados aleatoriamente no córtex externo de cada seção do rim foram avaliados de maneira cega. Uma imagem de cada glomérulo foi coberta com grades. O acúmulo de todas as interseções da grade foi calculado para a área global glomerular.

Além disso, a densidade (%) os túbulos contendo células vacuolizadas foi avaliada em uma base semiquantitativa, adotando-se uma análise simples-cega. Foram avaliadas 10 seções por blocos de tecido. Cada uma dessas 10 seções foi espaçada cerca de 20 μm uma da outra, a fim de ser representativa da extensão de 200 μm . Uma técnica de contagem de pontos foi usada para avaliar a proporção dos túbulos contendo células vacuolizadas em cortes corados por H&E. Uma grade quadrada de 500 μm^2 foi construída usando um software de imagem (Adobe Photoshop) e o tipo de estrutura encontrada na interseção das linhas de grade foi contada em um microscópio óptico (Diastar, Cambridge Instruments) com ampliação de 200x ou 400x. Os resultados foram expressos como uma porcentagem da área total analisada.

4.3 Biomarcadores do metabolismo de carboidratos, lipídeos e função hepática e renal

As concentrações plasmáticas de diversos analitos foram determinadas com o uso de kits comerciais (Labtest Diagnóstica S.A.), sendo os princípios dos métodos os seguintes:

- Glicose: método da glicose oxidase (TRINDER, 1969);
- Triacilgliceróis: método enzimático de reações acopladas (RIFAI; WARNICK, 2006);
- Colesterol total: método da colesterol oxidase (MROZ, 2003);
- Colesterol-HDL: inibição seletiva com polioxietileno lauril éter (RIFAI; WARNICK, 2006);
- Alanina aminotransferase (ALT): monitoramento cinético acoplado a lactato desidrogenase (WROBLEWSKI; LADUE, 1956);
- Fosfatase alcalina (ALP): hidrólise de 4-nitrofenil-fosfato (SCANDINAVIAN SOCIETY FOR CLINICAL CHEMISTRY, 1974);
- Creatinina: formação de cromógeno com picrato em meio alcalino (COOK, 1971);
- Ureia: hidrólise da ureia pela urease produzindo amônia e dióxido de carbono (BERGMEYER; GAWEHN, 1974);
- Ácido úrico: método da uricase (TRINDER, 1969);
- Albumina: verde de bromocresol (BARTHOLOMEW; DELANEY, 1966).

4.4 Hormônios e biomarcadores inflamatórios

As concentrações séricas de insulina, leptina e resistina, TNF- α , IL-6 e MCP-1 e os níveis de TNF- α , IL-6 e MCP-1 nos rins foram quantificados utilizando o kit MADKMAG-71K (MILLIPLEX® MAP, Mouse Adipokine Magnetic Bead Panel). De acordo com o fabricante, o princípio do método baseia-se na tecnologia Luminex® xMAP®, técnica que utiliza a marcação de microesferas magnéticas fluorescentes revestidas com um anticorpo de captura específico. A leitura das amostras foi realizada através do equipamento Luminex modelo Magpix System (MAGPIX®) e os dados analisados pelo software xPONENT®. Os resultados foram expressos em pg/mL (soro) e em pg/mg de proteína (rim).

4.5 Níveis plasmáticos de frutossamina

Os níveis plasmáticos de frutossamina foram determinados usando kit comercial (BioTécnica – Biotecnologia Avançada, Minas Gerais, Brasil). A frutossamina pode ser convertida na forma enólica em pH alcalino, sendo essa forma capaz de reduzir o azul de nitrotetrazólio (NBT) a uma formazana de coloração púrpura, que absorve a 530 nm; a intensidade de absorbância é proporcional a presença de frutossamina na amostra (JOHNSON; METCALF; BAKER, 1982). A absorbância foi avaliada após 10 e 15 minutos de incubação a 37°C. O resultado foi expresso em $\mu\text{mol/L}$ de frutossamina.

4.6 Biomarcador de peroxidação lipídica

Amostras de fígado e rim foram homogeneizadas em solução de KCl 1,15% na proporção de 190 mg de tecido para 0,5 mL e 0,3 mL, respectivamente, e centrifugados a 12860 g durante 10 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados para as determinações nos níveis de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) realizado de acordo com Kohn e Liversedge (1944). Os níveis de TBARS foram monitorados espectrofotometricamente a 535 nm (fígado e rim) ou fluorimetricamente nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 510 e 553 nm, respectivamente (plasma). Foi realizada uma curva de calibração com 1,1',3,3'-tetrametoxipropano (Figura 5). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ de TBARS (plasma) ou nmol de TBARS/g de tecido (fígado e rim).

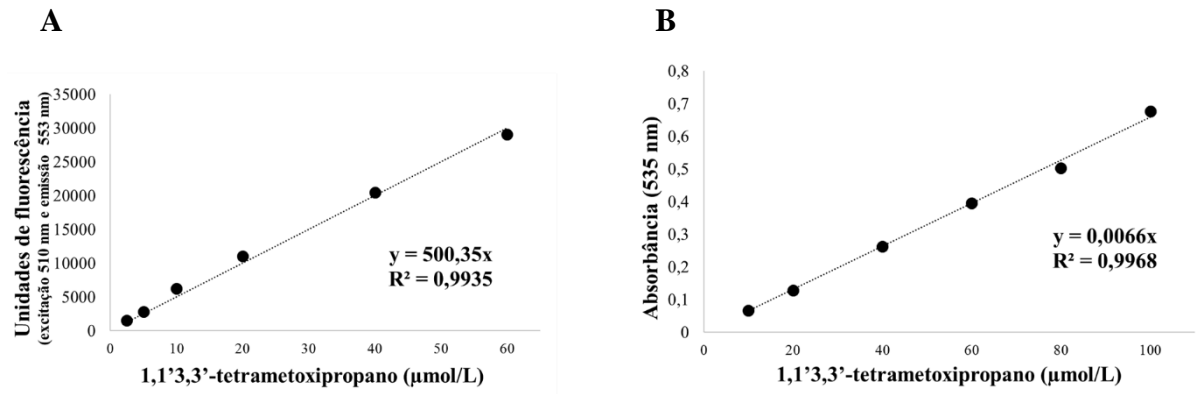


Figura 5. Curva de calibração de 1,1',3,3'-tetrametoxipropano em espectrofluorímetro (A) e em espectrofotômetro (B).

4.7 Atividades das enzimas antioxidantes

4.7.1 Preparo das amostras de tecidos para determinação das atividades das enzimas antioxidantes, SOD, CAT e GSH-Px

Amostras de fígado e rim foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) na proporção de 100 mg de tecido para 1 mL de tampão e centrifugado a 12860 g durante 10 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados para as determinações descritas a seguir.

4.7.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada de acordo com Beauchamp e Fridovich (1971). A oxidação da xantina gera o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) em reação catalisada pela xantina oxidase, o qual reduz o *nitro blue tetrazolium* (NBT) a uma formazana. Na presença de SOD ocorre inibição na redução do NBT, monitorada em 550 nm. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução do NBT em 50%. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

4.7.3 Atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi monitorada pelo consumo de H_2O_2 a 230 nm (BEERS; SIZER, 1952), resultados foram expressos em μmol de H_2O_2 consumido/min/mg de proteína.

4.7.4 Atividade da glutatona peroxidase (GSH-Px)

A atividade da GSH-Px foi monitorada de acordo com Rush e Sandiford (2003). GSH-Px catalisa a oxidação de GSH na presença de H_2O_2 . Na presença de glutatona redutase, a glutatona oxidada é reduzida à GSH com oxidação concomitante do NADPH a $NADP^+$. A oxidação do NADPH foi monitorada a 340 nm. Resultados foram expressos em μmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína.

4.7.5 Atividade da paraoxonase (PON 1)

A atividade de PON 1 foi determinada no plasma via hidrólise de paraoxon e liberação de *p*-nitrofenol, de acordo com Costa e colaboradores (1990) e modificações segundo Assis e colaboradores (2017). A mistura de ensaio consiste 10 μL de plasma em tampão Tris-HCl (15 mM; pH 8,5), contendo $CaCl_2$ (0,15 mM), NaCl (0,3 M) e paraoxon (1,2 mM). O ensaio foi realizado a 37°C e iniciado pela adição de paraoxon. A atividade foi monitorada medindo-se a absorvância a 405 nm por 5 min. Os resultados foram calculados assumindo o coeficiente de extinção molar de *p*-nitrofenol ($18.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (RICHTER; JARVIK; FURLONG, 2008). A atividade da PON 1 foi expressa em unidades (unidade = μmol paraoxon hidrolisado/min) por miligrama (mg) de colesterol-HDL.

4.8 Estimativa dos produtos finais de glicação avançada (AGEs)

Os AGEs podem ser estimados pela intensidade de fluorescência de alguns AGEs fluorescentes, tais como vesperlisinas A e B, FFI, lisil-pirrol piridina, *crossline* e o *fluorolink* (SÉRO et al, 2013). Os AGEs fluorescentes no plasma e fígado foram estimados tal como descrito por Zilin et al. (2001) com modificações, e no rim foi de acordo com metodologia proposta por Pokupec e colaboradores (2003). Os tecidos foram preparados conforme item 4.7.1.

No plasma e sobrenadante do fígado, adicionou-se ácido tricloroacético (0,12 M), hidróxido de sódio (0,1 M) e clorofórmio (1,2 M; plasma) ou clorofórmio (2,4 M; fígado). Para análise dos AGEs fluorescentes no rim, foi utilizado o homogenato previamente tratado apenas com hidróxido de sódio (0,1 M). Após tratamento prévio do plasma e do sobrenadante do fígado, estas amostras foram homogeneizadas e mantidas a temperatura entre 8 a 10°C durante 30 minutos. Em seguida, amostras de plasma, fígado e rim foram centrifugadas a 10000 g durante 10 minutos à 10°C. As intensidades de fluorescência relativas aos AGEs foram medidas espectrofluorometricamente nos comprimentos de onda de excitação 370 nm e emissão 440 nm.

Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência em razão da concentração de proteínas (UA/mg de proteína).

4.9 Dosagem de proteínas totais no plasma e dos sobrenadantes dos tecidos analisados

As concentrações de proteínas plasmáticas e dos sobrenadantes dos tecidos analisados foram determinadas segundo Lowry e colaboradores (1951). Uma mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu) sofre redução quando reage com proteínas, na presença de cobre (II), e produz um cromóforo azul monitorado espectrofotometricamente a 660 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/mL}$ e calculados utilizando uma curva de calibração com albumina bovina (Figura 6).

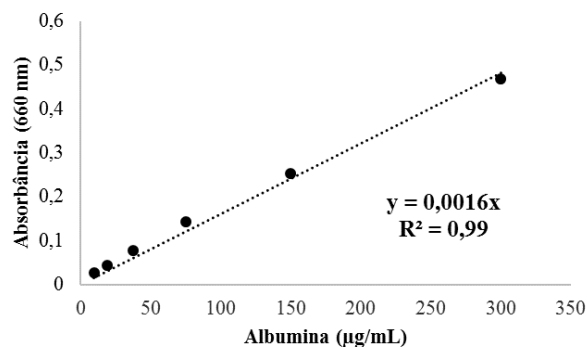


Figura 6. Curva de calibração de albumina bovina sérica para dosagem de proteínas totais no plasma e dos sobrenadantes dos tecidos analisados.

4.10 Dosagem de proteínas totais na urina de 24 horas

As concentrações de proteínas totais na urina de 24 horas foram determinadas segundo Bradford (1976). A interação do grupo amino das proteínas com o corante azul Brillhante de Coomassie G provoca o deslocamento do equilíbrio do corante da forma aniônica (vermelha) para a forma catiônica (azul), este último absorve no comprimento de onda em 595 nm. Os resultados foram calculados utilizando uma curva de calibração com albumina bovina (mg/mL) (Figura 7). Os valores de proteína total urinária (mg/mL) foram corrigidos pela creatinina urinária (mg/mL) (COOK, 1971), sendo assim os resultados expressos em proteína/creatinina.

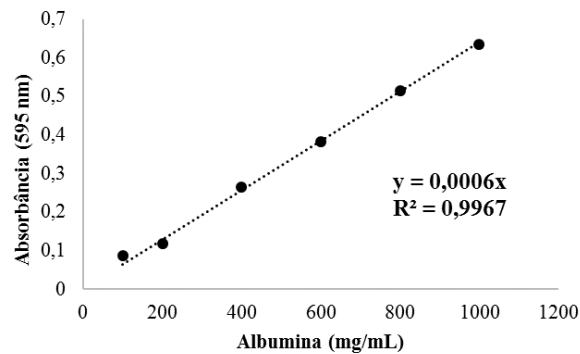


Figura 7. Curva de calibração de albumina bovina sérica para dosagem de proteínas totais na urina de 24 horas.

4.11 Western blotting

Amostras dos tecidos eTAB, sTAB, iTAM, músculo esquelético *gastrocnemius* e rins foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl (50 mM; pH 7,4) contendo 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 24,1 mM de deoxicolato de sódio, 0,01% de SDS, inibidores de proteases (1,5 μ M de aprotinina, 2,1 μ M de leupeptina, 1 mM de PMSF) e inibidores de fosfatases (10,1 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10,3 mM de ortovanadato de sódio). O homogenato foi centrifugado a 10500 g a 4°C por 30 minutos, e o sobrenadante foi utilizado para determinação da concentração de proteínas (LOWRY et al., 1951). Volumes iguais de sobrenadantes e tampão da amostra (10% de glicerol, 62,5 mM de Tris-HCl, 2% SDS, 33,2 mM de ditiotreitol, 0,01% de azul de bromofenol, pH 6,8), contendo de 15 a 75 μ g de proteínas, foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida de 10 a 12 % (LAEMMLI, 1970). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979).

As proteínas de interesse no estudo foram detectadas por incubação *overnight* a 4°C com anticorpos primários específicos: anti-fosfo-[Ser-473]-AKT (1:1000), anti-AKT (1:1000), anti-fosfo-[Thr 172]-AMPK (1:500), anti-AMPK (1:500), anti-BAX (1:500), anti-caspase-3 (1:1000) (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), anti-DDOST/AGE-R1 (1:500), anti-RAGE (1:500), anti- NF- κ B (1:500), anti-PGC-1 α (1:500), anti-NRF 2 (1:500), anti-GLO 1 (1:500), anti-SIRT 1 (1:500), anti-UCP 1 (1:1000) (ABCAM, Cambridge, MA, USA). Anticorpo anti- β -actina foi utilizado como controle interno (1:1000). O anticorpo primário foi detectado pela ligação com anticorpo secundário anti-IgG conjugado com HRP após 1 hora de incubação. Após lavagens, as membranas foram incubadas com substrato quimiluminescente: Tris-HCl 0,1 M (pH 8,8), 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinadiona (1,10 mM), ácido 4-iodofenilborônico (1,98 mM) e peróxido de hidrogênio (5,3 mM) (HAAN; BEHRMANN, 2007, com

modificações). As bandas quimiluminescentes foram capturadas com digitalizador C-Digit Blot (LI-COR, Lincoln, NE) e a intensidade das bandas foram analisadas usando o LI-COR Image Studio 4.0.

4.12 Estudo do potencial antiglicação da pentoxifilina via sistema-modelo de glicação proteica *in vitro*

O sistema-modelo de glicação da albumina sérica bovina (BSA) *in vitro* foi realizado de acordo com Meeprom et al. (2013), com algumas modificações. BSA (10 mg/mL) foi incubada na presença de glicose em duas concentrações (160 mM e 500 mM) em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,4), contendo azida sódica (0,02%), por 14 dias a 37°C. Foram realizadas incubações na ausência ou na presença de aminoguanidina (1 mM) e na ausência ou na presença de pentoxifilina (1 mM). A concentração da pentoxifilina foi escolhida de acordo com Rahbar e colaboradores (2000), e para fins comparativos, foi utilizada a mesma concentração para a aminoguanidina.

Após 14 dias de incubação, foram retiradas alíquotas das incubações para a estimativa de AGEs fluorescentes pela medida da fluorescência no comprimento de onda de excitação de 355 nm e de emissão de 430 nm (MEEPROM et al., 2013; SÉRO et al., 2013).

4.13 Conteúdo tecidual de triacilgliceróis

Realizou-se a extração de lipídeos totais em fígado e rim com clorofórmio e metanol (2:1) (FOLCH; LEES; SLOANE STANLEY, 1956). Ao final da extração, os solventes foram evaporados com nitrogênio gasoso e o *pellet* formado foi ressuspenso com 1 mL (fígado) ou com 0,3 mL (rim) de isopropanol. Para a determinação do conteúdo de triacilgliceróis nos tecidos, utilizou-se kit comercial (Labtest Diagnóstica S.A.), com metodologia de acordo com Rifai e Warnick (2006). Os resultados foram calculados utilizando uma curva de calibração de triacilgliceróis (mg/dL) (Figura 8). Os conteúdos de triacilgliceróis em fígado e rim foram expressos em mg/g de tecido.

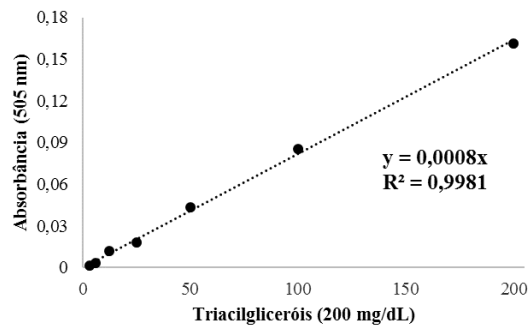


Figura 8. Curva de calibração de triacilglicerol.

4.14 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Análise de variância uma via (ANOVA) seguido por teste Newman-Keuls foram empregados para análise das diferenças intergrupos. Diferenças foram consideradas significativas em $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad InStat[®] 5.01.

5. RESULTADOS

5.1 Experimento piloto: Avaliação de parâmetros fisiometabólicos e de biomarcadores do estresse glico-oxidativo em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados pentoxifilina (25, 50 e 100 mg/kg)

5.1.1 Parâmetros fisiológicos

Durante as 8 semanas de oferta de dieta hiperlipídica, animais HL apresentaram um aumento no peso corporal a partir da 5^a semana (Figura 9A), e ao final do experimento apresentaram maior ganho de peso corporal total (Figura 9B), bem como maiores massas de eTAB (Figura 9C) e rpTAB (Figura 9D), quando comparados aos valores encontrados nos animais P e P100. Diante destes resultados, é evidente a instalação do modelo experimental de obesidade em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica durante 8 semanas.

Animais em dieta hiperlipídica e que receberam pentoxifilina nas doses de 25 e 100 mg/kg apresentaram perfil semelhante de ganho de peso corporal e de massas de tecidos adiposos dos animais HL. Vale destacar que os animais tratados com pentoxifilina na dose de 50 mg/kg (HP50) apresentaram um menor ganho de peso corporal após duas semanas consecutivas de tratamento com o fármaco, em relação aos animais HL, HP25 e HP100; no entanto, retomaram o ganho de peso corporal a partir da 6^a semana. Na Figura 6B podemos verificar que animais HP50 apresentaram uma tendência de redução no ganho de peso corporal total e nas massas dos tecidos adiposos brancos em comparação aos animais HP25 e HP100. Estes resultados não tiveram relação com uma menor ingestão alimentar (dados não apresentados). Diante disso, a dose de 50 mg/kg de pentoxifilina apresentou uma provável capacidade em atenuar o acelerado ganho de peso corporal devido ao consumo da dieta hiperlipídica (Figura 9).

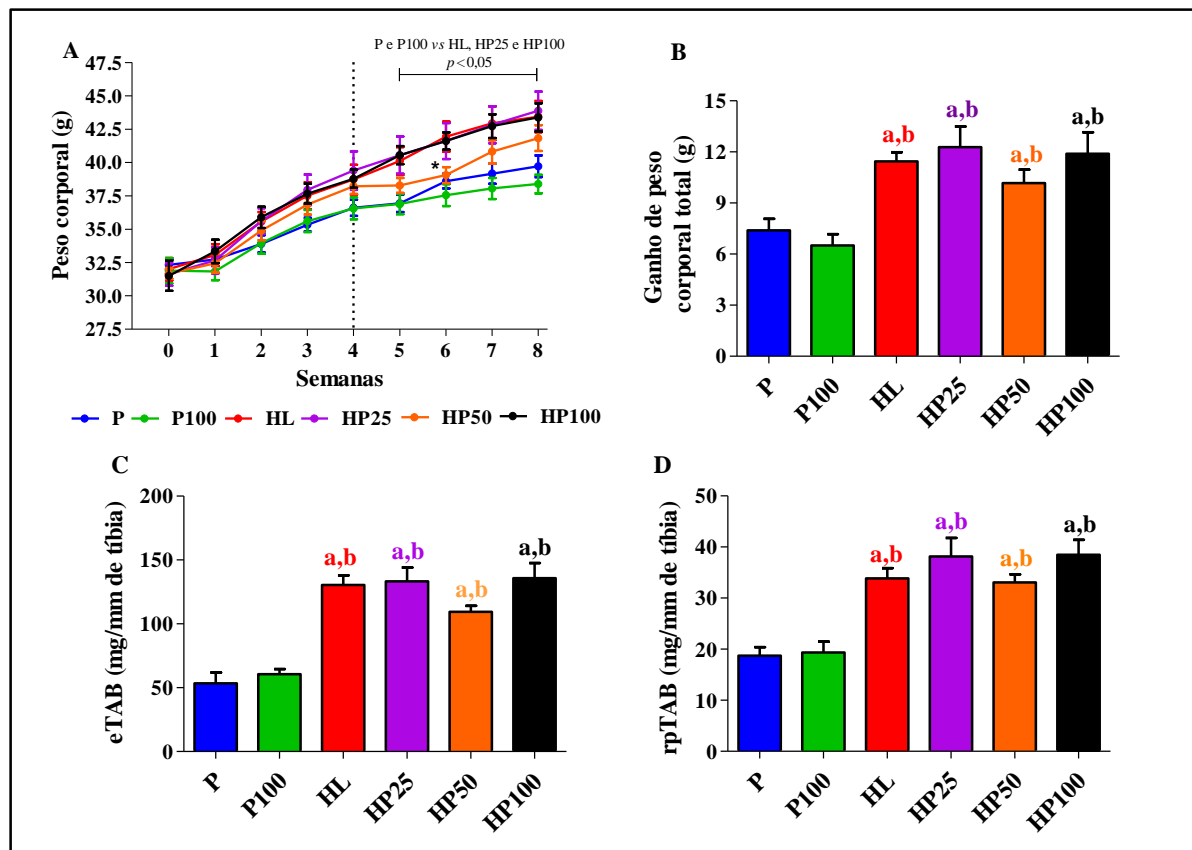


Figura 9. Evolução do peso corporal (A), ganho de peso corporal total (B), massa dos tecidos adiposos brancos epididimal (C) e retroperitoneal (D) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com P; b, diferenças com P100; *, diferenças com HL, HP25 e HP100.

5.1.2 Parâmetros bioquímicos plasmáticos

Todos os grupos que receberam dieta hiperlipídica apresentaram redução nos níveis plasmáticos de triacilgliceróis e aumento nos níveis plasmáticos de colesterol total e de colesterol-HDL, em relação aos animais que receberam dieta padrão (Tabela 2). Corroborando nossos achados, em estudo com camundongos C57BL/6 alimentados com dieta com alto conteúdo de lipídeos durante 2, 4, 6 e 12 semanas, Podrini e colaboradores (2013) encontraram um aumento progressivo nos níveis plasmáticos de colesterol total e colesterol-HDL, porém uma diminuição nos níveis de triacilgliceróis logo após 2 semanas de ingestão da dieta hiperlipídica.

Enquanto que a principal lipoproteína em humanos é a LDL, nos camundongos prevalece a lipoproteína HDL (GETZ, 2007), o que pode explicar o aumento observado nos níveis de colesterol-HDL nos animais dos grupos HL, HP25, HP50 e HP100. Já a redução nos

níveis de triacilgliceróis em animais alimentados com dieta hiperlipídica pode estar correlacionada com o aumento observado nas massas adiposas (sugerindo maior acúmulo de triacilgliceróis), bem como devido à deposição ectópica de lipídeos, principalmente no fígado, o que pode levar à esteatose (GUO et al. 2009).

Os tratamentos com as diferentes doses de pentoxifilina não foram capazes de prevenir a redução nos níveis de triacilgliceróis e o aumento nos níveis de colesterol total encontrados nos animais em dieta hiperlipídica. Os níveis plasmáticos de creatinina, ureia e ALT não apresentaram diferenças entre os grupos experimentais, indicando ausência de prejuízos na integridade hepática e função renal.

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos plasmáticos de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.

Grupos	Triacilgliceróis (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)	Colesterol-HDL (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)	ALT (U/L)
P	161,0 ±12,9	132,8 ±1,8	91,9 ±2,7	0,11 ±0,003	43,3 ±2,3	49,0 ±3,7
P100	149,0 ±16,2	139,0 ±6,2	97,2 ±4,3	0,11 ±0,005	41,7 ±1,7	48,8 ±3,3
HL	88,1 ±5,4 ^{a,b}	186,8 ±13,5 ^{a,b}	108,8 ±8,8 ^{a,b}	0,10 ±0,006	40,5 ±2,2	42,8 ±4,5
HP25	89,4 ±3,1 ^{a,b}	169,3 ±5,7 ^{a,b}	121,0 ±3,6 ^{a,b}	0,11 ±0,009	38,4 ±1,1	38,0 ±2,7
HP50	76,5 ±2,7 ^{a,b}	166,9 ±5,2 ^{a,b}	123,4 ±3,3 ^{a,b}	0,11 ±0,006	41,4 ±2,3	44,2 ±11,3
HP100	90,1 ±9,2 ^{a,b}	171,7 ±9,3 ^{a,b}	119,7 ±4,5 ^{a,b}	0,12 ±0,011	38,6 ±1,4	34,0 ±2,8

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com P; b, diferenças com P100.

5.1.3 Teste de tolerância à glicose oral

Podemos verificar a instalação do quadro de intolerância à glicose nos animais do grupo HL. Houve aumento nos níveis de glicemia em jejum (26%) em animais HL quando comparados aos valores obtidos no grupo P. Além disso, após a sobrecarga de glicose, os valores de glicemia dos animais HL nos tempos 30 a 120 minutos foram maiores em relação aos valores observados em animais P e P100. Ao final do TTGO (120 minutos), animais HL não corrigiram a glicemia de forma eficiente tal como observado nos animais em dieta padrão; após duas horas da sobrecarga de glicose, animais P apresentaram níveis glicêmicos semelhantes aos valores de glicemia do estado de jejum (Figura 10A). Os animais P100 apresentaram perfil glicêmico semelhante aos animais P, ou seja, o tratamento com

pentoxifilina em animais alimentados com dieta padrão não alterou os níveis de glicemia no estado em jejum e a tolerância à glicose (Figura 10).

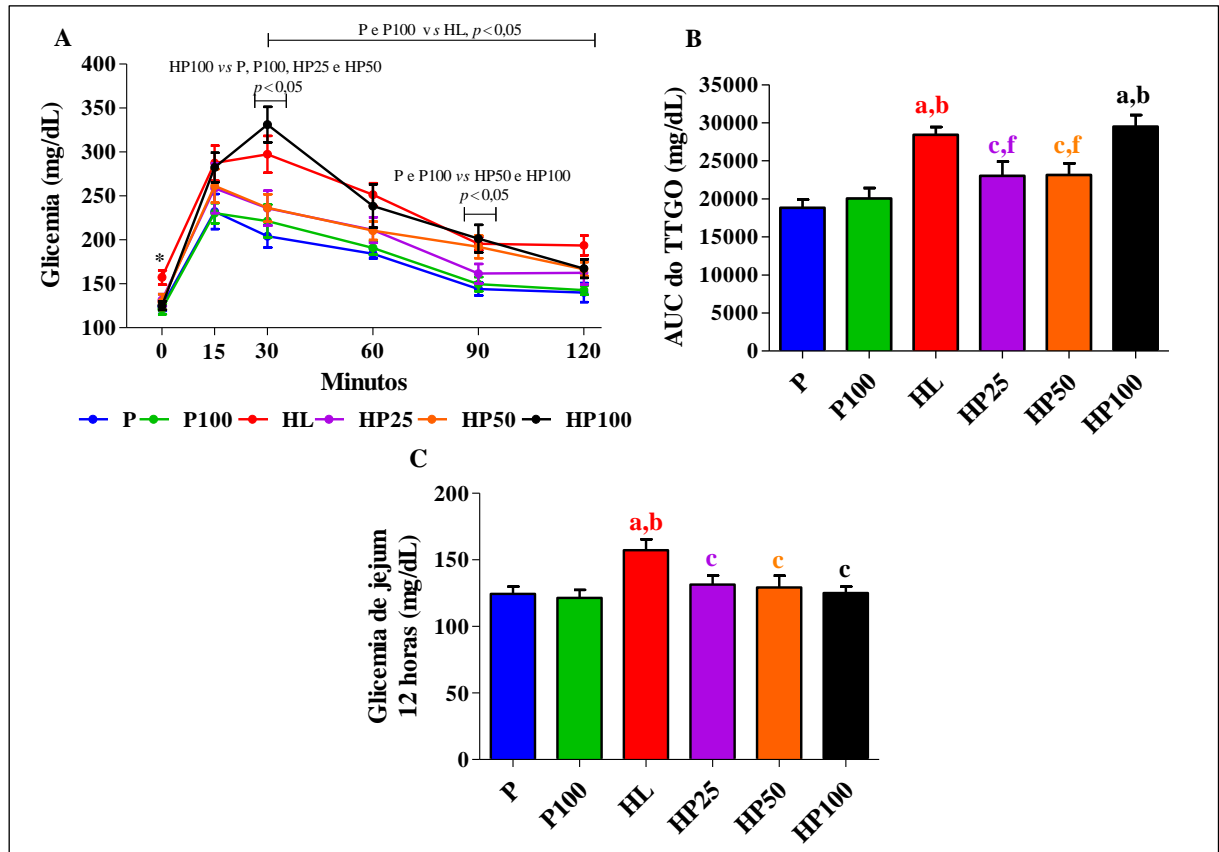


Figura 10. Teste tolerância à glicose oral (A), AUC da glicemia no TTGO (B) e glicemia de jejum de 12 horas (C) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com P; b, diferenças com P100; c, diferenças com HL; f, diferenças com HP100; *, diferenças com P, P100, HP25, HP50 e HP100.

Animais HP25, HP50 e HP100 apresentaram redução nos valores de glicemia de jejum de 16%, 18% e 20%, respectivamente, em relação aos animais HL (Figura 10C). Apesar de os animais HP25 e HP50 apresentarem um pico glicêmico semelhante aos animais HL, observou-se que os tratamentos com pentoxifilina nas doses de 25 e 50 mg/kg promoveram uma redução de glicemia após 15 minutos da sobrecarga de glicose (Figura 10A), sugerindo melhoria na tolerância à glicose (Figura 10B). Já os animais em dieta H e tratados com 100 mg/kg de pentoxifilina apresentaram um pico glicêmico 11% maior que os animais HL (Figura 10A). Vale destacar que, apesar de os animais HP100 atingirem uma glicemia de 331 mg/dL no tempo de 30 minutos, ao final do TTGO foram capazes de reduzir a glicemia para 167 mg/dL. No entanto, na análise geral do perfil do TTGO, os animais HP100 apresentaram intolerância à

glicose, como podemos observar no gráfico de área sob curva (AUC) da glicemia no TTGO (Figura 10B).

A glicose proveniente da dieta é absorvida no jejuno. Uma vez nos enterócitos, algumas moléculas de glicose ingressam na via glicolítica, enquanto que o restante atravessa a membrana basolateral e caem na circulação sanguínea via transportador de glicose 2 (GLUT 2) (WRIGHT; MARTÍN; TURK, 2003). Em trabalho com camundongos obesos e tratados com pentoxifilina na dose de 100 mg/kg, observou-se também o aumento nos níveis de glicose após sobrecarga no TTGO, provavelmente devido à maior absorção intestinal de glicose, comprovada pelo aumento na expressão gênica e proteica de GLUT 2 no jejuno destes animais (MASSART et al., 2012).

5.1.4 Marcadores de estresse glico-oxidativo e atividade da enzima antioxidante PON 1

Em animais do grupo HL houve um aumento nos níveis de TBARS no plasma (44%) (Figura 11A) e no fígado (98%) (Figura 11B), em comparação aos valores em animais P. A ingestão da dieta hiperlipídica durante 8 semanas não promoveu alteração nos níveis de TBARS no rim dos camundongos (Figura 11C). Em animais alimentados com dieta padrão e tratados com pentoxifilina, os níveis de TBARS no plasma, fígado e rim foram semelhantes aos valores em animais P (Figura 8).

Em animais alimentados com dieta hiperlipídica, o tratamento com pentoxifilina, em todas as doses estudadas (25, 50, 100 mg/kg), foi capaz de promover redução nos níveis plasmáticos de TBARS, de 23%, 29% e 27%, respectivamente, em comparação aos valores observados em animais HL (Figura 11). Ao analisarmos os níveis de TBARS no fígado, apenas as doses de pentoxifilina 50 e 100 mg/kg foram capazes de prevenir a lipoperoxidação neste tecido, em relação aos valores obtidos nos animais HL (Figura 11B). Apesar de o tratamento com 25 mg/kg de pentoxifilina ter reduzido os níveis de TBARS no plasma, esta dose não preveniu o aumento de TBARS no fígado de animais em dieta hiperlipídica. Vale ressaltar que o tratamento com 50 mg/kg de pentoxifilina promoveu o melhor resultado em relação aos níveis do biomarcador de lipoperoxidação no fígado, reduzindo em cerca de 45% os níveis hepáticos de TBARS, em comparação aos valores obtidos nos animais HL.

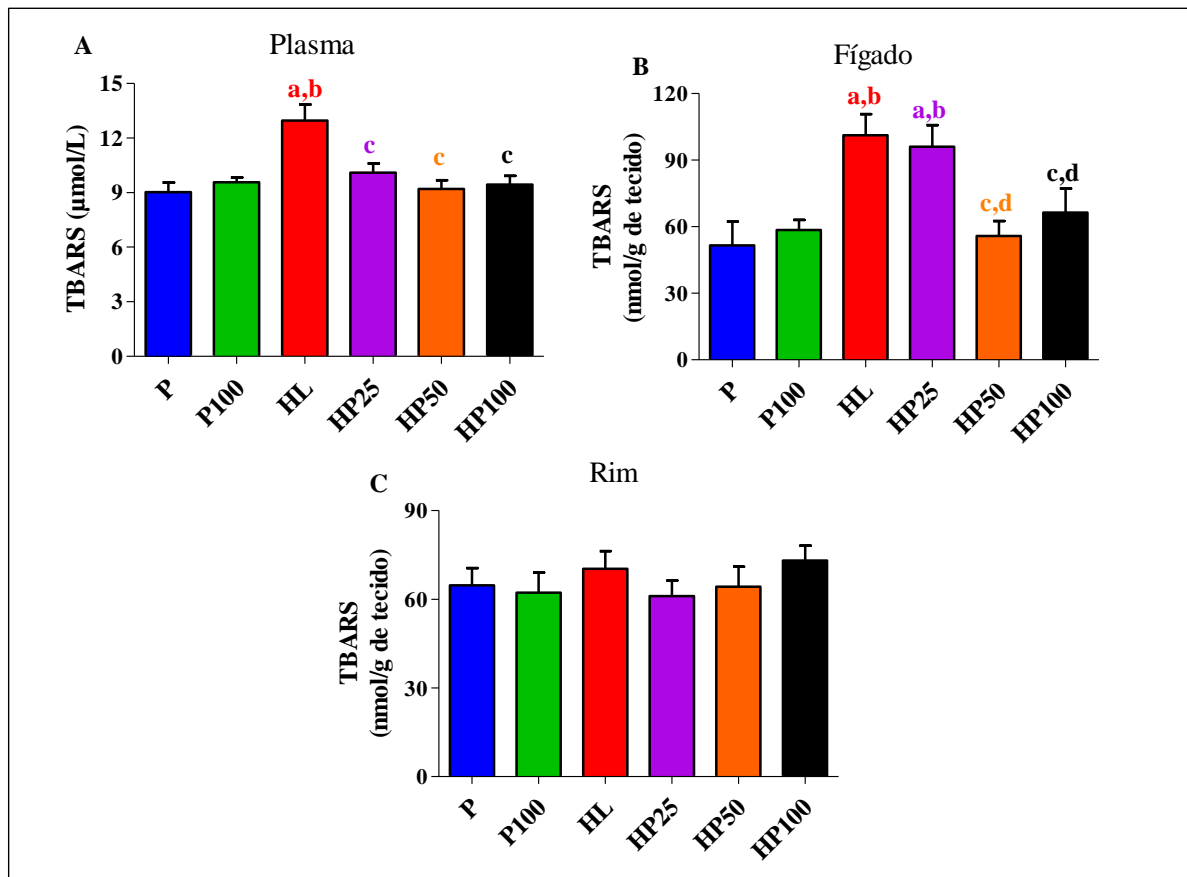


Figura 11. Níveis de TBARS no plasma (A), fígado (B) e rim (C) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com P; b, diferenças com P100; c, diferenças com HL; d, diferenças com HP25.

Como resultado preliminar relacionado a um biomarcador de estresse glicativo em animais alimentados com dieta HL e tratados com pentoxifilina, foram estimados os AGEs fluorescentes no plasma (Figura 12). Animais HL apresentaram um aumento de 93% nos níveis de AGEs fluorescentes no plasma, em relação aos valores em animais P. O tratamento com pentoxifilina, em todas as doses estudadas, promoveu redução de AGEs fluorescentes, sendo tais reduções de 40% no grupo HP25, 42% no grupo HP50 e 54% no grupo HP100, em relação aos valores em animais do grupo HL.

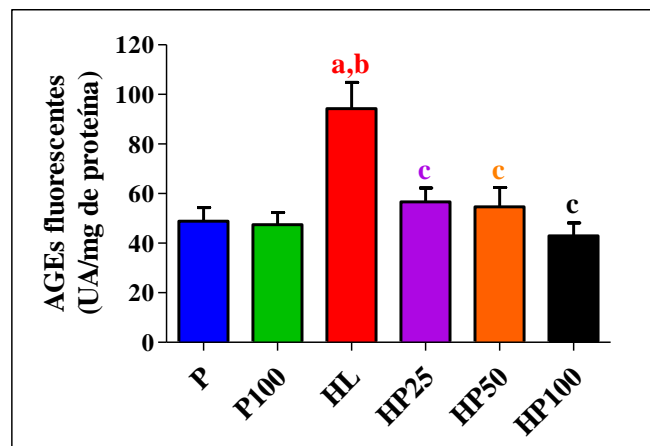


Figura 12. Estimativa dos AGEs fluorescentes no plasma de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com P; b, diferenças com P100; c, diferenças com HL.

A ingestão de dieta hiperlipídica durante 8 semanas prejudicou a atividade da PON 1, reduzindo em 27% a sua atividade em plasma de animais HL, quando comparados aos valores em animais alimentados com dieta padrão. O tratamento de animais em dieta hiperlipídica com pentoxifilina, em todas as doses estudadas, foi capaz de prevenir a perda na atividade de PON 1 no plasma (Figura 13).

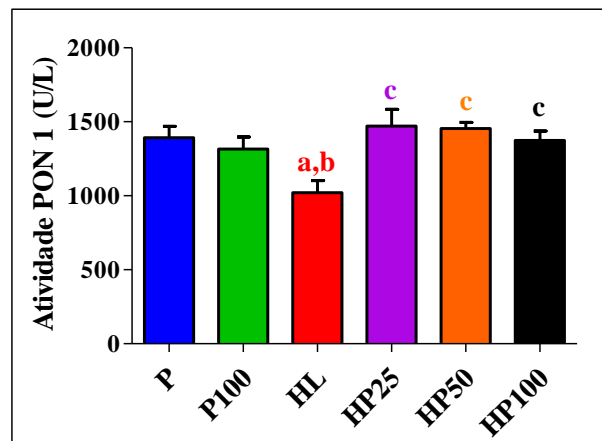


Figura 13. Atividade de paraoxonase 1 no plasma de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com P; b, diferenças com P100; c, diferenças com HL.

Diante dos resultados obtidos no experimento piloto, podemos verificar que animais que receberam dieta hiperlipídica durante 8 semanas e que foram tratados com pentoxifilina nas últimas 4 semanas apresentaram melhorias em biomarcadores de distúrbios fisiometabólicos e do estresse glico-oxidativo.

A escolha da dose de **50 mg/kg de pentoxifilina** considerou o fato de esta ter sido a única dose que apresentou tendência em reduzir o ganho de peso corporal e as massas de tecidos adiposos brancos epididimal e retroperitoneal em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Além disso, camundongos em dieta hiperlipídica e tratados com 50 mg/kg de pentoxifilina apresentaram redução nos níveis de TBARS no plasma e fígado, bem como redução nos níveis de AGEs fluorescentes no plasma, e aumento na atividade da enzima antioxidante PON 1. Por fim, o tratamento de animais em dieta hiperlipídica com 50 mg/kg de pentoxifilina melhorou a tolerância à glicose.

Em animais alimentados com dieta hiperlipídica, o tratamento com pentoxifilina na dose de 100 mg/kg prejudicou a tolerância à glicose, e o tratamento com pentoxifilina na dose de 25 mg/kg não preveniu o aumento nos níveis de TBARS no fígado.

Animais alimentados com dieta padrão e tratados com pentoxifilina não apresentaram alterações em nenhum parâmetro analisado, em comparação aos animais P.

Por fim, não foi observada toxicidade hepática ou renal em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica durante 8 semanas, bem como após o tratamento com pentoxifilina durante as 4 últimas semanas, em todas as doses estudadas.

A princípio, a padronização no nosso laboratório do modelo experimental de obesidade e resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica utilizou camundongos *Swiss*, uma linhagem *outbred* (heterogênica). Alguns autores apresentam argumentos favoráveis ao uso destes animais, principalmente enfatizando a variabilidade genética presente na população humana (FESTING, 2010). No entanto, a linhagem isogênica *inbred* (AKR/J, A/J, C57BL/J, C57BL/6J, BALB/c), devido a sua uniformidade genética, resulta em respostas com menor variação fenotípica bem como reprodutibilidade nos estudos farmacológicos (JENSEN et al., 2016). Dentre as diversas linhagens *inbred*, os camundongos C57BL/6J são os mais utilizados, desde os estudos iniciais de Surwit e colaboradores (1988 e 1995) que utilizaram estes animais para o estudo de distúrbios metabólicos (MONTGOMERY et al., 2013).

Entre os principais objetivos do nosso estudo, podemos destacar a compreensão dos mecanismos de ação da pentoxifilina na melhoria de alterações na morfologia renal e em marcadores do estresse glico-oxidativo, em animais obesos e resistentes à insulina. Em trabalho de Jiang e colaboradores (2005) os autores demonstraram que animais C57BL/6J são

susceptíveis a desenvolver alterações renais com a indução de obesidade por dieta hiperlipídica. Diversos estudos ainda demonstraram que lesões renais semelhantes à DRC em pacientes com síndrome metabólica aparecem em camundongos a partir de 12 semanas em dieta hiperlipídica (JIANG et al., 2005; TANAKA et al., 2011; DECLÈVES et al., 2011).

Diante dos fatos apresentados, para o experimento definitivo optamos por utilizar a linhagem de camundongos C57BL/6J para os estudos dos efeitos do tratamento com pentoxifilina (50 mg/kg) em animais alimentados com dieta hiperlipídica durante 14 semanas.

5.2 Experimento definitivo: Avaliação de parâmetros fisiometabólicos e de biomarcadores do estresse glico-oxidativo em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com pentoxifilina (50 mg/kg)

5.2.1 Parâmetros fisiológicos

A instalação da obesidade em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica durante as 14 semanas foi comprovada com o aumento significativo no ganho de peso corporal dos animais HL e HPTX, em especial a partir da 4^a semana, quando comparados aos valores encontrados nos animais P (Figura 14A). Vale ressaltar que, ao final do experimento, os animais HL quase duplicaram o peso corporal, em relação aos animais em dieta padrão (Figura 14B). Durante todo o período experimental, os animais HL apresentaram uma menor ingestão alimentar (g/dia) (Figura 14C). Apesar deste grupo ingerir uma quantidade de ração significativamente menor em relação aos animais P, é possível verificar que os animais em dieta hiperlipídica apresentaram maior ingestão energética, no período entre a 8^a e a 14^a semanas (Figura 14D).

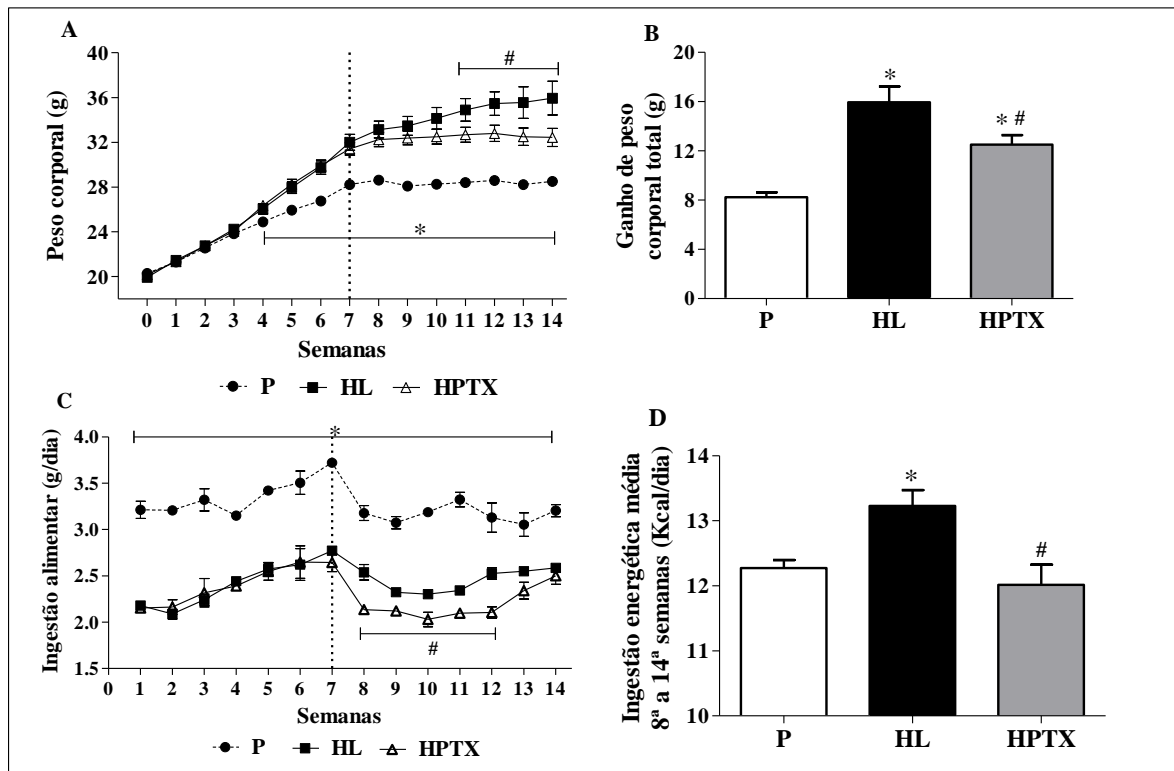


Figura 14. Evolução do peso corporal (A), ganho de peso corporal total (B), ingestão alimentar (C) e ingestão energética média (D) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. *, diferenças com P; #, diferenças com HL.

Animais HPTX apresentaram um menor ganho de peso corporal, em relação aos animais HL (Figuras 14A e B). Estes resultados corroboram os achados anteriores do experimento piloto, onde também foi observada tendência à atenuação no ganho de peso corporal em animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com 50 mg/kg de pentoxifilina (Figuras 5 A e B). Ao final do experimento, podemos verificar que os animais em dieta hiperlipídica e tratados com pentoxifilina apresentaram redução de 21% no ganho de peso corporal total (Figura 14B), em relação aos animais do grupo HL. O menor ganho de peso corporal em animais HPTX pode ser explicado, em parte, pelos menores valores de ingestão alimentar (Figura 14C) e de ingestão energética média (Figura 14D), observados logo após o início do tratamento com pentoxifilina. A atenuação no ganho de peso corporal nos animais HPTX ocorreu da 11ª até a 14ª semana de experimento. No entanto, animais HPTX apresentaram redução significativa no perfil de ingestão alimentar, da 8ª até a 12ª semana. Porém, após a 12ª semana, animais HPTX apresentaram um aumento gradativo na ingestão alimentar, alcançando valores semelhantes aos animais HL, na 14ª semana (Figura 14C). No entanto, este aumento da ingestão alimentar

observado no grupo HPTX, da 12^a a 14^a semanas, não culminou em aumento no ganho de peso corporal destes animais.

Corroborando o que foi observado no perfil de peso corporal, animais HL apresentaram aumento nas massas de todos os tecidos adiposos brancos (rpTAB, eTAB, sTAB) e marrom (iTAM), de 344%, 266%, 250%, 93%, respectivamente, em comparação às massas de tecidos adiposos de animais P (Figura 15). O tratamento de animais em dieta hiperlipídica com pentoxifilina promoveu uma redução nas massas de todos os tecidos adiposos estudados (Figura 15).

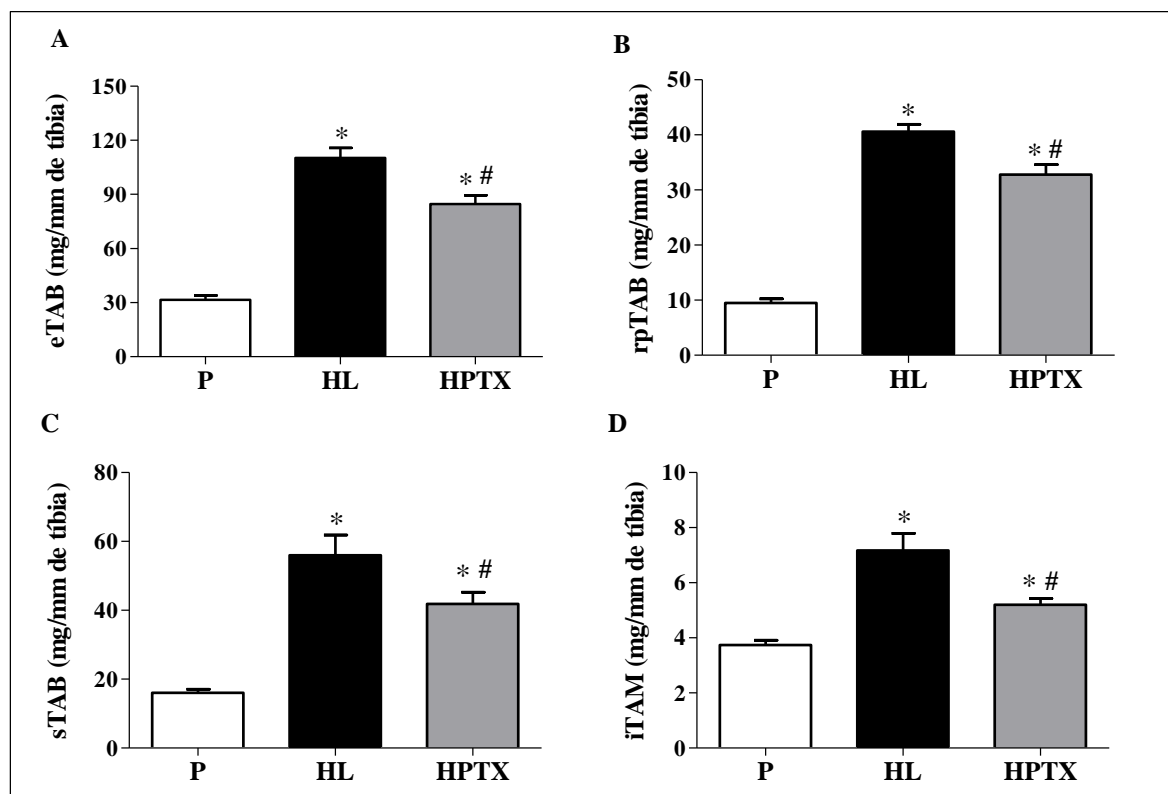


Figura 15. Massas (mg) dos tecidos adiposos branco retroperitoneal (A), epididimal (B), subcutâneo (C) e tecido adiposo marrom interescapular (D) corrigidos pelo comprimento da tibia (mm) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. *, diferenças com P; #, diferenças com HL ($p < 0,05$).

Nos animais HL, além do evidente aumento nas massas de todos os tecidos adiposos analisados, também podemos observar um aumento nas massas de fígado e rim, em comparação aos valores observados nos animais P (Tabela 3). Nos animais do grupo HPTX houve redução nas massas de fígado e rim, em relação aos animais HL. As massas dos músculos esqueléticos *gastrocnemius* e de coração não apresentaram diferenças entre os grupos experimentais.

Tabela 3. Massas do músculo esquelético *gastrocnemius*, fígado, coração e rim (mg) corrigidas pelo comprimento da tíbia (mm) de animais alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.

Grupos	Fígado (mg/mm de tíbia)	Rim (mg/mm de tíbia)	Coração (mg/mm de tíbia)	Músculo <i>Gastrocnemius</i> (mg/mm de tíbia)
P	59,5 ±3,0	8,8 ±0,2	8,6 ±0,3	9,8 ±0,2
HL	70,9 ±3,0 *	10,0 ±0,3 *	7,9 ±0,4	10,4 ±0,2
HPTX	61,1 ±2,0 #	8,6 ±0,2 #	8,0 ±0,2	9,8 ±0,2

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. *, diferenças com P; #, diferenças com HL ($p < 0,05$).

5.2.2 Parâmetros bioquímicos, hormonais e inflamatórios

A oferta da dieta hiperlipídica durante 14 semanas não promoveu aumento nos níveis plasmáticos de triacilgliceróis nos animais HL. Contudo, animais dos grupos HL e HPTX apresentaram um aumento significativo nos níveis de colesterol total e de colesterol-HDL, em relação aos animais que receberam dieta padrão (Tabela 4), tal como evidenciado por Podrini e colaboradores (2013). Os níveis plasmáticos de ALT e ALP, biomarcadores utilizados para a avaliação da integridade hepática, bem como os níveis plasmáticos de creatinina e ácido úrico, biomarcadores relacionados à função renal, não foram alterados, seja pela oferta de dieta hiperlipídica, seja pelo tratamento com pentoxifilina (Tabela 4). No entanto, animais HL e HPTX apresentaram aumento nos níveis de albumina, em comparação aos animais P.

Tabela 4. Níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol HDL, triacilgliceróis, ALT, ALP, ácido úrico, creatinina e albumina de animais alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina.

Grupos	P	HL	HPTX
Triacilgliceróis (mg/dL)	48,2 ±3,3	43,3 ±3,3	48,4 ±3,3
Colesterol total (mg/dL)	96,5 ±3,7	151,0 ±6,3 *	150,1 ±6,1 *
Colesterol-HDL (mg/dL)	86,2 ±3,3	123,1 ±4,2 *	128,4 ±5,3 *
ALT (UI/L)	84,5 ±3,2	76,9 ±3,8	77,19 ±4,9
ALP (UI/L)	42,2 ±1,8	45,8 ±2,2	41,2 ±2,3
Ácido úrico (mg/dL)	0,87 ±0,05	0,83 ±0,04	0,76 ±0,04
Creatinina (mg/dL)	0,165 ±0,009	0,154 ±0,006	0,165 ±0,005
Albumina (g/dL)	1,95 ±0,03	2,11 ±0,04 *	2,13 ±0,03 *

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. *, diferenças com P; #, diferenças com HL ($p < 0,05$).

Os níveis de triacilgliceróis foram aumentados no rim (2,6 vezes) e no fígado (2,3 vezes) de animais que receberam dieta hiperlipídica, quando comparados com os animais que receberam dieta padrão. O tratamento de animais em dieta hiperlipídica com pentoxifilina promoveu redução nos níveis de triacilgliceróis no rim e no fígado, de 53% e 47%, respectivamente, em relação aos valores obtidos nos animais do grupo HL (Figura 16).

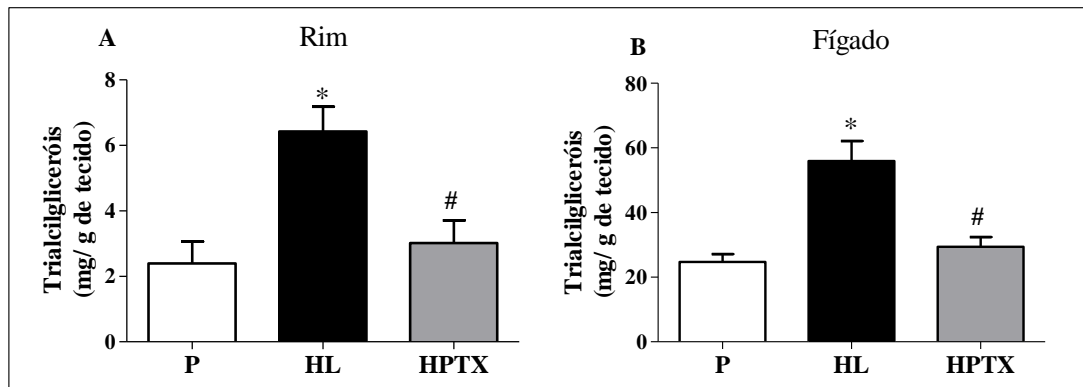


Figura 16. Conteúdo de triacilgliceróis no rim (A) e no fígado (B) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. *, diferenças com P; #, diferenças com HL ($p < 0,05$).

Nos animais do grupo HL, foram observados aumentos de 324% (4 vezes) nos níveis séricos de insulina, 679% (7,8 vezes) nos níveis séricos de leptina, e 73% nos níveis séricos de resistina, em comparação aos valores obtidos nos animais do grupo P (Figuras 17A, B e C). O tratamento de animais em dieta hiperlipídica com pentoxifilina promoveu diminuição nos níveis séricos de insulina e leptina, de 33% e 29%, respectivamente, em relação aos animais HL (Figuras A e B). No entanto, os níveis séricos de resistina não apresentaram diferença significativas entre os animais HPTX e HL (Figura 17C).

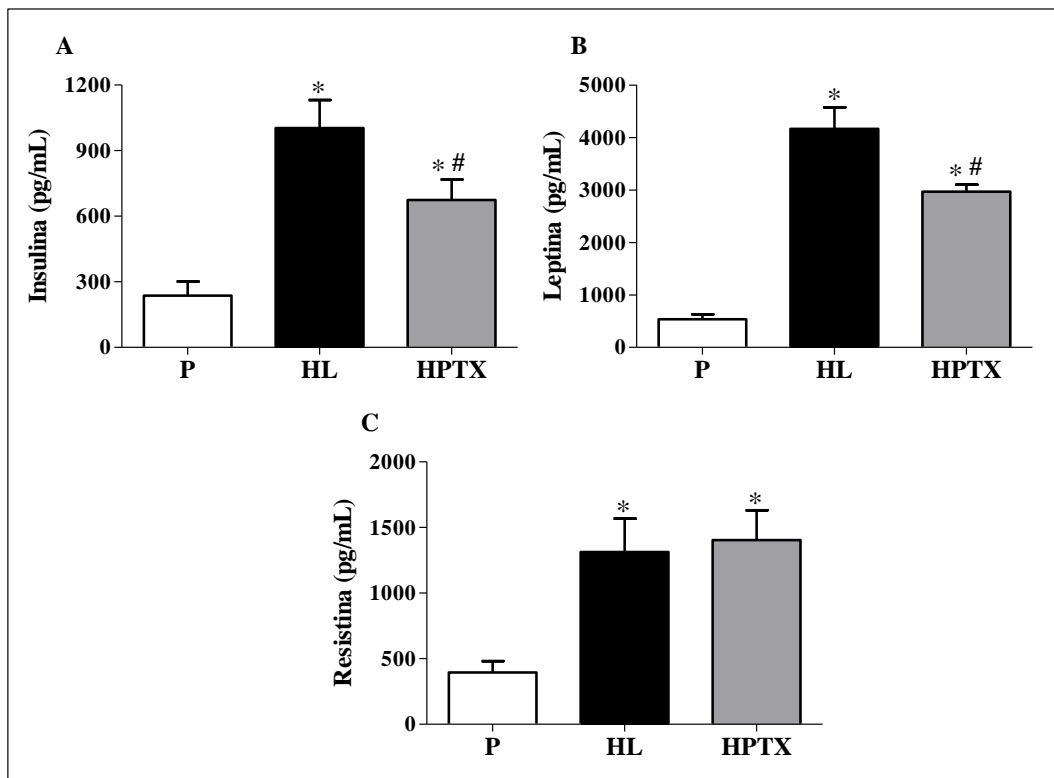


Figura 17. Níveis séricos de insulina (A), leptina (B) e resistina (C) de animais alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. *, diferenças com P; #, diferenças com HL ($p < 0,05$).

Em relação ao biomarcadores pró-inflamatórios, podemos observar nos animais do grupo HL um aumento de 27% nos níveis séricos de TNF- α e de 130% nos níveis séricos de MCP-1, em relação aos animais do grupo P (Figuras 18A e C). Em animais em dieta hiperlipídica, o tratamento com pentoxifilina promoveu uma redução de 48% nos níveis séricos de MCP-1 (Figura 18C), no entanto, nestes animais não foram observadas diferenças nos níveis séricos de TNF- α , quando comparados aos animais HL (Figura 18A). Os níveis séricos de IL-6 não foram diferentes entre os grupos experimentais (Figura 18B).

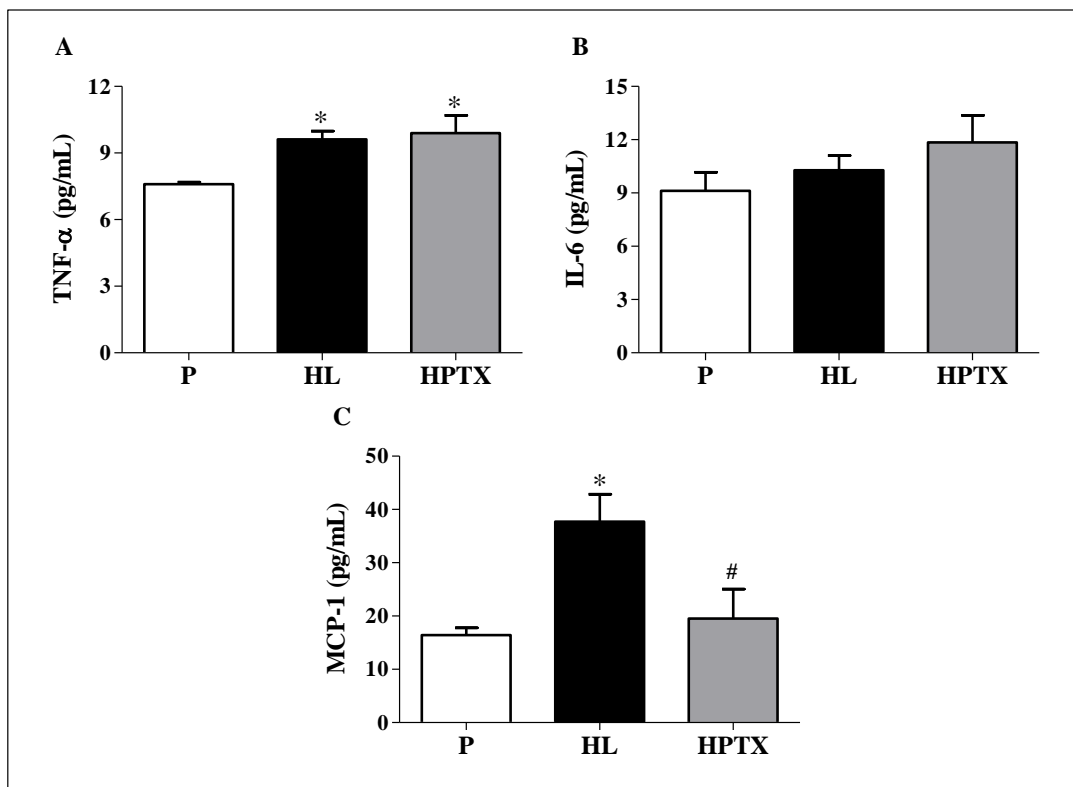


Figura 18. Níveis séricos de TNF- α (A), IL-6 (B) e MCP-1 (C) de animais alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. *, diferenças com P; #, diferenças com HL ($p < 0,05$).

5.2.3 Caracterização da intolerância à glicose e sensibilidade à insulina

Animais alimentados com dieta hiperlipídica durante 14 semanas apresentaram um aumento significativo nos níveis glicêmicos de jejum de 12 horas (67%) e de 6 horas (53%), em relação aos valores encontrados nos animais alimentados com dieta padrão (Figuras 19C e F, respectivamente). Em comparação aos animais P, após a sobrecarga de glicose, animais HL apresentaram um pico glicêmico 37% maior (Figura 19A) e, ao final do TTGO, não foram capazes de corrigir a glicemia de forma eficiente, em comparação aos animais P. Animais P foram capazes de alcançar, duas horas após a sobrecarga de glicose, níveis glicêmicos semelhantes aos valores da glicemia em jejum. Na Figura 19B, referente à AUC da glicemia no TTGO, podemos observar também a caracterização da tolerância à glicose prejudicada nos animais HL.

Com o monitoramento da glicemia no TTGO, podemos verificar que o tratamento com pentoxifilina reduziu em 23% os níveis de glicemia em jejum de 12 horas (Figura 19C). E pós-sobrecarga de glicose, nos tempos 15 até 120 minutos, o tratamento com pentoxifilina reduziu significativamente os níveis glicêmicos, em comparação aos valores obtidos nos animais HL

(Figura 19A). Na AUC da glicemia no TTGO, confirmou-se o efeito benéfico do tratamento com pentoxifilina em animais alimentados com dieta hiperlipídica (Figura 19B), o qual promoveu melhorias na tolerância à glicose.

Em adição ao estabelecimento da intolerância à glicose, podemos observar também uma redução da sensibilidade à insulina em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (Figura 19D). Após o desafio com insulina, em todos os tempos de monitoramento da glicemia no ITT, os níveis glicêmicos dos animais HL foram significativamente maiores em relação aos valores encontrados em animais P (Figura 19D). Vale ressaltar que os animais P, após 60 minutos da administração de insulina, atingiram níveis médios de glicemia sugestivos de hipoglicemia ($37,5 \pm 3,38$ mg/dL), enquanto que os animais HL apresentaram níveis médios glicêmicos maiores ($98,6 \pm 8,69$ mg/dL) após 60 minutos da administração de insulina. Estes dados sugerem uma redução da sensibilidade à insulina nos animais HL, confirmada pelos maiores valores de AUC da glicemia no ITT, em comparação aos animais P (Figura 19E).

Os animais que receberam dieta hiperlipídica e que foram tratados com pentoxifilina apresentaram uma redução de 20% na glicemia de jejum de 6 horas, em relação aos valores observados nos animais HL (Figura 19F). Frente ao desafio com insulina, animais em dieta hiperlipídica e tratados com pentoxifilina apresentaram melhorias significativas na sensibilidade à insulina, uma vez que houve maior redução na glicemia nos tempos 15, 45 e 60 minutos pós-administração de insulina, em comparação ao perfil observado em animais HL (Figura 19D). O aumento da sensibilidade à insulina nos animais HPTX também pode ser observado com a menor AUC da glicemia no ITT (Figura 19F). Portanto, em animais alimentados com dieta hiperlipídica durante 14 semanas, o tratamento com pentoxifilina nas últimas 7 semanas promoveu aumento da tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina.

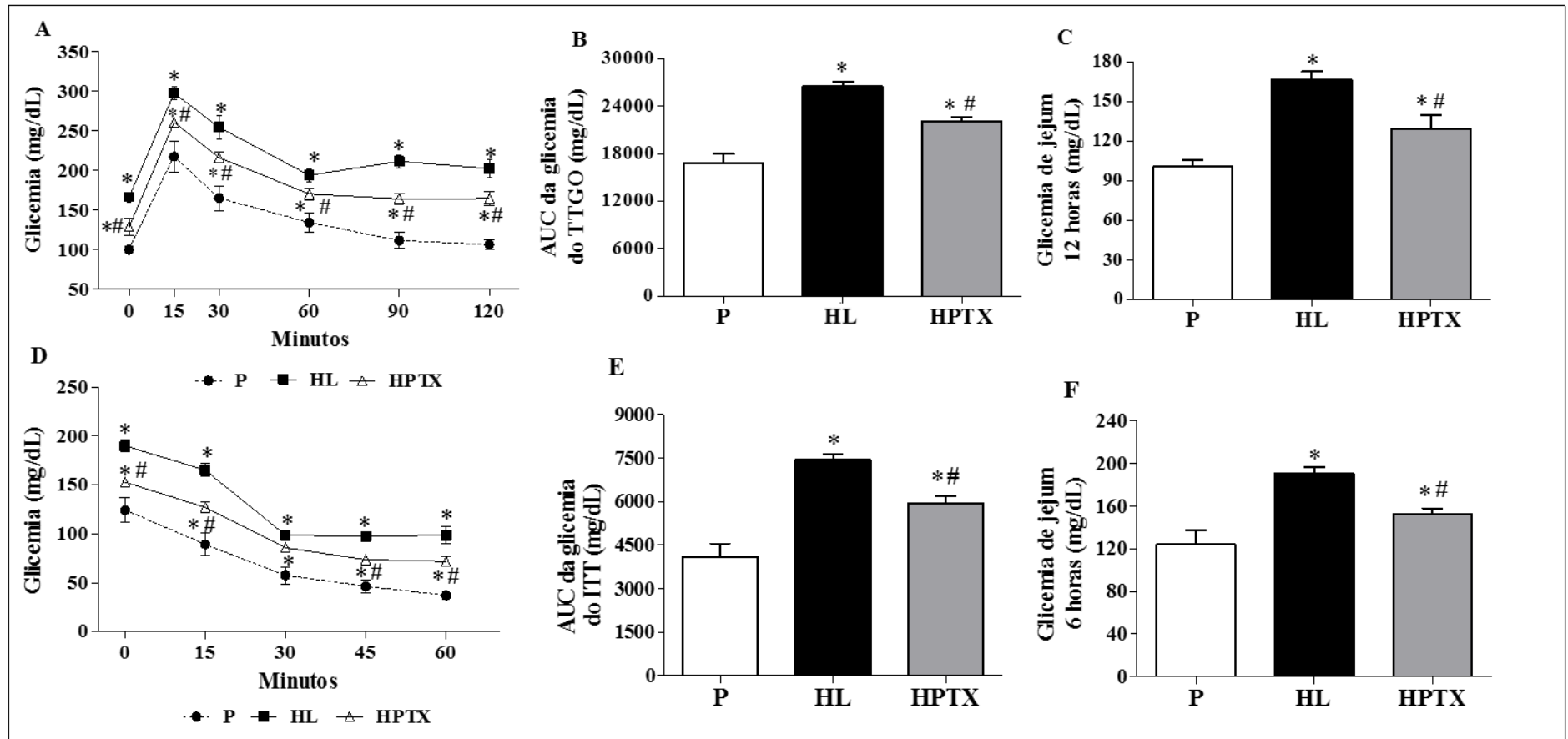


Figura 19. Teste de tolerância à glicose oral (A), AUC da glicemia no TTGO (B), glicemia de jejum de 12 horas de jejum (C), teste de tolerância à insulina (D), AUC da glicemia no ITT (E) glicemia de jejum de 6 horas (F) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. *, diferenças com P; #, diferenças com HL.

5.2.4 Níveis de fosforilação de AKT em tecidos adiposos brancos epididimal e subcutâneo, tecido adiposo marrom interescapular e no músculo esquelético *gastrocnemius*

Corroborando os resultados de intolerância à glicose e resistência à insulina, animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram diminuição nos níveis de fosforilação da AKT estimulada por insulina, em todos os tecidos adiposos estudados (Figura 20). Destaca-se que os menores níveis de fosforilação da AKT estimulada por insulina em animais HL ocorreram no iTAM (82%), seguido do sTAB (36%) e por último eTAB (26%), comparados aos níveis de fosforilação de AKT estimulada por insulina encontrados nos tecidos adiposos de animais P (Figuras 20A-C). No eTAB, podemos observar ainda a ocorrência de uma menor fosforilação basal de AKT nos animais HL, em comparação aos valores em animais P. No entanto, no sTAB e no iTAM, a fosforilação basal de AKT dos animais pertencentes aos grupos HL e HPTX foram maiores (6 e 4 vezes, respectivamente), em relação aos valores obtidos nos animais P.

De acordo com os resultados do TTGO e do ITT de animais HPTX (Figura 19), podemos sugerir que houve uma melhoria na tolerância a glicose destes animais, a qual pode ter sido uma consequência do aumento na sensibilidade à insulina, e tais resultados foram corroborados pela melhoria na ativação de um intermediário da sinalização de insulina nos tecidos adiposos eTAB, sTAB e iTAM, uma vez que houve aumento na fosforilação estimulatória da AKT. O tratamento com pentoxifilina promoveu aumentos nos níveis de fosforilação da AKT estimulada por insulina no iTAM (108%), sTAB (37%) e eTAB (32%) (Figura 20), em comparação aos valores encontrados nos tecidos adiposos de animais HL. Níveis basais de fosforilação da AKT em animais HPTX também foram maiores no eTAB, em relação aos valores em animais HL; no sTAB e iTAM não foram encontradas diferenças significativas nos níveis basais de fosforilação de AKT entre os animais HPTX e HL (Figura 20).

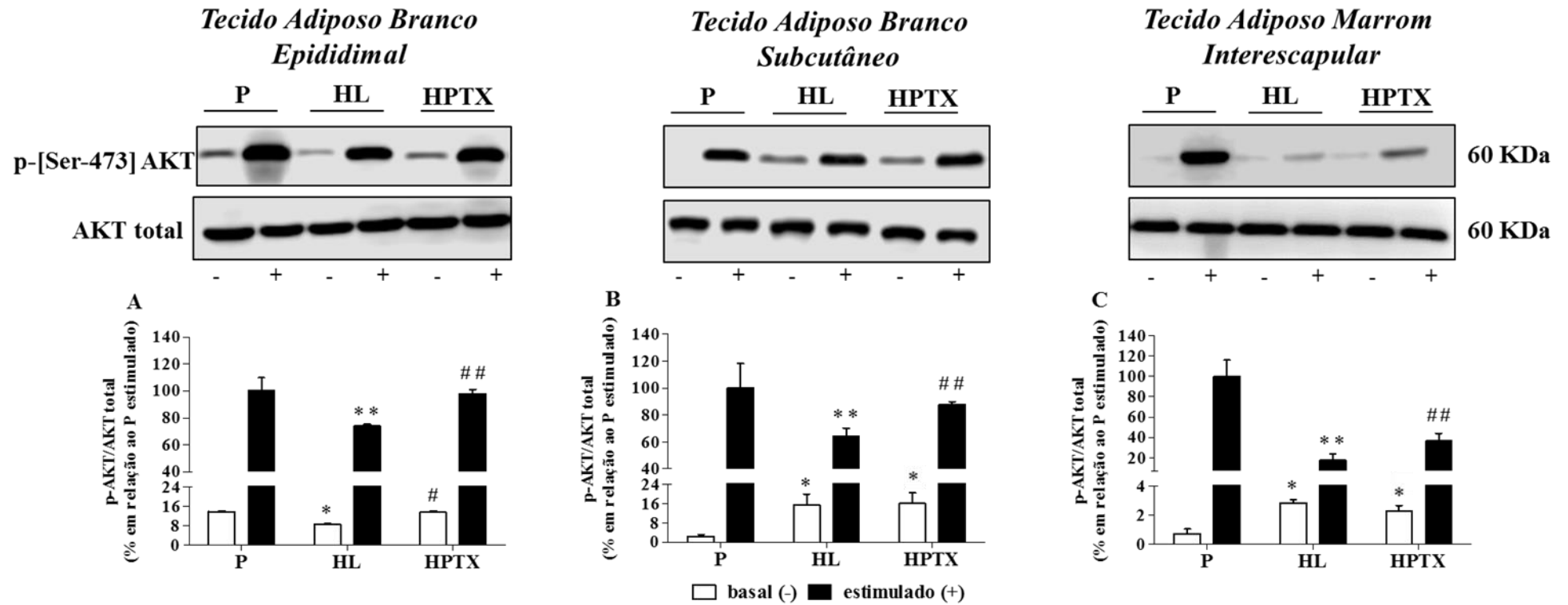


Figura 20. Fosforilação da AKT (basal e estimulada por insulina) nos tecidos adiposos brancos epididimal (A), subcutâneo (B) e no tecido adiposo marrom interescapular (C) de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. *, diferenças com P basal; **, diferenças com P estimulado; #, diferenças com HL basal; ##, diferenças com HL estimulado.

Tal como observado nos tecidos adiposos, também houve diminuição (80%) nos níveis de fosforilação da AKT estimulada com insulina no músculo esquelético *gastrocnemius* de animais do grupo HL, quando comparados aos valores obtidos nos animais P (Figura 21). O tratamento de animais em dieta hiperlipídica com pentoxifilina promoveu aumento de 41% nos níveis da fosforilação da AKT estimulada por insulina. Não foi possível a visualização e, portanto, a quantificação da fosforilação basal de AKT em músculos *gastrocnemius* em todos os grupos experimentais.

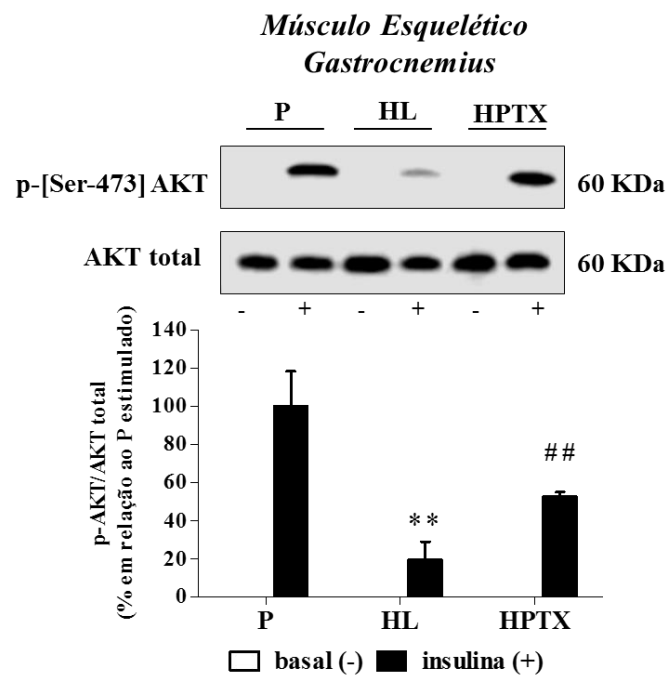


Figura 21. Fosforilação da AKT (basal e estimulada por insulina) no músculo esquelético *gastrocnemius* de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. **, diferenças com P estimulado; ##, diferenças com HL estimulado.

5.2.5 Parâmetros relacionados a inflamação, estresse glico-oxidativo e potencial antioxidante

Em animais alimentados com dieta hiperlipídica durante 14 semanas, houve aumento de 47% nos AGEs fluorescentes plasmáticos (Figura 22A) e de 51% nos níveis de TBARS (Figura 22C), em relação aos valores encontrados nos animais P. O tratamento de animais em dieta hiperlipídica com pentoxifilina promoveu redução nos níveis plasmáticos de ambos os biomarcadores, AGEs fluorescentes e TBARS, quando comparados aos valores encontrados

nos animais HL (Figura 22). Os níveis plasmáticos de frutossamina não foram diferentes entre os grupos experimentais (Figura 22B).

Em relação aos resultados obtidos nos níveis do colesterol-HDL, enquanto no experimento piloto animais HL apresentaram um aumento de apenas 19% (Tabela 2), no experimento definitivo observamos que animais alimentados com dieta hiperlipídica durante 14 semanas (HL e HPTX) apresentaram um aumento de 45% nos níveis de colesterol-HDL (Tabela 4), em comparação aos valores encontrados nos respectivos grupos P de cada experimento. Diante disso, no experimento definitivo, optamos pela correção da atividade da enzima antioxidante paraoxonase (PON 1) pelos níveis de colesterol-HDL. Vale destacar que, apesar de os animais HL e HPTX apresentarem elevados níveis de colesterol-HDL, podemos sugerir que a “qualidade” da lipoproteína HDL foi prejudicada em animais do grupo HL, devido à redução de 29% na atividade da PON 1 (após correção por HDL), em comparação aos valores encontrados em animais do grupo P. Por sua vez, o tratamento com pentoxifilina foi capaz de melhorar a qualidade da HDL, uma vez que a atividade de PON 1 (após correção por HDL) em animais HPTX foi 32% maior em relação àquela observada em animais HL (Figura 22D).

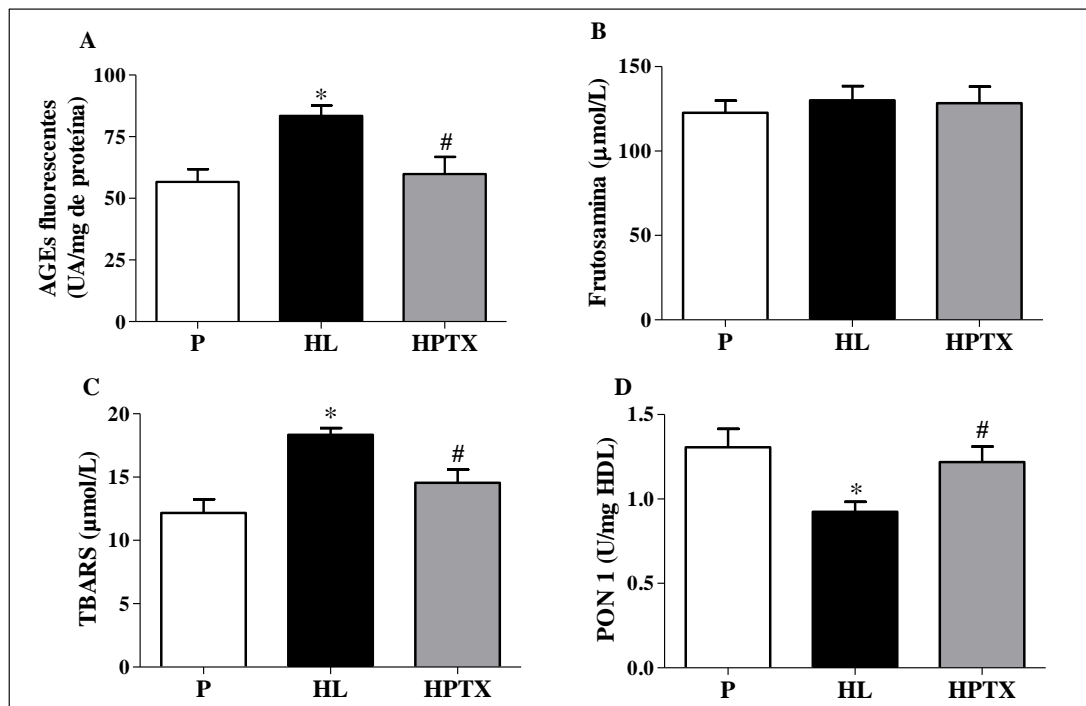


Figura 22. Estimativa dos AGEs fluorescentes (A), níveis de frutossamina (B), níveis de TBARS (C) e atividade de PON 1 (D) no plasma de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. *, diferenças com P; #, diferenças com HL.

Animais HL apresentaram um aumento de 24% nos AGEs fluorescentes no fígado, em relação aos valores encontrados em animais P (Figura 23A). Os níveis de TBARS em fígado de animais HL foram maiores (142%) em comparação aos valores observados em animais P (Figura 23B). Ainda no fígado, podemos observar que animais em dieta hiperlipídica apresentaram uma redução de 12% na atividade da SOD e de 26% nas atividades das enzimas antioxidantes GSH-Px e CAT (Figuras 23C-E).

O tratamento de animais em dieta hiperlipídica com pentoxifilina promoveu redução nos níveis de TBARS e AGEs fluorescentes no fígado (Figuras 23A e B) e foi capaz de reestabelecer as atividades de todas as enzimas antioxidantes estudadas (SOD, GSH-Px e CAT), as quais alcançaram valores semelhantes aos observados nos animais P (Figura 23 C-E).

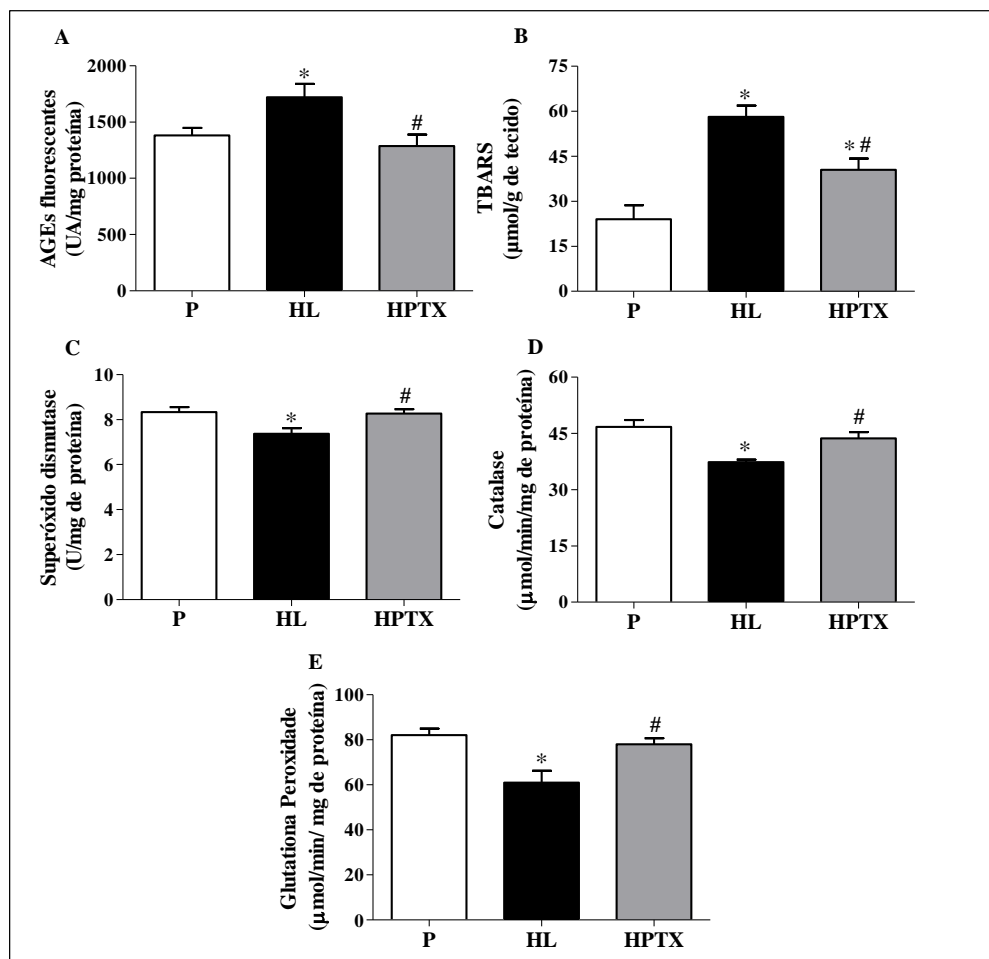


Figura 23. Estimativa dos AGEs fluorescentes (A) níveis de TBARS (B) e atividades das enzimas antioxidantes SOD (C), CAT (D) e GSH-Px (E) no fígado de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com p<0,05. *, diferenças com P; #, diferenças com HL.

Na Figura 24 é possível observar alterações sugestivas de presença de depósitos lipídicos dispostos de forma difusa por todo o córtex renal, especificamente no citoplasma das células do epitélio tubular. Os possíveis depósitos lipídicos aparecem na forma de pequenos glóbulos (seta), alguns se coalescendo e formando vesículas maiores (Figura 24B), mas não induzindo deformidade celular. Estes achados de possíveis depósitos lipídicos foram confirmados via análise semi-quantitativa, sendo observados túbulos renais vacuolizados em animais alimentados com dieta hiperlipídica, em relação à análise histológica dos rins de animais alimentados com dieta padrão (Figura 24D). O aumento observado nos níveis de triacilgliceróis em rins de animais HL (Figura 16A) também respalda o achado de depósitos lipídicos aumentados. Na Figura 24C, podemos observar a hipertrofia e expansão dos glomérulos renais em animais do grupo HL, com um aumento de 64% na área glomerular (Figura 24E), em comparação às estruturas dos glomérulos renais de animais do grupo P. Apesar das evidentes mudanças na estrutura renal dos animais HL, não foram observadas alterações em biomarcador de função renal (creatinina) ou de integridade glomerular (proteína urinária), tanto no plasma (Tabela 4) quanto em urina de 24 horas (Figura 24F), em relação aos valores encontrados nos animais P.

Em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com pentoxifilina, observou-se uma diminuição significativa dos possíveis depósitos de lipídeos (seta) nos rins, com células vacuolizadas em áreas mais restritas, em comparação ao grupo HL (Figuras 24A e D). Tal achado é corroborado pela diminuição observada nos níveis de triacilgliceróis em rins de animais HPTX (Figura 16A). Em animais HPTX verificou-se ainda a prevenção da hipertrofia e da expansão dos glomérulos (Figuras 24C), com redução de 27% na área glomerular renal (Figura 24E), em relação aos animais HL. Por fim, ao analisarmos os valores de proteína urinária corrigida pela creatinina urinária de animais HPTX, os resultados apontam uma tendência de redução neste biomarcador de integridade glomerular (Figura 24F).

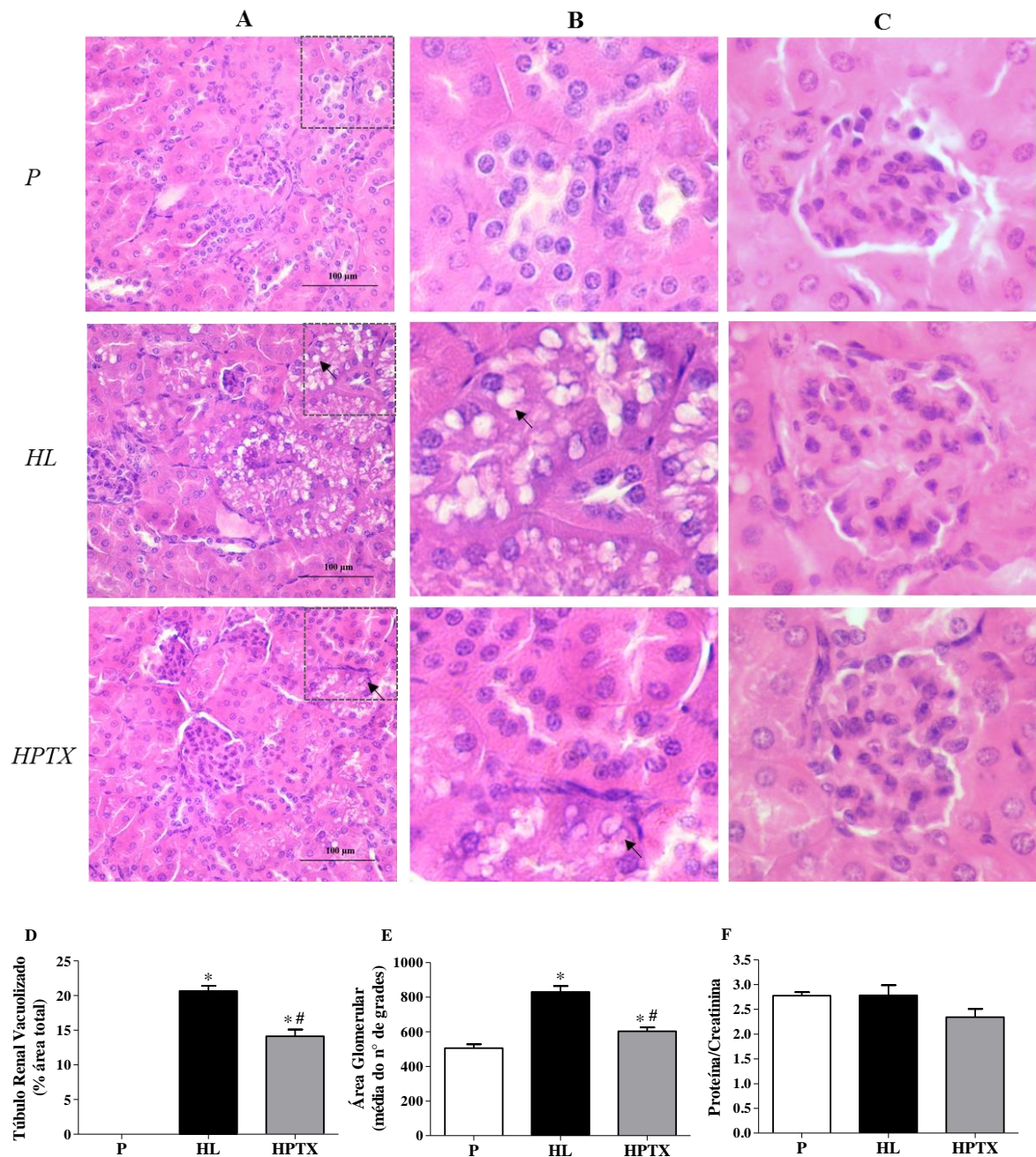


Figura 24. Imagens representativas de cortes histológicos de rins corados em H&E (ampliação de 400 x) (A); células tubulares vacuolizadas (setas) (B); glomérulo (C); densidade (%) de túbulos contendo células vacuolizadas (D); área glomerular (E) relação proteína total urinária e creatinina urinária (F) de animais alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. *, diferenças com P; #, diferenças com HL.

Nos rins de animais alimentados com dieta hiperlipídica, foram observados maiores níveis de TBARS e AGEs fluorescentes (Figura 25) em relação aos valores encontrados em animais P. O tratamento de animais em dieta hiperlipídica com pentoxifilina reduziu os níveis de TBARS e AGEs fluorescentes (Figura 25).

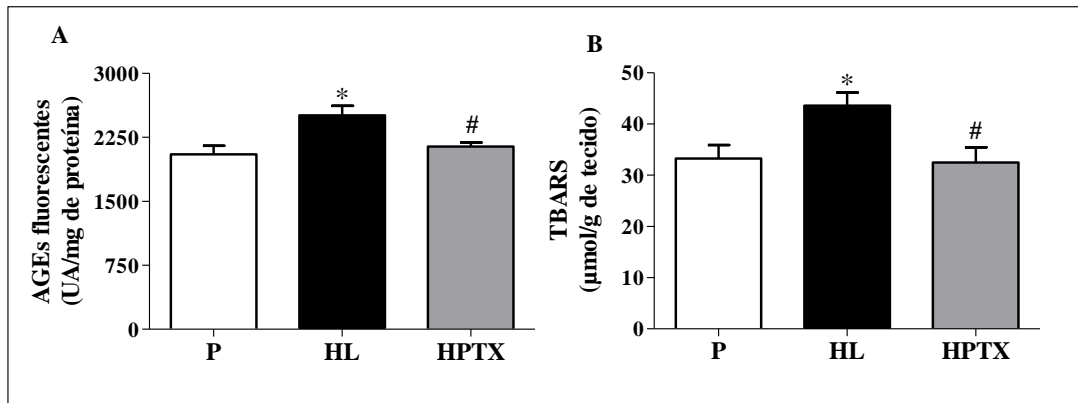


Figura 25. Estimativa dos AGEs fluorescentes (A) e níveis de TBARS (B) nos rins de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. *, diferenças com P; #, diferenças com HL.

Em relação ao biomarcadores pró-inflamatórios analisados nos rins, animais alimentados com dieta hiperlipídica durante 14 semanas apresentaram aumento de 22% nos níveis de TNF- α , 40% nos níveis de IL-6 e de 30% nos níveis de MCP-1, em relação aos valores encontrados em rins de animais do grupo P (Figuras 26A-C). O tratamento com pentoxifilina promoveu redução nos níveis de TNF- α , IL-6 e MCP-1, em 23%, 30% e 37% respectivamente, em relação aos valores encontrados em rins de animais HL.

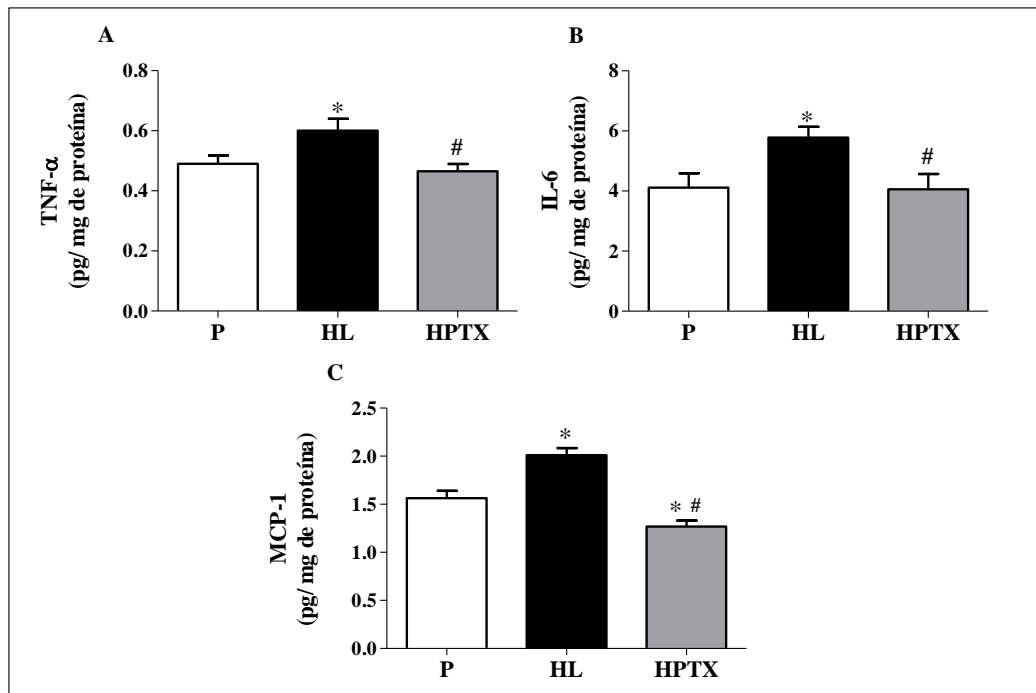


Figura 26. Níveis de TNF- α (A), IL-6 (B) e MCP-1 (C) nos rins de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. *, diferenças com P; #, diferenças com HL.

Nos rins de animais alimentados com dieta hiperlipídica, foram observadas diminuições nas atividades das enzimas antioxidantes SOD (15%), CAT (24%) e GSH-Px (20%) (Figura 27), em relação aos valores encontrados em animais P. O tratamento de animais em dieta hiperlipídica com pentoxifilina promoveu aumentos nas atividades de todas as enzimas antioxidantes estudadas (SOD, CAT e GSH-Px), em comparação valores encontrados em animais HL (Figuras 27).

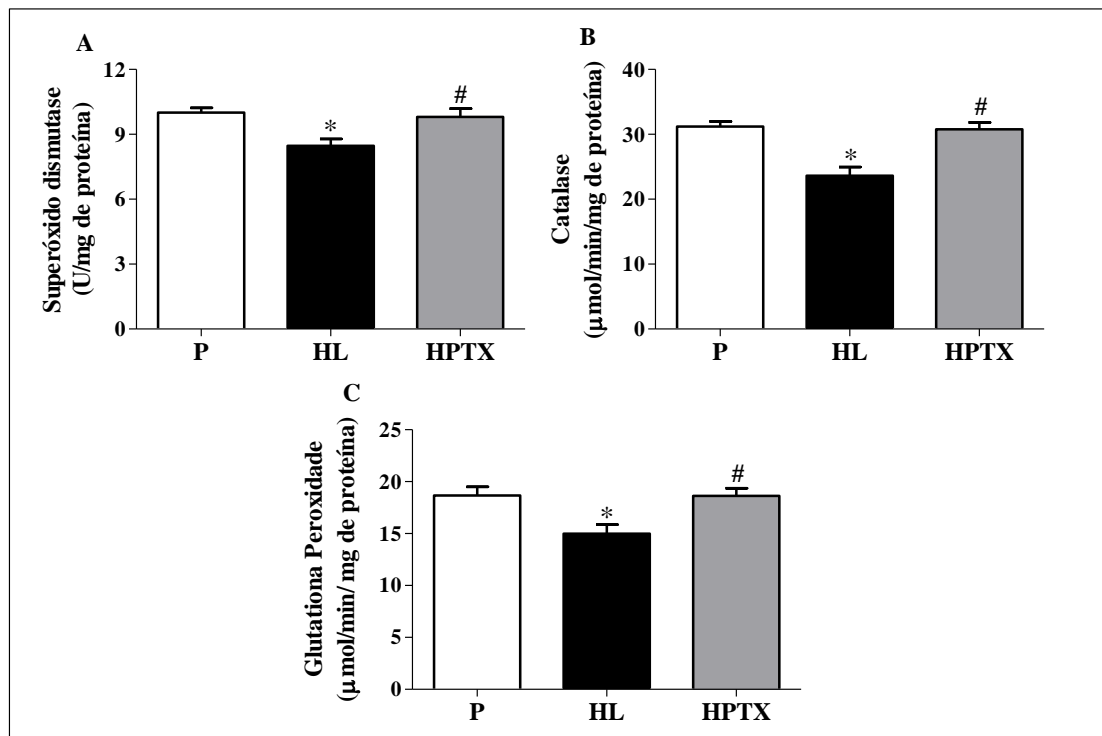


Figura 27. Atividade das enzimas antioxidantes SOD (A), GSH-Px (B) e CAT (C) nos rins de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. *, diferenças com P; #, diferenças com HL.

5.2.6 Estudo do potencial antiglicação da pentoxifilina em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro*

Nosso laboratório tem realizado o estudo da atividade antiglicação ou anti-AGE de diversas preparações de origem natural, utilizando sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* que se baseia na incubação de 10 mg/mL de BSA na presença de 500 mM de glicose, durante 10, 20 e 30 dias (MOTTA et al., 2018; SANTOS et al., 2019). No entanto, em estudo do potencial antiglicação da pentoxifilina realizado por Rahbar e colaboradores (2000), foram feitas incubações de 50 mg/mL de BSA na presença de 800 mM de glicose durante 7 dias; assim, para mimetizar as condições do estudo de Rahbar ao nosso sistema-modelo de glicação proteica, realizamos a correção proporcional da concentração de glicose em relação à concentração de BSA utilizada em nosso laboratório (10 mg/mL); caso Rahbar et al. (2000) tivesse conduzido incubações com 10 mg/mL de BSA, a concentração de glicose teria sido de 160 mM. Além disso, diante da possibilidade destas diferentes concentrações de glicose interferirem no estudo do potencial antiglicação da pentoxifilina, optamos por conduzir incubações de BSA na presença de ambas as concentrações de glicose, 160 mM e 500 mM.

Na Figura 28 podemos observar que, quando BSA foi incubada na presença de aminoguanidina (composto anti-AGE) ou de pentoxifilina, sem glicose, os valores de fluorescência relativos aos AGEs foram semelhantes aos encontrados nas incubações de BSA sozinha. Diante disso, podemos constatar que os aumentos nas intensidades de fluorescência encontrados nas incubações de BSA na presença de glicose, em ambas as concentrações (160 mM e 500 mM), podem estar relacionados ao aumento na geração de AGEs fluorescentes, devido ao aumento na glicação de BSA.

Em comparação aos valores de fluorescência relativos aos AGEs nas incubações de BSA sozinha, nota-se que a incubação de BSA + 500 mM de glicose apresentou maior fluorescência relativa aos AGEs (605%) em relação à incubação de BSA + 160 mM de glicose (427%) (Figura 28). Podemos sugerir que o maior número de moléculas de glicose nas incubações contendo 500 mM do monossacarídeo tenha favorecido uma maior frequência de choques efetivos entre as moléculas de glicose e as moléculas de BSA, além da possibilidade de ocorrência, com maior frequência, de auto-oxidação da glicose no meio de incubação, gerando intermediários (incluindo compostos dicarbonílicos) que também podem “atacar” a BSA e culminar na formação de AGEs (OTT et al., 2014).

A aminoguanidina é um composto reconhecido por seu potencial antiglicação ou anti-AGE; é capaz de reagir com compostos dicarbonílicos, tornando-os quimicamente inertes, impedindo ou diminuindo a formação dos AGEs (Thornalley, 2003). A incubação de BSA com aminoguanidina (1 mM), nas duas concentrações de glicose, diminuiu a formação de AGEs fluorescentes (Figura 28). Este resultado indica que o sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* é responsivo às intervenções que sejam capazes de inibir as modificações na estrutura da albumina promovidas pela glicação.

Os valores de fluorescência relativos aos AGEs encontrados nas incubações de BSA + glicose + PTX (1 mM), nas duas concentrações de glicose, foram semelhantes aos níveis de AGEs encontrados nas incubações de BSA somente com glicose (Figura 28). Assim, sugere-se que a pentoxifilina não tenha potencial anti-AGE em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro*, pelo menos nas condições por nós estudada. Correlacionando com os resultados *in vivo*, podemos supor que as ações anti-AGE da pentoxifilina observadas em camundongos em dieta hiperlipídica tratados com este fármaco não tenham relação com a sua capacidade *per se* de captura de intermediários de glicação.

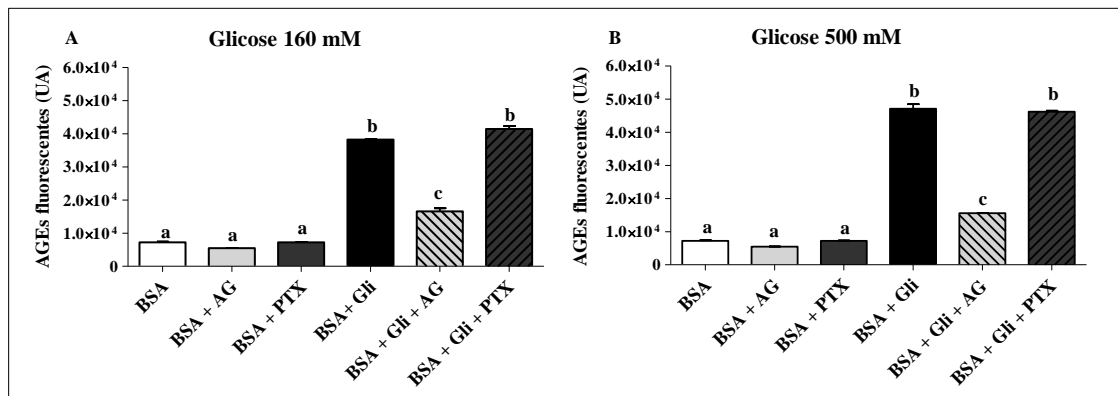


Figura 28. Efeito da pentoxifilina (1 mM) e aminoguanidina (1 mM) sobre a estimativa da formação de AGEs fluorescentes *in vitro*, nas incubações de BSA na presença de glicose nas concentrações de 160 mM (A) e de 500 mM (B), após 14 dias. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. Médias indicadas com letras iguais não diferem entre si estatisticamente. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. BSA: albumina sérica bovina; AG: aminoguanidina; Gli: glicose; PTX: pentoxifilina.

5.2.7 Efeito da pentoxifilina nos componentes relacionados à via da sinalização do receptor RAGE em rins de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

Foram observados aumentos nos níveis proteicos do receptor RAGE e do fator de transcrição NF- κ B nos rins de animais HL (92% e 112%, respectivamente), em comparação aos valores encontrados nos animais P (Figuras 29A e B). Acompanhando estas alterações, também foi possível observar um aumento de 75% nos níveis de BAX e um aumento de 23% nos níveis de caspase-3 clivada (marcadores de apoptose celular) (Figuras 29C e D).

Em comparação aos animais HL, animais tratados com pentoxifilina apresentaram diminuição nos níveis proteicos de RAGE (25%) e de NF- κ B (41%) (Figuras 29A e B). Em rins de animais HPTX, também foram observadas reduções nos níveis proteicos de BAX (43%) e de caspase-3 clivada (21%), os quais alcançaram valores semelhantes aos encontrados em rins de animais P (Figuras 29C e D).

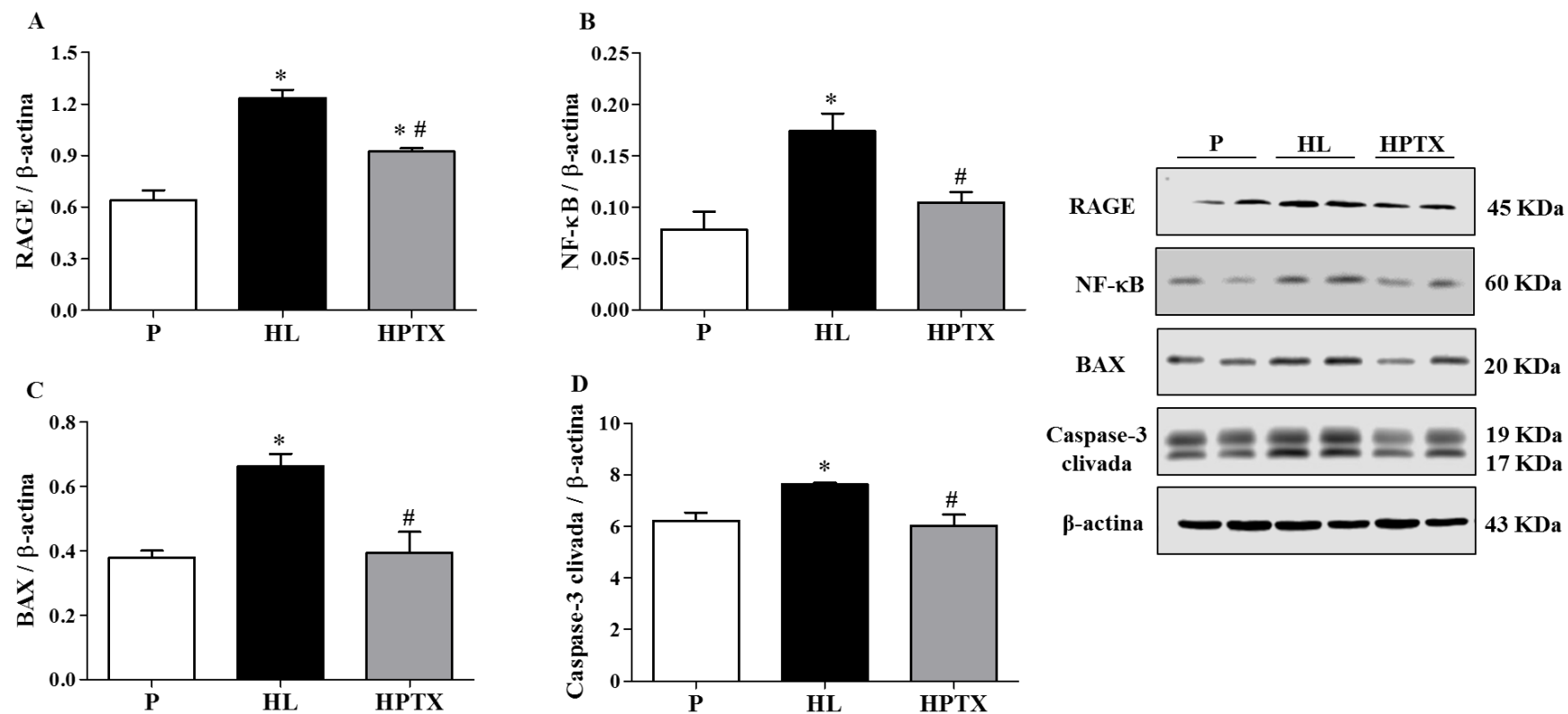


Figura 29. Níveis proteicos do receptor RAGE (A), NF- κ B (B), BAX (C) e caspase-3 clivada (D) nos rins de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. *, diferenças com P; #, diferenças com HL.

5.2.8 Efeito da pentoxifilina em componentes relacionados aos sensores metabólicos e à detoxificação dos AGEs em rins de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

Nos rins de animais HL, houve diminuição nos níveis proteicos do fator de transcrição NRF 2 (44%) (Figura 30C) e do receptor AGE-R1 (39%) (Figura 30E), em comparação aos valores encontrados em rins de animais P. Os níveis proteicos da enzima GLO 1, participante do sistema de detoxificação do metilglioxal (precursor de AGEs), não foram diferentes nos rins de animais P e HL (Figura 26D). O tratamento de animais em dieta hiperlipídica com pentoxifilina promoveu um aumento nos níveis de NRF 2 no rim (Figura 30C). O tratamento com pentoxifilina também aumentou (2 vezes) os níveis proteicos de GLO 1 nos rins, em relação aos valores em animais HL (Figura 30D). No entanto, em animais do grupo HPTX foi observada uma redução de 54% nos níveis de AGE-R1, em relação aos valores obtidos em animais HL (Figura 30E).

Animais dos grupos P, HL e HPTX não apresentaram diferenças nos níveis proteicos de PGC-1 α nos rins (Figura 30B). A ausência de alterações nos níveis proteicos renais de PGC-1 α entre os grupos experimentais sugere a necessidade de futuras investigações referentes às modificações pós-traducionais desta proteína, incluindo fosforilação e acetilação, para a compreensão do controle e funções de PGC-1 α nos rins de animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com pentoxifilina.

A fosforilação estimulatória de AMPK (Thr-172) nos rins de animais HL foi significativamente menor (23%), em comparação aos valores em rins de animais do grupo P. O tratamento com pentoxifilina promoveu um aumento de 30% nos níveis de fosforilação de AMPK, em relação aos valores encontrados em animais HL (Figura 30A).

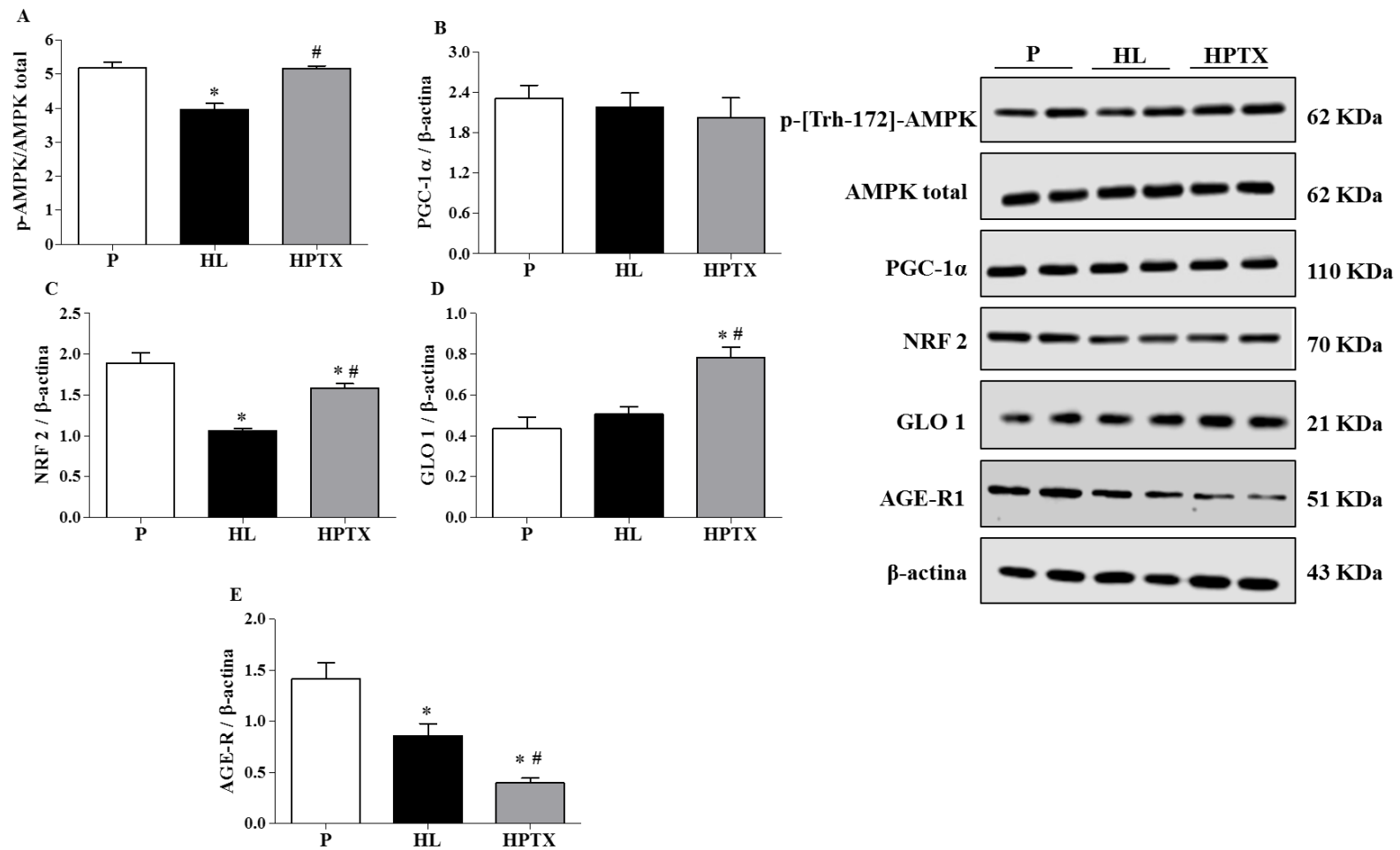


Figura 30. Níveis proteicos e/ou de fosforilação de AMPK (A), PGC-1α (B), SIRT 1 (B), NRF 2 (C), GLO 1 (D) e AGE-R1 (E) nos rins de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. *, diferenças com P; #, diferenças com HL ($p < 0,05$).

5.2.9 Efeito da pentoxifilina em componentes relacionados ao programa termogênico no tecido adiposo marrom interescapular de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica durante 14 semanas apresentaram alterações nos níveis proteicos de componentes relacionados ao programa termogênico no iTAM. Em animais HL, foram observadas diminuições nos níveis de fosforilação de AMPK (59%) e no conteúdo proteico de SIRT 1 (26%) (Figuras 31B e C). Entretanto, foram observados aumentos nos níveis proteicos de PGC-1 α (51%) e de UCP 1 (60%) em iTAM de animais HL (Figuras 31D e F), quando comparados aos valores em iTAM de animais do grupo P. Os níveis proteicos de NRF 2 no iTAM de animais P e HL não foram diferentes entre si (Figura 31E).

O tratamento de camundongos em dieta hiperlipídica com pentoxifilina promoveu, no iTAM, aumentos significativos nos níveis proteicos de SIRT 1, UCP 1 e NRF 2, de 29%, 19% e 41%, respectivamente, em relação aos valores no iTAM de animais HL (Figuras 31B, F e E). Por sua vez, em iTAM de animais HPTX, não foram observadas alterações nos níveis de fosforilação da AMPK e no conteúdo proteico de PGC-1 α (Figuras 31C e D), em relação aos valores obtidos nos animais HL.

Ainda podemos destacar que no iTAM de animais HL houve um aumento de 130% nos níveis proteicos de NF- κ B, e que o tratamento com pentoxifilina diminuiu em 47% os níveis deste fator de transcrição (Figura 31A). Dessa forma, destaca-se o potencial anti-inflamatório da pentoxifilina no iTAM de animais em modelo experimental de obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

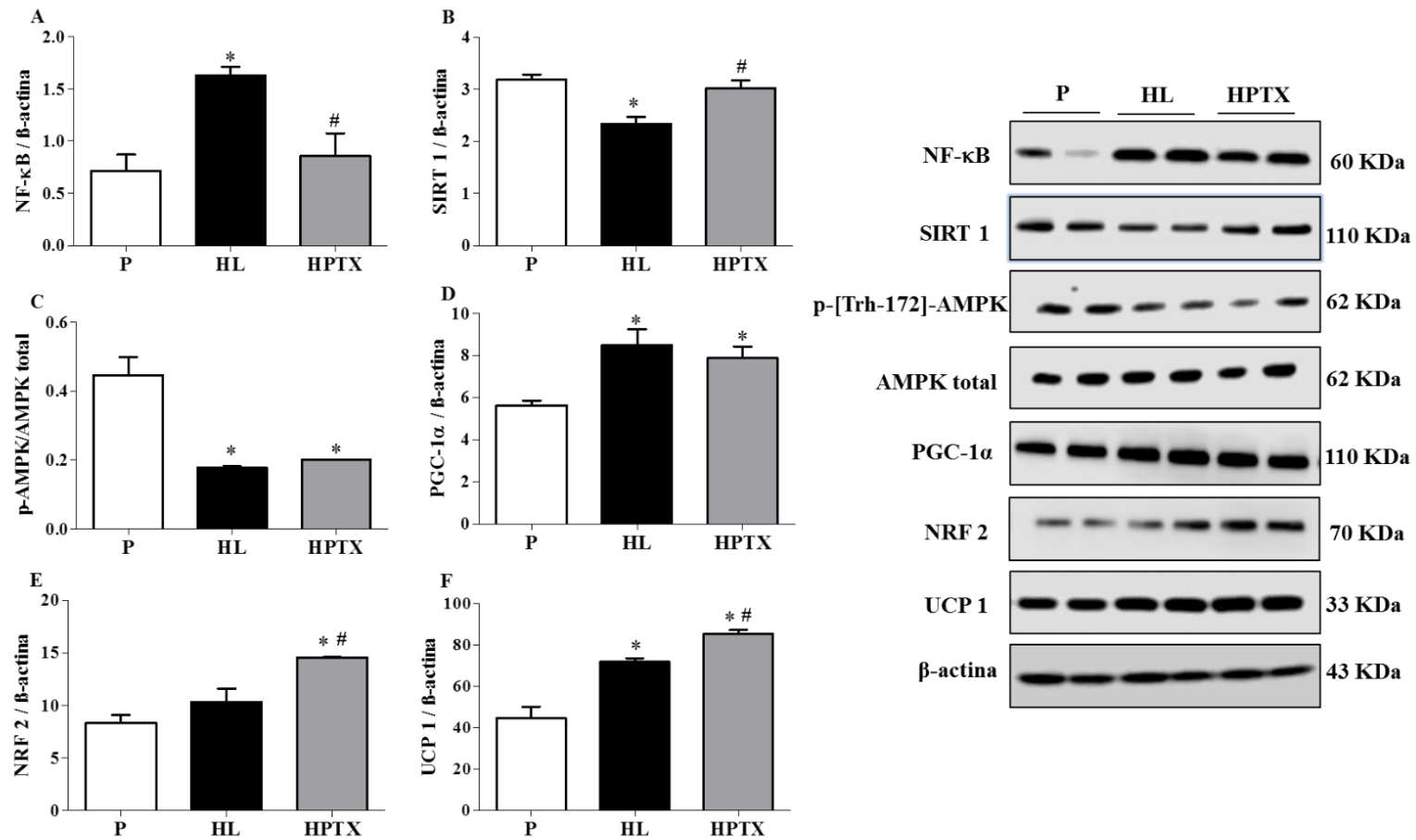


Figura 31. Níveis proteicos de NF-κB (A), SIRT 1 (B), níveis proteicos e/ou de fosforilação de AMPK (C), PGC-1α (D), NRF 2 (E) e UCP 1 (F) no tecido adiposo marrom interescapular de camundongos alimentados com as dietas P e HL e tratados com pentoxifilina. Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. *, diferenças com P; #, diferenças com HL.

6. DISCUSSÃO

Camundongos C57BL-6J alimentados com dieta hiperlipídica durante 14 semanas desenvolveram alterações metabólicas que possibilitaram a compreensão dos benefícios do tratamento com pentoxifilina como uma promissora opção para a atenuação das complicações observadas neste modelo experimental. O estabelecimento da obesidade em animais HL foi comprovado pelo aumento no ganho de peso corporal e das massas de tecidos adiposos, acompanhado pelo aumento nos níveis séricos de leptina. O desenvolvimento de resistência à insulina também foi caracterizado neste modelo experimental, via observação de redução nos níveis de fosforilação de AKT estimulada por insulina nos tecidos adiposos e no músculo esquelético *gastrocnemius*, corroborando a redução na sensibilidade à insulina e na tolerância à glicose, analisadas pelo ITT e TTGO, respectivamente. A resistência à insulina também pode ser reiterada em animais HL pelo aumento nos níveis séricos de insulina e resistina.

A análise dos níveis de insulina sérica em jejum é um dos critérios clínicos adotados no apoio ao diagnóstico de resistência à insulina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Assim, reconhecer os estágios iniciais da resistência à insulina e a capacidade funcional das células β pancreáticas é importante para a seleção e eficácia de uma intervenção terapêutica (GUTCH et al., 2015). Sabe-se que, frente às crescentes concentrações de glicose no sangue, como uma consequência da menor captação de glicose devido à resistência insulínica nos tecidos responsivos ao hormônio, as células β pancreáticas aumentam a secreção de insulina, gerando assim a hiperinsulinemia, como um mecanismo compensatório na tentativa de estimular a captação de glicose, e deste modo manter os níveis glicêmicos dentro da normalidade (CEFALU, 2001). Alguns estudos apontam que a instalação da obesidade é responsável por induzir a resistência à insulina e posteriormente a hiperinsulinemia (BOUCHER; KLEINRIDDERS; KAHN, 2014).

No entanto, uma hipótese distinta é apresentada por outros autores, na qual a hiperinsulinemia é a principal causa de resistência à insulina em modelo experimental de obesidade e em indivíduos obesos (SHANIK et al., 2008; CORKEY, 2012). De acordo com a revisão realizada por Czech (2017), o modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica pode diretamente acarretar no aumento na secreção de insulina, que parece contribuir com o estabelecimento de resistência à insulina, hiperglicemia e hiperlipidemia. Na obesidade, a hiperinsulinemia pode ser induzida pelos elevados níveis de AGL, muito comum nesta condição, os quais são potenciais estimuladores da secreção de insulina pelas células β

pancreáticas. Além disso, a secreção de insulina induzida por glicose é potencializada na presença de ácidos graxos via formação de mediadores intracelulares que incluem ERO e acil-CoA graxo de cadeia longa. Em adição, a hiperinsulinemia pode estimular a glicólise muscular, e conseqüentemente a formação de lactato, sendo este último substrato para a gliconeogênese no fígado levando ao aumento da glicemia em uma condição de obesidade e diabetes. Ainda, é pressuposto que a hiperinsulinemia crônica causa ativação de respostas inflamatórias (via mecanismos não completamente elucidados), culminando na estimulação da lipóse nos adipócitos e aumento nos níveis circulantes de AGL e glicerol, este último também pode ser substrato para a gliconeogênese, bem como serem re-esterificados em triacilgliceróis em órgãos/tecidos não adiposos. Por último, a hiperinsulinemia também pode ativar no fígado a lipogênese *de novo* (via ativação AKT/mTORC1), causando hiperlipidemia pelo aumento na produção da lipoproteína VLDL (CZECH et al., 2017).

Em animais HL também foi possível observar um aumento nos níveis séricos de resistina e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e MCP-1. A resistina é um hormônio conhecido por promover a resistência à insulina e a inflamação (PEREIRA; ALVAREZ-LEITE, 2014). Na obesidade, o estado de inflamação crônica de baixo grau é caracterizado pelo aumento na produção de várias citocinas pelo tecido adiposo, as quais desempenham um papel crítico na inflamação (XU et al., 2003) e exercem efeitos inibitórios sobre a via da sinalização de insulina (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; REHMAN; AKASH, 2016). Com a hipertrofia adipocítica, característica da obesidade, ocorre a ativação de vias de estresse intracelular e a liberação de fatores proteicos, incluindo MCP-1, o qual exerce atividade quimioatrativa de macrófagos M1, responsáveis por secretar as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 (LUCA; OLEFSKY, 2008; SALTIEL; OLEFSKY, 2017). O TNF- α pode ativar a via de sinalização IKK β /JNK, responsáveis por fosforilar em resíduo de serina o IRS-1, inibindo-o, e conseqüentemente reduzir a ativação da AKT e prejudicar a translocação do GLUT4, fatores que em conjunto acarretam na diminuição da captação de glicose pelos adipócitos (SAMUEL; SHULMAN, 2014; PETERSEN; SHULMAN, 2018). Demais vias relacionadas à promoção de resistência à insulina pela inflamação estão descritas no item 2.3 da revisão da literatura, desta tese. Apesar de diversos trabalhos relatarem que os níveis de IL-6 são persistentemente elevados tanto em indivíduos obesos (SINDHU et al., 2015) quanto em animais sob modelos animais de obesidade (ARÇARI et al., 2009), na contramão destes trabalhos, nosso estudo não observou alterações nos níveis séricos de IL-6 em animais HL, em relação aos animais P. Este resultado corrobora o estudo de Zhao e colaboradores (2015), onde camundongos C57BL-6J alimentados

com dieta hiperlipídica (60% de lipídeos) durante 14 semanas também não apresentaram aumento nos níveis séricos de IL-6.

Além disso, podemos verificar nos animais em dieta hiperlipídica a instalação do estresse glico-oxidativo no plasma, fígado e rim, com aumento nos níveis de marcadores de lesão oxidativa em lipídeos (TBARS), aumento na formação de AGEs e redução nas defesas antioxidantes endógenas (SOD, CAT, GSH-Px e PON 1). Nos rins de animais HL, a diminuição nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px pode ter sido uma consequência, pelo menos em parte, da diminuição nos níveis de NRF 2, um fator de transcrição nuclear que regula positivamente a expressão de enzimas antioxidantes, proteínas relacionadas a inflamação e morte celular (XU et al., 2019). Além disso, o NRF 2 foi relatado também aumentar a expressão da enzima GLO 1 (XUE et al., 2012).

A GLO 1 é um importante componente do sistema de detoxificação do metilglioxal, um composto dicarbonílico que participa da formação de AGEs endógenos (SILVA et al., 2013; OTT et al., 2014), e é expressa em diversos órgãos, incluindo o rim. A combinação entre o aumento excessivo de compostos dicarbonílicos e a redução da atividade de GLO 1 culmina no estresse dicarbonílico, o qual encontra-se envolvido no desenvolvimento da nefropatia diabética e da DRC ligada à obesidade. A literatura reporta que animais em modelos de obesidade apresentam redução nos níveis proteicos de GLO 1, no TAB e no fígado (RABBANI; THORNALLEY, 2018). Em animais sob modelo de dano tubular causado por isquemia-reperfusão, apesar de a atividade da GLO 1 estar reduzida, não foram encontradas diferenças na expressão gênica e proteica de GLO quando comparados os animais controle *versus* os animais que apresentavam injúria renal; os autores deste trabalho sugerem que a redução na atividade da GLO 1 pode ter ocorrido por modificações pós-transducionais ou por ação de inibidores (KUMAGAI et al., 2009), como por exemplo a S-nitrosoglutathione, formada a partir de NO e GSH (MITSUMOTO et al., 2000). Embora, no presente estudo, animais em dieta hiperlipídica durante 14 semanas apresentarem a instalação do estresse glico-oxidativo no rim, os níveis proteicos da enzima GLO 1 permaneceram inalterados, corroborando os achados de Kumagai e colaboradores (2009).

Além do rim ser alvo de modificações químicas em biomoléculas mediadas pelos AGEs, provavelmente é o principal órgão envolvido na eliminação destes compostos. Através da filtração de AGEs circulantes e subsequente excreção pela urina, os rins contribuem com a diminuição no acúmulo de AGEs no organismo e consequentemente diminui a geração de ERO (KOSCHINSKY et al., 1997; HE et al., 1999). No rim, também é pressuposto que a depuração de proteínas modificadas por AGEs na circulação ocorra via receptor AGE-R1 (LU et al., 2004).

Apesar de ainda não ser compreendida a ligação entre AGEs e AGE-R1, como também do processo de *clearance* de AGEs através deste receptor, estudos sugerem que a perda de AGE-R1 é um fator patológico que contribui para as complicações do diabetes (ZHUANG; FORBES, 2016). Diante disso, a diminuição nos níveis de AGE-R1 no rim de animais HL apontam um provável prejuízo neste sistema de detoxificação de AGEs, e conseqüentemente na integridade das células renais.

Embora os níveis plasmáticos de glicose e de AGEs fluorescentes (plasma, fígado e rim) apresentem-se elevados em animais HL, não observamos o aumento concomitante nos níveis de frutamina neste grupo experimental. A frutamina é um produto de Amadori formado pela reação não enzimática entre glicose e proteínas plasmáticas circulantes, principalmente a albumina. Assim, a concentração de frutamina no soro ou plasma está diretamente relacionada à concentração de glicose no sangue. Devido à menor vida útil da albumina em comparação à hemoglobina, as concentrações de frutamina refletem mudanças mais recentes nos níveis glicêmicos (2-4 semanas), em comparação à hemoglobina glicada (aproximadamente 120 dias) (SELVIN et al., 2014). Notavelmente, os estudos que encontraram aumentos nos níveis de frutamina em animais em dieta hiperlipídica trabalharam com modelo experimental de DM tipo 2 que, além da oferta da dieta hiperlipídica, também administraram aos animais estreptozotocina (UEDA-WAKAGI et al., 2019; WANG et al., 2014). Portanto, podemos sugerir que o modelo de DM tipo 2 seja capaz de promover um aumento nos níveis glicêmicos maior do que aquele observado em nosso estudo, no qual oferecemos aos animais somente uma dieta hiperlipídica para a promoção de obesidade e resistência à insulina.

As análises histológicas dos cortes transversais de rins de animais em dieta hiperlipídica nos permitiu sugerir uma possível deposição ectópica de lipídeos, uma vez que houve a visualização de áreas circulares negativas, sugestivas de depósitos de gordura. O acúmulo de lipídeos nos rins de animais HL pode ser confirmado, uma vez que este tecido apresentou um aumento significativo no conteúdo de triacilgliceróis. Este aumento do conteúdo de lipídeos nos rins pode estar associado ao aumento na atividade da proteína 1c ligadora do elemento regulatório de esterol (SREBP), um importante regulador da síntese de lipídeos neste tecido. SREBP induz a transcrição de enzimas chaves na lipogênese, tais como a acetil-CoA carboxilase (ACC) e a ácido graxo sintase, que por sua vez, acarretam no aumento na síntese de ácidos graxos e no acúmulo de triacilgliceróis (JIANG et al., 2005).

Além disso, o próprio aumento na ingestão de gorduras, típica deste modelo experimental, pode estar contribuindo para a deposição ectópica de lipídeos nos rins de animais HL. Os AGL plasmáticos são transportados principalmente pela albumina, e sua captação pelas

células renais envolve a dissociação entre o AGL e a albumina, mediada por proteínas presentes nas membranas plasmáticas, tais como a ácido graxo translocase (CD36) e a proteína transportadora de ácidos graxos (FATP). CD36 é o principal sistema de captação de ácidos graxos nos rins, e parece desempenhar um papel central no desenvolvimento e progressão da DRC. Elevados níveis de CD36 foram encontrados em cultura de células renais do túbulo proximal de humanos, após os tratamentos com albumina glicada, altas concentrações de glicose ou de AGL, bem como em camundongos diabéticos com glomerulopatia (SUSZTAK et al., 2005). Embora o papel fisiológico de FATP seja amplamente descrito nos tecidos adiposos, alguns membros desta família também são altamente expressos nos rins, sendo encontrado um aumento na expressão especificamente de FATP4 em rins de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (GAI et al., 2019).

A expansão dos glomérulos é o resultado da hipertrofia de todas as células glomerulares (glomerulomegalia), principalmente devido ao acúmulo de componentes da MEC (JEFFERSON; SHANKLAND; PICHLER, 2008). No DM e na obesidade, a hiperglicemia e a dislipidemia são responsáveis por estimular as modificações na estrutura dos glomérulos renais. Nestas patologias, aumento tanto nos níveis de glicose como de AGL desencadeiam alterações em níveis de fatores hemodinâmicos (sistema renina-angiotensina-aldosterona), metabólicos (AGEs, ERO, TGF- β), inflamatórios (citocinas) e fibróticos (fatores de crescimento, TGF- β). Estes fatores, por sua vez, provocam injúrias nas células renais e conseqüentemente ativação de inúmeras vias de sinalização intracelulares (PKC; JAK/STAT e Smad2/3) e fatores de transcrição (NF- κ B), estimulando a expressão de genes associados a apoptose, inflamação, fibrose e disfunção mitocondrial e conseqüentemente contribuem para a instalação da hipertrofia glomerular, expansão das células mesangiais, glomeruloesclerose e fibrose renal (ALICIC; ROONEY; TUTTLE, 2017).

Apesar de as evidentes mudanças na estrutura renal dos animais HL (análise histológica), não foram observadas alterações em biomarcadores da função renal (creatinina plasmática) e da integridade glomerular (proteinúria de 24 horas), em relação aos valores encontrados nos animais P. Contudo, diversos trabalhos com camundongos C57BL-6J alimentados com dieta hiperlipídica relataram alterações na integridade renal, sendo observado aumento nos níveis urinários de albumina (imunoensaio tipo ELISA) (JIANG et al., 2005; DECLÈVES et al., 2011; VAN DER HEIJDEN et al., 2015), como também aumento nos níveis de proteinúria (princípio de Bradford) (BOINI et al., 2014; MARTIN et al., 2018).

Recentemente tem sido demonstrado, em modelo experimental de obesidade (ratos obesos Zucker *fa/fa*), que os biomarcadores mais promissores para a detecção e prognóstico

precoce de lesão e função renais são fatores proteicos liberados pelas células tubulares danificadas e que são excretados na urina, tais como glutamil-aminopeptidase (GluAp) e alanil-aminopeptidase (AlaAp), presentes nas células tubulares renais, e Klotho, uma proteína transmembrana, expressa principalmente nas células dos túbulos contorcidos distal e proximal, cujos níveis são evidentemente reduzidos na DRC (MONTORO-MOLINA et al., 2018). Ainda podemos citar a lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) e a molécula-1 de injúria renal (KIM-1), biomarcadores de integridade renal que são eficazes em estudo com humanos obesos com doença renal precoce. NGAL é rapidamente liberado das células tubulares renais em resposta a várias injúrias provocadas no rim; enquanto KIM-1 é altamente expresso nas células dos túbulos proximais e liberado na urina após lesão renal isquêmica ou tóxica (PATSRİ et al., 2019). Diante disso, para confirmação de possíveis alterações na função e integridade renais em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica durante 14 semanas são necessárias investigações de biomarcadores mais específicos e precoces de lesão/integridade renais.

Alterações na função e morfologia renais são comumente observadas na obesidade e no DM. Nestas patologias, tais alterações têm relação, pelo menos em parte, com aumento nos níveis de AGEs circulantes, promovendo a ativação dos receptores RAGE nas células renais (TOMINO; HAGIWARA; GOHDA, 2011). Nos rins de animais HL, podemos observar o aumento nos níveis proteicos de componentes da via da sinalização do receptor RAGE, incluindo o próprio receptor, bem como NF- κ B, BAX e caspase-3 clivada. De acordo com a literatura, a interação do AGE-RAGE ativa a translocação de NF- κ B para o núcleo e induz a expressão deste receptor em células renais (BIERHAUS; NAWROTH, 2009; ROJAS et al., 2017), o que pode contribuir para explicar o aumento observado nos níveis de RAGE em rins de animais HL. Além disso, em rins de animais HL, as proteínas BAX e caspase-3 estavam com seus níveis aumentados, indicando uma possível ativação de vias apoptóticas mediadas pela ativação de RAGE. Em estudo com uma linhagem celular de podócitos, o bloqueio de RAGE (via anticorpo anti-RAGE ou pelo silenciamento por siRNA) protegeu significativamente os podócitos de apoptose celular induzida por proteínas plasmáticas oxidadas, ocorrendo uma diminuindo na ativação da via pró-apoptótica dependente de BAX e de caspase-3 (ZHOU et al., 2012).

O aumento de AGEs circulantes também induz um quadro inflamatório nos rins, através da ativação da sinalização do receptor RAGE e subsequente aumento nos níveis do fator de transcrição NF- κ B. Diante disso, podemos sugerir que o aumento nos níveis de NF- κ B em rins de animais HL pode ter correlação com o aumento nos níveis renais de TNF- α , IL-6 e MCP-1,

observados neste grupo. Além disso, o aumento das citocinas pró-inflamatórias observado em rins de animais HL também pode ter origem do processo inflamatório no tecido adiposo, bem como do acúmulo ectópico de lipídeos nos rins, induzindo a lipotoxicidade, e conseqüentemente a infiltração de células do sistema imune neste órgão (MENG et al., 2015).

A disfunção do tecido adiposo observada na obesidade pode exercer efeitos prejudiciais sobre vários órgãos, incluindo o rim (ZHU; SCHERER, 2018). Diversas evidências clínicas e experimentais apoiam a relação direta entre o tecido adiposo e a função renal, particularmente em relação à DRC e nefropatia diabética. Pacientes com DRC apresentam altos níveis circulantes de moléculas derivadas do tecido adiposo, tais como leptina, IL-6 e TNF- α , as quais são responsáveis por acarretar no aumento do estresse oxidativo, inflamação e fibrose no rim, e conseqüentemente gerando lesão renal (ZHU; SCHERER, 2018). A hiperleptinemia em humanos é frequentemente associada à progressão da doença renal, e tem sido definida como uma toxina urêmica (ZHU; SCHERER, 2018). Na literatura são descritas inúmeras vias de sinalização mediadas pela ligação da leptina ao seu receptor e que contribuem com processos patológicos no rim. Entretanto, a via de sinalização induzida pela leptina mais estudada é a JAK 2/STAT 3: a fosforilação da proteína Janus quinase 2 (JAK 2) leva a ativação do transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT 3) que, por sua vez, transloca-se ao núcleo aumentando a transcrição de genes que codificam fatores pró-fibróticos. Além disso, esta via, quando desregulada, também promove a ativação de células mesangiais renais e inflamação nas células tubulares em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (ZHU; SCHERER, 2018).

Outro ponto investigado em nosso estudo foi a análise de alguns componentes envolvidos no programa termogênico no iTAM de animais HL, uma vez que na literatura é descrito que o DM e a obesidade são condições que acarretam em prejuízos no processo de termogênese no TAM (CELI; LE; NI, 2015). No entanto, observou-se um aumento nos níveis proteicos de PGC-1 α e UCP 1 no iTAM de animais em dieta hiperlipídica, quando comparados aos animais do grupo P, corroborando os achados de outros trabalhos (BARGUT et al., 2016; LI et al., 2018; SHIRKHANI et al., 2018). Em modelo experimental de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, são observados altos níveis circulantes de AGL no plasma (GETZ, 2007) os quais, por sua vez, são os lipídeos descritos como os principais indutores da termogênese no TAM (TOWNSEND; TSENG, 2012). De acordo com recente trabalho de Shirkhani e colaboradores (2018), o consumo de uma dieta com alto teor de lipídeos pode estimular o aumento nos níveis de PGC-1 α e UCP 1 no TAM de camundongos. Bargut e colaboradores (2016), além de demonstrarem aumento nos níveis de PGC-1 α e UCP 1 no TAM de

camundongos em dieta hiperlipídica, os autores também observaram um aumento nos níveis de receptores β -adrenérgicos, e sugeriram que neste modelo experimental o estímulo do sistema nervoso simpático ativa a liberação de catecolaminas, que agem via receptores β -adrenérgicos no iTAM, regulando positivamente a expressão de PGC-1 α e UCP 1.

Embora tenha sido visto um aumento nos níveis proteicos de PGC-1 α no iTAM de animais HL, estes animais não apresentaram mudanças nos níveis proteicos de NRF 2, quando comparados aos animais P. É bem estabelecido que a biogênese mitocondrial nos adipócitos do iTAM ocorre via ativação de PGC-1 α ; este coativador regula a gênese de novas mitocôndrias via interação com diversos fatores de transcrição além do NRF 2, tais como o fator de transcrição mitocondrial A (Tfam), receptor de estrogênio (ERR) α e γ e os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR) γ e PPAR α (ZHANG; SUN; LIU, 2016; BHATTI; BHATTI; REDDY, 2017). NRF 2 e Tfam estão envolvidos na transcrição de enzimas mitocondriais e síntese de DNA mitocondrial (mtDNA); ERR α e γ participam de estímulo à captação de substratos energéticos, regulação da expressão de genes mitocondriais que codificam para componentes envolvidos na oxidação lipídica, incluindo componentes da cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa, ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs), dinâmica mitocondrial e defesas contra a estresse oxidativo; enquanto que a família de fatores de transcrição PPAR desempenha um importante papel na expressão de proteínas envolvidas no transporte e na oxidação de ácidos graxos (HOCK; KRALLI, 2009). Assim, para confirmarmos a possibilidade de ocorrência de biogênese mitocondrial no iTAM de animais alimentados com dieta hiperlipídica, faz-se necessária a investigação de outros componentes envolvidos neste processo, bem como o estudo do conteúdo de mitocôndrias neste tecido e a análise da capacidade termogênica. Ainda podemos sugerir que, caso tenha ocorrido a ativação de PGC1-1 α , talvez esta não tenha ocorrido por vias pós-transducionais que incluem fosforilação e desacetilação, através das atividades das proteínas AMPK e SIRT, pois ambas as proteínas apresentaram níveis reduzidos no iTAM de animais HL. Por fim, também foi possível verificar no iTAM de animais HL uma possível instalação de quadro inflamatório, devido ao aumento nos níveis proteicos de NF- κ B neste tecido.

A obesidade é comumente associada a níveis elevados de triacilgliceróis, tanto no estado de jejum quanto no estado alimentado (BLACKBURN et al., 2003). No entanto, nossos resultados indicaram que camundongos em dieta hiperlipídica durante 14 semanas não apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de triacilgliceróis (análise feita em plasma de animais com jejum de 6 horas), apesar de apresentarem aumentos nos conteúdos de triacilgliceróis no fígado e rim. Os triacilgliceróis da dieta são hidrolisados em monoacilglicerol

e ácidos graxos no lúmen do intestino delgado, e em seguida são incorporados em micelas, e os enterócitos realizam a captação destas gorduras, reesterificando-os em triacilgliceróis e incorporando-os em quilomícrons (QM). Os QM são liberados na circulação sanguínea pelo sistema linfático e metabolizados pelos órgãos periféricos pela ação da enzima lipase lipoproteica, que hidrolisa os triacilgliceróis contidos nestas lipoproteínas e os produtos sendo então captados pelos tecidos, especialmente adiposo, muscular e hepático. Dessa forma, a concentração plasmática de triacilgliceróis está relacionada com o equilíbrio entre a sua entrada e retirada da circulação sistêmica (MANSBACH; GORELICK, 2007). Em estudo com camundongos obesos (dieta hiperlipídica por 10 semanas) e controles (dieta padrão) foi demonstrado que ambos os grupos apresentaram valores semelhantes de triacilgliceróis no plasma após jejum de 4 horas, como também nos enterócitos do duodeno após jejum de 6 horas (UCHIDA et al., 2012), respaldando nossos achados. No entanto, Uchida e colaboradores (2012) demonstraram que, após 2 e 4 horas de sobrecarga oral de lipídeos (200 μ L de azeite), animais em dieta hiperlipídica apresentaram maiores níveis plasmáticos de triacilgliceróis, bem como QM de tamanho maior, em relação aos resultados encontrados nos animais controle. Em adição, observou-se em outro estudo que camundongos em dieta hiperlipídica apresentaram um aumento na atividade da lipase lipoproteica no tecido adiposo epididimal (FERREIRA et al., 2014). Assim, analisando estas informações de forma integrada aos nossos resultados, podemos supor que os animais HL estejam produzindo e secretando para a circulação sanguínea quantidades aumentadas de QM e estes sendo de tamanho maior (com carga elevada de triacilgliceróis), porém os triacilgliceróis estariam sendo hidrolisados pela lipase lipoproteica em velocidade aumentada, o que resultaria no não desenvolvimento da hipertrigliceridemia nos animais HL.

Todavia, podemos evidenciar um aumento significativo nos níveis de colesterol total e de colesterol-HDL nos animais dos grupos HL e HPTX, em relação aos animais que receberam dieta padrão, corroborando os achados de Podrini e colaboradores (2013). Em camundongos, prevalece na circulação para o transporte de colesterol a lipoproteína HDL, pois esta espécie não possui a proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), responsável por transferir os ésteres de colesterol da HDL para lipoproteínas contendo apoB, tais como LDL e VLDL. Desse modo, em camundongos, a HDL é a principal lipoproteína responsável por transportar a maioria do colesterol plasmático, enquanto que em humanos, este transporte ocorre principalmente via LDL (STEENBERGEN et al., 2010). A dieta hiperlipídica é composta por grandes quantidades de banha de origem animal, uma gordura rica em triacilgliceróis contendo ácidos graxos saturados e uma pequena quantidade de colesterol. De

acordo com resultados de um estudo com camundongos C57BL-6 alimentados por 5 semanas com dieta hiperlipídica (D12492, research diet: 31,6% de banha e 3,2% óleo de soja) muito semelhante à dieta por nós utilizada, os autores observaram que o aumento nos níveis circulantes de colesterol pode provenir da síntese *de novo* do colesterol no fígado. O mecanismo pelo qual ocorre aumento na velocidade de síntese de colesterol em condições de aumento de ingestão de dietas hiperlipídicas foi demonstrado no fígado de animais alimentados com dieta hiperlipídica e em cultura de hepatócitos (HepG2) incubados com ácido palmítico; este aumento na velocidade de síntese de colesterol parece estar relacionado ao fator de transcrição Sp1, que se liga a região promotora do gene SREBP-2, regulando sua transcrição, e consequentemente a ativação da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) redutase (aumento da atividade, expressão proteica e gênica). Os autores citam que a ativação de HMG-CoA redutase pode ser uma resposta metabólica a maior ingestão de ácidos graxos pela dieta hiperlipídica, porém, mais investigações para tal afirmação são necessárias (WU et al., 2013).

A albumina é a principal proteína plasmática e tem sido utilizada como um biomarcador da função hepática, bem como um indicador de quadros de deficiência nutricional proteica. Estudos apontam uma correlação entre obesidade e redução nos níveis plasmáticos de albumina em humanos (MOSLI et al., 2016). Entretanto, animais que receberam dieta hiperlipídica apresentaram um aumento nos níveis plasmáticos de albumina, em relação aos valores encontrados em animais P. Visto que os animais dos grupos HL e HPTX não apresentaram alteração em marcadores de integridade hepática, a desidratação foi postulada como um fator responsável por este aumento nos níveis plasmáticos de albumina. De acordo com O'Connell e colaboradores (2005), indivíduos desidratados apresentam um aumento nos níveis séricos de albumina, constatação feita através da realização de eletroforese de proteínas séricas. Apesar de a ingestão hídrica não ter sido monitorada nestes animais, podemos inferir o volume de ingestão hídrica a partir da realização da coleta de urina de 24 horas: animais em dieta hiperlipídica apresentaram um menor volume urinário de 24 horas (HL; $565 \pm 150 \mu\text{L}/24$ horas; HPTX; $500 \pm 89 \mu\text{L}/24$ horas), em comparação aos valores encontrados em animais em dieta P (P; $1115 \pm 149 \mu\text{L}/24$ horas). Acrescentando a este resultado, a literatura também reporta que animais mantidos em dieta hiperlipídica apresentam uma redução no consumo de água; sendo esta característica relacionada a menor quantidade de dieta ingerida por estes animais (AIZAWA; HOMMA; IGAWA, 2013; RAMALHO et al., 2017).

Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica durante 14 semanas e que foram tratados com 50 mg/kg de pentoxifilina apresentaram melhorias em diversos parâmetros analisados. Dentre eles, podemos destacar o efeito antiobesogênico, bem como a promoção de

redução nos níveis de biomarcadores do estresse glico-oxidativo, incluindo TBARS e AGEs fluorescentes (plasma, fígado e rim), e o aumento nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GSH-Px (fígado e rim) e PON 1 (plasma). Nos animais HPTX, também houve melhoria na sensibilidade à insulina, com aumento na fosforilação da AKT estimulada por insulina nos tecidos adiposos (eTAB, sTAB e iTAM) e músculo esquelético *gastrocnemius*; redução nos níveis séricos de insulina, leptina e MCP-1, bem como melhorou a tolerância à glicose. A atenuação de alterações renais promovida pela pentoxifilina em animais alimentados com dieta hiperlipídica incluem: (i) redução no acúmulo de triacilgliceróis e na área glomerular; (ii) redução nos níveis proteicos do receptor RAGE e de componentes relacionados a sua ativação, em especial BAX, caspase-3 (marcadores de apoptose) e NF- κ B (marcador de inflamação); (iii) redução nos níveis de citocinas pro-inflamatórias TNF- α , IL-6 e MCP-1; (iv) alterações nos níveis de componentes relacionados com a detoxificação de AGEs, induzindo aumento de GLO 1 e redução de AGE-R1; e (v) aumento nos níveis e/ou ativação do sensor metabólico AMPK e do fator de transcrição NRF 2. Por fim, observamos um aumento nos níveis de componentes do programa termogênico no iTAM de animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com a pentoxifilina, em especial NRF 2, SIRT 1 e UCP 1.

Muitos trabalhos não relatam o efeito antiobesogênico da pentoxifilina (YALNIZ et al., 2007; WU et al., 2010; ACEDO et al., 2015; YE et al., 2016). No entanto, animais HPTX apresentaram menor ganho de peso corporal, que por sua vez, pode estar associado à redução nas massas dos TAB, TAM, fígado e rim, em comparação aos animais HL. As menores massas de tecidos adiposos em animais HPTX pode ter relação com um possível efeito lipolítico da pentoxifilina, pois como um inibidor de PDE pode induzir o aumento nos níveis de AMPc, ativando PKA, a qual fosforila e ativa a enzima LHS, responsável por hidrolisar os triacilgliceróis em ácidos graxos, e estes ácidos graxos, uma vez na circulação sistêmica, podem alcançar outros órgãos para serem oxidados via β -oxidação (TOWNSEND; TSENG, 2012). Outro mecanismo através do qual a pentoxifilina pode reduzir a massa de um tecido é via estimulação da oxidação de ácidos graxos; Ye e colaboradores (2016) observaram que o tratamento de animais em modelo de NAFLD com pentoxifilina promoveu redução da massa e do acúmulo de lipídeos no fígado por regular positivamente os genes relacionados a β -oxidação de ácidos graxos, sem apresentar modificações na expressão de genes relacionados a lipogênese. Este trabalho também corrobora nossos achados quanto à diminuição no conteúdo de triacilgliceróis no fígado de animais HPTX.

Estudos com outras metilxantinas também relatam suas ações em diminuir o ganho de peso corporal e as massas dos tecidos adiposos em animais obesos (ARÇARI et al., 2009; WU

et al., 2016). Wu e colaboradores (2016) demonstraram, em animais obesos (dieta hiperlipídica durante 14 semanas), que o tratamento com teofilina, a partir da 8ª semana de experimento, preveniu o aumento no ganho de peso corporal; no caso do tratamento iniciando juntamente com a oferta da dieta hiperlipídica, a teofilina reduziu significativamente o peso corporal nestes animais, a partir da 2ª semana de tratamento. Além disso, camundongos obesos e tratados com erva-mate (*Ilex paraguariensis*), planta conhecida por apresentar em sua composição química altos teores de metilxantinas (cafeína e teobromina), observou-se uma atenuação no ganho de peso corporal nos animais após o início do tratamento com o extrato aquoso da planta (ARÇARI et al., 2009). Dentre os mecanismos propostos responsáveis pelo efeito antiobesogênico das metilxantinas estão (i) aumento na velocidade da lipólise nos tecidos adiposos através do bloqueio dos receptores de adenosina 1 e inibição da adenosina de maneira competitiva; (ii) inibição de PDE; (iii) estímulo do sistema nervoso simpático culminando na liberação da noradrenalina e consequentemente ativação dos receptores β -adrenérgicos, e por fim (iv) inibição da adipogênese nos adipócitos (CARRAGETA et al., 2018).

Podemos sugerir ainda que o menor ganho de peso corporal nos animais HPTX pode ter correlação com a menor ingestão alimentar. Sabidamente a ingestão alimentar é controlada pela ação da leptina (XENACHIS et al., 2001) e a obesidade é associada a uma resistência a esta adipocina (KNIGHT et al., 2010). Animais HPTX apresentaram redução nos níveis séricos de leptina e redução da ingestão alimentar. A partir destes resultados, podemos inferir que o tratamento com pentoxifilina pode ter promovido uma melhoria na sensibilidade à leptina e, portanto, foi possível observar a sua ação anorexígena através do menor consumo da dieta hiperlipídica, e consequentemente houve menor ganho de peso corporal em animais HPTX. Corroborando estes resultados, animais obesos tratados com metilxantinas de origem natural também apresentaram redução nos níveis séricos de leptina, bem como diminuição da ingestão alimentar e do peso corporal (KANG et al., 2012).

De acordo com Cypess e Kahn (2010), moléculas capazes de ativarem a termogênese no TAM podem ser efetivas na proteção contra a obesidade e o diabetes, bem como as complicações associadas a estas condições. Dentre estas moléculas, podemos citar as metilxantinas (cafeína ou teofilina) que, via inibição de adenosina e de PDE, pode aumentar e/ou prolongar o efeito estimulador da noradrenalina na termogênese e também na oxidação de lipídeos (DULLOO et al., 2011). Diante destes fatos, analisamos os componentes do programa termogênico no iTAM como um possível mecanismo promotor da redução do peso corporal em animais HPTX. O tratamento com pentoxifilina promoveu um aumento nos níveis das proteínas SIRT 1, PGC-1 α , NRF 2 e UCP 1 em iTAM. Sabe-se que a pentoxifilina é um inibidor de PDE

e, portanto, é capaz de aumentar os níveis intracelulares de AMPc. O AMPc é um importante segundo mensageiro envolvido na ativação da proteína quinase PKA, que por sua vez, é responsável pela estimulação da lipólise e subsequente aumento nos níveis de ácidos graxos, sendo a oxidação destes lipídeos o principal indutor da termogênese no iTAM. Além disso, PKA também estimula a transcrição gênica de UCP 1, via ativação do fator de transcrição CREB, proteína de ligação responsiva ao AMPc; CREB se liga à região promotora do gene para UCP 1 (denominado de elemento regulador do AMPc, CRE), aumentando assim a transcrição genica e os níveis proteicos de UCP 1 (TOWNSEND; TSENG, 2012).

A insulina é um hormônio proteico produzido e secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento nos níveis circulantes de glicose, aminoácidos e ácidos graxos (PETERSEN; SHULMAN, 2018); o aumento na secreção deste hormônio sem diminuição da glicemia encontra-se intimamente relacionado com a resistência à insulina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). O tratamento de animais em dieta hiperlipídica com pentoxifilina promoveu uma redução nos níveis séricos de insulina, a qual pode ter relação com a maior sensibilidade periférica ao hormônio, observada nestes animais, tal como encontrado em outros trabalhos (ACEDO et al., 2016; YE et al., 2016). A preservação da sensibilidade periférica à insulina nos animais HPTX (corroborada pelos níveis aumentados de fosforilação da AKT estimulada por insulina nos tecidos adiposos e músculo esquelético *gastrocnemius*) certamente contribui para a maior captação da glicose, e, conseqüentemente, promove redução da glicemia. Além disso, em estudo anterior do laboratório, observou-se que ratos com DM tipo 1 induzido por estreptozotocina e tratados com pentoxifilina apresentaram um aumento nos níveis séricos de insulina em relação aos ratos diabéticos não tratados (ARCARO et al., 2018); assim, podemos supor que a pentoxifilina também possa atuar de maneira a preservar a função das células β pancreáticas. Ainda podemos citar o tratamento com outros inibidores de PDE promovendo melhorias na sensibilidade à insulina, como o roflumilast (inibidor específico de PDE4) em camundongos em dieta hiperlipídica (MÖLLMANN et al., 2016) e o Sildenafil (inibidor específico de PDE5) em estudo com humano com sobrepeso e pré-diabetes (RAMIREZ et al., 2015).

A obesidade está associada a um estado de inflamação crônica de baixo grau, caracterizado pelo aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α (LUCA; OLEFSKY, 2008). O TNF- α é uma potente citocina que induz a produção de IL-6, o principal determinante da resposta inflamatória de fase aguda, e também tem efeitos negativos sobre o metabolismo de glicose e lipídeos e sobre as ações da insulina, tanto em indivíduos obesos quanto animais sob modelos de obesidade (KERN et al., 2001). A pentoxifilina é

amplamente conhecida por reduzir os níveis séricos de TNF- α (ACEDO et al., 2015; GARCIA et al., 2015; ARCARO et al., 2018), principalmente via inibição da transcrição gênica em células mononucleares periféricas (DUMAN et al., 2007). No entanto, no soro de animais HPTX, não houve redução nos níveis de TNF- α . Diante disso, não podemos inferir que a clássica ação anti-inflamatória da pentoxifilina (via redução de TNF- α) participe da promoção de melhorias na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina, nas condições por nós estudadas. Porém, vale a pena salientar que o potencial anti-inflamatório da pentoxifilina, especialmente promovendo redução nos níveis de TNF- α , foi observado no tecido renal, tal como será descrito adiante. Por fim, o tratamento com pentoxifilina também não alterou os níveis séricos de resistina, outro marcador de resistência à insulina monitorado no estudo.

No entanto, melhorias na sensibilidade à insulina em camundongos HPTX pode estar relacionada aos efeitos da pentoxifilina na diminuição dos níveis circulantes de MCP-1. Os níveis de MCP-1 aumentam no tecido adiposo e no plasma durante a obesidade (PANEE, 2012). MCP-1 atrai monócitos que se diferenciam em macrófagos nos tecidos adiposos, causando inflamação adicional através da produção de citocinas pró-inflamatórias; quando secretadas, essas citocinas estão relacionadas ao aparecimento da resistência à insulina no fígado e nos músculos esqueléticos (TATEYA; KIM; TAMORI, 2013). Em estudo de Tateya e colaboradores (2010) demonstraram que o aumento nos níveis circulantes de MCP-1 no plasma é suficiente para induzir a resistência à insulina, independente da inflamação do tecido adiposo. Diante disso, mesmo sem promover reduções nos níveis séricos de TNF- α , IL-6 e resistina, a redução isolada nos níveis circulantes de MCP-1 promovida pelo tratamento com pentoxifilina pode ter uma contribuição significativa na melhoria da sensibilidade à insulina em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

Nos rins, a instalação do processo inflamatório ocorre pela infiltração de monócitos, macrófagos e células T, e pela síntese aumentada de citocinas pró-inflamatórias por diversas células renais (células endoteliais, epiteliais, mesangiais e tubulares). Estas citocinas podem atuar de forma parácrina ou autócrina, induzindo prejuízos em várias estruturas renais, e desta forma, desempenhando um papel significativo na fisiopatologia da DRC. Estudos clínicos com pacientes diabéticos possuindo DRC do tipo doença glomerular primária, bem como em modelo animal de DM tipo induzido com estreptozotocina, apontam que a redução da proteinúria promovida pelo tratamento com pentoxifilina tem sido relacionada ao seu efeito anti-inflamatório (DONATE-CORREA et al., 2019). Animais em modelo de obesidade e resistência à insulina, o tratamento com pentoxifilina apresentou efeito anti-inflamatório nos rins, uma vez que reduziu os níveis de TNF- α , IL-16 e MCP-1 e a expressão de NF- κ B, evidências que apoiam

o uso da pentoxifilina no tratamento de disfunções renais. De acordo com Chen e colaboradores (2015), a ação anti-inflamatória da pentoxifilina no rim pode estar envolvida na regulação negativa da via de sinalização do NF- κ B, em modelo de glomerulonefrite em ratos induzidos por anticorpos monoclonais anti-Thy1. Além disso, a ativação da AMPK pelo tratamento com a pentoxifilina também pode ter promovido melhorias na inflamação e no estresse oxidativo, uma vez que a AMPK pode indiretamente inibir o NF- κ B, suprimir a NADPH oxidase e induzir a expressão de NRF 2 (TAIN; HSU, 2018).

A hiperglicemia exerce importante papel na promoção do estresse oxidativo por diversos mecanismos, que incluem ativação da via dos polióis, aumento na auto-oxidação da glicose e nas taxas de glicação proteica, acarretando na formação dos AGEs (BROWNLEE, 2005). Assim, o efeito benéfico da pentoxifilina na redução dos níveis glicêmicos em animais alimentados com dieta hiperlipídica pode contribuir para a redução observada nos AGEs circulantes e teciduais e nos níveis do biomarcador de lesão oxidativa em lipídeos, TBARS. A melhoria nos biomarcadores de estresse glico-oxidativo em animais HPTX pode ser associada a diversos fatores, tais como: (i) aumento na atividade da enzima antioxidante PON 1 no plasma; (ii) aumento nas atividades das enzimas antioxidantes em fígado e rim (SOD, CAT e GSH-Px) que, em parte, pode ter relação com o aumento observado nos níveis proteicos de NRF 2; (iii) ação antioxidante *per se* da pentoxifilina (CROUCH; FLETCHER, 1992; FREITAS; FILIPE, 1995; BHAT; MADYASTHA, 2001); (iv) potencial antiglicação *per se* da pentoxifilina (RAHBAR et al., 2000; WU et al., 2010). Em estudos anteriores demonstrou-se que o efeito antioxidante da pentoxifilina *in vivo* ocorre via diminuição na ativação de neutrófilos, responsáveis por gerar grandes quantidades de ânion superóxido via NADPH oxidase (CROUCH; FLETCHER, 1992), bem como nos estudos *in vitro*, nos quais observou-se que a pentoxifilina também possui capacidade “*scavenger*” de radicais peróxidos e radical hidroxila (FREITAS; FILIPE, 1995; BHAT; MADYASTHA, 2001). Contudo, há poucos trabalhos sobre o potencial antiglicação da pentoxifilina (RAHBAR et al., 2000; WU et al., 2010) e o conhecimento sobre os seus mecanismos de ação é limitado.

Em adição, outra importante ação da pentoxifilina no combate ao estresse glico-oxidativo pode ocorrer via redução na ativação das vias de sinalização acionadas pela interação AGE-RAGE, bem como via ativação de componentes da detoxificação dos AGEs. A redução de AGEs nos rins de animais HPTX pode ser uma consequência do aumento observado nos níveis proteicos de GLO 1 neste tecido. Além da GLO 1, outro importante componente relacionado a detoxificação de AGEs é o receptor AGE-R1 (SILVA et al., 2013; OTT et al., 2014). No entanto, a pentoxifilina promoveu uma redução significativa nos níveis proteicos do

receptor AGE-R1 em rins de animais em dieta hiperlipídica. Em recente trabalho, em camundongos C57BL-6J com inserção do gene *DDOST* (*dolichyl-diphosphooligosaccharide*), responsável por codificar o receptor AGE-R1/OST-48, foi demonstrado que o aumento deste receptor em podócitos foi acompanhado pelo aumento da captação e excreção de AGEs. Todavia, este resultado não foi associado a uma proteção renal, pois o aumento na expressão de AGE-R1 em podócitos também resultou em estresse oxidativo e estresse do RE, e subsequente prejuízo estrutural e declínio funcional do rim (ZHUANG et al., 2019). Apesar de estudos anteriores demonstrarem que a redução de AGEs circulantes promove uma melhoria na função renal (HARCOURT et al., 2011), os estudos de Zhuang (2018) indicam que terapias que promovem o aumento na expressão de AGE-R1 para o tratamento de complicações relacionadas ao DM podem ter efeitos colaterais indesejáveis, levando à disfunção renal, bem como fibrose hepática e intolerância à glicose. Diante disso, podemos sugerir que o tratamento com pentoxifilina em animais com obesidade e resistência à insulina pode trazer benefícios contra os possíveis danos causados pelos AGEs nos rins, uma vez que promoveu aumento nos níveis de GLO 1 e diminuição nos níveis de AGE-R1.

Estes dados em conjunto avançam nosso entendimento sobre os efeitos da pentoxifilina no processo de detoxificação de AGEs em rins de camundongos sob modelo experimental de obesidade e resistência à insulina. Complementando estes resultados, não encontramos potencial antiglicação ou anti-AGE da pentoxifilina em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro*, pelo menos em termos de formação de AGEs fluorescentes e nas condições estudadas em nosso laboratório; apesar de estudo de Rahbar et al. (2000) indicar que a pentoxifilina *in vitro* foi capaz de reduzir a formação de AGEs fluorescentes. Assim, podemos sugerir que o tratamento de animais alimentados com dieta hiperlipídica com pentoxifilina contribuiu para a diminuição nos níveis de AGEs via ações indiretas, como por exemplo, promovendo a redução da glicemia, ou ainda estas ações podem ser dependentes de possíveis metabólitos formados na biotransformação do fármaco. Destacam-se também as ações da pentoxifilina na regulação de componentes relacionados à detoxificação dos AGEs, tal como anteriormente explicado.

Estudos apontam que a enzima PON 1 pode desempenhar um importante papel na prevenção da aterosclerose relacionada à obesidade, uma vez que hidrolisa peróxidos lipídicos na LDL-ox (MACKNESS; MACKNESS, 2013). O estresse oxidativo é um dos principais fatores responsáveis pela formação da LDL-ox (LEVITAN; VOLKOV; SUBBAIAH, 2010), além de ser uma condição que favorece a diminuição na atividade da PON 1 (CHISTIYAKOV et al., 2017). Nos últimos anos, muitas pesquisas têm apresentado o uso de antioxidantes como uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento de diversas desordens metabólicas

(COSTA; GIORDANO; FURLONG, 2011; ASSIS et al., 2017). Antioxidantes de origem natural, incluindo curcumina, bixina e licopeno, foram estudados por Assis e colaboradores (2017), demonstrando a capacidade protetora destes compostos, promovendo aumento na atividade de PON 1 (ou inibindo a diminuição em sua atividade) e diminuição nos níveis de LDL-ox em ratos diabéticos. Fármacos com atividade antioxidante também podem ser citados como moduladores da atividade e expressão da PON 1, tais como estatinas, fibratos e agonistas de PPAR γ (COSTA; GIORDANO; FURLONG, 2011). Evidências indicam que a glicação da PON 1 também diminui sua atividade (YU et al., 2017). Devido à redução nos níveis de biomarcadores do estresse glico-oxidativo em animais HPTX, o tratamento com pentoxifilina pode ter prevenido a redução na atividade de PON 1 devido à sua ação antioxidante e/ou por tê-la protegido contra eventos glicativos, de forma direta ou indireta.

De acordo com Szeto e colaboradores (2016), o excesso de lipídeos nos rins de animais alimentados com dieta hiperlipídica provoca um aumento na geração de ERO e consequentemente danos mitocondriais (redução no tamanho e perda das cristas mitocondriais). Com a disfunção mitocondrial, ocorrem prejuízos na síntese de ATP e na β -oxidação de ácidos graxos, exacerbando o acúmulo de lipídeos nos rins. Os autores também observaram, neste modelo experimental, uma possível degeneração das mitocôndrias via participação do estresse de RE e da apoptose. Corroborando estes resultados, em rins de animais alimentados com dieta hiperlipídica durante 14 semanas houve aumento no conteúdo de lipídeos (áreas circulares negativas e conteúdo de triacilgliceróis) e possível ativação de apoptose (BAX e caspase-3). Assim, podemos inferir que o tratamento com pentoxifilina possivelmente protegeu a função e a estrutura das mitocôndrias presentes nas células renais, uma vez que reduziu os níveis do biomarcador de lipoperoxidação (TBARS), os níveis de triacilgliceróis e expressão das proteínas da via de apoptose. Em adição a estes resultados, nos rins de animais HPTX também houve redução nos níveis de RAGE, receptor associado à ativação de eventos pró-apoptóticos, pró-inflamatórios e pró-fibróticos, e pelo menos em parte, também pode ter participação na redução dos marcadores apoptóticos e na hipertrofia dos glomérulos.

A redução significativa nos possíveis depósitos de lipídeos nos rins de animais HPTX corroboraram os achados de Ye e colaboradores (2016); estes autores observaram um menor acúmulo de lipídeos em rins, bem como no fígado de animais em dieta hiperlipídica e tratados com pentoxifilina. Declèves e colaboradores (2014) demonstraram que o acúmulo de lipídeos nos rins de animais alimentados com dieta hiperlipídica parece ser atenuado após a ativação de AMPK, pelo tratamento com AICAR (ativador de AMPK), uma vez que preveniu o acúmulo de lipídeos nos rins via inibição da fosforilação da ACC, reduzindo assim a síntese de ácidos

graxos nas células renais. Em adição, os autores demonstraram que a ativação da AMPK também preveniu o aumento na área glomerular, podendo ter relação com a redução na expressão gênica de TGF- β , o principal indutor na formação de MEC em células renais. Portanto, de acordo com os nossos achados, o aumento nos níveis de fosforilação de AMPK observado em rins de animais HPTX pode ter contribuído tanto na redução do acúmulo de lipídeos, como também para a prevenção da hipertrofia e expansão dos glomérulos renais, em animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com pentoxifilina.

Tal como a pentoxifilina, outros inibidores de PDE também promoveram a ativação da proteína AMPK, em cultura de mioblastos tratados com rolipram (WANG et al., 2018) e em cultura de podócitos com tadalafil (LEE et al., 2015). Inibidores de PDE são conhecidos por aumentar os níveis de cAMP (WINDMEIER; GRESSNER, 1997). As principais funções celulares do cAMP são mediadas pelos efetores intracelulares PKA e EPAC. EPAC 1 aumenta os níveis intracelulares de Ca^{2+} e ativa AMPK via proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina β (CaMKK β), enquanto que a PKA aumenta a atividade da quinase B1 do fígado (LKB1), também culminando na ativação de AMPK (CHUNG; MANGANIELLO; DYCK, 2012). AMPK é conhecida por promover diversas melhorias no metabolismo energético, pois dentre suas ações, age sobre a dinâmica mitocondrial, ativando diretamente a fissão de mitocôndrias pela fosforilação do fator de fissão mitocondrial (MFF) (DUCOMMUN et al., 2015); ou indiretamente, fosforilando PGC-1 α , que posteriormente induz a transcrição de genes alvos de PPAR γ , como por exemplo o NRF 2 (TAIN; HSU; CHAN, 2016). Estudos recentes apontaram que o NRF 2 além de estimular a expressão gênica de proteínas antioxidantes (ZHANG; DAVIES; FORMAN, 2015), também é capaz de promover a fusão mitocondrial através da estimulação da proteína Drp 1 (SABOUNY et al., 2017). Portanto, a pentoxifilina, por ser um inibidor de fosfodiesterases, pode ativar indiretamente a AMPK via aumento dos níveis de cAMP nas células renais, promovendo assim melhorias contra danos mitocondriais, além de redução no acúmulo de lipídeos renais e na hipertrofia e expansão glomerular, citados anteriormente.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sugerem que o tratamento de animais submetidos ao modelo de obesidade e resistência à insulina com pentoxifilina foi eficaz na melhoria de diversas alterações metabólicas e promotora de proteção contra complicações teciduais, especialmente complicações renais associadas ao estresse glico-oxidativo.

Dentre os diversos benefícios associados ao tratamento com pentoxifilina, podemos destacar o efeito antiobesogênico, melhoria na sensibilidade à insulina e a atenuação das alterações na morfologia renal, bem como na promoção de diminuição nos níveis séricos de hormônios (insulina e leptina), níveis renais de biomarcadores inflamatórios (TNF- α , IL-6 e MCP-1) e de biomarcadores do estresse glico-oxidativo (TBARS e AGEs), e aumento nas atividades de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GSH-Px e PON 1).

Avanços foram conquistados na compreensão das ações protetoras da pentoxifilina nos rins de animais alimentados com dieta hiperlipídica, e tais ações podem ter relação com a atenuação nas alterações morfológicas renais induzidas pela dieta hiperlipídica, e que parecem depender da diminuição nos níveis proteicos do receptor RAGE e de componentes relacionados a sua ativação, em especial BAX, caspase-3 (marcadores de apoptose) e NF- κ B (marcador de inflamação). O tratamento de animais alimentados com dieta hiperlipídica com pentoxifilina também foi capaz de promover nos rins alterações em componentes relacionados com a detoxificação de AGEs, aumentando os níveis proteicos de GLO 1 e reduzindo os níveis de AGE-R1.

Por fim, observamos um aumento nos níveis proteicos de componentes do programa termogênico no iTAM de animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com a pentoxifilina.

Em conjunto, este estudo reúne evidências pré-clínicas que podem futuramente contribuir para o reposicionamento da pentoxifilina como uma opção para o tratamento da obesidade, diabetes e complicações associadas, com ênfase nas complicações renais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, G.; AL-HARRASI, A. S.; HUSSAIN, H.; HUSSAIN, J.; RASHID, R.; CHOUDHARY, M. I. Antiglycation therapy: Discovery of promising antiglycation agents for the management of diabetic complications. **Pharmaceutical Biology**, 54: 198-206, 2016.

ACEDO, S. C.; CARIA, C. R.; GOTARDO, É. M.; PEREIRA, J. A.; PEDRAZZOLI, J.; RIBEIRO, M. L.; GAMBERO, A. Role of pentoxifylline in non-alcoholic fatty liver disease in high fat diet-induced obesity in mice. **World Journal of Hepatology**, 24: 2551-2558, 2015.

AIZAWA, N.; HOMMA, Y.; IGAWA, Y. Influence of high fat diet feeding for 20 weeks on lower urinary tract function in mice. **Lower Urinary Tract Symptoms**, 5:101-108, 2013.

ALBUQUERQUE, D.; NÓBREGA, C.; MANCO, L.; PADEZ, C. The contribution of genetics and environment to obesity. **British Medical Bulletin**, 123:159-173, 2017.

ALICIC, R. Z.; ROONEY, M. T.; TUTTLE, K. R. Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, 12:2032-2045, 2017.

AMORIM, R. G.; GUEDES, G. D. S.; VASCONCELOS, S. M. D. L.; SANTOS, J. C. D. F. Kidney Disease in Diabetes Mellitus: Cross-Linking between Hyperglycemia, Redox Imbalance and Inflammation. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 112:577-587, 2019.

ARÇARI, D. P.; BARTCHEWSKY, W.; DOS SANTOS, T. W.; OLIVEIRA, K. A.; FUNCK, A.; PEDRAZZOLI, J.; DE SOUZA, M. F.; SAAD, M. J.; BASTOS, D. H.; GAMBERO, A.; CARVALHO, P. D. E. O.; RIBEIRO, M. L. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity**, 17:2127-2133, 2009.

ARCARO, C. A.; ASSIS, R. P.; ZANON, N. M.; PAULA-GOMES, S.; NAVEGANTES, L. C. C.; KETTELHUT, I. C.; BRUNETTI, I. L.; BAVIERA, A. M. Involvement of cAMP/EPAC/Akt signaling in the antiproteolytic effects of pentoxifylline on skeletal muscles of diabetic rats. **Journal of Applied Physiology**, 124:3, 704-716, 2018.

ASSIS, R.; ARCARO, C.; GUTIERRES, V.; OLIVEIRA, J.; COSTA, P.; BAVIERA, A.; BRUNETTI, I. Combined effects of curcumin and lycopene or bixin in yoghurt on inhibition of ldl oxidation and increases in hdl and paraoxonase levels in streptozotocin-diabetic rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n.4, 2017.

BADRI, S.; DASHTI-KHAVIDAKI, S.; LESSAN-PEZESHKI, M.; ABDOLLAHI, M. A review of the potential benefits of pentoxifylline in diabetic and non-diabetic proteinuria. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, 14:128-37, 2011.

BAIG, S.; SEEVASANT, I.; MOHAMAD, J.; MUKHEEM, A.; HURI, H. Z.; KAMARUL, T. Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand?. **Cell Death & Disease**, 7:e2058, 2016.

BARGUT, T. C. L.; SILVA-E, A. C. A. G.; SOUZA-MELLO, V; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; AGUILA, M. B. Mice fed fish oil diet and upregulation of brown adipose tissue thermogenic markers. **European Journal of Nutrition**, 55:159-169, 2016.

BHARGAVA, P.; SCHNELLMANN, R. G. Mitochondrial energetics in the kidney. **Nature Reviews Nephrology**, 13:629, 2017.

BARTHOLOMEW, R. J.; DELANEY, A. M. Bromocresol Green as a Reagent for Serum Albumin. **Proceedings of the Association of Clinical Biochemists**, 1:214, 1966.

BAVIERA, A. M.; ZANON, N. M.; CARVALHO NAVEGANTES, L. C.; MIGLIORINI, R. H.; KETTELHUT, I. D. C. Pentoxifylline inhibits Ca²⁺-dependent and ATP proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle from acutely diabetic rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 292: E702-8, 2007.

BAYKARA, M.; ATABEK, M. E.; EKLIOGLU, B. S.; KURTOGLU, S. Pentoxifylline treatment for protecting diabetic retinopathy in children with type 1 diabetes. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, 26: 19-24, 2013.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, 44: 276-87, 1971.

BEERS, R. F. J. R.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **The Journal of Biological Chemistry**, 195: 133-40, 1952.

BERGMEYER, H. U.; GAWEHN, K. Methods of enzymatic analysis. 2nd English Edition, v. 1, 1974.

BHANOT, S.; LEEHEY, D. J. Pentoxifylline for Diabetic Nephropathy: An Important Opportunity to Re-purpose an Old Drug? **Current Hypertension Reports**, 18:8, 2016.

BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. Antioxidant and radical scavenging properties of 8-oxo derivatives of xanthine drugs pentoxifylline and lisofylline. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 288:1212–1217, 2001.

BHATTI, J. S.; BHATTI, G. K.; REDDY, P. Hemachandra Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders: A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. **Molecular Basis of Disease**, 1863:1066-1077, 2017.

BLACKBURN, P.; LAMARCHE, B.; COUILLARD, C.; PASCOT, A.; BERGERON, N.; PRUD'HOMME, D.; TREMBLAY, A.; BERGERON, J.; LEMIEUX, I.; DESPRÉS, J. P. Postprandial hyperlipidemia: another correlate of the “hypertriglyceridemic waist” phenotype in men. **Atherosclerosis**, 171:327-336, 2003.

BIERHAUS, A.; NAWROTH, P. P. Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. **Diabetologia**, 52:2251-2263, 2009.

BOINI, K. M.; XIA, M.; ABAIS, J. M.; LI, G.; PITZER, A. L.; GEHR, T. W.; ZHANG, Y.; LI, P. L. Activation of inflammasomes in podocyte injury of mice on the high fat diet: effects of ASC gene deletion and silencing. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, 1843:836-845, 2014.

BOUCHER, J.; KLEINRIDDER, A.; KAHN, C. R. Ronald. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 6:a009191, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248-254, 1976.

BRASIL. Vigitel Brasil 2017: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, 54:1615-1625, 2005.

CAI, W.; HE, J. C.; ZHU, L.; LU, C.; VLASSARA, H. Advanced glycation end product (AGE) receptor 1 suppresses cell oxidant stress and activation signaling via EGF receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 103:13801-13806, 2006.

CAI, W.; HE, J. C.; ZHU, L.; CHEN, X.; STRIKER, G. E.; VLASSARA, H. AGE-receptor-1 counteracts cellular oxidant stress induced by AGEs via negative regulation of p66 shc-dependent FKHRL1 phosphorylation. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 294:C145-C152, 2008.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological Reviews**, 84: 277-359, 2004.

CARICILLI, A. M.; PICARDI, P. K.; DE ABREU, L. L.; UENO, M.; PRADA, P. O.; ROPELLE, E. R.; HIRABARA, S. M.; CASTOLDI, Â.; VIEIRA, P.; CAMARA, N. O.; CURI, R.; CARVALHEIRA, J. B.; SAAD, M. J. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. **PLoS Biology**, 9:1001212, 2011.

CARRAGETA, D. F.; DIAS, T. R.; ALVES, M. G.; OLIVEIRA, P. F.; MONTEIRO, M. P.; SILVA, B. M. Anti-obesity potential of natural methylxanthines. **Journal of Functional Foods**, v. 43, p. 84-94, 2018.

CASTRO, A. V. B.; KOLKA, C. M.; KIM, S. P.; BERGMAN, R. N. Obesity, insulin resistance and comorbidities? Mechanisms of association. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 58:600-609, 2014.

CEFALU, W. T. Insulin resistance: cellular and clinical concepts. **Experimental Biology and Medicine**, 226: 13-26, 2001.

CELI, F. S.; LE, T. N.; NI, B. Physiology and relevance of human adaptive thermogenesis response. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 26: 238–247, 2015.

CHE, R.; YUAN, Y.; HUANG, S.; ZHANG, A. Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal diseases. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, 306:F367-F378, 2013.

CHEN, Y. M.; CHIANG, W. C.; YANG, Y.; LAI, C. F.; WU, K. D.; LIN, S. L. Pentoxifylline attenuates proteinuria in anti-Thy1 glomerulonephritis via downregulation of nuclear factor- κ B and Smad2/3 signaling. **Molecular Medicine**, 21:276-284, 2015.

CHEN, Y. M.; CHIANG, W. C.; LIN, S. L.; TSAI, T. J. Therapeutic efficacy of pentoxifylline on proteinuria and renal progression: an update. **Journal of Biomedical Science**, 24:84, 2017.

CHISTIAKOV, D. A.; MELNICHENKO, A. A.; OREKHOV, A. N.; BOBRY SHEV, Y. V. Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. **Biochimie**, 132:19-27, 2017.

CHOE, S. S.; HUH, J. Y.; HWANG, I. J.; KIM, J. I.; KIM, J. B. Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders. **Frontiers in Endocrinology**, 7:30, 2016.

CHUNG, J. H.; MANGANIELLO, V.; DYCK, J. R. B. Resveratrol as a calorie restriction mimetic: therapeutic implications. **Trends in Cell Biology**, 22:546-554, 2012.

CODONER-FRANCH, P.; ALONSO-IGLESIAS, E. Resistin: insulin resistance to malignancy. **Clinica Chimica Acta**, 438:46-54, 2015.

COOK, J. G. H. Creatinine assay in the presence of protein. **International Journal of Clinical Chemistry**, 32:485-6, 1971.

CORKEY, B. E. Banting lecture 2011: hyperinsulinemia: cause or consequence? **Diabetes**, 61:4-13, 2012.

COSTA, L. G.; MCDONALD, B. E.; MURPHY, S. D.; OMENN, G. S.; RICHTER, R. J.; MOTULSKY, A. G.; FURLONG, C. E. Serum Paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 103:66-76, 1990.

COSTA, L. G.; GIORDANO, G.; FURLONG, C. E. Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: the hunt goes on. **Biochemical Pharmacology**, 81:337-344, 2011.

CROUCH, S. P.; FLETCHER, J. Effect of ingested pentoxifylline on neutrophil superoxide anion production. **Infection and Immunity**, 60:4504-9, 1992.

CYPESS, A. M.; KAHN, C. R. Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity**, 17:143-9, 2010.

CZECH, M. P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. **Nature Medicine**, 23:804, 2017.

DE BOER, I. H.; RUE, T. C.; HALL, Y. N.; HEAGERTY, P. J.; WEISS, N. S.; HIMMELFARB, J. Temporal trends in the prevalence of diabetic kidney disease in the United States. **Jama**, 305:2532–2539, 2011.

DECLÈVES, A. E.; MATHEW, A. V.; CUNARD, R.; SHARMA, K. AMPK mediates the initiation of kidney disease induced by a high-fat diet. **Journal of the American Society of Nephrology**, 22:1846–1855, 2011.

DECLÈVES, A. E.; ZOLKIPLI, Z.; SATRIANO, J.; WANG, L.; NAKAYAMA, T.; ROGAC, M.; LE, T. P.; NORTIER, J. L.; FARQUHAR, M. G.; NAVIAUX, R. K.; SHARMA, K. Regulation of lipid accumulation by AMK-activated kinase in high fat diet-induced kidney injury. **Kidney International**, 85:611-623, 2014.

DENIAUD, A.; MAILLIER, E.; PONCET, D.; KROEMER, G.; LEMAIRE, C.; BRENNER, C. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. **Oncogene**, 27:285–299, 2008.

DONATE-CORREA, J.; TAGUA, V. G.; FERRI, C.; MARTÍN-NÚÑEZ, E.; HERNÁNDEZ-CARBALLO, C.; UREÑA-TORRES, P.; RUIZ-ORTEGA, M.; ORTIZ, A.; MORA-FERNÁNDEZ, C.; NAVARRO-GONZÁLEZ, J. F. Pentoxifylline for renal protection in diabetic kidney disease. A Model of old drugs for new horizons. **Journal of Clinical Medicine**, 8:287, 2019.

SANTOS, C. H. C.; TALPO, T. C.; MOTTA, B. P.; KAGA, A. K.; BAVIERA, A. M.; CASTRO, R. N.; DA SILVA, V. C.; DE SOUSA-JUNIOR, P. T.; WESSJOHANN, L.; DE CARVALHO, M. G. New compounds of *Siolmatra brasiliensis* and inhibition of in vitro protein glycation damage. **Fitoterapia**, 133:109-119, 2019.

DU, X. L.; EDELSTEIN, D.; ROSSETTI, L.; FANTUS, I. G.; GOLDBERG, H.; ZIYADEH, F.; WU, J.; BROWNLEE, M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 97:12222-12226, 2000.

DU, J.; MA, Y. Y.; YU, C. H.; LI, Y. M. Effects of pentoxifylline on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, 20:569, 2014.

DUARTE, S. M. B.; STEFANO, J. T.; OLIVEIRA, C. P. Microbiota and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH). **Annals of Hepatology**, 18:416-421, 2019.

DUCOMMUN, S.; DEAK, M.; SUMPTON, D.; FORD, R. J.; NÚÑEZ GALINDO, A.; KUSSMANN, M.; VIOLLET, B.; STEINBERG, G. R.; FORETZ, M.; DAYON, L.; MORRICE, N. A.; SAKAMOTO, K. Motif affinity and mass spectrometry proteomic approach for the discovery of cellular AMPK targets: identification of mitochondrial fission factor as a new AMPK substrate. **Cellular Signalling**, 27:978-988, 2015.

DULLOO, A. G. The search for compounds that stimulate thermogenesis in obesity management: from pharmaceuticals to functional food ingredients. **Obesity Reviews**, 12:866-883, 2011.

DUMAN, D. G.; OZDEMIR, F.; BIRBEN, E.; KESKIN, O.; EKŞİOĞLU-DEMIRALP, E.; CELIKEL, C.; KALAYCI, O.; KALAYCI, C. Effects of pentoxifylline on TNF- α production by peripheral blood mononuclear cells in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Digestive Diseases and Sciences**, 52:2520-2524, 2007.

FALKEVALL, A.; MEHLEM, A.; PALOMBO, I.; HELLER SAHLGREN, B.; EBARASI, L.; HE, L.; YTTERBERG, A. J.; OLAUSON, H.; AXELSSON, J.; SUNDELIN, B.; PATRAKKA, J.; SCOTNEY, P.; NASH, A.; ERIKSSON, U. Reducing VEGF-B signaling ameliorates renal lipotoxicity and protects against diabetic kidney disease. **Cell Metabolism**, 25:713-726, 2017.

FERREIRA, A. V. M.; MENEZES-GARCIA, Z.; VIANA, J. B.; MÁRIO, E. G.; BOTION, L. M. Distinct metabolic pathways trigger adipocyte fat accumulation induced by high-carbohydrate and high-fat diets. **Nutrition**, 30:1138-1143, 2014.

FESTING, M. F. Inbred strains should replace outbred stocks in toxicology, safety testing, and drug development. **Toxicologic Pathology**, 38:681-690, 2010.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, 226:497-509, 1956.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiological Reviews**, 93:137-188, 2013.

FOWLER, M. J. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. **Clinical Diabets**, 26:77-82, 2008.

FREITAS, J. P.; FILIPE, P. M. Pentoxifylline. **Biological Trace Element Research**, 47:307-311, 1995.

FRIMAT, M.; DAROUX, M.; LITKE, R.; NEVIÈRE, R.; TESSIER, F. J.; BOULANGER, E. Kidney, heart and brain: three organs targeted by ageing and glycation. **Clinical Science**, 131:1069-1092, 2017.

GAI, Z.; WANG, T.; VISENTIN, M.; KULLAK-UBLICK, G. A.; FU, X.; WANG, Z. Lipid Accumulation and Chronic Kidney Disease. **Nutrients**, 11:722, 2019.

GALVAN, D. L.; GREEN, N. H.; DANESH, F. R. The hallmarks of mitochondrial dysfunction in chronic kidney disease. **Kidney International**, 92:1051-1057, 2017.

GARCIA, F. A. O.; REBOUÇAS, J. F.; BALBINO, T. Q.; DA SILVA, T. G.; DE CARVALHO-JÚNIOR, C. H. R.; CERQUEIRA, G. S.; BRITO G. A.; DE BARROS VIANA, G. S. Pentoxifylline reduces the inflammatory process in diabetic rats: relationship with decreases of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase. **Journal of Inflammation**, 12: 33, 2015.

GESTA, S.; TSENG, Y. H.; KAHN, C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. **Cell**, 131:242-256, 2007.

GETZ, G. S. Overview of murine atherosclerosis series. **Current Drug Targets**, 8:1144–1149, 2007.

GRUZDEVA, O.; BORODKINA, D.; UCHASOVA, E.; DYLEVA, Y.; BARBARASH, O. Leptin resistance: underlying mechanisms and diagnosis. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, 12:191, 2019.

GUILBAUD, A.; NIQUET-LERIDON, C.; BOULANGER, E.; TESSIER, F. J. How can diet affect the accumulation of advanced glycation end-products in the human body? **Foods**, 5:84, 2016.

GUO, J.; JOU, W.; GAVRILOVA, O.; HALL, K. D. Persistent diet-induced obesity in male C57BL/6 mice resulting from temporary obesogenic diets, **PloS One**, 4:e5370, 2009.

GUTCH, M.; KUMAR, S.; RAZI, S. M.; GUPTA, K. K.; GUPTA, A. Assessment of insulin sensitivity/resistance. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, 19:160, 2015.

HAAN, C.; BEHRMANN, I. A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. **Journal of Immunological Methods**, 318: 11-19, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERRIDGE, J. M. C. Free radical in Biology and Medicine. 3rd ed. New York: **Oxford Science Publications**, 2010.

HAN, J.; KAUFMAN, R. J. The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. **Journal of Lipid Research**, 57:1329-1338, 2016.

HARCOURT, B. E.; SOURRIS, K. C.; COUGHLAN, M. T.; WALKER, K. Z.; DOUGHERTY, S. L.; ANDRIKOPOULOS, S.; MORLEY, A. L.; THALLAS-BONKE, V.; CHAND, V.; PENFOLD, S. A.; DE COURTEN, M. P.; THOMAS, M. C.; KINGWELL, B. A.; BIERHAUS, A.; COOPER, M. E.; DE COURTEN, B.; FORBES, J. M. Targeted reduction of advanced glycation improves renal function in obesity. **Kidney International**, 80: 190-198, 2011.

HARRIS, R. B. S. Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, 1842:414-423, 2014.

HAUCK, A. K.; BERNLOHR, D. A. Oxidative stress and lipotoxicity. **Journal of Lipid Research** 57:1976-1986, 2016.

HE, C.; SABOL, J.; MITSUHASHI, T.; VLASSARA, H. Dietary glycotoxins: inhibition of reactive products by aminoguanidine facilitates renal clearance and reduces tissue sequestration. **Diabetes**, 48: 1308-1315, 1999.

HOCK, M. B.; KRALLI, A. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. **Annual Review of Physiology**, 71:177-203, 2009.

HOSSAIN, P.; KAWAR, B.; EL NAHAS, M. Obesity and diabetes in the developing world a growing challenge. **New England Journal of Medicine**, 356:213-5, 2007.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, 259:87-91, 1993.

INOUE, H.; KOBAYASHI-HATTORI, K.; HORIUCHI, Y.; OISHI, Y.; ARAI, S.; TAKITA, T. Regulation of the body fat percentage in developmental-stage rats by methylxanthine derivatives in a high-fat diet. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 70:1134-1139, 2006.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes Atlas, 8th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017.

ISAKOVA, T.; NICKOLAS, T. L.; DENBURG, M.; YARLAGADDA, S.; WEINER, D. E.; GUTIÉRREZ, O. M.; BANSAL, V.; ROSAS, S. E.; NIGWEKAR, S.; YEE, J.; KRAMER, H.; KDOQI US commentary on the 2017 KDIGO clinical practice guideline update for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease—mineral and bone disorder (CKD-MBD). **American Journal of Kidney Diseases**, 70:737-751, 2017.

JEFFERSON, J. A.; SHANKLAND, S. J.; PICHLER, R. H. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. **Kidney international**, 74:22-36, 2008.

JENSEN, V. S.; PORSGAARD, T.; LYKKESFELDT, J.; HVID, H. Rodent model choice has major impact on variability of standard preclinical readouts associated with diabetes and obesity research. **American Journal of Translational Research**, 8:3574, 2016.

JIANG, T.; WANG, Z.; PROCTOR, G.; MOSKOWITZ, S.; LIEBMAN, S. E.; ROGERS, T.; LUCIA, M. S.; LI, J.; LEVI, M. Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. **Journal of Biological Chemistry**, 280:32317-32325, 2005.

JOHNSON, R. N.; METCALF, P. A.; BAKER, J. R. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. **Clinica Chimica Acta**, 127:87-95, 1982.

KANG, Y. R.; LEE, H. Y.; KIM, J. H.; MOON, D. I.; SEO, M. Y.; PARK, S. H.; CHOI, K. H.; KIM, C. R.; KIM, S. H.; OH, J. H.; CHO, S. W.; KIM, S. Y.; KIM, M. G.; CHAE, S. W.; KIM, O.; OH, H. G. Anti-obesity and anti-diabetic effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Laboratory Animal Research**, 28:23-29, 2012.

KERN, P. A.; RANGANATHAN, S.; LI, C.; WOOD, L.; RANGANATHAN, G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 280:745–751. 2001.

KHANAPURE, A.; CHUKI, P.; DE SOUSA, S. Drug repositioning: old drugs for new indications, **Indian Journal of Applied Research**, 8:462-66, 2014.

KNIGHT, Z. A.; HANNAN, K. S.; GREENBERG, M. L.; FRIEDMAN, J. M. Hyperleptinemia is required for the development of leptin resistance. **PloS one**, 5:e11376, 2010.

KOHN, H. I.; LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 82: 292-300, 1944.

KOPPE, S. W.; SAHAI, A.; MALLADI, P.; WHITINGTON, P. F.; GREEN, R. M. Pentoxifylline attenuates steatohepatitis induced by the methionine choline deficient diet. **Journal of Hepatology**, 41:592-598, 2004.

KOSCHINSKY, T.; HE, C. J.; MITSUHASHI, T.; BUCALA, R.; LIU, C.; BUENTING, C.; HEITMANN, K.; VLASSARA, H. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 94, 6474–6479, 1997.

KUMAGAI, T.; NANGAKU, M.; KOJIMA, I.; NAGAI, R.; INGELFINGER, J. R.; MIYATA, T.; FUJITA, T.; INAGI, R. Glyoxalase I overexpression ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in rats. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, 296:F912-F921, 2009.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227:680-685, 1970.

LAI, T. S.; CHIANG, W. C.; CHEN, Y. M. Pentoxifylline: evidence strong enough for renoprotection? **Journal of the Formosan Medical Associations**, 115:591–2, 2016.

LEE, H. J.; FELIERS, D.; MARIAPPAN, M. M.; SATARANATARAJAN, K.; CHOUDHURY, G. G.; GORIN, Y.; KASINATH, B. S. Tadalafil integrates nitric oxide-hydrogen sulfide signaling to inhibit high glucose-induced matrix protein synthesis in podocytes. **Journal of Biological Chemistry**, 290:12014-12026, 2015.

LEPORINI, C.; PISANO, A.; RUSSO, E.; DE SARRO, G.; COPPOLINO, G.; BOLIGNANO, D. Effect of pentoxifylline on renal outcomes in chronic kidney disease patients: a systematic review and meta-analysis. **Pharmacological Research**, 107:315–32, 2016.

LEVITAN, I.; VOLKOV, S.; SUBBIAH, P. V. Oxidized LDL: Diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. **Antioxidants & Redox Signaling**, 13:39-75, 2010.

LI, Y. M.; MITSUHASHI, T.; WOJCIECHOWICZ, D.; SHIMIZU, N.; LI, J.; STITT, A.; HE, C.; BANERJEE, D.; VLASSARA, H. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 93:11047-11052, 1996.

LI, T.; GAO, J.; DU, M.; SONG, J.; MAO, X. Milk fat globule membrane attenuates high-fat diet-induced obesity by inhibiting Adipogenesis and increasing uncoupling protein 1 expression in white adipose tissue of mice. **Nutrients**, 10:331, 2018.

LILLIBRIDGE, J. A.; KALHORN, T. F.; SLATTERY, J. T. Metabolism of lisofylline and pentoxifylline in human liver microsomes and cytosol. **Drug Metabolism and Disposition**, 24:1174-9, 1996.

LIU, A. G.; ARCENEUX, K. P.; CHU, J. T.; JACOB, G. JR.; SCHREIBER, A. L.; TIPTON, R. C.; YU, Y.; JOHNSON, W. D.; GREENWAY, F. L.; PRIMEAUX, S. D. The effect of caffeine and albuterol on body composition and metabolic rate. **Obesity**, 23:1830–1835, 2015.

LIU, D.; WANG, L. N.; LI, H. X.; HUANG, P.; QU, L. B.; CHEN, F. Y. Pentoxifylline plus ACEIs/ ARBs for proteinuria and kidney function in chronic kidney disease: a meta-analysis. **Journal of International Medical Research**, 45:383–98, 2017.

LÓPEZ-DÍEZ, R.; SHEKHTMAN, A.; RAMASAMY, R.; SCHMIDT, A. M. Cellular mechanisms and consequences of glycation in atherosclerosis and obesity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA), Molecular Basis of Disease**, 1862:2244-2252, 2016.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, 193:265-275, 1951.

LU, C.; HE, J. C.; CAI, W.; LIU, H.; ZHU, L. I.; VLASSARA, H. Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101: 11767-11772, 2004.

LUCA, C.; OLEFSKY, J.M. Inflammation and Insulin Resistance. **FEBS Lett.** 582:97-105, 2008.

LUO, L.; LIU, M. Adipose tissue in control of metabolism. **Journal of Endocrinology**, 231: R77-R99, 2016.

MACKNESS, M.; MACKNESS, B. Targeting paraoxonase-1 in atherosclerosis. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, 17:829–837, 2013.

MADONNA, R.; DE CATERINA, R. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes—part I: pathways of vascular disease in diabetes. **Vascular Pharmacology**, 54:68-74, 2011.

MANOLESCU, B. N.; BUSU, C.; BADITA, D.; STANCULESCU, R.; BERTEANU, M. Paraoxonase 1—an update of the antioxidant properties of high-density lipoproteins. **Maedica**, 10:173, 2015.

MANSBACH, C. M.; GORELICK, F. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, 293:G645-G650, 2007.

MAO, Y. X.; CAI, W. J.; SUN, X. Y.; DAI, P. P.; LI, X. M.; WANG, Q.; HUANG, X. L.; HE, B.; WANG, P. P.; WU, G.; MA, J. F.; HUANG, S. B. RAGE-dependent mitochondria pathway: a novel target of silibinin against apoptosis of osteoblastic cells induced by advanced glycation end products. **Cell Death & Disease**, 9:674, 2018.

MARTIN, B.; CARON, N.; JADOT, I.; COLOMBARO, V.; FEDERICI, G.; DEPOMMIER, C.; DECLÈVES, A. É. Evaluation of inducible nitric oxide synthase inhibition on kidney function and structure in high-fat diet-induced kidney disease. **Experimental Physiology**, 103:125-140, 2018.

MASSART, J.; ROBIN, M. A.; NOURY, F.; FAUTREL, A.; LETTÉRON, P.; BADO, A.; ELIAT, P. A.; FROMENTY, B. Pentoxifylline aggravates fatty liver in obese and diabetic ob/ob mice by increasing intestinal glucose absorption and activating hepatic lipogenesis. **British Journal of Pharmacology**, 165:1361-1374, 2012.

MAURY, E.; BRICHARD, S. M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 314:1-16, 2010.

MCCARTY, M. F.; O'KEEFE, J. H.; DINICOLANTONIO, J. J. Pentoxifylline for vascular health: a brief review of the literature. **Open Heart**, 3:365, 2016.

MEEPROM, A.; SOMPONG, W.; CHAN, C.; ADISAKWATTANA, S. Isoferulic Acid, a New Anti-Glycation Agent, Inhibits Fructose and Glucose-Mediated Protein Glycation in Vitro. **Molecules**, 18:6439-54, 2013.

MENG, X. M.; TANG, P. M. K.; LI, J.; LAN, H. Y. TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. **Frontiers in Physiology**, 6:82, 2015.

MITSUMOTO, A.; KIM, K. R.; OSHIMA, G.; KUNIMOTO, M.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; NAKAGAWA, Y. Nitric oxide inactivates glyoxalase I in cooperation with glutathione. **The Journal of Biochemistry**, 128:647-654, 2000.

MIYAKE, Y.; YASUI, M.; IKEDA, K.; KONDO, T.; TSUKAMOTO, S.; HORI, C.; OKEMOTO, N.; MASHOU, K.; BANDO, R.; NAKAMURA, N.; TORAYA, T. Molecular cloning and expression of starfish protein kinase C isoforms. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 73:1550-1560, 2009.

MÖLLMANN, J.; KAHLES, F.; LEBHERZ, C.; KAPPEL, B.; BAECK, C.; TACKE, F.; WERNER, C.; FEDERICI M.; MARX N.; LEHRKE M. The PDE4 inhibitor roflumilast reduces weight gain by increasing energy expenditure and leads to improved glucose metabolism. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, 19:496-508, 2017.

MONTANARI, T.; POŠČIĆ, N.; COLITTI, M. Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review. **Obesity Reviews**, 18:495-513, 2017.

MONTEIRO, J. P.; ALVES, M. G.; OLIVEIRA, P. F.; SILVA, B. M. Structure-bioactivity relationships of methylxanthines: Trying to make sense of all the promises and the drawbacks. **Molecules**, 21:974, 2016.

MONTEIRO, M. P. "Obesity vaccines." **Human Vaccines & Immunotherapeutics** 10.4:887-895, 2014.

MONTGOMERY, M. K.; HALLAHAN, N. L.; BROWN, S. H.; LIU, M.; MITCHELL, T. W.; COONEY, G. J.; TURNER, N. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. **Diabetologia**, 56:1129-1139, 2013.

MONTORO-MOLINA, S.; LÓPEZ-CARMONA, A.; QUESADA, A.; O'VALLE, F.; MARTÍN-MORALES, N.; OSUNA, A.; VARGAS, F.; WANGENSTEEN, R. Klotho and aminopeptidases as early biomarkers of renal injury in Zucker obese rats. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1599, 2018.

MOSLI, R. H.; MILLER, A. L.; PETERSON, K. E.; KACIROTI, N.; ROSENBLUM, K.; BAYLIN, A.; LUMENG, J. C. Birth order and sibship composition as predictors of overweight or obesity among low-income 4-to 8-year-old children. **Pediatric Obesity**, 11:40-46, 2016.

MOTTA, B. P.; KAGA, A. K.; OLIVEIRA, J. O.; INACIO, M. D.; DA SILVA, C. F.; DE SOUSA JUNIOR, P. T.; BRUNETTI, I. L.; BAVIERA, A. M. *In vitro* inhibition of protein glycation and advanced glycation end products formation by hydroethanolic extract and two fractions of *Simaba trichilioides* roots. **Natural Product Research**, 1-5, 2018.

MROZ, J. R. Clinical Enzymology. In: Anderson SC, Cockayne S (eds). *Clinical Chemistry Concepts & Applications*, chapter 11, Mc Graw-Hill, 179-202, 2003.

MULLER, R. Hemorheology and peripheral vascular diseases: A new therapeutic approach. **Journal of Medicine**, 12: 209-35, 1981.

NEWTON, A. C.; BOOTMAN, M. D.; SCOTT, J. D. Second messengers. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 8: a005926, 2016.

NG, Y. Y.; CHEN, Y. M.; TSAI, T. J.; LAN, X. R.; YANG, W. C.; LAN, H. Y. Pentoxifylline inhibits transforming growth factor-beta signaling and renal fibrosis in experimental crescentic glomerulonephritis in rats. **American Journal of Nephrology**, v. 29, n. 1, p. 43-53, 2009.

NICKLASSON, M.; BJÖRKMAN, S.; ROTH, B.; JÖNSSON, M.; HÖGLUND, P. Stereoselective metabolism of pentoxifylline in vitro and in vivo in humans. **Chirality: The Pharmacological, Biological, and Chemical Consequences of Molecular Asymmetry**, 14:643-652, 2002.

NOWOTNY, K.; JUNG, T.; HÖHN, A.; WEBER, D.; GRUNE, T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. **Biomolecules**, 5:194-222, 2015.

O'CONNELL, T. X.; HORITA, T. J.; KASRAVI, B. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. **American Family Physician**, 71:105-112, 2005.

OSSWALD, H.; SCHNERMANN, J. Methylxanthines and the kidney. **Handbook of Experimental Pharmacology**, 200:391-412., 2011.

OTT, C.; JACOBS, K.; HAUCKE, E.; SANTOS, A. N.; GRUNE, T.; SIMM, A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biology**, 2:411-429, 2014.

OUCHI, N.; PARKER, J. L.; LUGUS, J. J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, 11:85, 2011.

PANEE, J. Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. **Cytokine**, 60:1-12, 2012.

PATSRI, O.; SIRIPURKPONG, P.; FONGSUPA, S.; KONGKHUM, S.; RERKSNAGARM T.; BORDEERAT, N. K. Comparison of renal biomarkers in obesity with early renal dysfunction. **Journal of Associated Medical Sciences**, 52:163-169, 2019.

PASUPULATI, A. K.; CHITRA, P. S.; REDDY, G. B. Advanced glycation end products mediated cellular and molecular events in the pathology of diabetic nephropathy. **Biomolecular Concepts**, p. 1-17, 2016.

PEREIRA, S. S.; ALVAREZ-LEITE, J. I. Adipokines: biological functions and metabolically healthy obese profile. **Journal of Receptor, Ligand and Channel Research**, 7:15-25, 2014.

PETERSEN, M. C.; SHULMAN, G. I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. **Physiological Reviews**, 98:2133-2223, 2018.

PODRINI, C.; CAMBRIDGE, E. L.; LELLIOTT, C. J.; CARRAGHER, D. M.; ESTABEL, J.; GERDIN, A. K.; KARP, N. A.; SCUDAMORE, C. L.; SANGER MOUSE GENETICS PROJECT; RAMIREZ-SOLIS, R.; WHITE, J. K. High-fat feeding rapidly induces obesity and lipid derangements in C57BL/6N mice. **Mammalian Genome**, 24:240-251, 2013.

POKUPEC, R.; KALAUZ, M.; TURK, N.; TURK, Z. Advanced glycation endproducts in human diabetic and non-diabetic cataractous lenses. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, 241:378-384, 2003.

PROTZEK, A. O.; RAFACHO, A.; VISCELLI, B. A.; BOSQUEIRO, J. R.; CAPPELLI, A. P.; PAULA, F. M.; BOSCHERO, A. C.; PINHEIRO, E. C. Insulin and glucose sensitivity, insulin secretion and β -cell distribution in endocrine pancreas of the fruit bat *Artibeus lituratus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 157:142–148, 2010.

RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J. Glyoxalase 1 Modulation in Obesity and Diabetes. **Antioxidants & Redox Signaling**, 30:354-374, 2018.

RADFAR, M.; LARIJANI, B.; HADJIBABAIE, M.; RAJABIPOUR, B.; MOJTAHEDI, A.; ABDOLLAHI, M. Effects of pentoxifylline on oxidative stress and levels of EGF and NO in blood of diabetic type-2 patients; a randomized, double-blind placebo-controlled clinical trial. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 59:302-6, 2005.

RAHBAR, S.; NATARAJAN, R.; YERNENI, K.; SCOTT, S.; GONZALES, N.; NADLER, J. L. Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. **Clinica Chimica Acta**, 301:65-77, 2000.

RALL, T. W. Drug used in the treatment of asthma. In: Limbird LE, Milinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG, Hardman JG, eds. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. New York: Pergamon Press, 618-38, 1990.

RAMALHO, L.; DA JORNADA, M. N.; ANTUNES, L. C.; HIDALGO, M. P. Metabolic disturbances due to a high-fat diet in a non-insulin-resistant animal model. **Nutrition & Diabetes**, 7:e245, 2017.

RAMIREZ, C. E.; NIAN, H.; YU, C.; GAMBOA, J. L.; LUTHER, J. M.; BROWN, N. J.; SHIBAO, C. A. Treatment with sildenafil improves insulin sensitivity in prediabetes: a randomized, controlled trial. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 100:4533-4540, 2015.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **Journal of Nutritional**, 1938-51, 1993.

REHMAN, K.; AKASH, M. S. H. Mechanisms of inflammatory responses and development of insulin resistance: how are they interlinked?. **Journal of Biomedical Science**, 23:87, 2016.

REIDY, K.; KANG, H. M.; HOSTETTER, T.; SUSZTAK, K. Molecular mechanisms of diabetic kidney disease. **The Journal of Clinical Investigation**, 124:2333-2340, 2014.

RICHTER, R. J.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. **Circulation: Genomic and Precision Medicine**, 1:147-152, 2008.

RIFAI, N.; WARNICK, G. R. Lipids, lipoproteins, Apolipoproteins, and other cardiovascular risk factors. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (eds). **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**, 4th ed, Elsevier S., 903-81, 2006.

ROJAS, A.; MORALES, M. A.; ARAYA, P.; GONZÁLEZ, I. RAGE-The Receptor of Advanced Glycation End Products. **eLS**, p. 1-7, 2017.

ROMÃO G. B. Estudo in vitro da ação de extrato hidroetanólico de *Cordia verbenácea* DC. Em espécies reativas de oxigênio de importância biológica. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2016.

RUSH, J. W; SANDIFORD, S. D. Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. **Clinical Biochemistry**, 36:345-51, 2003.

SABOUNY, R.; FRAUNBERGER, E.; GEOFFRION, M.; NG, A. C.; BAIRD, S. D.; SCREATON, R. A.; MILNE, R.; MCBRIDE, H. M.; SHUTT, T. E. The Keap1–Nrf2 stress response pathway promotes mitochondrial hyperfusion through degradation of the mitochondrial fission protein Drp1. **Antioxidants & Redox Signaling**, 27:1447-1459, 2017.

SALTIEL, A. R.; OLEFSKY, J. M. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. **The Journal of Clinical Investigation**, 127:1-4, 2017.

SAMPLE, C. H.; MARTIN, A. A.; JONES, S.; HARGRAVE, S. L.; DAVIDSON, T. L. Western-style diet impairs stimulus control by food deprivation state cues: implications for obesogenic environments. **Appetite**, 93:13-23, 2015.

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. **Cell**, 148:852-871, 2012.

STEENBERGEN, R. H.; JOYCE, M. A.; LUND, G.; LEWIS, J.; CHEN, R.; BARSBY, N.; DOUGLAS, D.; ZHU, L. F.; TYRRELL, D. L.; KNETEMAN, N. M. Lipoprotein profiles in SCID/uPA mice transplanted with human hepatocytes become human-like and correlate with HCV infection success. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver**, 299: G844–G854, 2010.

SCHAFFER, J. E. Lipotoxicity: When tissues overeat. **Current Opinion in Lipidology**, 14: 281-287, 2003.

SCHWARTZ, D. R.; LAZAR, M. A. Human resistin: found in translation from mouse to man. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 22:259-265, 2011.

SCHWEITZER, M. L.; STENGEL, B.; LEGRAND, K.; BRIANÇON, S.; JACQUELINET, C.; COMBE, C.; FOUQUE, D.; MASSY, Z. A.; LAVILLE, M.; FRIMAT, L.; AYAV, C. Obesity phenotype and patient-reported outcomes in moderate and severe chronic kidney disease: a cross-sectional study from the CKD-REIN cohort study. **Quality of Life Research**, p. 1-11, 2019.

SELVIN, E.; RAWLINGS, A. M.; GRAMS, M.; KLEIN, R.; SHARRETT, A. R.; STEFFES, M.; CORESH, J. Fructosamine and glycated albumin for risk stratification and prediction of incident diabetes and microvascular complications: a prospective cohort analysis of the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, 2:279-288, 2014.

SÉRO, L.; SANGUINET, L.; BLANCHARD, P.; DANG, B. T.; MOREL, S.; RICHOMME, P.; SÉRAPHIN, D.; DERBRÉ, S. Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts. **Molecules**, 18:14320-14339, 2013.

SHANIK, M. H.; XU, Y.; ŠKRHA, J.; DANKNER, R.; ZICK, Y.; ROTH, J. Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse?. **Diabetes Care**, 31:S262-S268, 2008.

SHIRKHANI, S.; MARANDI, S. M.; KAZEMINASAB, F.; ESMAEILI, M.; GHAEDI, K.; ESFARJANI, F.; SHIRALIAN-ESFAHANI, H.; NASR-ESFAHANI, M. H. Comparative studies on the effects of high-fat diet, endurance training and obesity on Ucp1 expression in male C57BL/6 mice. **Gene**, 676:16-21, 2018.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, 4:180-183, 2015.

SILVA, M. S.; GOMES, R. A.; FERREIRA, A. E.; PONCES FREIRE, A.; CORDEIRO, C. The glyoxalase pathway: the first hundred years... and beyond. **Biochemical Journal**, 453:1-15, 2013.

SINDHU, S.; THOMAS, R.; SHIHAB, P.; SRIRAMAN, D.; BEHBEHANI, K.; AHMAD, R. Obesity is a positive modulator of IL-6R and IL-6 expression in the subcutaneous adipose tissue: significance for metabolic inflammation. **PloS one**, 10:e0133494, 2015.

SINGH, N.; SHRESHTHA, A. K.; THAKUR, M. S.; PATRA, S. Xanthine scaffold: Scope and potential in drug development. **Heliyon**, 4:e00829, 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2017-2018), 2017.

STEPPAN, C. M.; WANG, J.; WHITEMAN, E. L.; BIRNBAUM, M. J.; LAZAR, M. A. Activation of SOCS-3 by resistin. **Molecular and Cellular Biology**, 25:1569-1575, 2005.

STINKENS, R.; GOOSSENS, G. H.; JOCKEN, J. W.; BLAAK, E. E. Targeting fatty acid metabolism to improve glucose metabolism. **Obesity Reviews**, 16:715-757, 2015.

STIRBAN, A.; GAWLOWSKI, T.; RODEN, M. Vascular effects of advanced glycation endproducts: clinical effects and molecular mechanisms. **Molecular Metabolism**, 3: 94-108, 2014.

SURWIT, R. S.; KUHN, C. M.; COCHRANE, C.; MCCUBBIN, J. A.; FEINGLOS, M. N. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. **Diabetes**, 37:1163-1167, 1988.

SURWIT, R. S.; FEINGLOS, M. N.; RODIN, J.; SUTHERLAND, A.; PETRO, A. E.; OPARA, E. C.; KUHN, C. M.; REBUFFÉ-SCRIVE, M. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. **Metabolism**, 44:645-651, 1995.

SUSZTAK, K.; CICCONE, E.; MCCUE, P.; SHARMA, K.; BÖTTINGER, E. P. Multiple metabolic hits converge on CD36 as novel mediator of tubular epithelial apoptosis in diabetic nephropathy. **PLoS Medicine**, 2:e45, 2005.

SZETO, H. H.; LIU, S.; SOONG, Y.; ALAM, N.; PRUSKY, G. T.; SESHAN, S. V. Protection of mitochondria prevents high-fat diet-induced glomerulopathy and proximal tubular injury. **Kidney International**, 90:997-1011, 2016.

TABIT, C. E.; CHUNG, W. B.; HAMBURG, N. M.; VITA, J. A. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, 11:61-74, 2010.

TAIN, Y-L; HSU, C-N. AMP-activated protein kinase as a reprogramming strategy for hypertension and kidney disease of developmental origin. **International Journal of Molecular Sciences**, 19:1744, 2018.

TAIN, Y-L; HSU, C-N; CHAN, J. Y. H. PPARs link early life nutritional insults to later programmed hypertension and metabolic syndrome. **International Journal of Molecular Sciences**, 17:20, 2016.

TAKAHASHI, N.; TETSUKA, T.; URANISHI, H.; OKAMOTO, T. Inhibition of the NF- κ B transcriptional activity by protein kinase A. **European Journal of Biochemistry**, 269:4559-4565, 2002.

TANAKA, Y.; KUME, S.; ARAKI, S.; ISSHIKI, K.; CHIN-KANASAKI, M.; SAKAGUCHI, M.; SUGIMOTO, T.; KOYA, D.; HANEDA, M.; KASHIWAGI, A.; MAEGAWA, H.; UZU, T. Fenofibrate, a PPAR α agonist, has renoprotective effects in mice by enhancing renal lipolysis. **Kidney International**, 79:871-882, 2011.

TANG, W.; MARTIN, K. A.; HWA, J. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. **Frontiers in Pharmacology**, 3:87, 2012.

TANG, C.; CAI, J.; DONG, Z. Mitochondrial dysfunction in obesity-related kidney disease: a novel therapeutic target. **Kidney International**, 90:930-933, 2016.

TATEYA, S.; TAMORI, Y.; KAWAGUCHI, T.; KANDA, H.; KASUGA, M. An increase in the circulating concentration of monocyte chemoattractant protein-1 elicits systemic insulin resistance irrespective of adipose tissue inflammation in mice. **Endocrinology**, 151:971-979, 2010

TATEYA, S.; KIM, F.; TAMORI, Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Frontiers in Endocrinology**, 4:93, 2013.

The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology: Four Enzymes in Blood. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory**, 33:291-306, 1974.

THORNALLEY, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 419:31-40, 2003.

TOFOVIC, S. P.; KOST JR, C. K.; JACKSON, E. K.; BASTACKY, S. I. Long-term caffeine consumption exacerbates renal failure in obese, diabetic, ZSF1 (fa-facp) rats. **Kidney International**, 61:1433-1444, 2002.

TOFOVIC, S. P.; SALAH, E. M.; JACKSON, E. K.; MELHEM, M. Early renal injury induced by caffeine consumption in obese, diabetic ZSF1 rats. **Renal Failure**, 29:891-902, 2007.

TOMINO, Y.; HAGIWARA, S.; GOHDA, T. AGE-RAGE interaction and oxidative stress in obesity-related renal dysfunction. **Kidney International**. 2011.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 76:4350-4354, 1979.

TOWNSEND, K.; TSENG, Y. Brown adipose tissue: recent insights into development, metabolic function and therapeutic potential. **Adipocyte**, 1:13-24, 2012.

TREMMEL, M.; GERDTHAM, U. G.; NILSSON, P. M.; SAHA, S. Economic burden of obesity: a systematic literature review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 14: 435, 2017.

TREWIN, A. J.; BERRY, B. J.; WOJTOVICH, A. P. Exercise and mitochondrial dynamics: keeping in shape with ROS and AMPK. **Antioxidants**, 7:7, 2018.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. **Journal of Clinical Pathology**, 22: 158-61, 1969.

UCHIDA, A.; WHITSITT, M. C.; EUSTAQUIO, T.; SLIPCHENKO, M. N.; LEARY, J. F.; CHENG, J. X.; BUHMAN, K. K. Reduced triglyceride secretion in response to an acute dietary fat challenge in obese compared to lean mice. **Frontiers in Physiology**, 3:26, 2012.

UEDA-WAKAGI, M.; NAGAYASU, H.; YAMASHITA, Y.; ASHIDA, H. Green Tea Ameliorates Hyperglycemia by Promoting the Translocation of Glucose Transporter 4 in the Skeletal Muscle of Diabetic Rodents. **International Journal of Molecular Sciences**, 20:2436, 2019.

VAN DER HEIJDEN, R. A.; BIJZET, J.; MEIJERS, W. C.; YAKALA, G. K.; KLEEMANN, R.; NGUYEN, T. Q.; DE BOER, R. A.; SCHALKWIJK, C. G.; HAZENBERG, B. P.; TIETGE, U. J.; HEERINGA, P. Obesity-induced chronic inflammation in high fat diet challenged C57BL/6J mice is associated with acceleration of age-dependent renal amyloidosis. **Scientific Reports**, v. 5, p. 16474, 2015.

VAN HERPEN, N. A.; SCHRAUWEN-HINDERLING, V. B. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. **Physiology & Behavior**, 94:231-241, 2008.

VANDEVIJVERE, S.; CHOW, C. C.; HALL, K. D.; UMALI, E.; SWINBURN, B. A. Increased food energy supply as a major driver of the obesity epidemic: a global analysis. **Bulletin of the World Health Organization**, 93:446–456, 2015.

VIRCHOW, R.; CHANCE, F. Cellular pathology, as based on physiological and pathological histology. J. Churchill; London: 1860. A more precise account of fatty metamorphosis.; p. 351(texto completo disponível eletronicamente via Google Books, <http://books.google.com/>).

WANG, Y.; CHEN, X.; SONG, Y.; CABALLERO, B.; CHESKIN, L. J. Association between obesity and kidney disease: A systematic review and meta-analysis. **Kidney International**, 73: 19–33, 2008.

WANG, Z. H.; HSU, C. C.; LIN, H. H.; CHEN, J. H. Antidiabetic effects of Carassius auratus complex formula in high fat diet combined streptozotocin-induced diabetic mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

WANG, Z.; LIANG, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, N.; LIU, Q.; WANG, Z. Phosphodiesterase 4 inhibitor activates AMPK-SIRT6 pathway to prevent aging-related adipose deposition induced by metabolic disorder. **Aging**, 10:2394, 2018.

WILLIAMS, E. P.; MESIDOR, M.; WINTERS, K.; DUBBERT, P. M.; WYATT, S. B. Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. **Current Obesity Reports**, 4:363–370, 2015.

WINDMEIER, C.; GRESSNER, A. M. Pharmacological aspects of pentoxifylline with emphasis on its inhibitory actions on hepatic fibrogenesis. **General Pharmacology: The Vascular System**, 29:181–96, 1997.

World Health Organization - Obesity and overweight factsheets. <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>> (acessado em 09 de janeiro de 2018).

WRIGHT, E. M.; MARTÍN, M. G.; TURK, E. Intestinal absorption in health and disease-sugars. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, 17:943–956, 2003.

WROBLEWSKI, F.; LADUE, J. S. Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac with hepatic disease. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 91:569-71, 1956.

WU, J.; ZHAO, M. Y.; ZHENG, H.; ZHANG, H.; JIANG, Y. Pentoxifylline alleviates high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis and early atherosclerosis in rats by inhibiting AGE and RAGE expression. **Acta Pharmacologica Sinica**, 31:1367-75, 2010.

WU, N.; SARNA, L. K.; HWANG, S. Y.; ZHU, Q.; WANG, P.; SIOW, Y. L.; KARMIN, O. Activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase during high fat diet feeding. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, 1832:1560-1568, 2013.

WU, B. N.; KUO, K. K.; CHEN, Y. H.; CHANG, C. T.; HUANG, H. T.; CHAI, C. Y.; DAI, Z. K.; CHEN, I. J. Theophylline-Based KMUP-1 Improves Steatohepatitis via MMP-9/IL-10 and Lipolysis via HSL/p-HSL in Obese Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, 17:1345, 2016.

XENACHIS, C.; SAMOJLIK, E.; RAGHUWANSHI, M. P.; KIRSCHNER, M. A. Leptin, insulin and TNF-alpha in weight loss. **Journal of Endocrinological Investigation**, 24:865-870, 2001.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C. J.; SOLE, J.; NICHOLS, A.; ROSS, J. S.; TARTAGLIA, L. A.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**. 112:1821-1830, 2003.

XU, E.; DUBOIS, M. J.; LEUNG, N.; CHARBONNEAU, A.; TURBIDE, C.; AVRAMOGLU, R. K.; DEMARTE, L.; ELCHEBLY, M.; STREICHERT, T.; LÉVY, E.; BEAUCHEMIN, N.; MARETTE, A. Targeted disruption of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 promotes diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. **Endocrinology**, 150:3503-3512, 2009.

XU, D.; XU, M.; JEONG, S.; QIAN, Y.; WU, H.; XIA, Q.; KONG, X. The Role of Nrf2 in Liver Disease: Novel Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. **Frontiers in Pharmacology**, 9:1428, 2019.

XUE, M.; RABBANI, N.; MOMIJI, H.; IMBASI, P.; ANWAR, M. M.; KITTERINGHAM, N.; PARK, B. K.; SOUMA, T.; MORIGUCHI, T.; YAMAMOTO, M.; THORNALLEY, P. J. Transcriptional control of glyoxalase 1 by Nrf2 provides a stress-responsive defence against dicarbonyl glycation. **Biochemical Journal**, 443:213-22, 2012.

YALNIZ, M.; BAHÇECIOĞLU, I. H.; KUZU, N.; CELEBI, S.; ATASEVEN, H.; USTÜNDAĞ, B.; OZERCAN, I. H.; SAHIN, K. Amelioration of Steatohepatitis with Pentoxifylline in a Novel Nonalcoholic Steatohepatitis Model Induced by High-Fat Diet. **Digestive Diseases and Sciences**, 52: 2380-86, 2007.

YAMAGISHI S; MATSUI T. Role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in liver disease. **European Journal of Medical Research**, 20:15, 2015.

YAMAMOTO, Y.; KATO, I.; DOI, T.; YONEKURA, H.; OHASHI, S.; TAKEUCHI, M.; WATANABE, T.; YAMAGISHI, S.; SAKURAI, S.; TAKASAWA, S.; OKAMOTO, H.; YAMAMOTO, H. Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice. **The Journal of Clinical Investigation**, 108:261-268, 2001.

YANG, Z.; MAKITA, Z.; HORII, Y.; BRUNELLE, S.; CERAMI, A.; SEHAJPAL, P.; SUTHANTHIRAN, M.; VLASSARA, H. Two novel rat liver membrane proteins that bind advanced glycosylation endproducts: relationship to macrophage receptor for glucose-modified proteins. **Journal of Experimental Medicine**, 174:515-524, 1991.

YE, J. H.; CHAO, J.; CHANG, M. L.; PENG, W. H.; CHENG, H. Y.; LIAO, J. W.; PAO, L. H. Pentoxifylline ameliorates non-alcoholic fatty liver disease in hyperglycaemic and dyslipidaemic mice by upregulating fatty acid β -oxidation. **Scientific Reports**, 6:33102, 2016.

YOUNOSSI, Z. M. Non-alcoholic fatty liver disease - a global public health perspective. **Journal of Hepatology**, 2018.

YU, D.; PETERMANN, A.; KUNTER, U.; RONG, S.; SHANKLAND, S. J.; FLOEGE, J. Urinary podocyte loss is a specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria. **Journal of the American Society of Nephrology**, 16:1733-41, 2005.

YU, W.; LIU, X.; FENG, L.; YANG, H.; YU, W.; FENG, T.; WANG, S.; WANG, J.; LIU, N. Glycation of paraoxonase 1 by high glucose instigates endoplasmic reticulum stress to induce endothelial dysfunction in vivo. **Scientific Reports**, 7:45827, 2017.

ZHANG, M.; XU, Y. J.; MENGI, S. A.; ARNEJA, A. S.; DHALLA, N. S. Therapeutic potentials of pentoxifylline for treatment of cardiovascular diseases. **Experimental & Clinical Cardiology**, 9: 103-111, 2004.

ZHANG, H.; DAVIES, K. J.; FORMAN, H. J. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. **Free Radical Biology and Medicine**, 88:314-336, 2015.

ZHAO, L.; ZHONG, S.; QU, H.; XIE, Y.; CAO, Z.; LI, Q.; YANG, P.; VARGHESE, Z.; MOORHEAD, J. F.; CHEN, Y.; RUAN, X. Z. Chronic inflammation aggravates metabolic disorders of hepatic fatty acids in high-fat diet-induced obese mice. **Scientific Reports**, 5:10222, 2015.

ZHANG, G.; SUN, Q.; LIU, C. Influencing factors of thermogenic adipose tissue activity. **Frontiers in Physiology**, 7:29, 2016.

ZHOU, L. L.; CAO, W.; XIE, C.; TIAN, J.; ZHOU, Z.; ZHOU, Q.; ZHU, P.; LI, A.; LIU, Y.; MIYATA, T.; HOU, F. F.; NIE, J. The receptor of advanced glycation end products plays a central role in advanced oxidation protein products-induced podocyte apoptosis. **Kidney International**, 82:759-770, 2012.

ZHU, Q.; SCHERER, P. E. Immunologic and endocrine functions of adipose tissue: implications for kidney disease. **Nature Reviews Nephrology**, 14:105, 2018.

ZHUANG, A.; FORBES, J. M. Diabetic kidney disease: a role for advanced glycation end-product receptor 1 (AGE-R1)? **Glycoconjugate Journal**, 33:645-652, 2016.

ZHUANG, A. Novel role of AGE-R1/OST48 in the metabolome and proteome promoting ER stress in the kidney and liver. 2018. Tese de Doutorado, School of Medicine, The University of Queensland, 2016.

ZHUANG, A.; YAP, F. Y. T.; MCCARTHY, D.; PENFOLD, S. A.; SOURRIS, K. C.; COUGHLAN, M. T.; SCHULZ, B. L.; FORBES, J. M. The AGE receptor, OST48 drives podocyte foot process effacement and basement membrane expansion in experimental diabetic kidney disease via promotion of endoplasmic reticulum stress. **bioRxiv**, p. 710186, 2019.

ZILIN, S.; NAIFENG, L.; BICHENG, L.; JIPING, W. The determination of AGE-peptides by flow injection assay, a practical marker of diabetic nephropathy. **Clinica Chimica Acta**, 313:69-75, 2001.

9. ANEXO

ANEXO 1: Parecer nº 45/2016 – Comissão de Ética no Uso de Animais.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de biomarcadores do estresse oxidativo e glicativo, status inflamatório e metabolismo energético de camundongos em modelo de obesidade e resistência à insulina tratados com pentoxifilina", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 45/2016, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Amanda Martins Baviera - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado ad-referendum pelo Coordenador da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em 13 de janeiro de 2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	março de 2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo <i>swiss albinus</i>
Nº de animais	84
Peso/Idade	20g - 3 a 4 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 13 de janeiro de 2017.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA