



**‘UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



André Luiz Ferreira de Freitas

**TERAPIA COMBINADA ENTRE METFORMINA E PENTOXIFILINA E AS
ALTERAÇÕES EM MARCADORES DO ESTRESSE GLICO-OXIDATIVO NO
DIABETES MELLITUS**

Araraquara
2024



**‘UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara



Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

André Luiz Ferreira de Freitas

**TERAPIA COMBINADA ENTRE METFORMINA E PENTOXIFILINA E AS
ALTERAÇÕES EM MARCADORES DO ESTRESSE GLICO-OXIDATIVO NO
DIABETES MELLITUS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Araraquara
2024

F866t

Freitas, André Luiz Ferreira de.

Terapia combinada entre metformina e pentoxifilina e as alterações em marcadores do estresse glico-oxidativo no diabetes mellitus / André Luiz Ferreira de Freitas. – Araraquara, 2024.
164 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – 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.

Orientadora: Amanda Martins Baviera.

1. Estresse oxidativo. 2. Antioxidante. 3. Antiglicação. 4. Inibidores de fosfodiesterase. I. Baviera, Amanda Martins, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6

Esta ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Terapia combinada entre metformina e pentoxifilina e as alterações em marcadores do estresse glico-oxidativo no diabetes mellitus

AUTOR: ANDRÉ LUIZ FERREIRA DE FREITAS

ORIENTADORA: AMANDA MARTINS BAVIERA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. AMANDA MARTINS BAVIERA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. SILVIA DE PAULA GOMES (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP)

Profa. Dra. VALÉRIA DORNELLES GINDRI SINHORIN (Participação Virtual)
Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais / Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT)

Araraquara, 08 de agosto de 2024

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos os envolvidos na realização desta dissertação. Inicialmente gostaria de agradecer os meus familiares e amigos pelo apoio incondicional, paciência e compreensão durante os momentos de dedicação intensa ao estudo e pesquisa. Seu apoio foi fundamental para que eu pudesse realizar o Curso de Mestrado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas- UNESP e concluir esta dissertação com sucesso.

Também gostaria de agradecer a minha orientadora Profa. Dra. Amanda Martins Baviera, que dedicou seu tempo e conhecimento para me orientar ao longo deste processo. Sua orientação foi fundamental para o sucesso deste trabalho.

Agradeço igualmente aos meus colegas do laboratório de Bioquímica e Enzimologia: Amanda, Camila, Felipe, Ingrid, Paulo, Renata, Sergio e Tainá, assim como o Prof Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, meus sinceros agradecimentos pelo auxílio e incentivo durante todo decorrer da minha pesquisa, oferecendo sugestões valiosas e contribuições significativas para o desenvolvimento do trabalho.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Por fim, agradeço a todas as instituições e pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Sem o apoio e colaboração de todos vocês, esta dissertação não teria sido possível. Muito obrigado a todos!

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

RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica resultante da deficiência na produção/secreção de insulina pelo pâncreas e/ou diminuição das ações da insulina nos tecidos. A principal característica do DM é a hiperglicemia crônica, que está relacionada às complicações a longo prazo da doença. A metformina é o principal medicamento utilizado no tratamento do DM tipo 2. A pentoxifilina, um inibidor não seletivo da fosfodiesterase, tem demonstrado benefícios no tratamento de distúrbios metabólicos e é uma opção em estratégias de terapia combinada para prevenção de complicações diabéticas. Neste estudo, os efeitos da combinação de metformina e pentoxifilina foram avaliados em ratos com DM induzido por estreptozotocina, a fim de melhorar o controle glicêmico e reduzir os impactos do estresse glico-oxidativo. Ratos Wistar machos foram distribuídos nos seguintes grupos: normal (N); diabético (D); diabético tratado com 4U/dia de insulina (DI4U); tratado com 250 mg/kg/dia de metformina (DMET); tratados com 100 mg/kg/dia de pentoxifilina (DP100); tratados com 250 mg/kg/dia de metformina + 25, 50 ou 100 mg/kg/dia de pentoxifilina (DMP25, DMP50, DMP100). Os tratamentos foram realizados por 42 dias. A glicemia dos ratos D aumentou progressivamente durante o experimento. Os tratamentos com metformina + pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg foram eficazes na redução da glicemia dos ratos diabéticos, entretanto, essa melhora não se refletiu em menores níveis de HbA1c. Nos ratos diabéticos, houve aumento nas concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicerídeos, alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), juntamente com redução nas concentrações de creatinina e ácido úrico, que foi revertida apenas pelo tratamento com insulina 4U. Os níveis de AGEs (marcadores de glicação avançada) foram elevados no plasma, fígado e rim de ratos D, com os níveis de AGE sendo diminuídos nos grupos DMP25, DMP50 e DMP100 (plasma e fígado) e DMP100 (rim). Os níveis de TBARS (marcadores de peroxidação lipídica) foram elevados no plasma e rim de ratos D, com todos os tratamentos sendo eficazes em reduzi-los nos rins de ratos diabéticos. Ratos diabéticos DMP50 e DMP100 mostraram aumentos significativos na atividade da enzima PON-1. As atividades das enzimas SOD e CAT foram diminuídas no fígado e rim de animais diabéticos não tratados; a atividade de GSH-Px foi aumentada nesses dois tecidos, o que parece ser um efeito compensatório ao estresse oxidativo. No fígado, nenhum tratamento foi capaz de recuperar as atividades de SOD e CAT. No rim, todos os tratamentos aumentaram a atividade de SOD, e a atividade de CAT foi aumentada nos grupos DMET, DP100 e DMP100. Curiosamente, para GSH-Px, sua atividade foi bastante estimulada no fígado e rim de ratos DMP50 e DMP100. Os resultados obtidos indicam que a terapia combinada entre metformina e pentoxifilina, embora não reverta os danos ao perfil lipídico e marcadores de integridade hepática e função renal, tem potenciais benefícios no combate ao estresse glico-oxidativo, pois reduz os níveis de glicemia e AGE em ratos diabéticos, além de preservar as atividades das enzimas PON-1, SOD e CAT (rim), e também estimula a atividade de GSH-Px.

Palavras-chave: estresse oxidativo; antioxidante; antiglicação; inibidores de fosfodiesterase.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disease resulting from a deficiency in the production/secretion of insulin by the pancreas and/or a decrease in the actions of insulin in the tissues. The main characteristic of DM is chronic hyperglycemia, which is related to the long-term complications of the disease. Metformin is the main drug used in the treatment of type 2 DM. Pentoxifylline, a non-selective phosphodiesterase inhibitor, has shown benefits in the treatment of metabolic disorders and is an option in combination therapy strategies to prevent diabetic complications. In this study, the effects of the combination of metformin and pentoxifylline were evaluated in rats with DM induced by streptozotocin, in order to improve glycemic control and reduce the impacts of glyco-oxidative stress. Male Wistar rats were distributed into the following groups: normal (N); diabetic (D); diabetic treated with 4U/day of insulin (DI4U); treated with 250 mg/kg/day of metformin (DMET); treated with 100 mg/kg/day of pentoxifylline (DP100); treated with 250 mg/kg/day of metformin + 25, 50 or 100 mg/kg/day of pentoxifylline (DMP25, DMP50, DMP100). The treatments were carried out for 42 days. The glycemia of the D rats increased progressively during the experiment. The treatments with metformin + pentoxifylline at doses of 25, 50 and 100 mg/kg were effective in reducing the glycemia of diabetic rats, however, this improvement was not reflected in lower HbA1c levels. In diabetic rats, there was an increase in plasma concentrations of total cholesterol, triglycerides, alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), together with a reduction in creatinine and uric acid concentrations, which was reversed only by treatment with 4U insulin. The levels of AGEs (markers of advanced glycation) were elevated in the plasma, liver and kidney of D rats, with AGE levels being decreased in the DMP25, DMP50 and DMP100 (plasma and liver) and DMP100 (kidney) groups. The levels of TBARS (markers of lipid peroxidation) were elevated in the plasma and kidney of D rats, with all treatments being effective in reducing them in the kidneys of diabetic rats. DMP50 and DMP100 diabetic rats showed significant increases in PON-1 enzyme activity. The activities of SOD and CAT enzymes were decreased in the liver and kidney of untreated diabetic animals; GSH-Px activity was increased in these two tissues, which appears to be a compensatory effect to oxidative stress. In the liver, no treatment was able to recover SOD and CAT activities. In the kidney, all treatments increased SOD activity, and CAT activity was increased in the DMET, DP100 and DMP100 groups. Interestingly, for GSH-Px, its activity was greatly stimulated in the liver and kidney of DMP50 and DMP100 rats. The results obtained indicate that the combined therapy between metformin and pentoxifylline, even though it does not reverse the damage to the lipid profile and markers of liver integrity and renal function, has potential benefits in combating glyco-oxidative stress, since it reduces blood glucose and AGE levels in diabetic rats, as well as preserving the activities of the enzymes PON-1, SOD and CAT (kidney), and also stimulating GSH-Px activity.

Keywords: oxidative stress; antioxidant; antiglycation; phosphodiesterase inhibitors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Relação entre hiperglicemia, desenvolvimento de estresse oxidativo e complicações cardiovasculares.....	25
Figura 02: Etapas do processo de glicação proteica.....	28
Figura 03: Processo de peroxidação lipídica.....	32
Figura 04: Sistema celular de defesa antioxidante.....	35
Figura 05: Estrutura da metformina.....	37
Figura 06: Estrutura da pentoxifilina.....	45
Figura 07: Área sob a curva (AUC) do peso corporal de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, ao longo de 42 dias de experimento.....	63
Figura 08: Níveis plasmáticos de glicose de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.....	65
Figura 09: Área sob a curva (AUC) da glicemia de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, ao longo de 42 dias de experimento.....	68
Figura 10 Níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.....	69
Figura 11: Níveis de frutossamina de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.	70
Figura 12: Níveis plasmáticos de triglicerídeos, colesterol total e colesterol-HDL de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.....	71
Figura 13: Níveis plasmáticos de albumina, fosfatase alcalina (ALP) e alanina aminotransferase (ALT) de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.....	73

Figura 14: Níveis plasmáticos de ácido úrico, ureia e creatinina de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.....	74
Figura 15: Níveis de AGEs fluorescentes e de TBARS em plasma de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.....	75
Figura 16: Atividade da enzima PON 1 em plasma de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.....	77
Figura 17: Níveis de AGEs fluorescentes e de TBARS em fígado de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.....	78
Figura 18: Níveis de AGEs fluorescentes e de TBARS em rins de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.....	79
Figura 19: Atividade das enzimas antioxidantes em fígado de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.....	80
Figura 20: Atividade das enzimas antioxidantes em rim de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso corporal de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia.....61

Tabela 2: Massas dos órgãos (fígado e rins) de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia.....64

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
°C	Grau Celsius
α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa
μg	Micrograma
μmol	Micromol
3-DG	3-desoxiglucosona
4-HNE	4-Hidroxinonenal
AC	Adenilil ciclase
ACC	Acetil-CoA carboxilase
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
AGPIs	ácidos graxos poli-insaturados
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
ALX	Aloxana
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinase dependente de AMP
AP-1	Proteína ativadora-1
APOE	Apolipoproteína E
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
BSA	Albumina sérica bovina
Ca ²⁺	Íon cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CICs	Canais iônicos responsivos ao AMP cíclico
cm	Centímetro
CNB	Domínios de ligação a nucleotídeos cíclicos
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CT	Colesterol total
D	Grupo diabético
DAG	Diacilglicerol
DAMPs	Moléculas de padrão molecular associadas a danos
DI4U	Grupo diabético tratado com 4 unidades de insulina
dL	Decilitro
DM	Diabetes Mellitus
DMET	Grupo diabético, tratado com 250 mg/kg/dia de metformina
DMP100	Grupo diabético tratado com 250 mg/kg/dia de metformina + 100 mg/kg/dia de pentoxifilina
DMP25	Grupo diabético tratado com 250 mg/kg/dia de metformina + 25 mg/kg/dia de pentoxifilina

DMP50	Grupo diabético tratado com 250 mg/kg/dia de metformina + 50 mg/kg/dia de pentoxifilina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
eNOS	Isoformas das sintases do óxido nítrico
EPACs	Proteína de troca ativada por AMP cíclico
EPM	Erro padrão da média
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina 1
FDA	Food and Drug Administration
Fe ²⁺	Íon férrico
FOXO1	Forkhead box protein O1
g	Grama
g	Unidade de medida de gravidade
G6Pase	Glicose-6-fosfatase
GAD	Glicolaldeído
GGCs	Gama-glutamilcisteína sintase
GLO	Glioxalase
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon-1
GLUT 4	Transportador de glicose do tipo 4
GMPc	Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
GO	Glioxal
GSH	Glutathiona reduzida
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
GSH-Rd	Glutathiona redutase
GSSG	Glutathiona oxidada
GST	Glutathiona-S-transferase
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HbA1c	Hemoglobina glicada
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMGB1	Proteína box-1 de grupo de alta mobilidade
HMG-CoA	3-hidróxi-3-metil-glutaril-CoA
HOMA	Modelo de avaliação da homeostase
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICAM	Molécula de adesão celular intercelular
IL	Interleucina
K ⁺	Íon potássio
Kg	Quilograma
L	Litro
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LHS	Lipase hormônio sensível

LpL	Lipase lipoproteica
LPO	Lipoperoxidação
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molaridade
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
MEPP	Via de produção de energia mitocondrial
Mfn2	Mitofusina 2
Mg	Miligrama
MGO	Metilglioxal
Mn-SOD	Superóxido dismutase de manganês
MPO	Mieloperoxidase
N	Grupo Normal, não-diabético
Na ⁺	Íon sódio
NAC	Núcleo de Atendimento à Comunidade
NaCl	Cloreto de sódio
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NAFLD	Doença hepática gordurosa não alcoólica
NaOH	Hidróxido de sódio
NBT	Nitro blue tetrazolium
ND	Nefropatia diabética
NF-κB	Fator nuclear kappa B
Nm	Nanometro
NO	Óxido nítrico
Nox	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase neutrofílica
NRF-2	Fator nuclear derivado de eritróide 2
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
OONO ⁻	Peroxinitrito
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio 1
PAMPs	Moléculas de padrão molecular associadas a patógenos
PGC-1α	Receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissoma e o coativador gama 1-alfa
PDEs	Fosfodiesterases
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLA ₂	Fosfolipase A2
PON-1	Paraoxonase 1
PON-2	Paraoxonase 2
POPDCs	Proteínas que possuem o domínio Popeye
RAGE	Receptor for AGEs
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RNA	Ácido ribonucleico
ROH	Álcool de lipídeos
ROOH	Hidroperóxidos orgânicos

Rpon1	Paraoxonase 1 humana recombinante
SAC	Adenilil ciclase solúvel
SHP-1	Proteína tirosina fosfatase
SOD	Superóxido dismutase
STZ	Estreptozotocina
TAP	Tempo de ativação de protrombina
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF- β	Fator transformador de crescimento beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TZP	Triazepinona
U	Unidade
UA	Unidade arbitrária
uPA	Plasminogênio da uroquinase de macrófagos
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	21
2.1 Diabetes Mellitus.....	21
2.2 Estresse glico-oxidativo no DM.....	24
2.3 Sistema celular de defesa antioxidante.....	32
2.4 Metformina.....	36
2.5 Nucleotídeos cíclicos.....	39
2.6 Inibidores de fosfodiesterase (PDEs).....	43
3. OBJETIVOS	49
3.1. Objetivo geral	49
3.2. Objetivos específicos.....	49
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1. Animais e desenho experimental.....	50
4.2. Determinações analíticas.....	53
4.2.1. Biomarcadores do metabolismo de carboidratos, lipídeos e função hepática e renal.....	53
4.2.2. Biomarcadores de lesão glico-oxidativa.....	56
4.2.3. Componentes relacionados aos sistemas antioxidantes.....	57
4.3. Análise estatística.....	59
5. RESULTADOS.....	60
5.1 Parâmetros fisiológicos, glicemia e níveis de HbA1c.....	60
5.2 Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo.....	75
5.2.1 Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo no plasma.....	75
5.2.2 Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo no fígado.....	78
5.2.3 Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo no rim.....	79
5.3 Biomarcadores dos sistemas antioxidantes.....	80
5.3.1 Biomarcadores dos sistemas antioxidantes no fígado.....	80
5.3.2 Biomarcadores dos sistemas antioxidantes no rim.....	83
6. DISCUSSÃO.....	85
7. CONCLUSÕES.....	116
8. REFERÊNCIAS.....	117

ANEXO A: Alterações relativas (% de D) em biomarcadores plasmáticos, hepáticos e renais de metabolismo de carboidratos e lipídios, danos oxidativos e defesas antioxidantes em ratos diabéticos STZ após 42 dias de tratamento com metformina e pentoxifilina individualmente ou combinados.....161

ANEXO B: Alterações relativas (% de D) em biomarcadores plasmáticos, hepáticos e renais de metabolismo de carboidratos e lipídios, danos oxidativos e defesas antioxidantes em ratos diabéticos STZ após 42 dias de tratamento com metformina e pentoxifilina individualmente ou combinados, com ênfase nos efeitos quando os fármacos estão em combinados.....163

ANEXO C: CEUA/FCF/CAr nº 20/2022.....164

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica caracterizada por prejuízos na secreção de insulina pelas células β do pâncreas e/ou nas ações do hormônio nos tecidos-alvo. A hiperglicemia crônica participa do estabelecimento e manutenção das complicações do DM, principalmente via promoção de estresse glico-oxidativo. O estresse glico-oxidativo surge em decorrência da exacerbação na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), os quais contribuem para a patogênese das complicações microe macrovasculares do DM (Volpe *et al.*, 2018; Chilelli; Burlina; Lapolla, 2013; Rochettei *et al.*, 2014).

A produção de AGEs ocorre principalmente em decorrência do processo de glicação de proteínas, onde nas fases iniciais são gerados compostos dicarbonílicos, os quais são altamente reativos. A propagação das reações que envolvem os compostos dicarbonílicos e as biomoléculas, especialmente proteínas, levam à formação de diversos AGEs (Bierhaus *et al.*, 1998; Nowotny *et al.*, 2015). Já o principal local de produção de EROs são as mitocôndrias. O aumento na oxidação da glicose em células onde a sua captação ocorre de maneira independente de insulina (células hepáticas, renais e endoteliais, células β pancreáticas, células da retina), bem como o aumento na oxidação de ácidos graxos, ambos são cruciais para o aumento na produção de EROs nas mitocôndrias, contribuindo para o surgimento do estresse oxidativo no DM (Giacco; Brownlee, 2010).

A metformina (dimetilbiguanida) foi sintetizada pela primeira vez em 1922, e em 1950 o cientista francês Jean Sterne publicou um estudo sobre as ações da metformina e também nomeou o composto como “Glucophage”, que significa “comedor de glicose”. A partir desse momento, a metformina passou a ser prescrita para o tratamento do DM (Pryor; Cabreiro, 2015). A metformina exerce os seus efeitos principalmente no fígado, diminuindo a velocidade da gliconeogênese e, assim, contribui para a redução da glicemia, especialmente no jejum. Outro local de ação da metformina é o trato gastrointestinal, onde atua diminuindo a absorção de glicose e aumentando a secreção de GLP-1, o que leva a uma melhora da glicemia pós-prandial. A metformina também age nos músculos, através da

melhora na sensibilidade à insulina e pelo aumento na velocidade de captação de glicose. Por fim, também possui efeitos nos tecidos adiposos, onde reduz a inflamação, e assim melhora a sensibilidade à insulina (Rena; Hardie; Pearson, 2017; Valencia *et al.*, 2017; Thomas, I.; Gregg, 2017).

Variações nas respostas individuais à terapia antihiperglicêmica são frequentes nos indivíduos que utilizam metformina (Zhou *et al.*, 2016). Além disso, aproximadamente 20% dos pacientes em uso contínuo da metformina manifestam distúrbios gastrointestinais, tais como diarreia, dispepsia, náuseas e vômitos, sendo a intensidade desses efeitos proporcional à dose administrada do fármaco. Ao uso crônico da metformina também se encontra associado ao surgimento de episódios de acidose láctica, especialmente em indivíduos com doença renal crônica. Tais efeitos adversos encontram-se entre as principais causas de descontinuidade do uso da metformina (Flory *et al.*, 2019). Portanto, estratégias terapêuticas que melhorem a tolerância à metformina, sem afetar sua resposta antihiperglicêmica, são muito interessantes para a diminuição dos efeitos adversos do fármaco.

Porém, para a adoção de uma estratégia de terapia combinada com a metformina, devem ser considerados alguns aspectos, que incluem a eficácia no controle do DM e suas complicações, custos associados ao agente antidiabético selecionado para a combinação, dentre outros fatores. A literatura reporta que o elevado custo dos novos fármacos antidiabéticos continua sendo uma barreira significativa para seus usos em muitas regiões do mundo, consequentemente inviabilizando a adoção das terapias combinadas desses fármacos com a metformina, tendo em vista o caráter crônico da doença (Cahn; Cefalu, 2016). Por esse motivo, parece interessante o estudo de novas terapias combinadas com a metformina, levando em consideração a existência de uma ampla gama de compostos bioativos que sejam eficazes no controle das disfunções metabólicas observadas no DM, bem como o custo-benefício da adoção dessa terapia em longo prazo. Nesse sentido, alguns bioativos que atuam como inibidores de fosfodiesterases (PDEs) de nucleotídeos cíclicos emergem como opções interessantes para as estratégias terapêuticas de terapias combinadas com a metformina, com o intuito de atuarem em vias sinalizadoras desreguladas das disfunções metabólicas, como o DM.

As enzimas PDEs de nucleotídeos cíclicos são membros de uma superfamília altamente conservada de fosfohidrolases que seletivamente catalisam a hidrólise de ligações de fosfato dos nucleotídeos cíclicos adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) e guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc), que por sua vez gera como produtos os respectivos nucleotídeos não cíclicos 5'-AMP e 5'-GMP (Azevedo *et al.*, 2014). Ambos AMPc e GMPc são considerados nucleotídeos reguladores, pois participam da condução de mudanças intracelulares adaptativas mediante diversos sinais químicos externos ("primeiros mensageiros"), os quais se ligam a receptores específicos que disparam a transdução do sinal intracelular que leva à produção dos "segundos mensageiros", AMPc ou GMPc (Bender; Beavo, 2006). Proteínas intracelulares ativadas por AMPc ou GMPc participam do controle em curto (especialmente via fosforilação) e longo prazo (modulação da expressão gênica) de uma infinidade de processos metabólicos. Por este motivo, ter como estratégia farmacológica a inibição dessas enzimas que eliminariam AMPc e/ou GMPc tem sido sugerida como uma opção interessante para a ativação de processos sinalizatórios dependentes destes "segundos mensageiros", deste modo permitindo o controle de processos metabólicos alterados em situações de disfunções metabólicas, incluindo o DM (Lugnier *et al.*, 2020). Diversas pesquisas clínicas e programas dedicados ao desenvolvimento de fármacos têm como foco a inibição catalítica de PDEs, para os mais diversos fins terapêuticos, o que inclui as desordens metabólicas (Baillie; Tejeda; Kelly, 2019).

A pentoxifilina é um derivado de metilxantina que atua como um inibidor não-seletivo de PDEs (Rall, 1990; Windmeier; Gressner, 1997). Possui ações hemorreológicas (Samlaska; Winfield, 1994), sendo utilizada no tratamento de claudicação intermitente e outros distúrbios vasculares (Samlaska; Winfield, 1994; Bevan; Waller; Ramsay, 1992). A pentoxifilina age nas propriedades reológicas do sangue, ao diminuir diminuindo a viscosidade do plasma e do sangue total, especialmente via redução nos níveis de fibrinogênio plasmático. Também aumenta a distendibilidade dos eritrócitos e diminui a agregação eritrocitária e plaquetária, assim levando a uma melhora da microcirculação de vários órgãos. Também suprime a ativação de neutrófilos, o que leva a uma melhora na eficiência com a qual os neutrófilos podem fluir pelos vasos sanguíneos (Gillings, 1995; Mccarty; O'Keefe; Dinicolantonio, 2016). Consequentemente, a pentoxifilina

melhora a perfusão tecidual, aumentando o fluxo sanguíneo, podendo aliviar os sinais e sintomas da dor isquêmica.

Tem sido reportado que o tratamento de ratos com esteatose hepática não alcoólica com inibidores de PDEs, administrados individualmente ou em combinação com a metformina, é capaz de promover diversos benefícios, incluindo redução do ganho de peso corporal, atenuação da resistência à insulina, diminuição dos níveis de colesterol total e triglicerídeos, redução dos níveis de marcadores de injúria e disfunção hepáticas, redução da esteatose hepática, fibrose e inflamação lobular, entre outros efeitos benéficos, com destaque para os efeitos benéficos da pentoxifilina (El-Deen *et al.*, 2020; Heeba *et al.*, 2020). Em trabalho Ćulafić *et al.* (2020) demonstraram que a terapia combinada de metformina com pentoxifilina promoveu uma aparente melhora em parâmetros bioquímicos de pacientes com esteatohepatite não alcoólica, juntamente com redução da resistência à insulina, atividades de enzimas hepáticas e ácido úrico. Adicionalmente aos efeitos citados acima, outra ação que os fármacos apresentam é um efeito antioxidante, este efeito sendo descrito para ambos os fármacos por meio da ativação da AMPK que por sua vez age regulando positivamente o fator nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf-2), fator responsável pela transcrição das enzimas antioxidantes (Hee *et al.*, 2014; Abbaszadeh *et al.*, 2018; Wang *et al.* 2020; Chhunchha; Kubo; Singh, 2022; Zamanian *et al.*, 2023).

Tendo em vista os potenciais benefícios da terapia combinada entre metformina e pentoxifilina e as ações antioxidante e anti-inflamatória desses fármacos, o presente trabalho pretende investigar os efeitos da terapia combinada entre metformina e pentoxifilina em parâmetros fisiometabólicos e de estresse glico- oxidativo em sistema-modelo *in vivo* de DM.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Diabetes Mellitus

No ano de 2021, estimou-se que, em todo o mundo, 537 milhões de adultos com idade entre 20 e 79 anos tinham DM (tipos 1 e tipo 2, diagnosticados ou não), o que equivale a 10% de todos os adultos nesta faixa etária. No Brasil, o número de pessoas com DM em 2021 foi estimado em 15,7 milhões, deste modo o país ocupa a 6ª posição dentre os países com os maiores números de casos da doença (International Diabetes Federation, 2021).

O DM tipo 1 inclui todos os casos de drástica insuficiência na produção e secreção de insulina (deficiência absoluta de insulina) atribuíveis a processos de autoimunidade que culminam em destruição das células β pancreáticas (DM tipo 1A), bem como os casos de destruição destas células por etiologia desconhecida, sem evidência de autoimunidade (DM tipo 1B ou idiopático). Consequentemente, é uma condição complexa em relação ao manejo da glicemia e prevenção das complicações agudas e crônicas decorrentes da hiperglicemia. Injeções de insulina são necessárias para a promoção de melhor qualidade de vida, e bons resultados só podem ser alcançados com múltiplas injeções diárias ou com o uso de uma bomba de insulina. A terapia com insulina requer automonitoramento da glicemia, bem como uma abrangente educação sobre DM e o apoio de profissionais de saúde qualificados (ADA, 2014; Brasil, 2013b; International Diabetes Federation, 2021).

Segundo a 10ª edição do Atlas da IDF (Federação Internacional de Diabetes), os números de novos casos de DM tipo 1 estão aumentando a cada ano, devido à crescente incidência da doença em muitos países e em decorrência do envelhecimento da população devido à redução nas taxas de mortalidade. Adicionalmente, um relatório do Atlas da IDF de 2022 foi realizado através de uma nova abordagem metodológica, onde foram combinados dados sobre a incidência e a mortalidade de DM tipo 1 entre aqueles com DM tipo 1 e aqueles sem a doença para estimar a prevalência, incidência e expectativa de vida para aqueles com DM tipo 1 em todos os países; também nessa nova metodologia foram consideradas as estimativas de aumentos na incidência ao longo do tempo para países que não têm dados de incidência recentes. Nessa nova abordagem, foram apresentados valores

ainda maiores do que aqueles estimados no ano anterior: a doença demonstrou um crescimento entre todas as faixas etárias, havendo, no ano de 2022, 8,75 milhões de indivíduos em todo o mundo com DM tipo 1, onde 1,9 milhões destes indivíduos vivem em países de rendimentos baixo e médio-baixo. Da população global com DM tipo 1 em 2022, 1,52 milhões (17%) tinham menos de 20 anos, 5,56 milhões (64%) tinham entre 20 e 59 anos e 1,67 milhões (20%) tinham 60 anos ou mais. (International Diabetes Federation, 2021; International Diabetes Federation, 2022). Ainda nesse relatório foi estimado um número de 182.000 mortes devido ao DM tipo 1, sendo aproximadamente 35.000 dessas representados por indivíduos não diagnosticados com menos de 25 anos de idade, que podem vir a óbito dentro de 12 meses após o início dos sintomas, sendo mais frequentes em países com menos recursos (International Diabetes Federation, 2022).

Com relação aos novos casos de DM tipo 1, foram estimados 530.000 de casos diagnosticados em todas as idades, destes 201.000 casos identificados em indivíduos com menos de 20 anos de idade, e 329.000 de novos casos ocorreram em pessoas com 20 anos ou mais. No ano de 2022, a idade média de uma pessoa com DM tipo 1 foi de 40 anos, indicando assim os impactos positivos dos avanços nas tecnologias de diagnóstico e tratamento da doença. O Brasil se encontra entre os 10 países com os maiores números de casos; o país apresenta um total de 588.800 casos, destes 112.240 casos em menores de 20 anos, 402.894 entre 20-59 anos e 73.330 casos em maiores de 60 anos (International Diabetes Federation, 2022).

O DM tipo 2 é a forma mais comum de diabetes (praticamente 90% dos casos da doença), e tem sido citado como um dos principais problemas de saúde no mundo, uma vez que sua prevalência tem aumentado dramaticamente ao longo dos anos. O DM tipo 2 é caracterizado pela combinação entre resistência à insulina e disfunção pancreática (inadequada resposta de secreção compensatória de insulina), esta última culminando em deficiência relativa de insulina; ambas as manifestações estão presentes no momento em que o DM tipo 2 se manifesta clinicamente (DeFronzo *et al.*, 2015).

A cada dia crescem os números relacionados ao DM tipo 2 em jovens; as estimativas sobre a prevalência da doença foram as mais altas em jovens do Brasil e México, bem como nas populações indígenas nos EUA e Canadá, e entre as populações negras nas Américas (entre 160-3.300 indivíduos a cada 100.000

habitantes). As razões para esses aumentos na incidência do DM tipo 2 são multifatoriais, o que inclui o aumento da obesidade infantil, adoção de comportamento sedentário e ingestão excessiva de calorias, obesidade materna, diabetes gestacional, predisposição genética, disparidades de status socioeconômico e dificuldade de acesso aos cuidados em saúde (International Diabetes Federation, 2021).

Mesmo com os cuidados no controle da glicemia, visando prevenir ou minimizar os impactos das complicações do DM, é importante salientar que, devido ao caráter crônico da doença, episódios de hiperglicemia podem promover alterações em longo prazo nas células, fenômeno este conhecido como “memória metabólica” (Berezin, 2016).

A “memória metabólica” é o conceito dado ao conjunto de consequências deletérias relacionadas ao inexistente ou insuficiente controle metabólico, ou até mesmo aos episódios transitórios de hiperglicemia no DM, os quais têm associação com o estabelecimento das complicações da doença e da piora da capacidade de acionamento dos sistemas endógenos de defesa contra estas agressões (Berezin, 2016). É um fenômeno promovido coletivamente por diversos mecanismos, os quais incluem geração de produtos avançados da glicação, estresse oxidativo, ativação da via dos polióis, inflamação e alterações epigenéticas. Do ponto de vista clínico, a “memória metabólica” mostra a importância e a eficácia da rápida introdução de um tratamento intensivo aos indivíduos diabéticos (ou até mesmo pré-diabéticos) à luz do diagnóstico destas condições, com o objetivo de alcançar a rápida normalização do controle metabólico, ou se aproximar o quanto puder desta, a fim de minimizar os impactos em longo prazo que contribuem para as complicações desta doença (Ceriello; Ihnat; Thorpe, 2009; Laiteerapong *et al.*, 2018).

Por outro lado, a intensificação do controle glicêmico pode levar a outro tipo de preocupação aos indivíduos diabéticos, que é a ocorrência de episódios de hipoglicemia. A hipoglicemia pode acontecer em pacientes diabéticos que fazem o uso de insulina, sulfonilureias ou meglitinidas (Gangji *et al.*, 2007). Os casos de hipoglicemia são mais comumente observados em indivíduos com DM tipo 1, mas também podem ocorrer (com menor frequência e/ou gravidade) em indivíduos com DM tipo 2. A metformina e outros medicamentos antihiperglicêmicos que atuam como inibidores da enzima dipeptidil peptidase-4, ou os agonistas do receptor do peptídeo-

1 semelhante ao glucagon, as tiazolidinedionas ou os inibidores do co- transportador de sódio-glicose-2, também podem estar associados com episódios de hipoglicemia, entretanto em menor frequência, ou seja, apresentam menor risco (Thrasher, 2017).

Nos pacientes diabéticos, a hipoglicemia grave pode afetar a capacidade de julgamento, o desempenho de atividades diárias simples, e o comportamento. Em casos mais graves, a hipoglicemia pode resultar em convulsões e perda de consciência; também em alguns episódios de hipoglicemia podem ser observados déficits neurológicos transitórios e, raramente, pode haver danos neurológicos permanentes (Nakhleh; Shehadeh, 2021).

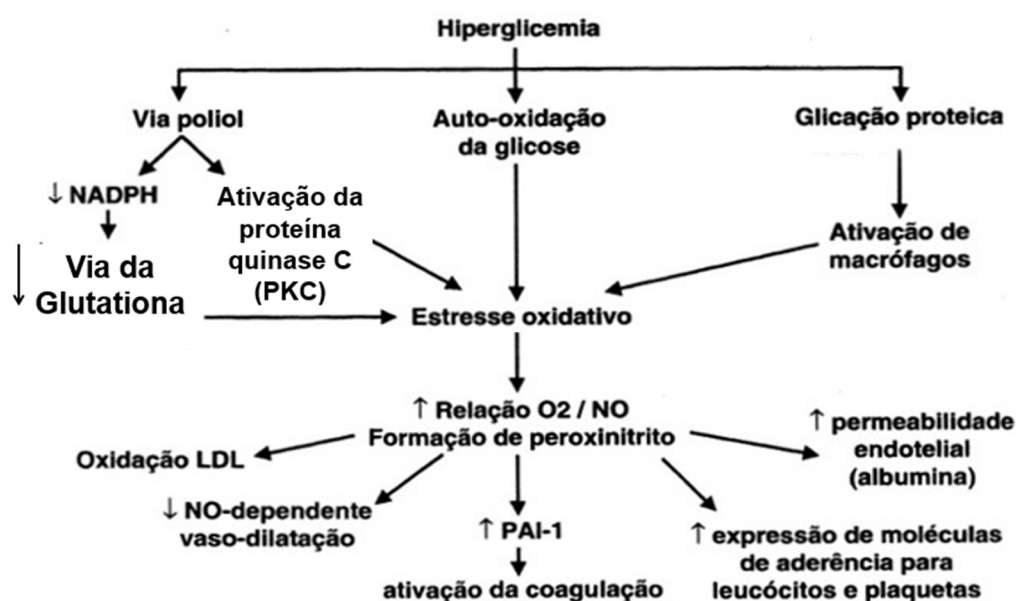
2.2 Estresse glico-oxidativo no DM

A hiperglicemia que ocorre no DM tipo 1 ou DM tipo 2 surge em decorrência da combinação entre (i) incapacidade de determinados tecidos (especialmente tecidos musculares e adiposos) em realizarem o processo de captação de glicose, devido à não translocação eficiente dos transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT 4) para a membrana plasmática, bem como (ii) aumento na produção hepática de glicose, devido ao aumento nas velocidades das vias bioquímicas glicogenólise e gliconeogênese. Como resultado, tecidos que não dependem da insulina para o processo de captação de glicose (os quais frequentemente expressam os transportadores de glicose dos tipos 1 e 2), incluindo células endoteliais, fígado, rins e mesmo as células β do pâncreas, estes passam a captar uma maior quantidade de glicose no cenário da hiperglicemia, o que resulta em elevação nas concentrações de glicose no interior dessas células (Gross *et al.*, 2002; Costa; Moreira, 2021).

O excesso de glicose captado por estas células alimentará diversas vias, entre elas: (i) auto-oxidação, processo que pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que em excesso causam estresse oxidativo; (ii) via do poliol: onde a glicose é convertida em sorbitol e posteriormente em frutose; ao longo dessa via, ocorre redução do NADPH e ativação da proteína quinase C, o que pode resultar em uma diminuição nas defesas antioxidantes (especialmente aquelas dependentes do antioxidante não enzimático glutathione reduzida (GSH), que por consequência contribui para o desenvolvimento de estresse oxidativo; (iii) glicação proteica: ocorre a ligação não enzimática entre glicose e proteínas, a mesma resulta em uma cadeia

de reações e rearranjos estruturais que culminam na formação dos produtos de glicação avançada (AGEs), os quais se acumulam no organismo ao longo do tempo e contribuem para a progressão do estresse oxidativo (Figura 01) (Wajchenberg, 2002; Lapolla *et al.*, 2004; Volpe *et al.*, 2018).

Figura 01: Relação entre hiperglicemia, desenvolvimento de estresse oxidativo e complicações cardiovasculares.



Fonte: Adaptado de Wajchenberg, 2002.

O estresse oxidativo é descrito como um estado onde ocorre o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) e/ou pela diminuição nas defesas antioxidantes. O estresse oxidativo no DM está associado ao estabelecimento das complicações crônicas microvasculares (retinopatias, neuropatias, nefropatias) e macrovasculares (doenças cardiovasculares e cerebrovasculares) (Madonna; de Caterina, 2011).

Ao estresse oxidativo estão comumente associados quadros de inflamação. Na resposta inflamatória, células do sistema imunológico são infiltradas e ativadas, resultando na produção e liberação de mediadores inflamatórios, as citocinas, no local da lesão (Gumieniczek *et al.*, 2005; Ambade; Mandrekar, 2012). Tanto a inflamação crônica quanto o estresse oxidativo estão exacerbados no diabetes mellitus. Esses

dois processos têm correlação com estados fisiológicos e patológicos, com interações que envolvem mecanismos de amplificação mútua (Emmendoerffer *et al.*, 2000; Costa; Garlid *et al.*, 2008). Citocinas inflamatórias podem indiretamente desencadear estresse oxidativo, ativando macrófagos em casos de inflamação crônica (Oguntibeju, 2019).

A inflamação crônica afeta principalmente os tecidos devido à produção contínua e excessiva de EROs, o que pode levar à depleção de moléculas e sistemas antioxidantes. As EROs também aumentam a inflamação, ativando quinases associadas ao estresse e estimulando a expressão de citocinas pró-inflamatórias através de fatores incluindo fator nuclear kappa B (NF- κ B) e proteína ativadora-1 (AP-1) (Fialkow; Wang; Downey, 2007; Hold; El-Omar, 2008).

Quando há um estado de estresse oxidativo, há um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 β e interleucina-6. Esse aumento na geração de EROs também está associado a hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos, e tem sido observado como um fator importante no desenvolvimento do DM tipo 2 (Donath *et al.*, 2013; Shin, S. *et al.*, 2020).

O estresse oxidativo é também o principal fator que induz a apoptose nas células β pancreáticas expostas a altas concentrações de ácidos graxos livres e hiperglicemia (Piro *et al.*, 2002; Marciniak *et al.*, 2004). Estudos mostram que a expressão de TNF- α é significativamente maior nos rins de ratos diabéticos (Chow *et al.*, 2005). Essa citocina é citotóxica para células renais e potencialmente causa danos significativos. Ademais, o aumento da interleucina-6 é relatado como promotor de aumentos na geração de radicais do tipo ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Codoñer-Franch *et al.*, 2011).

Acredita-se que uma das principais vias pela qual a hiperglicemia ocasiona um quadro de estresse oxidativo seja pela ativação da via que envolve diacilglicerol (DAG) – proteína quinase C (PKC) – e NADPH oxidase, gerando assim um aumento da formação de EROs e desta forma desencadeando várias vias de sinalização metabólica que levam à inflamação, secreção de citocinas, morte celular e, conseqüentemente, complicações diabéticas como retinopatia, nefropatia, neuropatia, doença cardíaca, angiogênese (Volpe *et al.*, 2018).

A hiperglicemia observada em indivíduos diabéticos é capaz de elevar os níveis do metabólito diacilglicerol (DAG), culminando na ativação da proteína quinase C

(PKC). A PKC é responsável por causar diversas complicações características do DM, principalmente cardiovasculares, renais e na retina. Deste modo, com a ativação excessiva de PKC, seus efeitos serão maiores, ocasionando aumento na expressão de fatores de crescimento, vasoconstrição e agregação plaquetária (Schalkwijk; Stehouwer, 2005, Yang, H. *et al.*, 2011). Adicionalmente, PKC é responsável por ativar outros dois mediadores que estimulam a produção de ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), incluindo NF- κ B e a enzima NADPH oxidase (Barbosa, K. *et al.*, 2010).

A PKC, como citado anteriormente, é ativada por DAG, e pode afetar a síntese e ativação de proteínas-chave, como por exemplo:

- **Proteínas de sinalização:** fosfatase 1 (SHP-1), p38 proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK);
- **Expressão de citocinas:** fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), endotelina (ET-1), fator transformador de crescimento β (TGF- β), molécula de adesão celular intercelular endotelial (ICAM), inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1);
- **Fatores do ciclo celular e fatores de transcrição funcionais:** fator nuclear kappa B (NF- κ B);
- **Enzimas:** NADPH oxidase, Na⁺-K⁺ATPase, Fosfolipase A2 (PLA2), óxido nítrico sintase endotelial (eNOS).

A PKC pode desencadear uma cascata de efeitos em diversos sistemas do corpo, podendo causar diminuição do fluxo sanguíneo, oclusão capilar, inflamação, geração de radicais livres e danos a diversas macromoléculas (Way; Katai; King, 2001; Schaan, 2003; Noh; King, 2007; Gerald *et al.*, 2009; Gerald; King, 2010; Cosentino-Gomes; Rocco-Machado; Meyer-Fernandes, 2012; Ayala, 2019; Amorim *et al.*, 2019; Mohd Nor *et al.*, 2022; Krishnamurthy *et al.*, 2024).

Concentrações de glicose similares a aquelas encontradas em condições de hiperglicemia podem estimular a produção de EROs via ativação da NADPH oxidase dependente de PKC, em cultura de células endoteliais da aorta, células musculares lisas e células mesangiais renais (Etoh *et al.*, 2003). A NADPH oxidase é a principal fonte de formação de EROs em células não fagocitárias. A expressão de componentes da NADPH oxidase é regulada positivamente em tecidos vasculares em

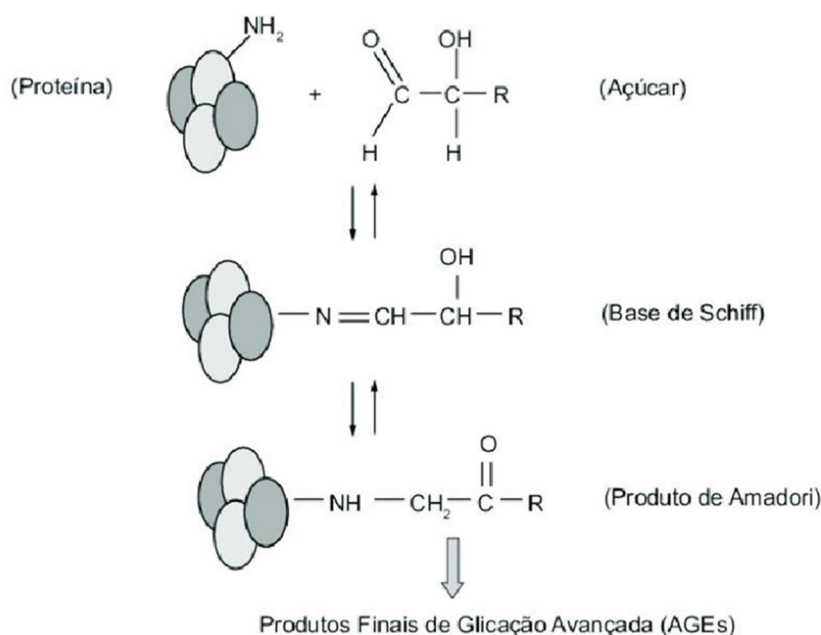
casos de DM e doença arterial coronariana (Huang *et al.*, 2002).

Por fim, as EROs causam danos a tecidos de modo a gerar gradativamente injúrias às estruturas celulares, perda de suas funções e, finalmente, levar à morte celular. O dano celular resultante do estresse oxidativo pode atingir lipídeos de membrana (Etsuo *et al.*, 2005), ácidos nucleicos (Thomas, B. *et al.*, 2011), proteínas (Ling; Söll, 2010) e açúcares (Bonnetfont-Rousselot, 2002).

Concomitantemente à formação de EROs, a hiperglicemia também pode exacerbar a geração de produtos finais de glicação avançada, ou os AGEs. Ambos EROs e os AGEs estão envolvidos na promoção de efeitos deletérios aos tecidos no contexto do DM (Singh, V. *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2022).

Os produtos finais de glicação avançada são gerados a partir de uma reação covalente e não enzimática entre carboidratos redutores, como por exemplo a glicose, com um grupo amino terminal de resíduos de lisina e arginina em proteínas, fosfolipídeos e ácidos nucleicos, levando a formação de uma base de Schiff instável. A base de Schiff pode sofrer rearranjos, formando um produto de Amadori, mais estável. Essa reação, a glicação proteica, depende principalmente dos níveis de glicose e do tempo de permanência do paciente diabético em uma condição de controle glicêmico ineficaz (Figura 02) (Monnier, V., 2003; Pinto *et al.*, 2022).

Figura 02: Etapas do processo de glicação proteica.



Fonte: Adaptado de Lapolla, *et al.*, 2004.

Os rearranjos intra e intermoleculares dos produtos de Amadori envolvem reações oxidativas que levam à geração de compostos dicarbonílicos ou oxoaldeídos, os quais são moléculas bastante reativas, e incluem glioxal, metilglioxal, glicolaldeído e 3-desoxiglucosona. Esses compostos induzem modificações rápidas e irreversíveis de proteínas. Glioxal e metilglioxal são gerados em excesso no DM não controlado, mas também em outras condições metabólicas onde o estresse dicarbonílico prevalece. Eles interagem rapidamente com macromoléculas, levando à rápida formação de AGEs extracelulares e intracelulares (Brownlee, 2001; Schalkwijk; Stehouwer, 2020).

Durante algumas das reações que culminam na formação de AGEs, também podem ser gerados EROs, exacerbando o estresse oxidativo e os danos estruturais e funcionais das macromoléculas (Jay; Hitomi; Griendling, 2006; Hidalgo; Zamora, 2005). Por exemplo, a geração de AGEs em organismos vivos pode ocorrer em células do sistema imune, como os neutrófilos, monócitos e macrófagos, os quais, após estímulo inflamatório, ativam mieloperoxidase e NADPH oxidase, exacerbando o estresse oxidativo (Huebschmann *et al.*, 2006; Barbosa, J.; Oliveira; Seara, 2008). A geração de AGEs também pode ser induzida durante inflamação aguda e crônica devido à ativação da mieloperoxidase neutrofilia, via aumento na produção de glicolaldeído, um oxoaldeído muito reativo. Além disso, a oxidação de certos aminoácidos, ácidos graxos e corpos cetônicos contribui para a geração de oxoaldeídos que podem formar os AGEs (Thornalley; Rabbani, 2009).

Fontes exógenas de oxoaldeídos e de AGEs incluem dieta e tabaco, representando fontes de AGEs que contribuem para o *pool* corporal de AGEs, embora os mecanismos exatos que regulam a absorção intestinal dos AGEs não sejam bem conhecidos (Dubois *et al.*, 2021).

Estruturalmente, os AGEs são muito heterogêneos, dificultando sua avaliação e quantificação no sangue, tecidos e células. Alguns deles induzem ligações cruzadas em proteínas e/ou emitem fluorescência, quando excitados (Genuth *et al.*, 2015).

Os AGEs podem ser reconhecidos por vários receptores, sendo o receptor RAGE o mais conhecido. O receptor RAGE é responsável por mediar os efeitos biológicos dos AGEs em diferentes tipos de células. Além dos AGEs, o receptor RAGE também interage com outros ligantes que estão associados a diversas respostas celulares, incluindo certos DAMPs (moléculas de padrão molecular associadas a

danos), grupo S100 de proteínas, HMGB1 (proteína box-1 de grupo de alta mobilidade), β amiloide e DNAs. Os RAGE também respondem como um sensor imune inato de PAMPs (moléculas de padrão molecular associadas a patógenos), incluindo lipopolissacarídeos (LPS) bacteriano, proteínas virais e parasitárias e DNA bacteriano (Kim; Jeong; Jang, 2021).

O receptor RAGE tem um papel importante no estabelecimento das complicações vasculares do diabetes. Há muitas evidências que sugerem que os AGEs e os receptores RAGE têm um papel ativo no desenvolvimento e progressão de doenças cardíacas relacionadas ao diabetes (Fishman *et al.*, 2018).

A degradação de AGEs ainda não é processo muito bem elucidado, mas parece envolver diversas enzimas que medeiam a degradação de metabólitos intermediários das reações iniciais e de propagação da glicação. Dentre essas enzimas tem-se as glioxalase (GLO) 1 e 2, que detoxificam o metilglioxal em lactato, diminuindo assim as taxas de formação dos AGEs (Thornalley, 2003; Yumnam, Subedi; Kim, 2020).

O estabelecimento de ligações cruzadas em proteínas é uma das principais características associadas aos AGEs; tais ligações induzem alterações nas estruturas das proteínas e prejudicam sua capacidade funcional, contribuindo para a perda de função das biomoléculas, e precede o desenvolvimento das complicações diabéticas (Lapolla *et al.*, 2005; Van Buren; Le Winter, 2011; Sompong *et al.*, 2013; Singh, V. *et al.*, 2014). Também há relatos da associação de AGEs com lipoproteínas, adiponectina, TNF- α , interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-18 e grupo de alta mobilidade box-1 (HMGB-1) como mediadores inflamatórios críticos das complicações diabéticas (Volpe *et al.*, 2018).

No DM, além do aumento na formação de EROs, também pode ocorrer uma redução nas atividades de algumas enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT). Essa diminuição nas atividades de enzimas antioxidantes pode ser correlacionada às alterações estruturais observadas nestas proteínas em razão de ataque por EROs ou após processo de glicação proteica (Sindhu *et al.*, 2004; Rajendran *et al.*, 2014; Arcaro *et al.*, 2014).

Dentro de um organismo vivo o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é produzido na cadeia de transporte de elétrons, ou pela via das oxidases como NADPH oxidase neutrofílica (Nox). É um radical altamente reativo, podendo reagir com diversas

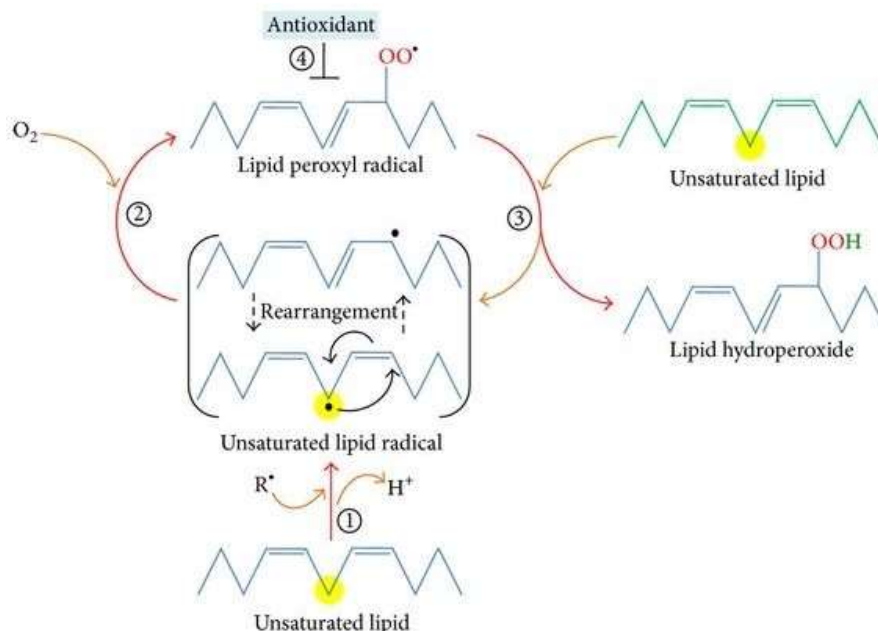
moléculas para proporcionar a formação de outras EROs diretamente, por via enzimática ou processos catalisados por metais. Através da reação de Haber-Weiss, o $O_2^{\bullet-}$ pode reagir com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e formar radical hidroxila ($HO^{\bullet}$); se faz indispensável ressaltar a importância dos íons metálicos no aumento da velocidade desta reação. Por último, a reação de Fenton pode vir a acontecer se o H_2O_2 reagir com um catalisador de ferro, como por exemplo o Fe^{2+} , formando o radical $HO^{\bullet}$ (Flora, 2009; Romão, 2016).

Juntamente com o AGEs, outras substâncias e/ou metabólitos gerados durante o estresse glico-oxidativo podem ser usados como biomarcadores desta condição, incluindo o TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*), marcadores de peroxidação lipídica. Eles são produtos originados do processo de lipoperoxidação (LPO), onde diversos lipídeos presentes no organismo podem sofrer ação das EROs, acarretando na morte celular em casos onde ocorre o acúmulo excessivo dos produtos de LPO (Ayala; Muñoz; Argüelles, 2014). Os principais lipídeos alvos da LPO são aqueles contendo uma ou mais ligações duplas carbono-carbono, especialmente ácidos graxos poli-insaturados. Dentre as etapas da LPO, há a perda de hidrogênio de um carbono, com adição de oxigênio, culminando na geração de radical peroxil lipídico e hidroperóxido (Yin; Xu; Porter, 2011).

O processo de LPO pode ser dividido em quatro etapas. Na etapa de iniciação, os pró-oxidantes retiram o hidrogênio alílico, formando o radical lipídico centrado no carbono; o radical de carbono sofre um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado (etapa 1). Na fase de propagação, o radical lipídico reage com oxigênio para formar um radical peroxil lipídico (etapa 2). Esse radical peroxil lipídico reage com outros lipídios presentes na membrana celular, retirando um hidrogênio e assim gerando um novo radical lipídico e um hidroperóxido lipídico. Esses radicais livres podem reagir com mais lipídios, aumentando ainda mais o dano celular (etapa 3). Na etapa de terminação ocorre quando as espécies radicais peroxil lipídicas geradas durante as etapas de iniciação e propagação reagem entre si ou com antioxidantes presentes nas células que doam um átomo de hidrogênio para as espécies radicais peroxil lipídicas, neutralizando sua atividade resultando na formação de produtos do tipo não radicais e interrompendo o ciclo de peroxidação lipídica (etapa 4) (Figura 03). Importante ressaltar que esses compostos podem sofrer decomposição e gerar espécies carbonílicas reativas, incluindo HNE (4- hidroxinonenal) e MDA

(malondialdeído), que reagem com proteínas, formando biomarcadores do estresse oxidativo (Baynes; Dominiczak, 2015).

Figura 03: Processo de peroxidação lipídica.



Fonte: Ayala, Muñoz; Argüelles 2014.

2.3 Sistemas celulares de defesas antioxidantes

As enzimas SOD, CAT e GSH-Px são componentes do sistema celular de defesa antioxidante, elas desempenham um papel crucial e indispensável na estratégia de defesa antioxidante, atuando como a primeira linha de defesa contra EROs, especialmente o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o qual é constantemente gerado no metabolismo oxidativo, principalmente através da via de produção de energia mitocondrial. Essas enzimas tem como função prevenir ou suprimir a formação de radicais livres e espécies reativas (Ighodaro; Akinloye, 2018).

A SOD é uma metaloenzima que necessita de um cofator metálico para sua atividade, e existem diversas formas de enzima dependendo do tipo de íon metálico que atua como cofator, incluindo ferro, zinco, cobre e manganês. Essas formas incluem Fe-SOD em procariotos e cloroplastos, Mn-SOD em procariotos e mitocôndrias, e Cu/Zn-SOD em eucariotos, encontrados principalmente no citoplasma,

mas também em cloroplastos e peroxissomos. As diferentes formas de SOD são codificadas por genes diferentes (Ighodaro; Akinloye, 2018). Cu/Zn-SOD é codificada pelo gene *sod1* no cromossomo 21, o MnSOD é codificada pelo gene *sod2* no cromossomo 6, por fim o SOD extracelular eucariótico Cu-Zn SOD é codificada pelo gene *sod3* no cromossomo 4. A enzima antioxidante SOD3 está presente em todos os tecidos humanos, sendo especialmente importante em tecidos como o coração. Esta enzima desempenha um papel crucial na proteção contra diversas doenças, tais como as doenças cardiovasculares, neurológicas, pulmonares, aterosclerose, diabetes, hipertensão, inflamações e lesões de isquemia-reperfusão (Karuppanapandian *et al.*, 2011; Gill; Narendra; 2010; Dringen, 2005; Fridovich, 1995; Rosen *et al.*, 1993).

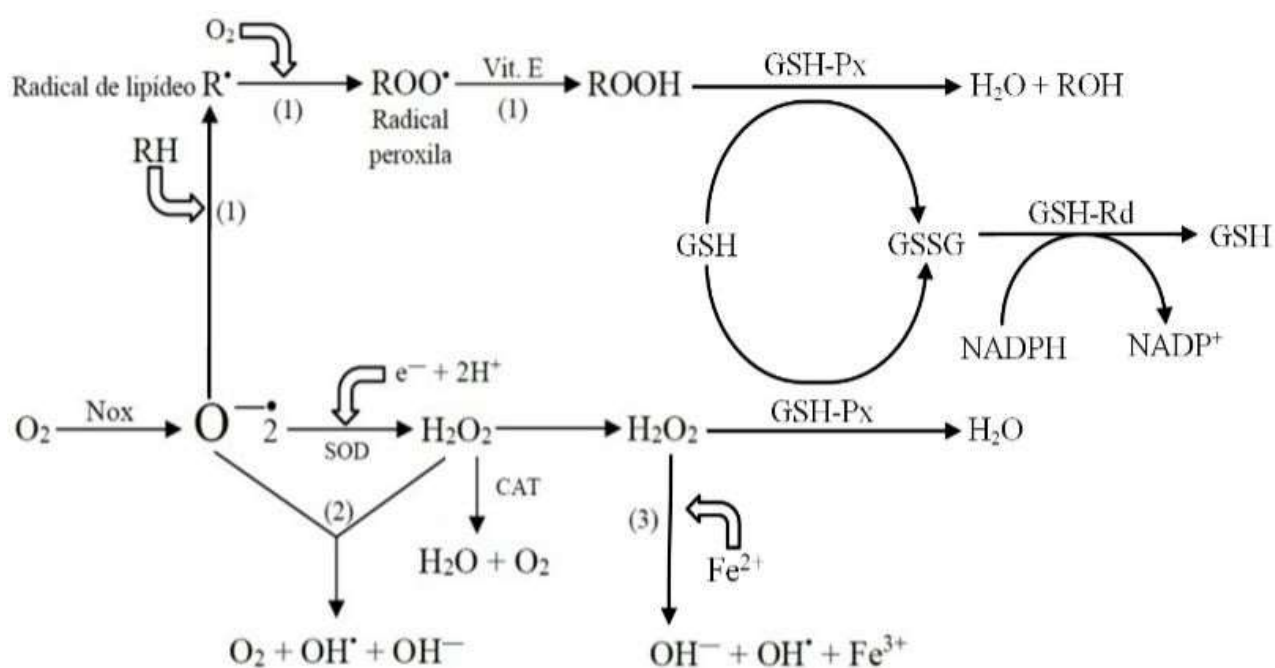
A CAT é uma proteína tetramérica, ou seja, uma proteína com uma estrutura quaternária de quatro subunidades semelhantes, e é codificada pelo gene *ctt1* no cromossomo 11. Essa enzima se encontra em grande quantidade em quase todos os tecidos vivos que utilizam oxigênio, são encontradas principalmente nos peroxissomos celulares, mas está ausente nas mitocôndrias das células dos mamíferos, sendo a única exceção as mitocôndrias presentes no coração do rato. Deste modo, a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio nas mitocôndrias das células dos mamíferos é realizada por outra enzima conhecida como GSH-Px. A CAT tem como seus principais cofatores o ferro e o manganês. Além disso, apresenta uma alta eficiência, pode decompor milhões de moléculas de peróxido de hidrogênio em um segundo. Juntamente ao peróxido de hidrogênio, a CAT também reage eficientemente com doadores de hidrogênio, tais como metanol, etanol, ácido fórmico ou fenóis com atividade de peroxidase. Sua atividade ocorre em duas etapas: primeiro, uma molécula de peróxido de hidrogênio oxida o heme em uma espécie oxiferril, gerando um radical de porfirização. Em seguida, uma segunda molécula de peróxido de hidrogênio atua como agente redutor para regenerar a enzima ao estado de repouso, produzindo oxigênio e água (Ighodaro; Akinloye, 2018; Góth; Rass; Páy, 2004; Chelikani; Fita; Loewen, 2004; Radi *et al.*, 1991). Com relação aos níveis de CAT, diz-se que os seres humanos com alguma deficiência relacionada a essa enzima pode apresentar algumas complicações, entre elas indivíduos que apresentam baixos níveis de catalase (acatalasemia) estão mais predispostos a diabetes mellitus tipo 2 e são, por vezes, acometidos por aterosclerose e neoplasia (Góth; Rass; Páy, 2004).

A GSH-Px é uma enzima importante dentro das células, decompõe peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e peróxidos lipídicos em seus álcoois correspondentes, principalmente nas mitocôndrias e às vezes no citoplasma. Sua atividade, na maioria das vezes, depende do cofator selênio. Por isso, é comumente chamada de selenocisteína peroxidase (Ighodaro; Akinloye, 2018). A função principal da enzima é impedir a peroxidação lipídica, protegendo as células do estresse oxidativo (Gill; Narendra, 2010). Existem oito tipos de GSH-Px em humanos, sendo codificadas respectivamente pelos cromossomos 3, 14, 5, 19, 6, 6, 1 e 5, sendo que a GSH-Px1 é a mais comum e encontrada em praticamente todas as células (Morón; Castilla-Cortázar, 2012; Arthur, 2001). A GSH-Px2 é mais presente no trato gastrointestinal, especialmente no intestino, enquanto a GSH-Px3 é mais comum nos rins. A estrutura típica da GSH-Px é tetramérica, mas a GSH-Px4 é um monômero, sendo conhecida principalmente por degradar hidroperóxidos de fosfolipídeos. A GSH-Px5 em humanos e roedores e a GSH-Px6 em roedores são diferentes das outras GSH-Px por não dependerem de selênio, o que pode limitar sua capacidade de eliminar o H_2O_2 eficazmente (Burk *et al.*, 2011; Noblanc *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2009; Baek *et al.*, 2007; Drevet, 2006; Kryukov *et al.*, 2003; Ursini *et al.*, 1999). Estudos destacam a importância clínica da GSH-Px, relacionando-a com proteção antioxidante reduzida, danos oxidativos e neurotoxicidade. Além disso, a deficiência de GSH-Px1 tem sido associada ao aumento do estresse oxidativo vascular e disfunção endotelial. As GSH-Px, especialmente a GSH-Px1, desempenham um papel importante no desenvolvimento e prevenção de várias doenças, incluindo câncer e doenças cardiovasculares (Chabory *et al.*, 2009; Forgione *et al.*, 2002; Rayman, 2005).

Na figura 04 encontram-se descritos os sistemas de defesas antioxidantes presentes nas células, com ênfase nas atividades enzimáticas (SOD, CAT, GSH-Px). A SOD tem como função converter o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , uma forma menos reativa. Posteriormente, o H_2O_2 é convertido pela CAT em H_2O e O_2 . O peróxido de hidrogênio também pode ser substrato da enzima GSH-Px (ou GPx), onde ao converter uma molécula de glutatona na forma reduzida (GSH) em sua forma oxidada (GSSG), o H_2O_2 é convertido em H_2O . Após isso, na presença da coenzima NADPH, GSSG é reduzida em GSH por ação da enzima glutatona redutase (GSH-Rd) (Ighodaro; Akinloye, 2018).

Adicionalmente, para diminuir processos de lipoperoxidação, também há a ação dos sistemas antioxidantes endógenos que envolvem vitaminas. A vitamina E é responsável por cessar a reação em cadeia de peroxidação de ácidos graxos, neutralizando o ciclo de reações da lipoperoxidação. Os hidroperóxidos orgânicos (ROOH) podem ser reduzidos pela GSH-Px, formando ROH (álcool de lipídeos) inerte (Flora, 2009; Baynes; Dominiczak, 2015; Romão, 2016).

Figura 04: Sistema celular de defesa antioxidante.



Fonte: Romão, 2016, modificado.

As enzimas do tipo paraoxonase (PON) incluem PON1, PON2 e PON3, são conhecidas por suas propriedades antioxidantes e capacidade de prevenir danos relacionados ao estresse oxidativo especialmente em lipoproteínas (Levy, Reichert, Bydlowski, 2019; Meneses *et al.*, 2019; Shunmoogam *et al.*, 2018). PON1 e PON3 são sintetizadas principalmente no fígado e encontradas no plasma em associação à lipoproteína de alta densidade (HDL), desempenham um papel crucial em vários distúrbios metabólicos, incluindo o DM (Chistiakov *et al.*, 2017; Shunmoogam *et al.*, 2018; Reichert; Levy; Bydlowski, 2020).

Especificamente a PON1, tal como dito anteriormente, é uma enzima plasmática que circula associada à HDL, ela é responsável por proteger as lipoproteínas (especialmente a LDL) contra o ataque das EROs através da hidrólise

de peróxidos lipídicos, tais como ésteres de colesterol e fosfolipídeos (Aviram *et al.*, 2000). Portanto, a atividade da PON1 é de extrema importância e contribui para o potencial antiaterogênico da HDL (Rozenberg *et al.*, 2003). Os pesquisadores Mazur (1946) e Aldridge (1953) tiveram um papel fundamental na identificação e classificação da PON1. Inicialmente ela foi identificada como um A-esterase, mas depois se tornou conhecida como paraoxonase devido à sua capacidade de detoxificar o composto organofosforado paraoxon, um metabólito tóxico do Paration (pesticida agrícola). Atualmente, a PON1 é considerada a paraoxonase mais importante, pois possui a capacidade de hidrolisar vários intermediários oxidados, bem como a homocisteína tiolactona, um aminoácido sulfurado que participa do metabolismo da metionina, e tem sido considerado um fator de risco para aterosclerose cerebral, coronariana e periférica. Desta forma, a PON1 tem papel protetor via atenuação do estresse oxidativo e proteção das membranas celulares contra a peroxidação lipídica, atenuando a aterosclerose (Chistiakov *et al.*, 2017; Shunmoogam *et al.*, 2018).

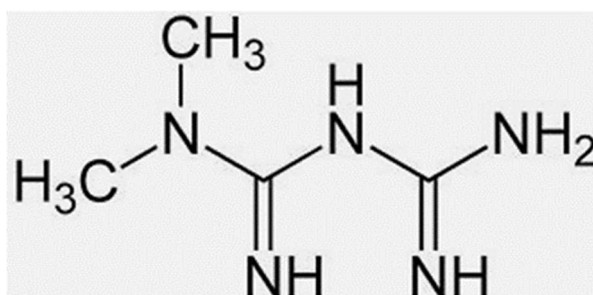
Estudos demonstram que níveis alterados de PON1 estão ligados ao DM tipo 1 e tipo 2, bem como à macroangiopatia diabética e à microangiopatia, destacando sua importância nessas condições (Reichert; Levy; Bydlowski, 2020; Wu, D.; Wu, C.; Zhong *et al.*, 2018). Além disso, o papel protetor da PON1 vai além do DM, incluindo doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e câncer, enfatizando sua importância no combate a doenças relacionadas à idade e condições relacionadas ao estresse oxidativo (Levy; Reichert; Bydlowski, 2019; Meneses *et al.*, 2019; Shunmoogam *et al.*, 2018; Reichert; Levy; Bydlowski, 2020).

2.4 Metformina

A metformina (dimetilbiguanida) (Figura 05) é um fármaco antidiabético normalmente prescrito para o tratamento do DM tipo 2 (Pryor; Cabreiro, 2015). A metformina exerce seus efeitos principalmente no fígado, diminuindo a velocidade da gliconeogênese, contribuindo assim para uma diminuição na glicemia de jejum. Outro local de ação da metformina é o trato gastrointestinal, onde atua diminuindo a absorção de glicose e aumentando a secreção de GLP-1, levando à melhoria da glicemia pós-prandial. A metformina também age nos músculos, melhorando a

sensibilidade à insulina e aumentando a velocidade de captação de glicose. Por fim, também possui efeitos nos tecidos adiposos, onde reduz a inflamação, e assim melhora a sensibilidade à insulina (Rena; Hardie; Pearson, 2017; Valencia *et al.*, 2017; Thomas I.; Gregg, 2017).

Figura 05: Estrutura da metformina.



Fonte: Adaptado Beissweiger e Ruggiero, 2003.

A metformina tem como principal mecanismo de ação para o controle da glicemia a inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons em células hepáticas, o que resulta no aumento da concentração de AMP, aumentando a relação AMP:ATP, essas alterações levam a ativação da proteína quinase dependente de AMP (AMPK). A ativação da AMPK pela metformina leva à fosforilação de múltiplos alvos, incluindo várias enzimas de processos biossintéticos. A metformina melhora o metabolismo de lipídeos e carboidratos, principalmente glicose, pois inibe a acetil-CoA carboxilase (ACC), a hidroximetilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase) e a síntese de glicogênio hepático. Além disso, a AMPK age de forma indireta na diminuição da expressão gênica dos genes lipogênicos e neoglicogênicos. A ativação da AMPK no fígado inibe a transcrição das enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (G6Pase), desacelerando assim a gliconeogênese (Antunes; Bazotte, 2015; Rena; Hardie; Pearson, 2017).

Nas últimas duas décadas, a metformina tem sido utilizada como opção de tratamento de primeira linha para o DM tipo 2, por ser um medicamento de boa eficácia, baixo custo e bom perfil de segurança. Outros benefícios também têm sido atribuídos à metformina, incluindo a promoção de diminuição em marcadores inflamatórios e redução do risco de doenças cardiovasculares, sendo esses benefícios inicialmente independentes do efeito antihiperlipêmico do fármaco (Sanchez-Rangel; Inzucchi, 2017). Já dentre os efeitos adversos mais comumente relacionados

ao uso da metformina, destacam-se os efeitos gastrointestinais (diarreia, náuseas, desconforto abdominal), que em sua maioria são leves, transitórios e dose-dependentes (Bouchoucha; Uzzan; Cohen, 2011), acidose láctica especialmente em pacientes com doença renal crônica avançada (incidência muito rara, estimada em 3-10 por 100.000 pessoas/ano) (Richy *et al.*, 2014) e promoção de deficiência de vitamina B12 (baixa incidência) (Jager *et al.*, 2010; Sanchez-Rangel; Inzucchi, 2017).

Em adultos com DM tipo 1, o uso de metformina em associação com a insulina exógena melhora a sensibilidade à insulina, reduzindo as necessidades de doses elevadas de insulina (Jacobsen; Henriksen; Beck-Nielsen, 2009; Lund *et al.*, 2009). Além disso, há um crescimento no interesse do uso da metformina no tratamento de jovens com DM tipo 1, visando melhor controle glicêmico e menor dependência de insulina (Moran *et al.*, 1999; Sarnblad; Kroon; Aman, 2003; Nadeau *et al.*, 2015). Portanto, investigações sobre o uso da metformina nas estratégias de terapias combinadas são de extrema importância para o aprimoramento das estratégias terapêuticas para o DM.

A metformina também mostra significativo potencial em relação à promoção de melhorias na nefropatia diabética (Ravindran *et al.*, 2016), bem como há evidências de seus efeitos de diminuição do estresse oxidativo e de marcadores inflamatórios que participam do desenvolvimento de complicações diabéticas (Chakraborty; Chowdhury; Bhattacharyya, 2011), também é capaz de diminuir a produção de EROs em células endoteliais (Venu *et al.*, 2021).

A metformina também tem se mostrado muito eficaz quando utilizada em combinação com outros fármacos antidiabéticos para o controle da glicemia no DM tipo 2. A introdução de terapias combinadas entre metformina e outros antidiabéticos orais é quase uma regra no manejo do DM tipo 2, devido ao progressivo declínio na capacidade secretória de células β pancreáticas que caracteriza esta doença. No entanto, a literatura reporta que os ensaios para verificação da eficácia das terapias combinadas entre metformina e outros agentes antidiabéticos foram realizados em prazo relativamente curto, com ênfase somente na verificação da eficácia no controle glicêmico. Portanto, avanços são necessários para a compreensão do papel das terapias combinadas com metformina na prevenção ou atenuação das complicações microvasculares e macrovasculares do DM, bem como a eficácia dessas terapias na preservação da função das células β do pâncreas (Sanchez-Rangel; Inzucchi, 2017).

De fato, apesar de os estudos indicarem resultados positivos das terapias combinadas de metformina com outros agentes antidiabéticos na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares e complicações renais diabéticas (Singh, A.; Singh, R.; Chakraborty, 2021), por outro lado, há evidências da falta de melhores efeitos das terapias combinadas com metformina na atenuação das complicações cardiovasculares no DM, em comparação aos efeitos da monoterapia (Li, T. *et al.*, 2021), o que reforça a necessidade de estudos nessa área.

Ademais, a adoção de uma terapia combinada com a metformina deve considerar, além da eficácia no controle do DM e suas complicações, os custos associados ao agente antidiabético selecionado para a combinação. A literatura reporta que o elevado custo dos novos fármacos antidiabéticos continua sendo uma barreira significativa para seus usos em muitas regiões do mundo, consequentemente inviabilizando a adoção das terapias combinadas desses fármacos com a metformina, tendo em vista o caráter crônico da doença (Cahn; Cefalu, 2016). Por esse motivo, parece interessante o estudo de novas terapias combinadas com a metformina, levando em consideração a existência de bioativos que sejam eficazes no controle das disfunções metabólicas observadas no DM, bem como o custo-benefício da adoção dessa terapia em longo prazo. Nesse sentido, alguns bioativos que atuam como inibidores PDEs de nucleotídeos cíclicos emergem como opções interessantes para as estratégias terapêuticas de terapias combinadas com a metformina com o intuito de atuarem em vias sinalizatórias desreguladas das disfunções metabólicas, incluindo o DM.

2.5 Nucleotídeos cíclicos

Os nucleotídeos cíclicos são moléculas que desempenham um papel crucial na sinalização e regulação celular. Eles são formados pela reciclagem de nucleotídeos, especificamente monofosfato de adenosina (AMP) ou monofosfato de guanosina (GMP). Os dois nucleotídeos cíclicos mais conhecidos são o monofosfato de adenosina cíclica (AMPc) e o monofosfato de guanosina cíclica (GMPc). Os nucleotídeos cíclicos atuam como segundos mensageiros, transmitindo sinais dos receptores da superfície celular para alvos intracelulares. Eles se envolveram em uma ampla gama de processos celulares, incluindo

metabolismo, expressão gênica, regulação do canal iônico e crescimento, diferenciação celular e função imunitária, sendo considerado como um regulador universal da função celular numa ampla variedade de organismos, incluindo protozoários, plantas e animais (Francis; Corbin, 1999; Beavo; Brunton, 2002; Zaccolo; Movsesian, 2007; Yarwood, 2020).

Muitas doenças, como distúrbios metabólicos, psiquiátricos, cardiovasculares, pulmonares, inflamatórios e certos tipos de câncer, estão relacionadas à sua desregulação, alguns exemplos relacionados a essa desregulação do AMPc são a fibrose cardíaca (Delaunay *et al.*, 2019), carcinoma hepatocelular (Massimi *et al.*, 2019), reestenose (Smith; Newby; Bond, 2019) e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Zuo *et al.*, 2020). Além disso o AMPc promove a migração de monócitos para os tecidos e a reprogramação de macrófagos para um fenótipo semelhante ao Th2 e a captação de células apoptóticas (Negreiros-Lima *et al.*, 2020).

O AMPc é sintetizado intracelularmente através da ativação de receptores acoplados à proteína G com produção de AMPc por estímulos fisiológicos. Este processo traduz a ligação do ligante extracelular em sinais intracelulares, causando alterações conformacionais no receptor, levando à dissociação das subunidades heterotriméricas da proteína G, $G\alpha$ e $G\beta\gamma$, na membrana plasmática. A subunidade $G\alpha$ ativa especificamente a adenilil ciclase (AC), promovendo a conversão de ATP em AMPc. Por outro lado, as subunidades inibitórias de $G\alpha$ bloqueiam a ativação da AC, limitando a produção de AMPc (Levitzki, 1987; Mystek *et al.*, 2019).

Como mencionado anteriormente, a ativação de proteínas efetoras pelo AMPc desempenha um papel crucial na regulação de diversos processos celulares. Para que essa ativação ocorra, é necessário que haja níveis elevados de AMPc dentro da célula, o que permite a ativação de diferentes vias de sinalização por meio da interação específica com proteínas efetoras contendo domínios de ligação a nucleotídeos cíclicos. Entre essas proteínas estão: **I)** proteína quinase dependente de AMPc (proteína quinase A, PKA), cuja sinalização dessa proteína ativada é realizada por meio da fosforilação de uma imensa variedade de proteínas alvo intracelulares (Hjerrild *et al.*, 2004; Yarwood, 2020); **II)** a proteína de troca ativada por AMPc (EPACs 1 e 2), onde estão relacionadas principalmente na estimulação das GTPases, Rap1 e Rap2, por intermédio de sua atividade inerente

ao fator de troca de nucleotídeos guanina (Rooij *et al.*, 1998); **III**) Os canais iônicos responsivos ao AMPc (CICs), esses canais são encontrados em neurônios sensoriais olfativos, no cérebro, nos rins e no coração, sendo esses últimos chamados de CICs ativados por hiperpolarização e são responsáveis por manter os batimentos cardíacos regulares (Matulef; Zagotta, 2003); **IV**) as proteínas que possuem o domínio Popeye (POPDCs) (Yarwood, 2020).

A PKA é uma proteína quinase que pode ser ativada por meio de nucleotídeos cíclicos, especificamente AMPc. A ativação desta pelo AMPc ocorre por meio da ligação do AMPc aos domínios de ligação a nucleotídeos cíclicos (CNB) do PKA. Os domínios CNB regulam alostericamente a atividade de PKA iniciando a ligação e a cooperatividade de AMPc, bem como estimulando interações entre domínios que levam à conformação ativa de PKA. A ativação da PKA pelo AMPc é importante para regular vários processos celulares, e a diversidade funcional da PKA é aumentada pela presença de diferentes isoformas de subunidades regulatórias. A seletividade de PKA para AMPc em comparação a outros nucleotídeos cíclicos, como GMPc, é alcançada por meio de interações específicas entre os domínios CNB e AMPc (Brown *et al.*, 2013.; Hao *et al.*, 2019; Gao, 2022).

POPDCs são, entre os receptores de AMPc, os mais recentes descobertos, esses receptores estão ligados à membrana interagindo com o canal de potássio do domínio de dois poros, TREK-1 (Froese *et al.*, 2012) e Caveolina-3 (Alcalay *et al.*, 2013.), tal ação está relacionada à regulação da atividade do marca-passo (Yarwood, 2020). Também é descrito o papel central para a família POPDC na homeostase dos órgãos, estando presente em diferentes vias celulares que estão envolvidas no tráfego de membranas, arritmia cardíaca, distrofia muscular, proliferação celular, migração e invasão (Amunjela; Swan; Brand, 2019). De fato, a deleção de POPDCs produz arritmia cardíaca acentuada, sugerindo que eles têm um papel essencial na função cardíaca consistente com sua expressão principalmente nos cardiomiócitos (Schindler *et al.*, 2012). Importante ressaltar que ainda se tem muito a aprender a respeito dos POPDCs e trabalhos futuros irão revelar ainda mais a importância e os mecanismos de ação desta nova família de proteínas de ligação ao AMPc.

Além disso, estudos mostraram uma ligação entre o AMPc e a sinalização da AMPK, que desempenha um papel crucial na homeostase energética celular e sistêmica. A regulação do eixo AMPc/AMPK tem sido implicada em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo inflamação, diabetes, obesidade e envelhecimento. Tem-se o conhecimento que a sinalização de AMPc é ativada em situações de estresse fisiológico e metabólico, levando assim ao aumento dos níveis de AMPc celular, e essa ativação da sinalização do AMPc pode promover a atividade da AMPK, processo esse descrito como eixo AMPc/AMPK (Hardy; Pryde, 2020; Lee *et al.*, 2019; Wang, F. *et al.*, 2020; Li, C. *et al.*, 2020; Yarwood, 2020). A sinalização através da AMPc pode ser estimulada por meio da liberação de hormônios do estresse, como adrenalina e glucagon, que ativam a AC ligada à membrana e aumentam os níveis de AMPc celular. Esse aumento nos níveis de AMPc pode subsequentemente aumentar a atividade da AMPK. Além disso, pesquisas recentes descobriram o papel de microdomínios distintos de AMPc gerados pela adenilil ciclase solúvel na regulação da atividade basal e provocada pela AMPK (Aslam; Ladilov, 2022).

O eixo AMPc/AMPK possui um papel fundamental na manutenção energética celular e sistêmica, apoiando os processos necessários para a homeostase energética e redox, incluindo biogênese mitocondrial, autofagia e metabolismo de glicose e lipídios (Yarwood, 2020; Aslam; Ladilov, 2022). Adicionalmente, é importante citar a existência dos microdomínios de AMPc, que são regiões localizadas dentro das células onde ocorre a sinalização de AMPc. Esses microdomínios são gerados pela adenilil ciclase solúvel (SaC), uma enzima que é responsável por produzir a AMPc em resposta a sinais específicos da célula. O SaC produz AMPc em compartimentos diferentes dentro das células, permitindo uma regulação mais local e precisa da sinalização de AMPc. Esses microdomínios podem possuir diferentes concentrações e dinâmicas de AMPc em comparação com os níveis gerais de AMPc celular. Juntamente a isso já foi demonstrado a relação dos microdomínios de AMPc e a AMPK, onde eles desempenham um papel regulador da atividade AMPK (Aslam; Ladilov, 2022).

Os mecanismos específicos pelos quais os microdomínios do AMPc regulam a atividade da AMPK ainda estão sendo investigados, mas sugere-se que a sinalização localizada do AMPc dentro desses microdomínios pode modular direta

ou indiretamente a ativação da AMPK e as vias de sinalização. Compreender a regulação do eixo AMPc/AMPK é importante para desenvolver estratégias para tratar distúrbios metabólicos e explorar seu papel em diversas doenças, incluindo inflamação, isquemia, diabetes, obesidade e envelhecimento, bem como investigar o papel dos microdomínios do AMPc na regulação da AMPK a fim de alcançar um melhor entendimento sobre o controle espacial e temporal da homeostase e do metabolismo energético celular (Yarwood, 2020; Aslam; Ladilov, 2022).

Esses avanços na compreensão da sinalização do AMPc fornecem *insights* sobre seu papel na homeostase celular e potenciais aplicações translacionais, se utilizando, por exemplo, do estudo do metabolismo dos nucleotídeos cíclicos para terapia e desenvolvimento de uma série de medicamentos que agem antagonizando alguns bloqueios de sinais por parte dessas moléculas, podendo incluir como exemplo β -bloqueadores (por exemplo, propranolol), asma (por exemplo, salbutamol) e anti-disfunção erétil (Sildenafil) (Yarwood, 2020).

2.6 Inibidores de fosfodiesterase (PDEs)

Existem 11 famílias de PDEs, as quais se localizam em diferentes tecidos ou órgãos, e são categorizadas de acordo com suas propriedades enzimáticas, homologia de sequência e sensibilidade a inibidores. Cada família de PDEs compreende de um a quatro genes que expressam múltiplas isoformas. Entre as 11 isoformas, os membros das famílias PDE4, PDE7, PDE8 estão envolvidos na hidrólise específica do AMPc; os membros das famílias PDE5, PDE6, PDE9 estão envolvidos na hidrólise específica do GMPc; já os membros das famílias PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 e PDE11 hidrolisam tanto AMPc quanto GMPc (Azevedo *et al.*, 2021; Omori; Kotera, 2007; Baillie; Tejeda; Kelly, 2019).

As múltiplas ações das PDEs foram descobertas em diferentes órgãos. Consequentemente, também foram observadas as consequências de alterações nas atividades das PDEs que culminam em desregulação no metabolismo dos nucleotídeos cíclicos que levam à progressão de diversas doenças. Como exemplos dos efeitos deletérios dessa desregulação podem ser citados: (i) uma diminuição nos níveis de AMPc mediada por PDE3 gera uma contratilidade cardíaca prejudicada e aumenta o risco de insuficiência cardíaca (Knight; Yan, 2012); (ii) no fígado, a PDE4

mostrou induzir inflamação impulsionada por endotoxina na doença hepática alcoólica (Wahlang *et al.*, 2018); (iii) também foi observado o envolvimento de PDEs em certas doenças renais e o efeito protetor de inibidores de PDE3 e PDE4 para tratamento de lesões associadas a isquemia/reperfusão renal (Keravis; Lugnier, 2012; Choi *et al.*, 2009).

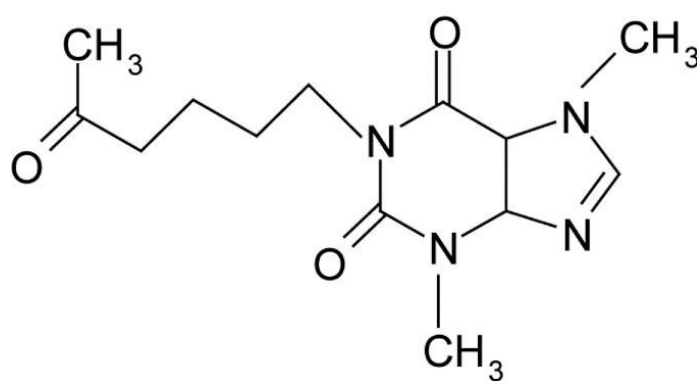
Diversos inibidores de PDEs encontram-se aprovados e disponíveis para o tratamento de uma diversidade de condições clínicas. O primeiro inibidor de PDE reconhecido foi a teofilina (inibidor não seletivo de PDE), aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 1937, sendo indicada para o tratamento da asma e broncoconstrição devido às suas ações broncodilatadoras, tal como outros inibidores não seletivos, incluindo aminofilina, oxtrifilina e difilina. Pentoxifilina também é um inibidor não seletivo de PDE, sendo indicada para o tratamento da claudicação intermitente. Cilostazol é um inibidor seletivo de PDE3, também utilizado no tratamento da claudicação intermitente e tem uso *off-label* para a prevenção de acidente cerebrovascular e estenose coronariana. Milrinona também é um inibidor seletivo de PDE3, indicado no tratamento de falência cardíaca congestiva. O roflumilast, um inibidor seletivo de PDE4 de segunda geração, é indicado para o tratamento de doença pulmonar obstrutiva crônica. Inibidores seletivos de PDE 5 são utilizados no tratamento da disfunção erétil, incluindo sildenafil, vardenafil, tadalafil e avanafil. A papaverina é um inibidor seletivo de PDE10 utilizado no tratamento de espasmo visceral (Baillie; Tejeda; Kelly, 2019).

De especial interesse desse projeto, revisões de Lugnier *et al.* (2020) e Baillie, Tejeda e Kelly (2019) reúnem diversas evidências pré-clínicas e clínicas, respectivamente, da eficácia de inibidores de PDEs na atenuação de diversas disfunções metabólicas. Dentre os inibidores de PDEs frequentemente estudados no cenário das disfunções metabólicas, temos a pentoxifilina.

A pentoxifilina [3,7-dimetil-1-(5-oxohexil)-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona] (Figura 06) é um derivado de metilxantina que atua como um inibidor não-seletivo de PDEs (Rall, 1990; Windmeier; Gressner, 1997). Possui ações hemorreológicas (Samlaska; Winfield, 1994), sendo utilizada no tratamento de claudicação intermitente e outros distúrbios vasculares (Samlaska; Winfield, 1994; Bevan; Waller; Ramsay, 1992). A pentoxifilina age nas propriedades reológicas do sangue, diminuindo a viscosidade do plasma e do sangue total, especialmente via redução nos níveis de

fibrinogênio plasmático. Aumenta a distensibilidade dos eritrócitos e diminui a agregação eritrocitária e plaquetária, melhorando a microcirculação de vários órgãos. Suprime a ativação de neutrófilos, melhorando a eficiência com a qual os neutrófilos podem fluir pelos vasos sanguíneos (Gillings, 1995; Mccarty; O'Keefe; Dinicolantonio, 2016). Assim, a pentoxifilina melhora a perfusão tecidual, aumentando o fluxo sanguíneo, podendo aliviar os sinais e sintomas da dor isquêmica.

Figura 06: Estrutura da pentoxifilina.



Fonte: Mircia *et al.*, 2015.

As ações anti-inflamatórias da pentoxifilina também têm sido bastante exploradas. Em monócitos e linfócitos, a pentoxifilina é capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF- α e IL-6, por mecanismo relacionado à inibição de PDEs, com subsequente aumento nos níveis de AMPc, ativação de proteína quinase dependente de AMPc (proteína quinase A, PKA), inibição de NF- κ B e diminuição na expressão gênica destas citocinas (Layseca-Espinosa; Sánchez-Madrid; González-Amaro, 2003; Donate-Correa *et al.*, 2019).

Há diversas evidências dos efeitos benéficos associados à pentoxifilina em estudos com modelos animais que simulam as desordens metabólicas, e da mesma forma há evidências de seus benefícios em estudos pré-clínicos, incluindo doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) (Acedo *et al.*, 2015), distúrbios cardiovasculares (Zhang *et al.*, 2004), retinopatia diabética (Baykara *et al.*, 2013) desaceleração/redução na perda de tecido muscular esquelética devido à deficiência de insulina (Arcaro *et al.*, 2018). Esses efeitos benéficos da pentoxifilina demonstram estar correlacionados ao seu potencial antioxidante (Radfar *et al.*, 2005), na sua

capacidade antiglicação (Rahbar *et al.*, 2000), nos seus efeitos 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).

Em estudo de nosso laboratório de Inácio *et al.* (2020), o tratamento de camundongos obesos e resistentes à insulina com 50 mg/kg de pentoxifilina por 7 semanas promoveu diversas melhorias em parâmetros relacionados à inflamação, bem como melhorou a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose. Especialmente em relação às suas ações renoprotetoras, esse estudo avançou na compreensão dos mecanismos de ação da pentoxifilina no combate ao estresse glico-oxidativo nos rins. Inácio *et al.* (2020) observaram que, nos rins de animais obesos/resistentes à insulina, a pentoxifilina inibiu a expansão glomerular, a deposição de lipídeos, diminuiu os níveis de citocinas pró-inflamatórias e promoveu a ativação da enzima AMPK. Tem sido demonstrado que as ações benéficas de inibidores de PDEs no combate às disfunções metabólicas podem ter relação com a capacidade destes compostos em ativarem AMPK (Lugnier *et al.*, 2020). Sabe-se que AMPK é capaz de ativar o fator de transcrição NRF 2 (fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2); a ativação de NRF 2 encontra-se envolvida no estímulo à expressão de enzimas antioxidantes (Tonelli; Chio; Tuveson, 2018) e da enzima glioxalase 1 (GLO 1) (Xue *et al.*, 2012). A GLO 1 pertence ao sistema da glioxalase, o qual combate os efeitos deletérios do estresse dicarbonílico. Um dos principais substratos deste sistema de detoxificação é o metilglioxal, considerado um dos mais importantes agentes glicantes *in vivo*, gerando diversos AGEs (Schalkwijk; Stehouwer, 2020).

Por fim, Inácio *et al.* (2020) também observaram que a pentoxifilina diminuiu o acúmulo de AGEs e os níveis do receptor RAGE e seus componentes *downstream* em rins de animais obesos, o que conseqüentemente contribuiu para mitigar o estresse oxidativo. A pentoxifilina também aumentou os níveis de componentes de citoproteção que participam da detoxificação de AGEs e EROs, incluindo GLO 1 e as enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GSH-Px). Os níveis urinários de albumina foram diminuídos, o que reafirma os efeitos antialbuminúricos da pentoxifilina. Todas estas respostas agregam valor ao potencial anti-inflamatório da pentoxifilina, já previamente associado às suas ações renoprotetoras no diabetes.

Em estudos de El-Deen *et al.* (2020) e Heeba *et al.* (2020), foram avaliados os efeitos de diferentes inibidores de PDEs (pentoxifilina, cilostazol e sildenafil),

administrados oralmente sozinhos ou na forma de terapias combinadas com a metformina, em sistemas-modelo *in vivo* de esteatose hepática não alcoólica em ratos (indução pela ingestão de dieta hiperlipídica). Nestes estudos, os tratamentos de animais mantidos em dieta hiperlipídica com os inibidores de PDEs, sozinhos ou co-administrados com metformina, tiveram múltiplos benefícios em parâmetros usualmente alterados nas disfunções metabólicas: houve diminuição no ganho de peso corporal, redução nos índices de composição corporal (representado pela razão gordura visceral/músculo *gastrocnemius*) e índice hepático [(peso do fígado seco / peso corporal) × 100], atenuação na resistência à insulina (redução no HOMA-IR, níveis séricos de insulina e glicemia de jejum), também foram observadas reduções nos níveis séricos das enzimas hepáticas ALT e AST que indicam marcadores de injúria hepática e de bilirrubina total (marcador de disfunção hepática), diminuição nos níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos, redução nos níveis hepáticos de malondialdeído (MDA) e óxido nítrico (NO), aumento nos níveis hepáticos de GSH (glutathiona reduzida, metabólito antioxidante), diminuição nos níveis hepáticos de TNF- α e NF- κ B e redução da esteatose hepática, fibrose e inflamação lobular. Destaca-se que as ações dos inibidores de PDEs foram potencializadas quando utilizados de forma combinada com a metformina. Dentre os fármacos, o que mais se destacou, tanto em monoterapia quanto na terapia combinada com a metformina, foi a pentoxifilina, a qual demonstrou uma capacidade de promoção de diversos benefícios nos parâmetros avaliados, em comparação aos demais inibidores de PDEs administrados de forma isolada ou combinados com a metformina (El-Deen *et al.*, 2020; Heeba *et al.*, 2020).

Também foram estudados por Ćulafić *et al.* (2020) os efeitos da terapia combinada entre pentoxifilina e metformina na promoção de melhorias em parâmetros bioquímicos em pacientes com esteatohepatite não alcoólica. Foram observadas aparentes melhorias nos pacientes tratados com pentoxifilina e metformina, tendo como efeitos principais a diminuição da resistência à insulina, dos níveis circulantes das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e dos níveis séricos de ácido úrico. Com esses efeitos, verificou-se uma redução na progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica para esteatohepatite não alcoólica nos pacientes tratados.

Assim como nos estudos realizado por Čulafić *et al.* (2020) outros pesquisadores vêm investigando o uso de inibidores de PDEs em terapias combinadas, de forma simples, a terapia medicamentosa combinada é o uso de duas ou mais drogas diferentes para tratar uma determinada condição médica. Essa abordagem é muitas vezes utilizada para aumentar a eficácia do tratamento ao permitir combater tal condição através de mais de um alvo farmacêutico, podendo assim reduzir os efeitos colaterais ou tratar múltiplos sintomas de uma só vez.

O uso de terapia medicamentosa combinada utilizando inibidores da PDEs demonstra que essa estratégia se mostra promissora no tratamento de distúrbios metabólicos, como resistência à insulina, diabetes tipo 2 e obesidade. Descobriu-se que os inibidores da PDE5 sensibilizam os tecidos-alvo da insulina à insulina, controlando assim a ação do metabolismo da insulina e da glicose (Antinozzi; Sgro; Di Luigi, 2020).

Outros exemplos de investigações a respeito da utilização desse grupo de fármacos foram: sua utilização em quadros de insuficiência cardíaca crônico associado com antagonistas de receptores β -adrenérgicos (Van Tassell *et al.*, 2008), PDE5 combinada com α -bloqueador para melhorar os sintomas do trato urinário inferior e a disfunção erétil (Kallidonis *et al.*, 2020), combinação de metilxantinas (terapêuticas baseadas em diferenciação) e inibidores de PDE 4 e PDE5 para o tratamento do câncer no pulmão (Domvri *et al.*, 2017), entre outros. Essas descobertas sugerem que a terapia combinada com inibidores da PDEs pode oferecer potenciais abordagens no tratamento dos distúrbios metabólicos. A terapia medicamentosa combinada, especificamente o uso de inibidores da PDEs, mostra-se promissora no tratamento de distúrbios metabólicos.

Tendo em vista os potenciais benefícios da terapia combinada entre metformina e pentoxifilina, e mediante as ações antioxidante e anti-inflamatória desses fármacos, nesse projeto pretendemos nos propormos a realizar uma investigação a respeito dos efeitos da terapia combinada entre metformina e pentoxifilina sobre os parâmetros fisiometabólicos e de estresse glico-oxidativo em sistema-modelo *in vivo* de DM.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar os impactos da terapia combinada entre metformina e pentoxifilina sobre parâmetros fisiometabólicos, biomarcador relacionados ao metabolismo de carboidratos, estresse glico-oxidativo em sistema-modelo *in vivo* de DM.

3.2. Objetivos específicos

Durante ou após 42 dias de tratamento, avaliar os efeitos dos tratamentos de ratos diabéticos (indução via administração de estreptozotocina) com metformina sozinha ou co-administrada com pentoxifilina, monitorando:

- Parâmetros fisiológicos: peso corporal, massas de fígado e rins;
- Biomarcadores relacionados ao do metabolismo de carboidratos: níveis plasmáticos de glicose, níveis sanguíneos de hemoglobina glicada (HbA1c);
- Marcadores de lesão glico-oxidativa: níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS; plasma, fígado e rim), níveis de produtos finais de glicação avançada (AGEs fluorescentes; plasma, fígado e rim);
- Marcadores relacionados à proteção antioxidante: atividades das enzimas paraoxonase 1 (PON 1; plasma), SOD (fígado e rim), CAT (fígado e rim) e GSH-Px (fígado e rim).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e desenho experimental

Foram utilizados 48 animais (ratos), da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar machos com a idade entre 3 a 4 semanas e peso aproximado de 150 g, provenientes do Biotério Central de Botucatu, UNESP, que foram transportados da cidade de Botucatu, SP até a cidade de Araraquara, SP em caixas de polipropileno com maravalha com dimensões de 414 x 344 x 174 mm. Os animais foram recebidos e mantidos no Biotério do Departamento de Análises Clínicas, FCFar/UNESP campus de Araraquara, recebendo dieta comercial e água *ad libitum* com ciclo luz-escuro de 12 horas, temperatura de 23 ± 1 °C e umidade de $55 \pm 5\%$, onde ficaram em um período de aclimação de 4 dias. Ressalta-se que para o planejamento estatístico, foram utilizadas as fórmulas descritas por Dell, Holleran e Ramakrishnan (2002).

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

1. Normal, não-diabético, tratado com água (N, n=6);
2. Diabético, tratado com água (D, n=6)
3. Diabético, tratado com 4 unidades/dia de insulina (DI4U, n=6);
4. Diabético, tratado com 250 mg/kg/dia de metformina (DMET, n=6);
5. Diabético, tratado com 100 mg/kg/dia de pentoxifilina (DP100, n=6);
6. Diabético, tratado com 250 mg/kg/dia de metformina + 25 mg/kg/dia de pentoxifilina (DMP25, n=6);
7. Diabético, tratado com 250 mg/kg/dia de metformina + 50 mg/kg/dia de pentoxifilina (DMP50, n=6);
8. Diabético, tratado com 250 mg/kg/dia de metformina + 100 mg/kg/dia de pentoxifilina (DMP100, n=6).

Para a indução do DM experimental, foi utilizado o fármaco diabetogênico estreptozotocina (STZ). A STZ foi dissolvida em tampão citrato 0,01M (pH 4,5) e administrada nos ratos após jejum de 12 horas, na dose de 40 mg STZ/kg de peso corporal, via veia jugular, em animais anestesiados com isoflurano (Isoforine®). Animais normais, não diabéticos, foram submetidos aos mesmos procedimentos, porém, recebendo somente tampão citrato pela veia jugular.

Após 3 dias da indução do diabetes, foram determinadas as glicemias dos animais, a dosagem foi realizada no plasma obtido de sangue que foi coletado por via caudal dos animais em estado alimentado. Ratos com glicemia de estado alimentado igual ou superior a 300 mg/dL foram selecionados para compor os grupos experimentais contendo animais diabéticos, conforme os grupos a serem conduzidos e os tratamentos a serem realizados.

A pentoxifilina foi obtida comercialmente através da empresa Sigma- Aldrich® (CAS 6493-05-6). A metformina HCl foi obtida comercialmente por meio de uma farmácia de manipulação (Farmácia Bandeirantes, Araraquara, SP).

A pentoxifilina e a metformina foram solubilizadas em água. Os tratamentos foram realizados via administração orogástrica, duas vezes ao dia (8:00 e 18:00 horas), durante 42 dias, período esse estabelecido ao se analisar os períodos de tratamentos de 30 dias por Figueiredo *et al.* (2020) e 50 dias por Assis *et al.* (2017), assim definindo 42 dias com o intuito de conseguir avaliar alterações mais acentuadas em uma fase mais crônica de um estresse glico-oxidativo estabelecido em modelo diabético estreptozotocínico. Os fármacos foram pesados em tubo Falcon com tampa, no dia anterior a administração, levando-se em conta a média do peso corporal dos animais de cada grupo, sendo pesado o equivalente a dose do dia. As doses utilizadas nesse estudo foram baseadas em trabalhos anteriores realizados no nosso laboratório (Laboratório de Bioquímica e Enzimologia, Departamento de Análises Clínicas, FCFar/UNESP campus de Araraquara), bem como outros trabalhos na literatura utilizando a metformina e pentoxifilina. Foram usados como referência os trabalhos de Roxo *et al.* (2019), Figueiredo *et al.* (2020) para a dose usada de metformina e os trabalhos de Baviera *et al.* (2007), Garcia *et al.* (2015), Arcaro *et al.* (2018) e Inacio *et al.* (2020) para as doses usadas de pentoxifilina, juntamente a esses trabalhos também foi usado como referência para as dose isoladas e combinados os trabalhos de El-Deen *et al.* (2020), Heeba *et al.* (2020) e Cúlafic *et al.* (2020). Assim as seguintes

doses foram escolhidas para os tratamentos: **DMET**: 250 mg de metformina / kg de animal ao dia, **DP100**: 100 mg de pentoxifilina /kg de animal ao dia, **DMP25**, **DMP50**, **DMP100**: 250 mg de metformina + pentoxifilina (25/50/100 mg) / kg de animal ao dia. Posteriormente, no dia seguinte, os fármacos foram solubilizados em água e administrados aos animais, fracionando-se a dose (1 mL/animal/dia), na forma de duas doses de 0,5 mL para cada animal.

Animais **N** e **D** receberam por gavagem somente água (veículo), a fim de emular o mesmo estresse proveniente da administração oral dos fármacos aos animais que não receberam nenhum tratamento, assim excluindo-se qualquer alteração ocasionada pelo procedimento.

Animais do grupo **DI4U** receberam insulina (Novolin® N) preparada em NaCl 0,85% por via subcutânea, em duas doses diárias de 2U de insulina cada (totalizando 4U insulina/dia), durante os 42 dias.

Periodicamente foram realizadas as seguintes determinações: peso corporal (semanalmente), glicemia (dias 0, 15, 30 e 42 de tratamento) que assim como anteriormente descrito foi determinada no plasma obtido de sangue que foi coletado por via caudal dos animais em estado alimentado. Ao final dos 42 dias, os animais foram eutanasiados através do método de decapitação por guilhotina, o que se sucedeu pela coleta direta de sangue pela região cervical exposta/aberta em tubo com heparina ou EDTA para obtenção do plasma. Também foram coletados e pesados os órgãos: fígado e rins. Suas carcaças foram armazenadas em saco plástico e acondicionadas em freezer (-20°C) até a retirada para incineração pela empresa NGA Estre Ambiental, CNPJ: 03.147.393/0001-59.

O sangue dos animais foi coletado, sendo uma parte em tubo com heparina, onde foi centrifugado (Eppendorf Centrifuge 5804 R) e obtido o plasma, o qual foi armazenado a -80°C, posteriormente esse plasma foi utilizado nos testes descritos no item 4.2 (glicemia, AGEs fluorescentes, TBARS, PON1). A outra parte do sangue foi coletada em tubo com EDTA, em seguida diluído em reagente diluente próprio conforme estipulado pela empresa Trinity Biotech LTDA., e armazenado a -20°C, após isso as amostras foram levadas para o Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC) da Unesp de Araraquara-SP, onde foram utilizados para determinação dos níveis de hemoglobina glicada, tal como indicado no item 4.2.1. Os órgãos (fígado e rim) foram pesados, fracionados e em seguida armazenados a -80°C, em seguida os órgãos foram preparados tal como descrito no item 4.2.2 e utilizado nas dosagens de AGEs

fluorescentes e TBARS.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Câmpus de Araraquara (CEUA/FCF/Car 20/2022, Anexo 1).

4.2 Determinações analíticas

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

- **Glicemia:** A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose à ácido glucônico e H_2O_2 . O H_2O_2 reage com 4-aminoantipirina, sob a ação de uma enzima do tipo peroxidase, formando uma antipirilquinonimina, monitorada em 505 nm, e cuja intensidade de absorção é proporcional à concentração da glicose na amostra (Trinder, 1969). Os resultados foram expressos como mg/dL.
- **Hemoglobina glicada:** Amostras de sangue total foram diluídas com o Reagente Premier Diluente na proporção de 1:10 e armazenado no freezer na temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente a dosagem foi realizada no equipamento Premier Hb9210 da Trinity Biotech, por meio da tecnologia patenteada de afinidade ao boronato associada a cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Nesse método, a amostra de sangue é injetada em uma coluna cromatográfica, onde os diferentes componentes da hemoglobina são separados com base em suas propriedades físico-química, através do uso da ligação específica da glicação por afinidade ao boronato para detectar todas as espécies de Hb glicada presentes e quantificada com base na área sob a curva do pico correspondente (Trinity Biotech). Os resultados foram expressos como porcentagem (%).
- **Triglicerídeos:** A concentração de triacilgliceróis foi determinada via reações enzimáticas acopladas; os triacilgliceróis são hidrolisados pela lipase, produzindo glicerol e ácidos graxos livres. O glicerol é fosforilado pela gliceroquinase,

produzindo glicerol-3-fosfato, o qual é oxidado à dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio sob ação da glicerol-3-fosfato oxidase. O H_2O_2 participa da oxidação de 4-aminoantipirina, pela ação catalizadora da peroxidase, gerando quinoneimina, monitorada a 505 nm, sendo diretamente proporcional à concentração dos triacilgliceróis na amostra (Rifai; Warnick, 2006). Os resultados foram expressos como mg/dL.

- **Colesterol total:** A concentração de colesterol total foi determinada utilizando sistema de reações enzimáticas acopladas, com colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase. O produto final formado é a antipirilquinonimina, monitorada em 505 nm, e cuja intensidade de absorção é proporcional à concentração de colesterol na amostra (Mroz, 2003). Os resultados foram expressos como mg/dL.
- **Colesterol-HDL:** O poliânion composto por fosfotungstato de sódio e íons de magnésio forma complexos estáveis com a superfície de VLDL, LDL e quilomicra. Os complexos formados com as partículas do colesterol-HDL presentes no soro não se estabilizam, ficando sujeitos à ação detergente do polioxietileno lauril éter, solubilizando-se. Em seguida, ocorre a ação de colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase, resultando na formação de um cromóforo que é diretamente proporcional à concentração de colesterol presente no colesterol-HDL da amostra (Rifai; Warnick, 2006). Os resultados foram expressos como mg/dL.
- **Albumina:** O método de dosagem de albumina utilizado baseia-se na ligação da albumina com o corante verde de bromocresol em meio ácido, esta ligação promove um desvio do pico de absorvidade do corante, permitindo que a cor resultante possa ser medida colorimetricamente na presença de excesso do corante. Este complexo pode ser medido colorimetricamente entre 600 e 640 nm, sendo a intensidade da cor diretamente proporcional à concentração de albumina na amostra (Peters; Biamont; Doumas, 1982). Os resultados foram expressos como mg/dL.

- **ALT:** A ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o alfa-cetoglutarato, resultando na formação de glutamato e piruvato. A atividade da ALT pode ser determinada pela intensidade de coloração da hidrazona formada em meio alcalino, que é diretamente proporcional à quantidade de piruvato, em determinado tempo, que, por sua vez, é em função da atividade enzimática, e a intensidade de coloração da hidrazona formada é medida (Wroblewski; Ladue, 1956). Os resultados foram expressos U/L.
- **ALP:** O método utiliza 4-nitrofenil-fosfato como substrato, em condições otimizadas a fosfatase alcalina (ALP) cataliza em meio alcalino a hidrólise e transferência do grupo fosfato de 4-nitrofenilfosfato ao 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), libertando 4-nitrofenol. A concentração catalítica determina-se a partir da velocidade de formação de 4-nitrofenol, medido a 405 nm (Scandinavian Society for Clinical Chemistry, 1974). Os resultados foram expressos U/L.
- **Creatinina:** Em condições otimizadas, a creatinina presente na amostra reage com o ácido pícrico, formando um complexo de cor amarelo-avermelhada. A quantidade de cor formada é proporcional à concentração de creatinina na amostra (Cook, 1971). Os resultados foram expressos como mg/dL.
- **Ácido úrico:** O ácido úrico é oxidado pela uricase (UOD) em alantoína, gás carbônico (CO₂) e água oxigenada (H₂O). Através de uma reação de copulação oxidativa catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reage com o diclorofenolsulfonato (DCFS) e 4-aminoantipirina (4-AMP), produzindo uma antipirilquinonimina de cor vermelha. A absorbância do complexo formado, medida em 520 nm, é diretamente proporcional à concentração de ácido úrico da amostra (Trinder, 1969). Os resultados foram expressos como mg/dL.
- **Ureia:** Em condições otimizadas, a ureia presente na amostra é hidrolisada pela urease, a amônia em meio alcalino, na presença de nitroprussiato de sódio e hipoclorito, reage com o salicilato, produzindo um complexo de azul de indofenol. A intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de ureia na amostra e

pode ser determinada espectrofotometricamente em 580 nm (Bergmeyer; Gawehn, 1974). Os resultados foram expressos como mg/dL.

- **Frutosamina:** Os níveis plasmáticos de frutosamina foram determinados usando kit comercial (BioTécnica – Biotecnologia Avançada, Minas Gerais, Brasil). A frutosamina 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 frutosamina 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 frutosamina.

4.2.2 Biomarcadores de lesão glico-oxidativa

- **AGEs fluorescentes:** Os AGEs fluorescentes foram estimados tal como descrito por Zilin *et al.* (2001) e Pokupec *et al.* (2003), com modificações. Amostras de 0,1 g de fígado ou rim foram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato 10 mM (pH 7,4) e centrifugadas a 10000 *g* durante 10 minutos à 4 °C para a obtenção do sobrenadante. No plasma e nos sobrenadantes dos homogenatos de fígado foram adicionados 1,21 M (plasma) e 2,42 M (fígado) de clorofórmio, 0,12 M de ácido tricloracético e 0,1 M de hidróxido de sódio (NaOH); os tubos foram homogeneizados em vórtex e mantidos a 8-10 °C durante 30 minutos e posteriormente centrifugados à 10.000 *g* durante 10 minutos a 10 °C. Nos sobrenadantes dos homogenatos de rim foi adicionado 0,1 M de NaOH; os tubos foram homogeneizados em vórtex e centrifugados à 10.000 *g* durante 10 minutos a 10 °C. Em seguida os sobrenadantes foram levados à espectrofluorímetro (leitor de placa Synergy H1) (comprimentos de onda de excitação 370 nm e de emissão 440 nm). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência/mg de proteína (UA/mg proteína).
- **Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS):** Amostras de fígado ou rim (0,25 g) foram homogeneizadas em 1 mL de cloreto de potássio 1,15%. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 *g* por 10 min a 4 °C e os sobrenadantes utilizados para as análises. As amostras (plasma e sobrenadantes

de fígado e rim) foram desproteinizadas com ácido perclórico 10%, de acordo com Pilz *et al.* (2000). Os dienos, produtos finais de peroxidação lipídica, incluindo malondialdeído (MDA), foram determinados usando a reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (Kohn; Liversedge, 1944). Os níveis de TBARS foram determinados espectrofotometricamente a 535 nm (fígado e rim) ou fluorimetricamente (plasma) nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 510 nm e 553 nm, respectivamente. O equipamento utilizado para realizar a leitura espectrofotometricamente foi o leitor de microplacas PowerWave XS2 – BioTeK® e o equipamento utilizado para realizar a leitura fluorimetricamente foi o (leitor de microplacas Synergy H1– BioTeK®). Foi realizada uma curva analítica e o 1,1'3,3'- tetrametoxipropano foi utilizado como padrão. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ (plasma) e em nmol/g de tecido (fígado e rim).

- **Dosagem de proteínas totais:** As proteínas foram quantificadas no plasma e nos sobrenadantes dos tecidos (fígado e rim) de acordo com o método de Lowry *et al.* (1951), sendo realizadas diluições de 1:600 (plasma), 1:100 (rim) e 1:200 (fígado). Os resultados foram expressos como mg/mL de proteína.

4.2.3 Componentes relacionados aos sistemas antioxidantes

- **Atividade da enzima paraoxonase 1 (PON 1):** A atividade de PON 1 foi determinada no plasma via hidrólise do substrato paraoxon e liberação de *p*-nitrofenol, de acordo com Costa, L. *et al.* (1990) e modificações segundo Assis *et al.* (2017). O ensaio consiste de adição do plasma em tampão Tris-HCl (15 mM), pH 8,5, contendo 0,15 mM de CaCl_2 , 0,3 M de NaCl e 1,2 mM de paraoxon. O ensaio foi realizado a 37°C e iniciado pela adição de paraoxon. A atividade foi monitorada medindo-se a absorbância a 405 nm por 5 minutos. Os resultados foram calculados assumindo o coeficiente de extinção molar de *p*-nitrofenol ($18.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). A atividade da PON 1 foi expressa em unidades/litro (unidade= μmol paraoxon hidrolisado/min) (Costa, L. *et al.*, 1990; Richter; Jarvik; Furlong, 2008; Assis *et al.*, 2017).
- **Preparo das amostras de tecido:** amostras de 0,1 g de fígado ou rim foram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato 10 mM (pH 7,4) e centrifugadas a 10000 *g* durante 10 minutos à 4 °C para a obtenção do sobrenadante. O sobrenadante foi utilizado para as determinações da atividade da SOD, CAT e

GSH-Px descritas na sequência, essas sendo realizadas nas seguintes diluições para o fígado 1:50 (SOD,GSH-Px), 1:400 (CAT) e para o rim foram 1:25 (SOD), 1:200 (CAT) e 1:50 (GSH-Px).

- **Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD):** A atividade de SOD foi determinada de acordo com Beauchamp e Fridovich (1971), onde a oxidação da xantina gera o radical $O_2^{\cdot-}$ pela ação catalítica da xantina oxidase, o qual reduz o nitroblue tetrazolium (NBT) a uma formazana. Na presença de SOD ocorre inibição da redução do NBT, monitorada em 550 nm. Os resultados foram expressos como U/mg de proteína. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução do NBT em 50%.
- **Atividade da enzima catalase (CAT):** A atividade de CAT foi monitorada pelo consumo do H_2O_2 monitorado em 230 nm (Beers; Sizer, 1952). Os resultados foram expressos como mmol de H_2O_2 consumido/min/mg de proteína.
- **Atividade da enzima glutationala peroxidase (GSH-Px):** Determinou-se a atividade da GSH-Px de acordo com o método descrito por Rush e Scandiford (2003). A GSH-Px catalisa a oxidação de GSH na presença de H_2O_2 . Na presença de GSH-Rd, a GSSG é reduzida à GSH com oxidação concomitante do NADPH à $NADP^+$. A oxidação do NADPH é monitorada pela diminuição da absorbância em 340 nm. Os resultados foram expressos em mmol de NADPH consumido/min/mg de proteína.
- **Dosagem de proteínas totais:** As proteínas foram quantificadas no plasma e nos sobrenadantes dos tecidos (fígado e rim) de acordo com o método de Lowry *et al.* (1951), sendo realizado diluições de 1:600 (plasma), 1:100 (rim) e 1:200 (fígado).

4.3 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados passaram inicialmente por testes de normalidade e homogeneidade de variâncias. Posteriormente foram analisados via avaliação da variância Two- Way (ANOVA) para avaliação temporal da glicemia e One-way (ANOVA) para os demais parâmetros avaliados no estudo, seguida da análise de diferença pelo teste Student-Newman-Keuls, para comparações intergrupos. O teste t-Student foi utilizado para comparações intragrupo nos parâmetros relativos ao dia 0. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando GraphPad Prism® 6.0.

5. RESULTADOS

5.1 Parâmetros morfométricos e bioquímicos de animais diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia

Durante os 42 dias do experimento, todos os animais, independente do tratamento realizado, apresentaram uma taxa de ganho de peso corporal constante. No entanto, os animais tratados com insulina (DI4U) foram aqueles que tiveram a maior taxa de ganho de peso, em comparação aos demais grupos, deste modo os animais DI4U apresentaram valores semelhantes àqueles observados em animais normais, não diabéticos. Já os ratos diabéticos pertencentes aos grupos DMET, DP100, DMP25, DMP50 e DMP100 apresentaram as menores taxas de ganho de peso em comparação aos animais DI4U, com valores semelhantes à evolução de peso corporal dos animais diabéticos que não receberam tratamento (Tabela 1).

Tabela 1: Peso corporal de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia.

Peso corporal (g)								
Semanas de tratamento								
Grupos	0	1	2	3	4	5	6	Δ Peso (sem 6 – sem 0)
N	115,20 ± 3,22 (a)	129,70 ± 3,30 (a)	176,2 ± 6,76 (a)	204,6 ± 5,76 (a,b)	234,4 ± 4,96 (a,b,d)	261,4 ± 4,97 (a,b,d)	271,6 ± 3,94 (a,d)	156,40 ± 4,21 (a)
D	183,00 ± 3,44 (b,c,d)	210,80 ± 5,76 (b,c,d)	243,4 ± 8,79 (b,c,d)	248,4 ± 9,51 (a,b)	257,2 ± 7,56 (a,b,d)	257,1 ± 10,30 (a,b,d)	261,2 ± 6,96 (a,d)	78,20 ± 4,93 (b,d)
DI4U	186,42 ± 4,20 (b,c,d)	224,42 ± 4,11 (b,c,d)	273,08 ± 7,73 (b,c,d)	300,42 ± 9,53 (c)	328,58 ± 9,79 (c)	352,17 ± 9,76 (c)	363,17 ± 10,29 (c)	176,75 ± 8,49 (a, c)
DMET	186,33 ± 13,00 (b,c,d)	216,92 ± 13,99 (b,c,d)	246,67 ± 14,53 (b,c,d)	257,42 ± 17,08 (a,b,d)	268,08 ± 17,86 (a,b,c,d)	267,67 ± 15,92 (a,b,d)	274,17 ± 18,07 (a,d)	87,83 ± 8,25 (b,d)
DP100	189,58 ± 9,23 (b,c,d)	220,17 ± 10,30 (b,c,d)	252,33 ± 11,25 (b,c,d)	261,08 ± 10,59 (b,c,d)	275,50 ± 12,23 (a,b,c,d)	271,67 ± 14,94 (a,b,d)	282,33 ± 16,79 (a,d)	92,75 ± 15,08 (a,b,d)
DMP25	187,71 ± 1,95 (b,c,d)	217,86 ± 3,49 (b,c,d)	239,36 ± 3,32 (b,c,d)	250,71 ± 3,57 (b,d)	269 ± 5,06 (b,d)	265,71 ± 7,39 (a,b,d)	285,14 ± 5,98 (a,b)	97,43 ± 5,29 (b,d)
DMP50	188,00 ± 5,40 (b,c,d)	217,75 ± 6,85 (b,c,d)	250,67 ± 10,32 (b,c,d)	259,17 ± 10,54 (b,c,d)	274,50 ± 13,85 (a,b,c,d)	274,58 ± 10,15 (a,b,d)	289,25 ± 13,72 (a,d)	101,25 ± 10,33 (b,d)
DMP100	188,67 ± 4,53 (b,c,d)	209,75 ± 4,98 (b,c,d)	233,92 ± 3,92 (b,d)	244,25 ± 4,97 (b,d)	249,25 ± 4,18 (a,b,d)	245,58 ± 8,77 (a,b,d)	251,5 ± 6,24 (a,d)	62,83 ± 7,53 (b,d)

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a=sem diferença estatística do grupo N; b=sem diferença estatística do grupo D; c=sem diferença estatística do grupo DI4U; d=sem diferença estatística do grupo DMP100; letras iguais sem diferença estatística entre os grupos da mesma coluna (semana). **Fonte:** Autoria próprio.

Todos os grupos de animais diabéticos, independente do tratamento, apresentaram valores médios de peso corporal semelhantes ao grupo D, durante as duas primeiras semanas de experimento. A partir da 3ª semana de tratamento, os animais diabéticos que foram tratados com 4U/dia de insulina passaram a apresentar um ganho de peso corporal maior em relação aos demais grupos, sendo, a partir desse ponto, o grupo de animais com o maior valor médio de peso corporal, enquanto os demais grupos de animais diabéticos (D, DMET, DP100, DMP25, DMP50 e

DMP100) apresentaram menores valores de peso corporal quando comparados ao grupo DI4U.

No decorrer das semanas experimentais, todos os animais, independente do tratamento, continuaram ganhando peso corporal; animais diabéticos tratados com insulina apresentaram maiores valores de peso corporal em relação aos ratos diabéticos não tratados, até a última semana. Na última semana, foram observadas as seguintes alterações nos valores de peso corporal de cada grupo constituído de ratos diabéticos tratados, em comparação aos ratos diabéticos não tratados (grupo D): (i) o grupo DI4U apresentou um aumento de 39%; (ii) o grupo DMET teve um ganho de 5%; (iii) o DP100 apresentou um ganho de 8%; (iv) os grupos DMP25 e DMP50 demonstraram aumentos no ganho de peso de 9% e 11%, respectivamente; (v) o grupo DMP100 apresentou uma redução de 4% no peso corporal, contudo, exceto pelo grupo DI4U os demais grupos diabéticos não apresentaram diferença estatística do grupo D em nenhuma das semanas experimentais.

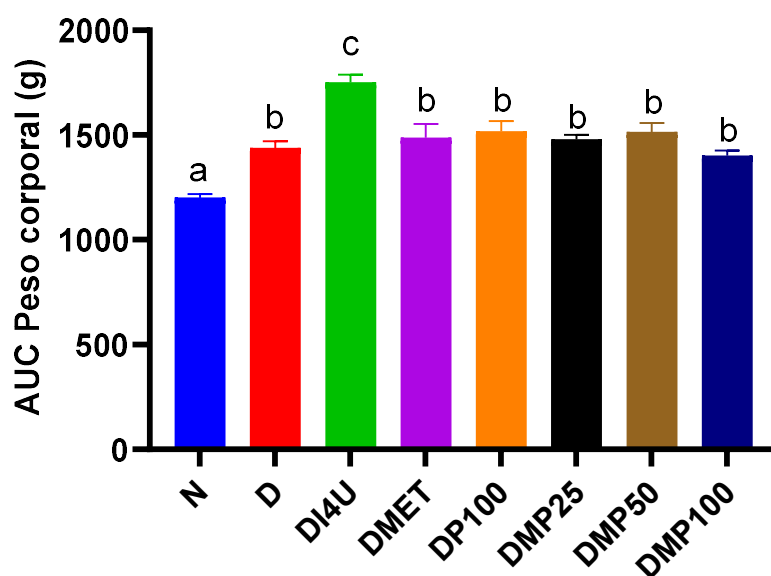
Animais diabéticos tratados com 100 mg/kg de pentoxifilina + 250 mg/kg de metformina obtiveram menor ganho de peso corporal quando comparados aos ratos dos grupos DMP25 e DMP50, sendo observado uma redução de 12% e 13% respectivamente.

Ao se observar a variação de ganho de peso dos animais (Δ peso), pode-se verificar que o grupo D apresentou uma redução de 50% quando comparado ao grupo N. Ratos diabéticos tratados com insulina foram os únicos animais que apresentaram valores de Δ peso próximos aos animais não diabéticos. Os demais grupos de ratos diabéticos tratados (DMET, DP100, DMP25, DMP50, DMP100) apresentaram valores de Δ peso similares aos ratos D.

Por fim, foi estimada a área sob a curva (AUC) referente ao peso corporal dos animais ao longo das semanas de tratamento (figura 07). O grupo DI4U apresentou um aumento na AUC do peso corporal (22%) em relação ao grupo D, exibindo a maior AUC de peso corporal entre os grupos experimentais, isso ocorre pois a área sob a curva se refere à área total que está contida sob a curva que representa a variação do peso ao longo do tempo, sendo mais abrangente, deste modo, mesmo o grupo DI4U apresentando um ganho de peso proporcional similar ao grupo N, por atingir pesos maiores até o final do experimento isso reflete em uma AUC maior no DI4U se comparado ao N.

Os demais grupos não apresentaram diferenças em relação aos valores de AUC do peso corporal quando comparados aos animais diabéticos do grupo D, bem como quando comparados a AUC entre si.

Figura 07: Área sob a curva (AUC) do peso corporal de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, ao longo de 42 dias de experimento.



Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a= sem diferença estatística do grupo N; b= sem diferença estatística do grupo D; c= sem diferença estatística do grupo DI4U; letras iguais sem diferença entre os grupos. **Fonte:** Autoria próprio.

Na tabela 2 estão apresentados os valores médios das massas dos órgãos (fígado e rim) dos animais de cada grupo experimental, após os 42 dias de tratamentos com insulina, metformina e pentoxifilina, isolados ou em terapia combinada.

Tabela 2: Massas dos órgãos (fígado e rins) de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia.

Grupo	N	D	DI4U	DMET	DP100	DMP25	DMP50	DMP100
Peso total (g)								
Fígado	10,149 ± 0,347	11,927 ± 0,582	14,271 ± 0,894	12,756 ± 0,919	12,511 ± 0,783	12,536 ± 0,277	12,992 ± 0,813	11,299 ± 0,671
Rim	2,104 ± 0,087	3,082 ± 0,192	3,133 ± 0,058	2,994 ± 0,160	3,216 ± 0,115	3,100 ± 0,061	3,180 ± 0,208	2,854 ± 0,163
Relação entre peso do órgão/peso corporal (g)								
Fígado	0,037 ± 0,001 (a)	0,046 ± 0,001 (b)	0,039 ± 0,002 (a)	0,046 ± 0,001 (b)	0,044 ± 0,002 (b)	0,044 ± 0,0005 (b)	0,045 ± 0,001 (b)	0,045 ± 0,002 (b)
Rim	0,008 ± 0,0002 (a)	0,012 ± 0,0005 (b)	0,009 ± 0,0001 (a)	0,011 ± 0,0003 (b)	0,011 ± 0,0005 (b)	0,011 ± 0,0003 (b)	0,011 ± 0,0004 (b)	0,011 ± 0,0005 (b)

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a= sem diferença estatística do grupo N; b= sem diferença estatística do grupo D; letras iguais sem diferença entre os grupos. **Fonte:** Autoria próprio.

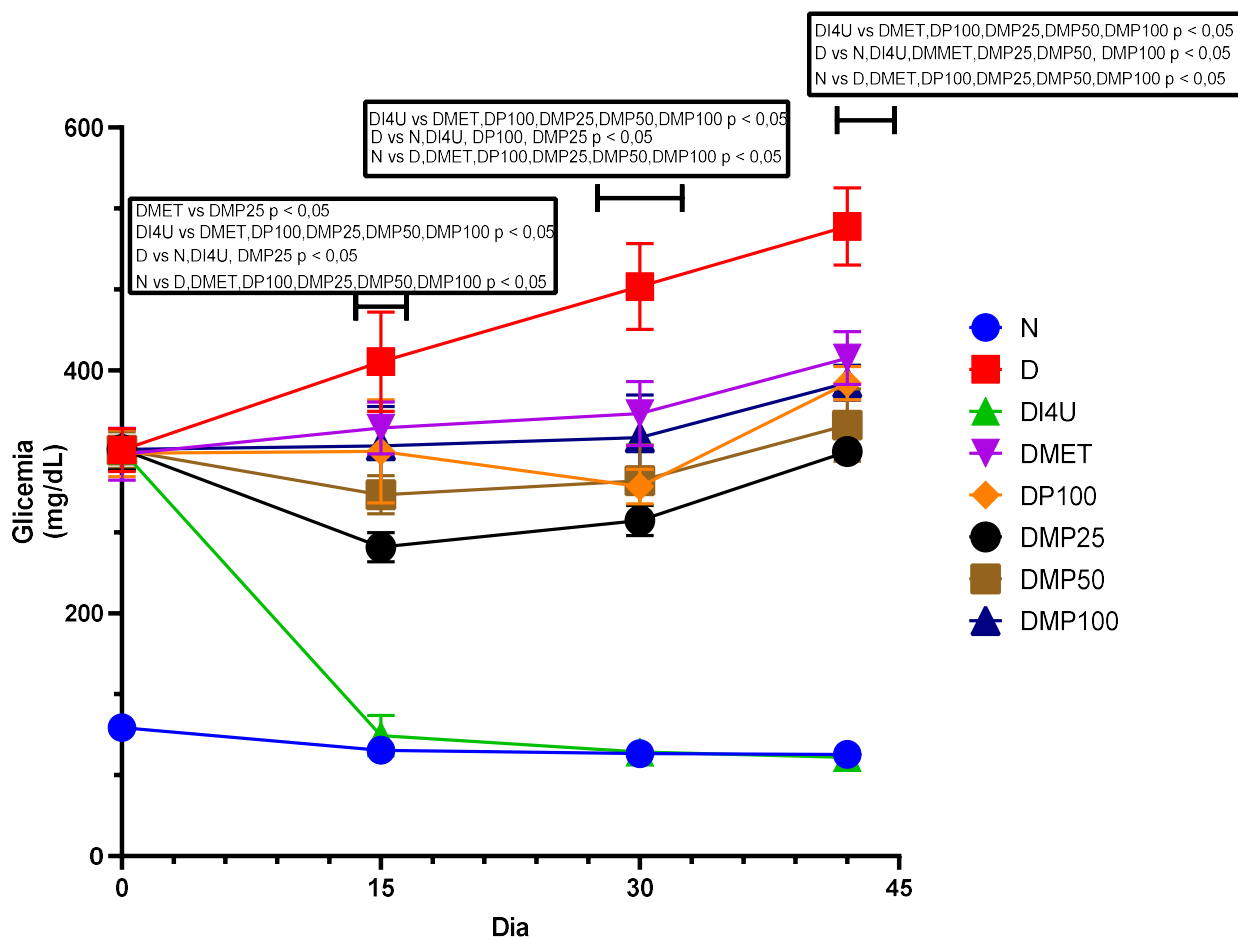
Todos os animais diabéticos, independentemente do tratamento que receberam, apresentaram um aumento nas massas de fígado, quando comparados aos valores encontrados nos ratos normais (N). Quando comparado as massas de fígado corrigidas pelo peso corporal dos animais N e D, nota-se um aumento de 24% na razão fígado/peso corporal nos animais diabéticos. Ao analisar o grupo DI4U, pode-se observar que a massa do fígado corrigida pelo peso corporal é semelhante ao grupo normal, não diabético. Os animais diabéticos tratados com metformina e/ou pentoxifilina (25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg) não apresentaram diferença nas massas de fígado quando comparados aos ratos diabéticos não tratados. Entre os grupos experimentais, os animais em insulino terapia foram aqueles com menor massa de fígado, sendo possível observar uma redução de 15% quando comparado aos animais diabéticos não tratados.

Todos os ratos diabéticos (D, DMET, DP100, DMP25, DMP50, DMP100) demonstraram ter aumento no peso dos rins, quando comparados aos valores em ratos não diabéticos, sendo um aumento de aproximadamente 50% no grupo D quando

comparado ao grupo N, e de aproximadamente 38% nos grupos DMET, DMP25, DMP50, DMP100 quando comparados ao grupo N. Contudo, não foram observadas diferenças nas massas de rins de animais diabéticos na comparação entre os grupos D, DMET, DP100, DMP25, DMP50, DMP100. O único grupo a não apresentar tal aumento na massa de rim foi o grupo DI4U.

Na figura 08 estão representados os valores médios de glicemia dos animais, desde o dia 0 (pareamento) até o dia 42 (último dia de tratamento). A determinação da glicemia foi realizada nos dias 0, 15, 30 e 42 de tratamento.

Figura 08: Níveis plasmáticos de glicose de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.



Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. **Fonte:** Autoria próprio.

Pode-se confirmar um aumento significativo na glicemia dos animais que foram submetidos ao sistema-modelo *in vivo* de DM, via administração de STZ, quando comparados aos animais que não receberam o fármaco diabetogênico, assim confirmando o estabelecimento de um quadro de hiperglicemia associado ao DM experimental.

Animais do grupo N apresentaram valores de glicemia constantes durante os 42 dias de experimento, obtendo-se concentrações próximas a 80 mg/dL ao longo dos dias de experimento.

Ratos diabéticos não tratados (grupo D) apresentaram um aumento progressivo nos valores de glicemia, do dia 0 ao dia 42 de experimento, iniciando no dia 0 com valores médios de glicemia 155% maiores ($334,30 \pm 17,66$ mg/dL) em relação aos valores do grupo N ($131,31 \pm 7,56$ mg/dL). Ao final do experimento, a glicemia de ratos D alcançou valores que foram 497% maiores ($509,89 \pm 39,59$ mg/dL) que aqueles de animais normais (grupo N) ($83,74 \pm 5,26$ mg/dL), demonstrando uma evolução e o agravamento do quadro diabético em animais estriptozotocínicos não tratados.

A partir do dia 15 de experimento, animais diabéticos tratados com insulina alcançaram valores de glicemia semelhantes àqueles de animais normais, não diabéticos, com uma redução de aproximadamente 73% quando comparados aos animais diabéticos sem tratamento, no mesmo período.

Houve uma rápida queda nos níveis glicêmicos dos animais diabéticos tratados com insulina, do dia 0 ao dia 15, o que correspondeu a uma redução de 67%, posteriormente a glicemia se manteve em níveis similares até o último dia de experimento. Os valores de glicemia de animais do grupo DI4U, assim como o grupo N, se mantiveram mais baixos que os valores observados nos demais grupos, ao longo das semanas de experimento.

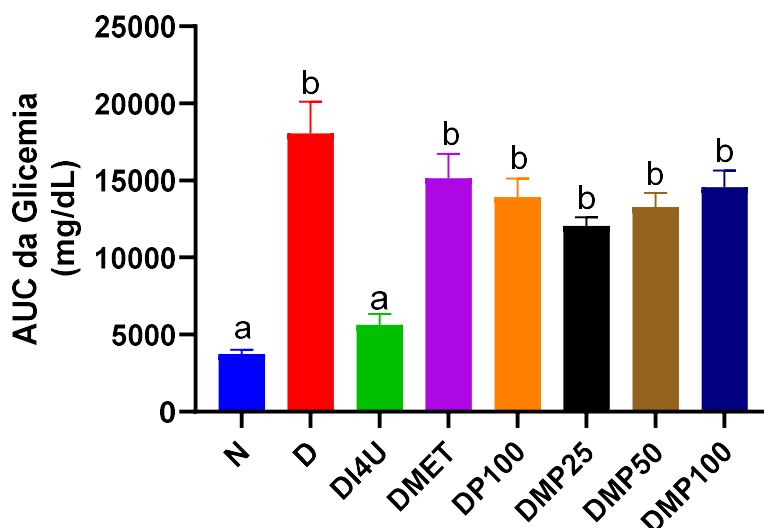
Em relação aos valores de glicemia de animais tratados com metformina, sozinha ou combinada com pentoxifilina, podemos observar que o melhor controle glicêmico foi alcançado nos ratos diabéticos tratados com 250 mg/kg de metformina + 25 mg/kg de pentoxifilina (grupo DMP25) e nos ratos diabéticos tratados com 250 mg/kg de metformina + 50 mg/kg de pentoxifilina (grupo DMP50): a partir do 15º dia de tratamento, os animais tratados com as terapias combinadas supracitadas

apresentaram reduções na glicemia de 38% e 27%, respectivamente, em comparação ao grupo D, e no 30º dia de tratamento tal redução foi de 41% para o grupo DMP25 e de 34% para o grupo DMP50.

Após 42 dias de experimento, ratos diabéticos tratados somente com metformina tiveram uma redução da glicemia de 20 %, em comparação aos ratos do grupo D, o grupo diabético tratado somente com pentoxifilina demonstrou uma redução de 17%. Com relação aos tratamentos combinados, ratos tratados com metformina + pentoxifilina nas doses 25 mg/kg, 50 mg/kg e 100 mg/kg tiveram diminuições nos valores de glicemia de 33%, 30% e 20%, respectivamente, quando esses grupos são comparados aos animais que compõem o grupo diabético sem tratamento.

Também foi estimada a área sob a curva (AUC) dos níveis glicêmicos dos ratos ao longo dos 42 dias de experimento, os resultados estão representados na figura 09. Podem-se observar maior valor de AUC da glicemia no grupo D, sendo 387% maior se comparado ao grupo N e 227% quando comparado ao grupo DI4U. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas nos valores de AUC da glicemia dos grupos DMET, DP100, DMP25, DMP50, DMP100 quando comparados ao grupo D.

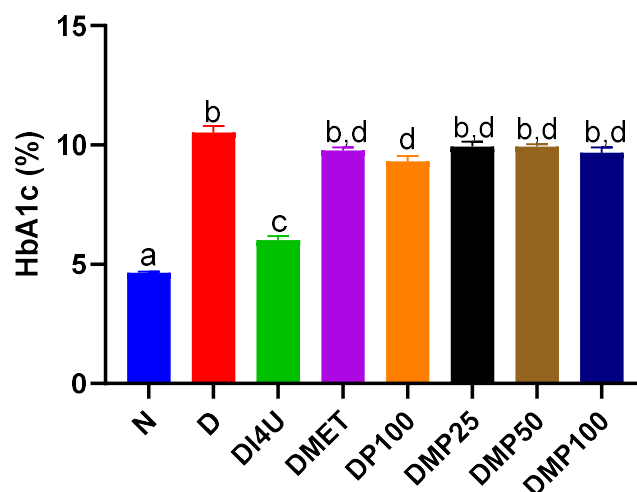
Figura 09: Área sob a curva (AUC) da glicemia de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, ao longo de 42 dias de experimento.



Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. A= sem diferença estatística do grupo N; b= sem diferença estatística do grupo D; letras iguais sem diferença entre os grupos. **Fonte:** Autoria próprio.

No último dia de experimento, além da retirada e pesagem dos órgãos, também foi realizada a coleta de sangue; esse sangue foi utilizado para a obtenção de plasma (utilizado para a análise de diversos marcadores bioquímicos) e parte do sangue foi separada para a determinação dos níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) e frutossamina nos animais normais e diabéticos não tratados ou tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, após 42 dias de tratamentos, onde os resultados estão demonstrados na figura 10 e 11.

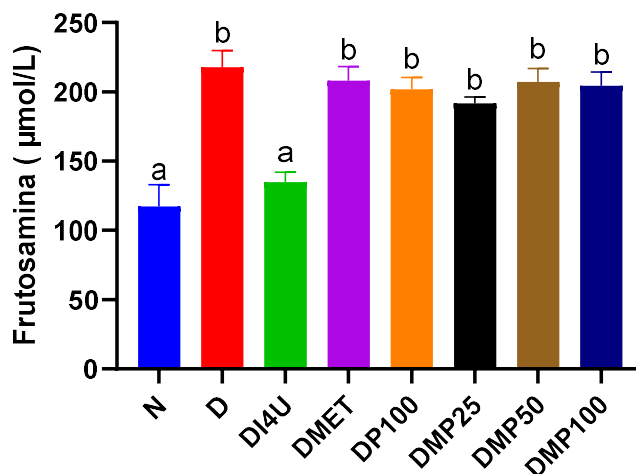
Figura 10: Níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.



Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. A = sem diferença estatística do grupo N; b = sem diferença estatística do grupo D; c = sem diferença estatística do grupo DI4U; d = sem diferença estatística do grupo DP100; letras iguais sem diferença entre os grupos. **Fonte:** Autoria próprio.

Observando a figura 10 pode-se identificar um aumento dos níveis de HbA1c nos D, DMET, DP100, DMP25, DMP50 e DMP100, estes grupos obtiveram um aumento de quase duas vezes quando comparados ao grupo N, onde o grupo diabético não tratado (D) apresentou um aumento de 127% nos níveis de HbA1c, quando comparado ao grupo de ratos normais, não diabéticos. Os animais diabéticos tratados com insulina apresentaram uma diminuição de 41% nos níveis de HbA1c, quando comparados aos animais do grupo D. Com relação aos grupos constituídos de ratos diabéticos submetidos aos tratamentos com metformina sozinha ou combinada com pentoxifilina, observamos que não houve diferenças nos valores de HbA1c, quando comparados aos animais do grupo D. Animais do grupo DP100 apresentaram uma redução de 12% quando comparado ao grupo D, entretanto, apresentou um valor 100% maior que o grupo N e 54% maior que o grupo DI4U.

Figura 11: Níveis de frutossamina de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.



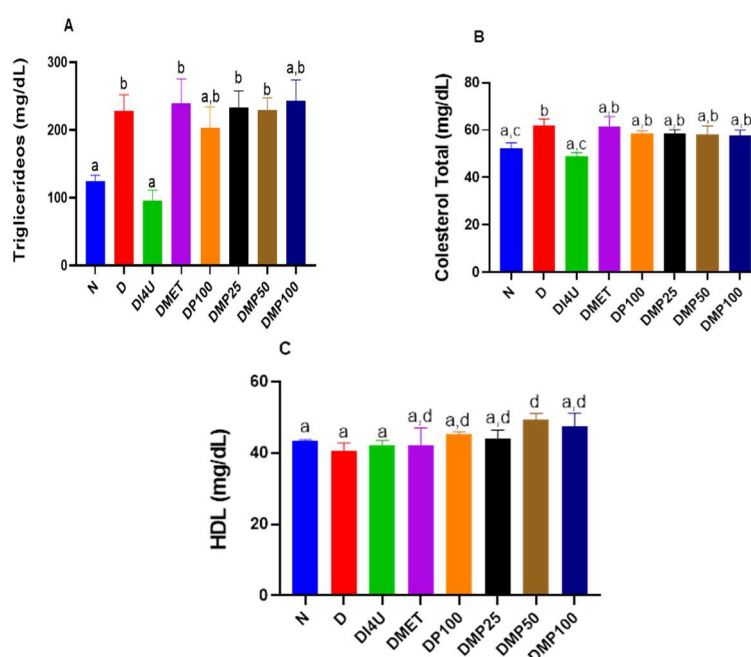
Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a = sem diferença estatística do grupo N; b = sem diferença estatística do grupo D; letras iguais sem diferença entre os grupos. **Fonte:** Autoria próprio.

Na figura 11 é possível observar um aumento nos níveis de frutossamina no plasma dos animais diabéticos, apresentando um aumento de 86% quando se compara o grupo D com o grupo N. Entre os tratamentos, aquele que demonstrou capacidade de reduzir os níveis de frutossamina a valores estatisticamente diferentes do grupo diabético não tratado foi o tratamento com a insulina, que promoveu uma redução de 38% quando comparado ao grupo diabético, os demais grupos de animais diabéticos tratados se mostraram com valores próximos ao do grupo D.

Na figura 12 é apresentado o perfil lipídico dos animais normais e diabéticos, tratados e não tratados, sendo as concentrações dos marcadores bioquímicos triglicerídeos (figura 12A), colesterol total (figura 12B) e colesterol-HDL (figura 12C). Foram observados aumentos de triglicerídeos e de colesterol total de, respectivamente, 84% e 19%, nos grupos diabéticos comparados aos ratos normais (figura 12A e figura 12B). O grupo DI4U foi o grupo que mais se aproximou dos valores do grupo N para ambos os marcadores, tendo uma redução quando comparado ao grupo D de 58% nos níveis de triglicerídeos e redução de 21% nos níveis de colesterol total. Em relação aos níveis de triglicerídeos (figura 12A) no plasma de ratos diabéticos submetidos aos demais tratamentos, os grupos DMET, DMP25, DMP50 demonstraram

valores próximos ao dos animais diabéticos sem tratamento, sendo os grupos DP100 e DMP100 similares estatisticamente tanto do grupo N quanto do grupo D. Com relação ao colesterol total (figura 12B), pode-se observar que todos os tratamentos se apresentaram diferentes estatisticamente do grupo tratado com 4U de insulina, ao mesmo tempo não demonstraram diferença tanto do grupo N quanto do grupo D. Por fim, a respeito dos níveis de HDL-colesterol (figura 12C) não se observou diferença entre os animais diabéticos não tratados e animais não diabéticos, e entre os tratamentos apenas o grupo DMP50 não se assemelha estatisticamente do grupo N, sendo o grupo DMP50 diferente dos grupos D e DI4U também, esse grupo demonstrou um pequeno aumento de 21% quando comparado ao grupo N.

Figura 12: Níveis plasmáticos de triglicerídeos, colesterol total e colesterol-HDL de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.

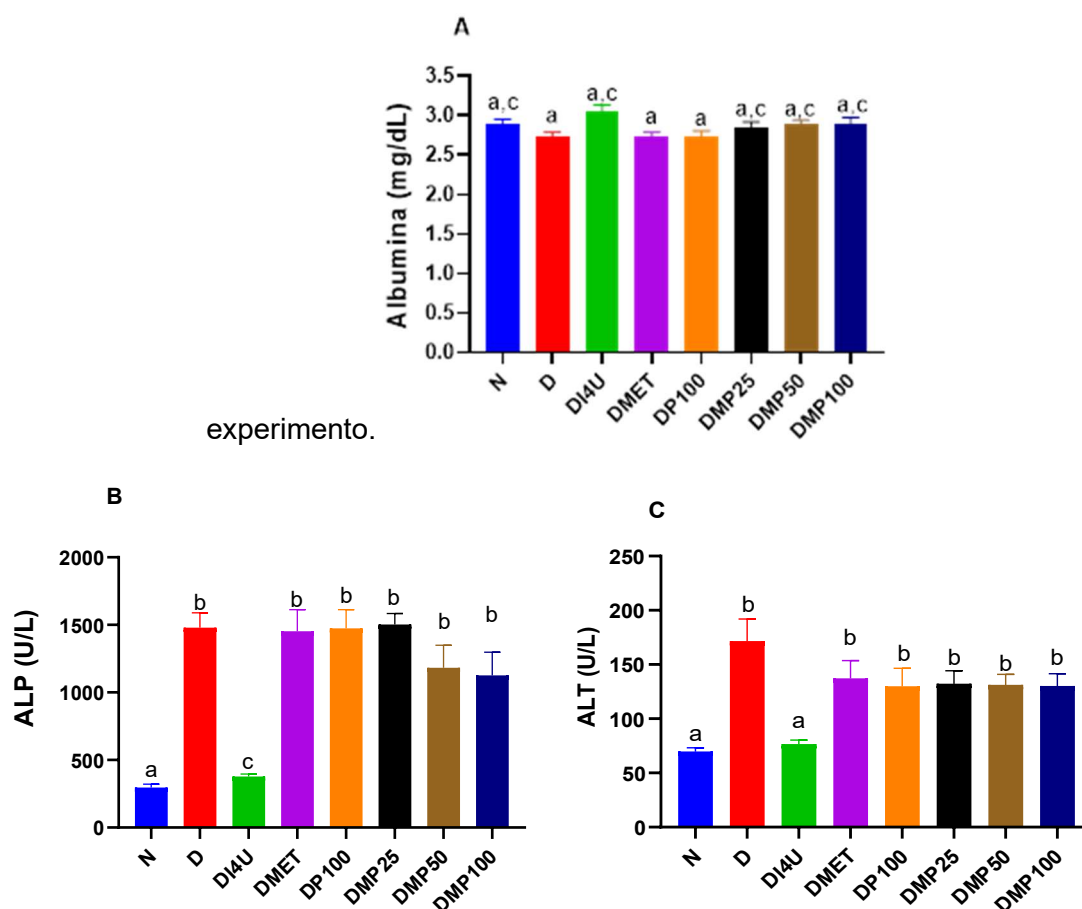


(A) triglicerídeos (mg/dL); (B) colesterol total (mg/dL); (C) colesterol-HDL (mg/dL). Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a= sem diferença estatística do grupo N; b= sem diferença estatística do grupo D; c= sem diferença estatística do grupo DI4U; d= sem diferença estatística do grupo DMP50; letras iguais sem diferença entre os grupos. **Fonte:** Autoria próprio.

Na figura 13 estão representados os níveis plasmáticos de albumina (figura 13A), ALP (figura 13B) e ALT (figura 13C). Primeiramente, ao se observar os níveis de albumina (figura 13A), todos os grupos se apresentaram com valores próximos aos do grupo N, assim sendo estatisticamente iguais, sendo as únicas diferenças observadas a dos grupos D, DMET e DP100 com o grupo DI4U, sendo essa diferença de, em média, aproximadamente 10% menores.

Sobre os níveis de ALP (figura 13B), se pode observar um grande aumento nos seus níveis nos grupos diabéticos, sendo o grupo D com valores 399% maiores do que aqueles encontrados no grupo dos ratos não diabéticos. Entre os grupos tratados, aquele com os menores níveis de ALP no plasma foi o grupo DI4U, com níveis próximos ao grupo N, tendo uma redução de 74% se comparado ao grupo D. Os grupos DMP50 e DMP100, mesmo demonstrando uma tendência em ter menores níveis da ALP, eles não se apresentaram estatisticamente diferentes do grupo D. Adicionalmente, os níveis de ALT (figura 13C) se encontram maiores nos grupos de animais diabéticos tratados e não tratados, sendo o DI4U a única exceção; o grupo D quando comparado ao grupo N apresentou um aumento de 147%, seguido pelos grupos DMET, DP100, DMP25, DMP50 e DMP100, que apresentaram um aumento de, em média, 90%.

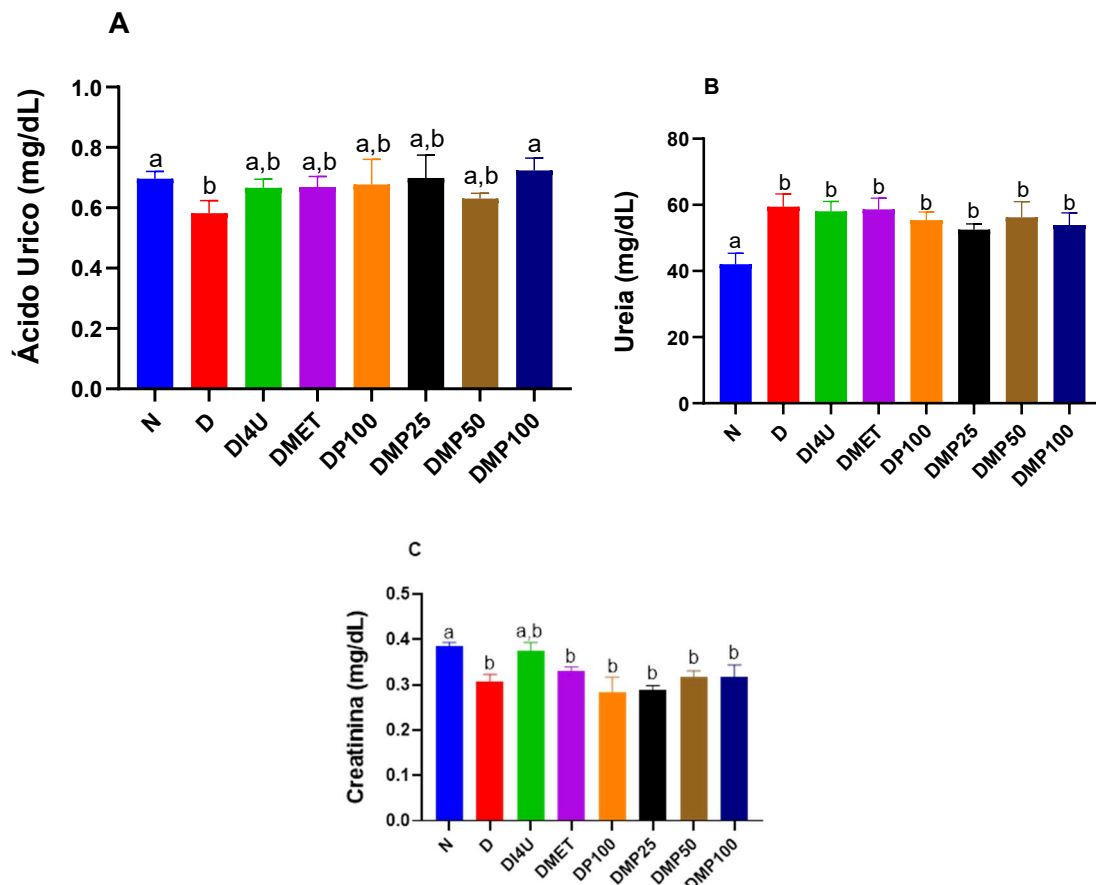
Figura 13: Níveis plasmáticos de albumina, fosfatase alcalina (ALP) e alanina aminotransferase (ALT) de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de



(A) albumina (mg/dL); **(B)** ALP (U/L); **(C)** ALT (U/L). Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a = sem diferença estatística do grupo N; b = sem diferença estatística do grupo D; c = sem diferença estatística do grupo DI4U; letras iguais sem diferença entre os grupos. **Fonte:** Autoria próprio.

Na figura 14 estão representados os resultados referentes aos níveis plasmáticos de ácido úrico (figura 14A), ureia (figura 14B) e creatinina (figura 14C).

Figura 14: Níveis plasmáticos de ácido úrico, ureia e creatinina de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.



(A) ácido úrico (mg/dL); (B) ureia (mg/dL); (C) creatinina (mg/dL). Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a = sem diferença estatística do grupo N; b = sem diferença estatística do grupo D; c = sem diferença estatística do grupo DI4U; letras iguais sem diferença entre os grupos. **Fonte:** Autoria próprio.

Na figura 14A foi possível observar uma redução nos níveis plasmáticos de ácido úrico em animais do grupo D quando comparado ao grupo de animais normais, sendo uma redução de 17%. Ao mesmo tempo os grupos de animais tratados, com exceção do DMP100, não demonstraram diferenças, tanto do grupo N quanto do grupo D, com relação ao grupo DMP100 ele foi o único tratamento que foi capaz de manter os valores diferentes do grupo D, sendo 25% maior.

Avaliando a figura 14B observou-se um aumento na concentração de ureia no plasma dos ratos diabéticos não tratados e tratados, esse aumento foi de aproximadamente 41% quando comparado ao grupo N. Todos os tratamentos não demonstraram a capacidade de reduzir a ureia no plasma dos animais a níveis estatisticamente diferentes do grupo diabético sem tratamento.

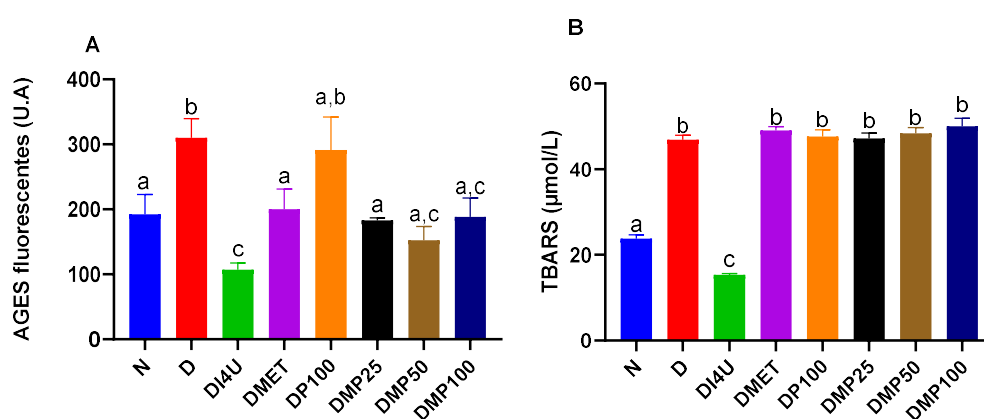
Quando avaliados os níveis plasmáticos de creatinina (figura 14C) se identificou uma redução desse marcador no plasma dos ratos diabéticos não tratados e tratados, sendo o grupo DI4U o único que não apresentou diferença tanto do grupo N quanto do grupo D. Os demais grupos tiveram uma redução de aproximadamente 20% quando comparados ao grupo de ratos não diabéticos.

5.2 Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo

5.2.1 Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo no plasma

Foram avaliados no plasma os seguintes marcadores de estresse glico-oxidativo: AGEs fluorescentes (marcadores de glicação avançada) e TBARS (marcadores de peroxidação lipídica). Os resultados estão apresentados na figura 15.

Figura 15: Níveis de AGEs fluorescentes e de TBARS em plasma de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.



(A) AGEs fluorescentes (U.A); (B) TBARS (μmol/L). Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a = sem diferença estatística do grupo N; b = sem diferença estatística do grupo D; c = sem diferença estatística do grupo DI4U; letras iguais sem diferença entre os grupos. **Fonte:** Autoria próprio.

Os animais do grupo D apresentaram um aumento de 61% nos níveis

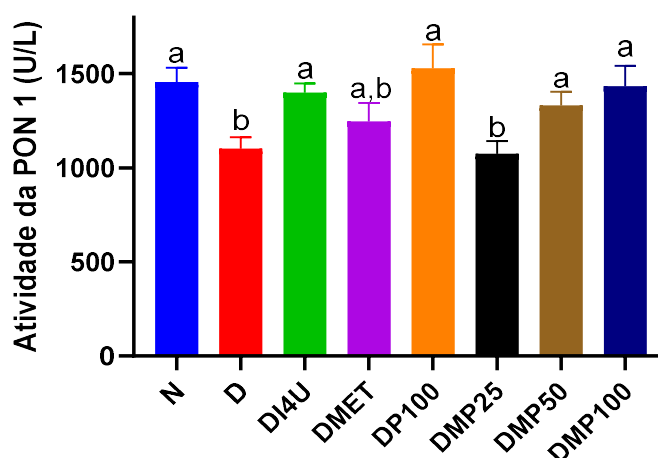
plasmáticos de AGEs fluorescentes (Figura 15A) quando comparados aos animais do grupo N. Ratos diabéticos tratados com insulina apresentaram uma redução de 65% nos níveis plasmáticos de AGEs fluorescentes, quando comparados aos ratos diabéticos não tratados. Em relação aos impactos dos tratamentos de ratos diabéticos com metformina sozinha ou combinada com pentoxifilina, as terapias com as melhores capacidades de redução nos níveis plasmáticos de AGEs fluorescentes foram as seguintes: metformina sozinha, a qual promoveu uma redução de 35% e metformina+pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, as quais promoveram diminuições de 41%, 51% e 39%, respectivamente, quando comparados aos ratos diabéticos não tratados.

Quando avaliados os níveis plasmáticos de TBARS (Figura 15B), observamos que os ratos diabéticos sem tratamento (grupo D) apresentaram um aumento nos níveis de TBARS de aproximadamente 97%, quando comparados aos animais não diabéticos (grupo N). Com relação ao grupo DI4U, ao ser comparado ao grupo D, pode-se observar uma redução de aproximadamente 67% nos níveis plasmáticos de TBARS. Não foram observadas diferenças nos níveis plasmáticos de TBARS quando comparados os valores dos grupos DMET, DP100, DMP25, DMP50, DMP100 *versus* grupo D.

Na figura 16 estão representados os valores médios referentes à atividade da enzima paroxonase 1 (PON1) no plasma de ratos não diabéticos, diabético não tratado e os diabéticos tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.

Figura 16: Atividade da enzima PON 1 em plasma de ratos normais e ratos diabéticos não

tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.



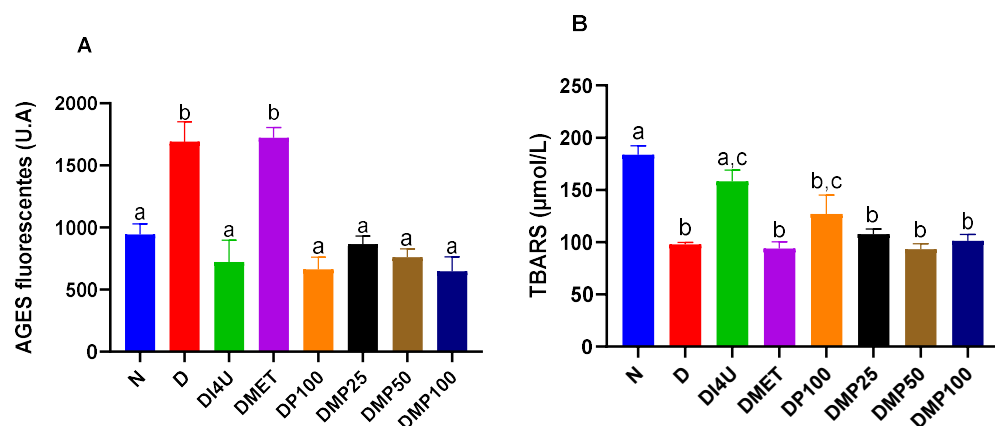
Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. A= sem diferença estatística do grupo N; b= sem diferença estatística do grupo D; letras iguais sem diferença entre os grupos. **Fonte:** Autoria próprio.

Houve uma redução de 24% na atividade da PON1 em plasma de ratos diabéticos do grupo D em relação aos ratos normais, do grupo N. O tratamento com metformina combinada com 25 mg/kg de pentoxifilina foi o único a não conseguir recuperar a atividade da PON1 em plasma de ratos diabéticos, demonstrando uma redução de aproximadamente 26 % quando comparado aos grupos N e 30% quando comparado ao DP100. Os demais tratamentos (conduzidos nos grupos DI4U, DP100, DMP50, DMP100) demonstraram capacidade de elevar a atividade da enzima PON1 em plasma de ratos diabéticos, para valores próximos àqueles observados em ratos normais. Os grupos que mais se destacaram em termos de elevação da atividade de PON1 foram os grupos DP100, DMP100, DI4U e DMP50, pois conservaram quase que totalmente a atividade da enzima em plasma de ratos diabéticos, indicando um aumento de atividade de 39%, 30%, 27% e 21% respectivamente quando comparado ao grupo D.

5.2.2 Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo no fígado

Foram avaliados, no fígado, os níveis de AGEs fluorescentes e de TBARS após 42 dias de experimento; os resultados estão apresentados na figura 17.

Figura 17: Níveis de AGEs fluorescentes e de TBARS em fígado de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.



(A) AGEs fluorescentes (U.A); **(B)** TBARS ($\mu\text{mol/L}$). Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a= sem diferença estatística do grupo N; b= sem diferença estatística do grupo D; c= sem diferença estatística do grupo DP100; letras iguais sem diferença entre os grupos.

Fonte: Autoria próprio.

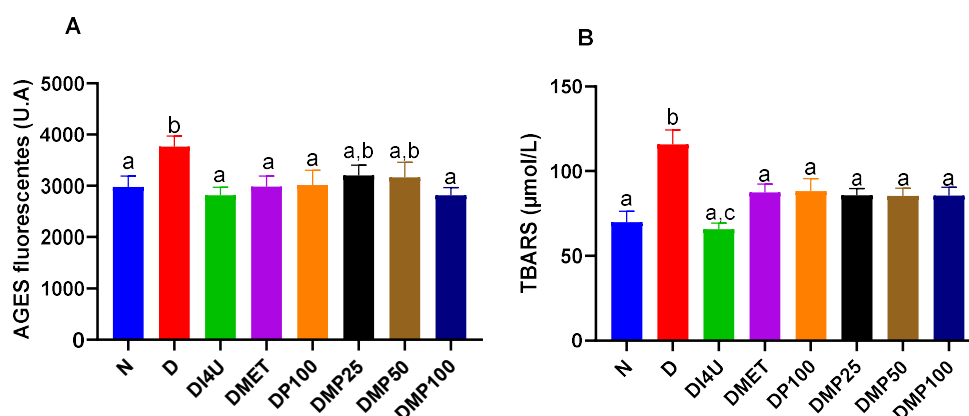
Ao avaliar os níveis de AGEs fluorescentes no fígado (Figura 17A), pode ser observado um aumento de 79% em animais D, quando comparados com valores em fígado de animais N. Os ratos diabéticos em insulino terapia foram capazes de manter uma concentração de AGEs fluorescentes no fígado próxima aos valores de ratos normais, tendo uma redução de 57% se comparado aos valores de animais diabéticos do grupo D. Dentre os tratamentos conduzidos o grupo DMET foi o único que não reduziu os níveis de AGEs no fígado. As terapias com metformina + 100 mg/kg de pentoxifilina e 100 mg/kg de pentoxifilina foram as que mais reduziram os níveis de AGEs, com reduções de 62% e 61% respectivamente em relação ao grupo D. Todos os tratamentos, exceto o DMET, não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre si.

Quando avaliados os níveis hepáticos de TBARS (Figura 17B), interessantemente, observou-se uma diminuição de 47% nos níveis de TBARS em fígado de animais do grupo D quando comparados ao grupo N. Ademais, todos os grupos constituídos de animais diabéticos tratados apresentaram níveis baixos de TBARS no fígado, com exceção do grupo DI4U, o qual apresentou um aumento de 62%, quando comparados aos ratos diabéticos sem tratamento (grupo D). O grupo DP100 se apresentou ligeiramente maior em termos de níveis de TBARS, com um aumento de 30%, porém essa diferença com o grupo D não foi estatisticamente significativa.

5.2.3 Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo no rim

Foram avaliados os níveis de AGEs fluorescentes e de TBARS nos rins de ratos normais e diabéticos não tratados ou tratados aos longo de 42 dias, eos resultados estão apresentados na figura 18.

Figura 18: Níveis de AGEs fluorescentes e de TBARS em rins de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.



(A) AGEs fluorescentes (U.A); **(B)** TBARS (μmol/L). Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a= sem diferença estatística do grupo N; b= sem diferença estatística do grupo D; c= sem diferença estatística do grupo DI4U; letras iguais sem diferença entre os grupos. **Fonte:** Autoria próprio.

Avaliando os níveis de AGEs fluorescentes nos rins (Figura 18A), pode-se

observar que o grupo D apresentou um aumento de 26% quando comparados ao grupo N. Os animais diabéticos tratados com insulina apresentaram uma diminuição de 25% nos níveis renais de AGEs em relação aos valores encontrados em ratos diabéticos não tratados, sendo similar ao valor observado no grupo N. Ao observar os efeitos da terapia isolada de metformina, terapia isolada de pentoxifilina e combinada entre metformina + pentoxifilina, os grupos DMET, DP100 e DMP100 foram os que demonstraram efeito redutor nos níveis de AGEs nos rins de ratos diabéticos, sendo esta redução de respectivamente 21%, 20% e 25%, e tendo eficácia próxima ao tratamento padrão de insulina 4U/dia.

Quando avaliados os níveis de TBARS nos rins (Figura 18B), pode-se observar um aumento de 66% nos níveis de TBARS nos animais diabéticos não tratados (grupo D) quando comparados aos animais normais (grupo N). Os animais diabéticos tratados com insulina apresentaram diminuição de 43% nos níveis renais de TBARS quando comparados aos ratos diabéticos não tratados. O grupo DI4U reduziu 43% os níveis de TBARS no órgão quando comparado ao grupo D. Com relação aos outros tratamentos, eles foram capazes de diminuir, em média aproximadamente 26%, os níveis renais de TBARS em ratos diabéticos quando se comparou como o grupo D.

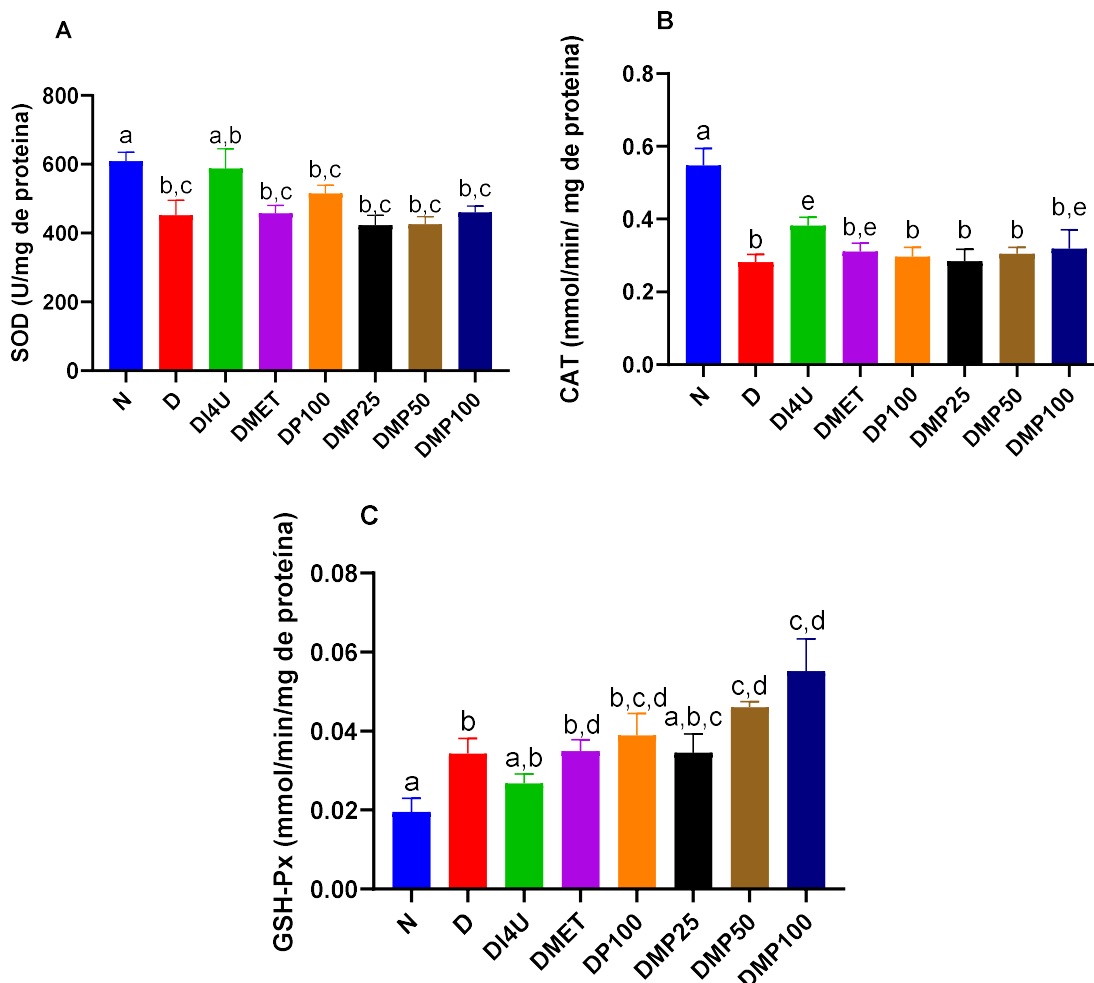
5.3 Biomarcadores dos sistemas antioxidantes

5.3.1 Biomarcadores dos sistemas antioxidantes no fígado

Foram analisadas as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px no tecido hepático de ratos normais e diabéticos não tratados ou tratados ao longo de 42 dias, os resultados dos testes estão representados na figura 19.

Figura 19: Atividade das enzimas antioxidantes em fígado de ratos normais e ratos

diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.



(A) Superóxido dismutase (SOD; U/mg de proteína); **(B)** Catalase (CAT; mmol/min/mg de proteína); **(C)** Glutaciona peroxidase (GSH-Px; mmol/min/mg proteína). Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a= sem diferença estatística do grupo N; b= sem diferença estatística do grupo D; c= sem diferença estatística do grupo DMP50; d= sem diferença estatística do grupo DMP100; e= sem diferença estatística do grupo DI4U; letras iguais sem diferença estatística entre os grupos. **Fonte:** Autoria próprio.

Quando observado a atividade da SOD no fígado (Figura 19A), pode-se identificar que o grupo D apresentou uma redução de 26% na atividade desta enzima em relação ao grupo N. Entre os tratamentos avaliados, apenas o tratamento com a insulina na dose de 4U/dia apresentou valores semelhantes àqueles encontrados no grupo N. Contudo, mesmo sendo possível observar uma possível capacidade de

aumentar a atividade da enzima SOD no fígado de ratos diabéticos a níveis próximos aos ratos não diabéticos, este tratamento ainda apresenta valores estatisticamente semelhantes ao grupo D. Os demais tratamentos com metformina e/ou pentoxifilina não foram capazes de aumentar a atividade de SOD em fígado de ratos diabéticos, quando comparados aos animais diabéticos não tratados.

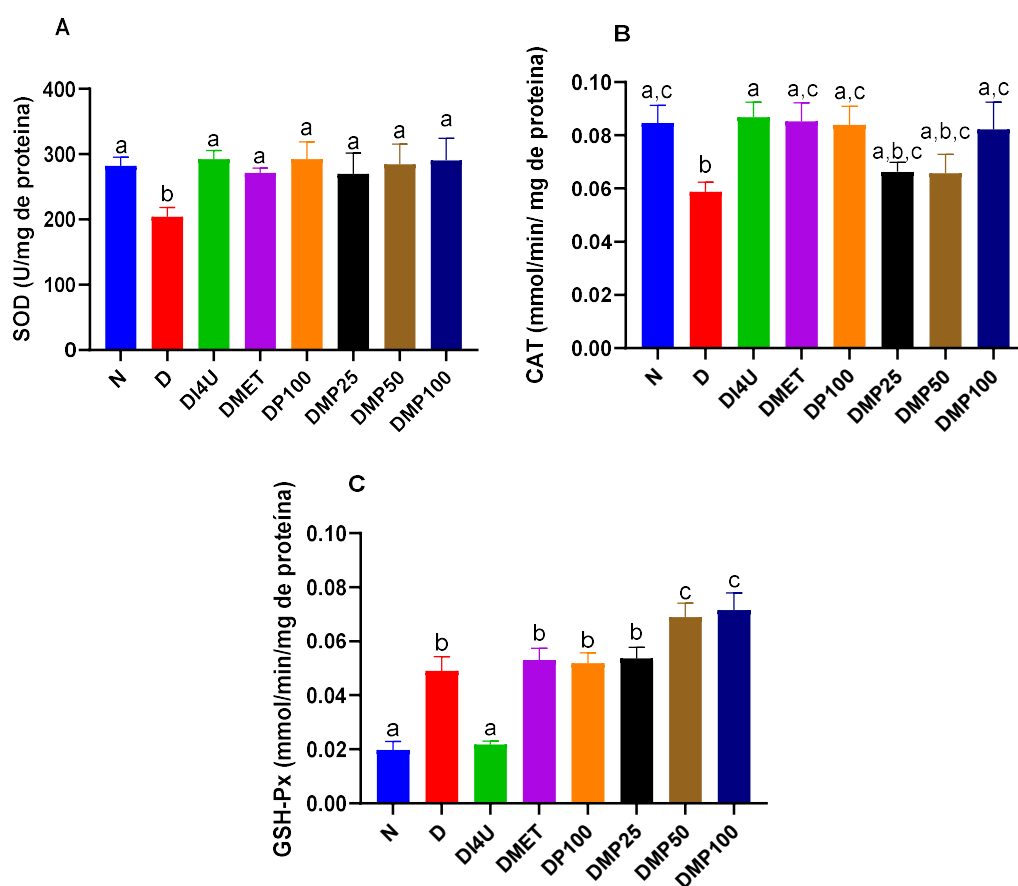
Com relação à atividade da enzima CAT no fígado (Figura 19B), pode-se observar um perfil similar ao que ocorreu com a SOD: quando comparado ao grupo de animais não diabéticos, os animais diabéticos não tratados apresentaram uma redução na atividade da CAT no fígado de 49%. O grupo tratado DI4U foi o único que apresentou uma maior atividade hepática da CAT entre os grupos de animais tratados, tendo uma atividade 35% maior em relação àquela observada no grupo D. Entre os outros tratamentos, apenas os grupos DMET e DMP100 não apresentaram diferença estatística do grupo insulina. Por outro lado, todos os grupos tratados, exceto DI4U, não demonstraram ser diferentes estatisticamente do grupo D.

Em relação à atividade da enzima GSH-Px no fígado (Figura 19C), pode-se observar um aumento na atividade da enzima de todos os grupos constituídos de ratos diabéticos, em comparação ao N. Um ponto a se destacar é o aumento acentuado na atividade de GSH-Px no fígado de animais tratados com metformina + pentoxifilina nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg, sendo esses aumentos, respectivamente, 34% e 61% maiores que os valores encontrados no grupo D, sendo apenas esses dois grupos diferentes estatisticamente dos grupos N e D. Entre os tratamentos isolados e combinados as terapias do grupo DMET e DMP50 foram os únicos grupos que demonstraram diferença entre si, tendo o grupo DMP50 um aumento de 32 % quando comparado ao grupo DMET.

5.3.2 Biomarcadores dos sistemas antioxidantes no rim

Por fim, as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px também foram avaliadas no tecido renal de ratos normais e diabéticos não tratados ou tratados ao longo de 42 dias, os resultados podem ser observados na figura 20.

Figura 20: Atividade das enzimas antioxidantes em rim de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, metformina e/ou pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia, após 42 dias de experimento.



(A) Superóxido dismutase (SOD; U/mg de proteína); **(B)** Catalase (CAT; mmol/min/mg de proteína); **(C)** Glutathione peroxidase (GSH-Px; mmol/min/mg proteína). Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a= sem diferença estatística do grupo N; b= sem diferença estatística do grupo D; c= sem diferença estatística do grupo DMP50; letras iguais sem diferença estatística entre os grupos. Fonte: Autoria próprio.

Em relação à atividade da SOD nos rins (Figura 20A), pode-se observar que os animais do grupo D apresentaram uma redução de 28% quando comparados aos animais grupo N. Todos os tratamentos foram capazes de aumentar a atividade da SOD em rins de ratos diabéticos, sendo a média do aumento da atividade e pelos tratamentos de 39% quando comparado ao grupo D, alcançando valores semelhantes aos observado em rins de ratos do grupo N.

Com relação a atividade da enzima CAT nos rins (Figura 20B), pode-se observar que o grupo de animais diabéticos não tratados, quando comparados aos animais normais, não diabéticos, apresentaram uma redução na atividade da CAT de 31%. Os grupos tratados DI4U, DMET, DP100 e DMP100 apresentaram atividades de CAT elevadas e bem próximas àquela observada no grupo de animais normais, sendo respectivamente, 48%, 45%, 43% e 40% maiores que aquela observada no grupo D. Já a atividade da CAT em rins de animais dos grupos DMP25 e DMP50 não foi diferente daquela do grupo D.

Sobre a atividade da enzima GSH-Px nos rins (Figura 20C), pode-se observar um aumento na atividade da enzima no grupo de D de 148% quando comparado aos animais não diabéticos. Ademais, pode-se observar que os grupos tratados com metformina combinada com pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg/dia ou apenas os fármacos metformina ou pentoxifilina isolados também demonstraram aumentos significativos na atividade da GSH-Px em rins, em comparação ao grupo N, sendo o grupo DI4U o único que não teve esse aumento na atividade enzimática e permaneceu semelhante ao perfil do grupo N. Outro ponto a se destacar é que, semelhante a essa enzima no fígado, a atividade da enzima GSH-Px nos rins de animais pertencentes aos grupos DMP50 e DMP100 apresentou um aumento ainda mais acentuado, sendo suas atividades, respectivamente, 41% e 46% maiores que aquela do grupo D. Ao se comparar as terapia combinada DMP50 com as terapias isoladas DMET e DP100 foi observado um aumento de 30% e 33% respectivamente, já ao comparar o grupo DMP100 com os mesmo grupos se observou um aumento de 35% e 38% respectivamente.

6. DISCUSSÃO

O modelo de DM experimental estreptozotocínico utilizado no presente estudo mimetizou algumas alterações fisiológicas e bioquímicas do DM tipo 1. Houve, por exemplo, um menor ganho de peso corporal nos animais diabéticos sem tratamento quando comparados aos ratos normais, não diabéticos, ou em relação aos ratos diabéticos tratados com 4U/dia de insulina. Outro ponto a ser destacado é o estabelecimento de um quadro de hiperglicemia nos ratos diabéticos, 3 dias após a administração de STZ.

A administração de STZ nos ratos é responsável pela indução de morte de células β pancreáticas, diminuindo drasticamente a capacidade de produção e secreção de insulina. Com a subsequente diminuição nos níveis circulantes de insulina, ocorre o surgimento de um quadro de hiperglicemia nos animais diabéticos, o que pode ser consequência da combinação de diversas alterações, destacando-se: (i) diminuição na velocidade de captação de glicose pelos tecidos que possuem o transportador de glicose GLUT 4 (em especial músculos esqueléticos, tecidos adiposos); (ii) aumento na velocidade de produção hepática de glicose, devido principalmente a aceleração dos processos glicogenólise e gliconeogênese.

Com o estabelecimento de um quadro de hiperglicemia crônica, as complicações observadas no DM, denominadas complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia, neuropatia diabéticas) e macrovasculares (cardiovasculares, isquemias vasculares periféricas ou centrais) são possíveis de serem notadas (Niedowicz; Daleke, 2005).

O menor ganho de peso corporal observado nos animais diabéticos possivelmente ocorreu devido à redução nos níveis circulantes de insulina, culminando em prejuízos nas respostas anabólicas em tecidos dependentes da ação deste hormônio. A insulina estimula os processos bioquímicos que fazem parte das vias de síntese de glicogênio, proteínas e lipídeos, assim como promove o armazenamento de triglicerídeos nos tecidos adiposos por meio da ativação da lipase lipoproteica (LpL), aumentando assim a captação de triglicerídeos de lipoproteínas plasmáticas. Ademais, com a drástica redução nos níveis de insulina em ratos diabéticos, vias catabólicas podem ser estimuladas; não haverá inibição na atividade da lipase hormônio sensível (LHS), a qual hidrolisa os triglicerídeos armazenados nos

tecidos adiposos, e com isso também pode ser observada uma diminuição nas massas de tecidos adiposos. Ademais, também pode ter ocorrido uma inibição na captação de glicose pelos adipócitos, reduzindo assim o substrato para a síntese de ácidos graxos e triglicerídeos. Juntamente com essas alterações, pode ter ocorrido um aumento na velocidade de degradação proteica associada com redução da síntese proteica em ratos diabéticos, ocasionando perda ou redução no ganho de massa muscular esquelética (Felig; Bergman, 1995; Hegele, 2016; Saltiel, 2021).

Através dos resultados apresentados nas tabelas 1 e 2, observa-se que, em uma condição em que há deficiência na capacidade de produção de insulina, o uso de uma terapia com insulina exógena é eficiente na conservação das massas dos tecidos e consequentemente favorece o ganho de peso corporal, possivelmente por sua ação em estimular vias bioquímicas anabólicas em paralelo à inibição de processos bioquímicos catabólicos.

Em outros trabalhos realizados anteriormente no laboratório, foi observado um comportamento semelhante, onde o tratamento de ratos diabéticos com a insulina causou um maior ganho de peso corporal (Roxo *et al.*, 2019; Figueiredo *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2020).

Em contrapartida, avaliando os demais resultados (Tabela 1), não foram observadas diferenças entre as terapias utilizando metformina e/ou pentoxifilina, de forma isolada ou utilizando uma estratégia de terapia combinada, na promoção de melhorias no ganho de peso corporal. Deste modo, pode-se supor que, em relação ao aumento do ganho de massa corporal ou à capacidade de inibição da perda de massa corporal, a estratégia de terapia combinada entre metformina e pentoxifilina não causou benefícios, e o seu uso se justifica caso demonstre efeitos em outros parâmetros além do peso corporal. Contudo, em relação a segurança da pentoxifilina, é importante ressaltar que ela é considerada um fármaco seguro, sendo em circunstâncias raras não prescrita. No entanto, seu monitoramento em termos de segurança é indicado quando está sendo utilizada por pacientes em hemodiálise crônica (Silver; Kroboth, 1987). Sobre as doses de pentoxifilina, em humanos se considera dose terapêutica concentrações entre 0,06 a 5,4 µg/mL, e dose letal variando de 8,7 a 51 µg/mL (Baselt, 2014; Molina; Hargrove, 2019;).

Em trabalhos anteriores realizados no nosso laboratório por Roxo *et al.* (2019) e Figueiredo *et al.* (2020), foi observado que ratos diabéticos tratados com metformina não tiveram perda do peso corporal, entretanto, o ganho de peso corporal que eles

apresentaram foi menor, quando comparados aos ratos diabéticos tratados com insulina. Na literatura, esse padrão também pode ser observado; em um trabalho realizado por Nahar *et al.* (2022) em animais diabéticos induzidos por STZ, durante 13 semanas de experimento, observou-se uma manutenção do peso dos animais tratados com metformina. Trabalho de Dima *et al.* (2007) também corrobora os resultados desse trabalho, onde foi verificada uma manutenção do peso corporal dos ratos diabéticos após um período de 21 dias de tratamento com metformina.

De forma geral, a diferença dos grupos D, DMET, DMP25, DMP50 e DMP100 como relação ao DI4U em termos de menor ganho de peso corporal pode ser devido às maiores taxas de degradação de gorduras e de proteínas teciduais, bem como às maiores taxas de proteólise induzida por deficiência de insulina (Subash Babu *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2014).

Em termos de massas de tecidos, houve aumento nas massas dos rins de animais diabéticos pertencentes a todos os grupos experimentais, quando comparados aos animais não diabéticos, com exceção do grupo tratado com insulina, o qual demonstrou um peso de rim menor e semelhante aos ratos não diabéticos. Esse aumento na massa dos rins pode estar relacionado às complicações promovidas pelo DM; devido ao quadro de estresse glico-oxidativo, o órgão pode estar sofrendo com alterações estruturais e funcionais, podendo culminar em modificação da homeostase da função renal, espessamento da membrana basal e mesangial, indução da inflamação e fibrose, podocitopatia, mesangiopatia, entre outros (Pasupulati *et al.*, 2016).

Houve um aumento nas massas do fígado dos ratos diabéticos não tratados e tratados com o metformina e/ou pentoxifilina, isoladamente ou em combinação, tal como ocorreu com os rins. Houve a manutenção do tamanho dos órgãos (fígado e rim) somente nos ratos diabéticos tratados com insulina, se assemelhando aos pesos de órgãos verificados nos animais normais, não diabéticos.

Esse aumento nos órgãos (fígado e rins) pode estar relacionado com algum dano desencadeado pelas complicações do DM, os quais podem estar sofrendo as consequências da geração exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs), juntamente com a aceleração dos processos de glicação e lipoperoxidação de biomoléculas, os quais em conjunto apresentam diversos efeitos deletérios a esses tecidos, podendo evoluir para uma fibrose, esteatose ou algo mais severo (Evelson *et al.*, 2005; Leite *et al.*, 2011; Regnell, Lernmark, 2011; Verderese; Younossi, 2013).

Para confirmar a presença de algum grau de injúria e/ou comprometimento das funções destes órgãos (fígado e rins), foram realizadas posteriormente as análises de biomarcadores hepáticos e renais (ALT, ALP, albumina, creatinina, ácido úrico).

Ainda com relação ao fígado, o aumento na massa desse órgão pode estar relacionado com o estado diabético. As alterações hepáticas observadas em associação ao DM podem variar desde degeneração gordurosa das células hepáticas até esteatohepatite e fibrose periportal (Lucchesi; Cassettari; Spadella, 2015). Welt *et al.* (2004) descreveram achados semelhantes usando análises morfológicas e morfométricas em fígado de ratos Wistar submetidos ao diabetes experimental induzido por STZ, ou em ratos submetidos à hipóxia aguda durante um período de semanas; os autores observaram um aumento no tamanho dos hepatócitos e seus núcleos, diminuição da relação núcleo/citoplasma e conteúdo de glicogênio, um número deficiente de cisternas de RER e a presença de numerosos vacúolos de gordura nas células hepáticas, bem como uma densidade aumentada de colágeno dos tipos I, III e VI ao redor dos vasos, indicando fibrose hepática.

Em contraste, é importante ressaltar que outros estudos sugerem que as alterações morfológicas hepáticas identificadas nas fases iniciais da indução do DM com aloxana (ALX) ou com STZ podem estar relacionadas às ações tóxicas dessas drogas, além dos efeitos do DM como principal causa dessas agressões teciduais (Shaw Dunn; Sheehan; Mclellan, 1943; Junod *et al.*, 1967; Lukens, 1948).

Com relação ao aumento observado nos rins, foi observado que existe uma correlação entre o estado hiperglicêmico e o aumento da massa do tecido renal. Em estudo Seyer-Hansen (1977), observou-se em ratos diabéticos (induzidos por STZ) um aumento dos rins, e neste estudo descreveu-se presença de hipertrofia e hiperplasia, além de aumento nos conteúdos de RNA e DNA no rim. No mesmo estudo houve estreita correlação entre o grau de distúrbio metabólico, níveis glicêmicos, glicosúria e a taxa de crescimento renal hipertrófico durante os primeiros sete dias de diabetes, e através desses resultados sugeriu-se que o aumento na massa dos rins em situações de hiperglicemia menos elevada pode ter um desfecho diferente e menos grave do que no diabetes mais severo, menos controlado em termos de glicemia. Estudos demonstraram que a hiperglicemia aguda pode levar à hipóxia renal transitória e danos nos rins em humanos (Vakilzadeh *et al.*, 2019; Maurits *et al.*, 2021). Além disso, evidenciou-se que a hiperglicemia é um fator causal na atividade pró-coagulante associada à nefropatia diabética, levando à formação de fibrina renal e

insuficiência renal (Polhill *et al.*, 2004). Além disso, a hiperglicemia foi associada ao aumento nos níveis urinários da proteína quimioatrativa de monócitos do tipo 1 (MCP-1), a qual está intimamente associada a indução de dano renal, refletindo em proteinúria e redução da taxa de filtração glomerular (eTFG) (Dirkje *et al.*, 2005). Esses achados sugerem que a hiperglicemia desempenha um papel importante na patogênese da nefropatia diabética e pode contribuir para promoção de danos ao tecido renal.

Outros trabalhos corroboram as alterações histológicas e bioquímicas no tecido renal causadas pelo DM (Karatug *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014). Ressaltando que alguns trabalhos sugeriram que o eixo EGF-EGFR desempenha um papel significativo no crescimento renal precoce relacionado ao diabetes, bem como outros fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) e o fator de crescimento transformador β (TGF- β), os quais também estão envolvidos no aumento dos rins no diabetes (Wassef; Kelly; Gilbert, 2004; Tang *et al.*, 2012).

No decorrer do presente experimento, houve um aumento significativo na glicemia e nos níveis de hemoglobina glicada nos animais diabéticos quando comparados aos valores encontrados em animais normais, demonstrando assim o estabelecimento do DM. A hiperglicemia crônica pode acarretar diversas complicações associadas ao estabelecimento de um quadro de estresse glicoxidativo, o qual foi demonstrado neste trabalho pelo aumento nos níveis de hemoglobina glicada, AGEs fluorescentes em plasma e rins, juntamente com o TBARS no plasma e nos rins.

Ao se observar a evolução da glicemia dos animais no presente estudo, observamos que os tratamentos com insulina e os demais tratamentos resultaram, mesmo em menor escala, em uma certa capacidade de controlar a glicemia. Esse resultado é consistente com outros resultados conquistados no laboratório por Arcaro *et al.* (2014), Roxo *et al.* (2019) e Figueiredo *et al.* (2020).

Considerando os resultados de redução da glicemia dos ratos diabéticos tratados com metformina, possivelmente estes surgiram em decorrência de seus efeitos já conhecidos: (i) no fígado, a metformina diminuiu a velocidade da gliconeogênese; (ii) no trato gastrointestinal, diminuiu a absorção intestinal de glicose e aumentou a secreção de GLP-1; (iii) nos músculos, aumentou a sensibilidade à insulina e a captação de glicose; (iv) nos tecidos adiposos, reduziu a inflamação

(Antunes; Bazotte, 2015; Rena, Hardie; Pearson, 2017; Thomas, I.; Gregg, 2017). Também podem ser encontrados na literatura resultados semelhantes aos nossos, em termos de redução da glicemia em ratos diabéticos tratados com metformina; por exemplo, Dima *et al.* (2007) verificaram uma redução na glicemia em ratos diabéticos quando comparados aos ratos diabéticos não tratados ao final do experimento, após 21 dias de tratamento com 500 mg/kg de metformina.

Com relação ao tratamento combinado entre metformina e pentoxifilina nas doses anteriormente descritas, houve uma redução na glicemia quando comparados aos ratos diabéticos, no entanto, não foram observadas diferenças entre a terapia isolada ou combinadas com metformina e pentoxifilina, indicando que não houve uma sinergia de ação desses fármacos, pelo menos em termos de efeitos na glicemia. Em relação aos efeitos com a pentoxifilina e os impactos na glicemia, caso apresentasse uma maior sinergia com a metformina possivelmente sua contribuição no controle glicêmico se daria de forma indireta, através de seus já observados efeitos anti-inflamatórios, bem como via promoção de aumento da glicólise aeróbica e do consumo de oxigênio em tecidos isquêmicos (Hepgül, *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2015; Donate-Correa *et al.*, 2019), ao seu potencial antioxidante (Radfar *et al.*, 2005), antiglicação (Rahbar *et al.*, 2000) e via inibição de PDE (Baviera *et al.*, 2007; Arcaro *et al.*, 2018).

Corroborando os resultados encontrados neste trabalho com relação à terapia combinada entre metformina e pentoxifilina e os impactos na glicemia, Garcia *et al.* (2014), ao testarem os efeitos de 5 mg/kg de pentoxifilina em associação com 5 mg/kg de metformina, os autores não observaram redução ainda maior nos valores de glicemia de ratos diabéticos induzidos por STZ, em comparação aos efeitos dos fármacos isolados.

Analisando os resultados referentes aos níveis de hemoglobina glicada (HbA1c), apenas o tratamento com insulina proporcionou uma redução nos seus níveis, sendo um resultado já verificado em trabalhos anteriores do laboratório (Figueiredo *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2020). Ratos diabéticos tratados com 4U insulina foram os únicos que apresentaram redução de HbA1c, quando comparados aos ratos diabéticos não tratados. Em trabalho de Garcia *et al.* (2014), os autores observaram efeitos positivos com relação ao tratamento com pentoxifilina nos níveis de HbA1c depois de 2 meses de tratamento: o fármaco promoveu uma redução nos níveis desse biomarcador, tanto na dose de 50 mg/kg quanto na dose de 5 mg/kg de pentoxifilina. Avaliando esses resultados, podemos sugerir que os efeitos da pentoxifilina em

diminuir os níveis de HbA1c estejam relacionados à combinação entre diminuição da glicemia e sua capacidade de mitigar processos de glicação de proteínas e de geração AGEs, como pode ser observado nos trabalhos de Wu, J. *et al.* (2010) e Inacio *et al.* (2020).

Adicionalmente, resultados obtidos por Frolidi *et al.* (2022) demonstraram, *in vitro*, que a metformina não apresentou boa atividade antiglicação, o que corrobora os resultados obtidos no nosso estudo com ratos diabéticos tratados somente com metformina e a falta de efeitos nos níveis de HbA1c. Ademais, no presente trabalho, também foram determinados os níveis plasmáticos de frutossamina, um marcador importante para o acompanhamento do DM e suas complicações, tal como proposto por muitos autores, incluindo Hindle *et al.* (1986). Ao contrário da HbA1c, que reflete os níveis de glicose no sangue durante um período mais longo (2-3 meses), a frutossamina fornece uma visão geral do controle da glicemia nas 2-3 semanas anteriores (Gottschling; Pusch; Michaelis, 2009; Sarabhai *et al.*, 2023). A frutossamina foi realizada com o intuito de auxiliar na compreensão dos efeitos *in vivo* da metformina e pentoxifilina em termos de processos de glicação de biomoléculas em período mais curto. Os resultados se assemelharam aos observados com a HbA1c, onde entre os animais diabéticos em tratamento, apenas o grupo DI4U demonstrou uma aparente capacidade de mitigar o processo glicativo em ratos diabéticos. Através desse resultado é reforçada a ideia de que a metformina não apresentou boa atividade antiglicação, sendo observada falta de melhoria nesse parâmetro em trabalhos que avaliam o efeito da metformina sobre a frutossamina em pacientes diabéticos não dependentes de insulina, ou seja, diabéticos do tipo 2 (Pedersen *et al.*, 1989; Gregorio *et al.*, 1990).

Em trabalho de Garcia *et al.* (2014), pode-se observar que em modelo de diabetes induzido com aloxano, assim como a HbA1c, foi observado que a pentoxifilina nas doses de 5 e 50 mg/kg pode gerar uma redução nas concentrações de frutossamina sérica nos animais após um período de tratamento de 1 mês, sendo esse resultado contrário ao que observa no presente trabalho, podendo estar ou não relacionado ao período de tratamento ser diferente entre os dois estudos, sendo necessárias mais investigações para melhor compreender essa diferença.

Foram dosados no plasma os níveis de triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL, esses marcadores refletem o perfil lipídico no plasma dos ratos que fizeram parte do experimento.

(i) No DM tipo 1, a deficiência de insulina pode gerar um aumento na atividade da enzima LHS nos tecidos adiposos, e por consequência leva a um aumento na velocidade de lipólise e assim aumento nos níveis de ácidos graxos livres no plasma, que se acumulam no fígado, por consequência ocorre um aumento na velocidade de síntese hepática de triglicerídeos (Regnell; Lernmark, 2011). Esse aumento na velocidade de síntese de triglicerídeos também contribui com o acúmulo de triglicerídeos no tecido hepático, que em um determinado ponto pode evoluir para uma quadro de esteatose hepática (Donnelly *et al.*, 2005). Adicionalmente a isso, em situação de excesso de glicose, esta pode ser convertida em ácidos graxos e estes são utilizados para sintetizar os triglicerídeos, que devem ser armazenados nos tecidos adiposos após exportação mediada por VLDL (Browning; Horton, 2004).

Após 42 dias de experimento, houve um aumento significativo nos níveis plasmáticos de triglicerídeos em animais diabéticos sem tratamento, quando comparados aos valores em plasma de animais não diabéticos.

(ii) O aumento nos níveis séricos de triglicerídeos é algo comum de ser observado em quadros de DM, esse aumento pode ser uma consequência também da diminuição na atividade da lipase lipoproteica (LpL), responsável pela retirada dos triglicerídeos das lipoproteínas quilomícron e VLDL, essa diminuição na atividade da LpL pode estar relacionada à deficiência de insulina induzida em nosso modelo experimental (Felig; Bergman, 1995; Rifai; Warnick, 2006).

(iii) A hipertrigliceridemia no DM também pode ocorrer pelo aumento observado na ingestão alimentar (hiperfagia), resultando em aumento na produção de quilomícrons.

Ao se avaliar os resultados obtidos na avaliação do perfil lipídico nos grupos tratados, apenas o grupo DI4U demonstrou capacidade de reverter o quadro de hipertrigliceridemia, possivelmente por reverter a deficiência de insulina endógena, e assim regularizar as vias anabólicas teciduais dependentes deste hormônio (Felig; Bergman, 1995; Stump *et al.*, 2005). Contudo não se pode observar um efeito benéfico por parte da metformina e da pentoxifilina em reverter este quadro de dislipidemia. Por outro lado, em trabalho de Figueiredo *et al.* (2020), foi demonstrado uma discreta diminuição nos níveis plasmáticos de triglicerídeos em todos os grupos diabéticos tratados com licopeno ou com metformina em iogurte, administrados de forma isolada

ou combinada, todos com valores menores em relação aos encontrados em animais diabéticos tratados somente com veículo(iogurte), deste modo sendo mais eficientes na promoção de redução nos níveis de triglicerídeos em ratos diabéticos quando comparado ao nosso presente trabalho. Corroborando os achados encontrados por Figueiredo *et al.* (2020), Roxo *et al.* (2019), trataram animais diabéticos com 250 mg/kg de metformina em iogurte durante 30 dias e averiguaram uma diminuição nos níveis plasmáticos de triglicerídeos e de colesterol, em comparação aos valores em animais diabéticos tratados somente com veículo (iogurte).

A diminuição na glicemia promovida pelos tratamentos com metformina ou pentoxifilina poderia gerar, pelo menos em parte, uma redução nos níveis plasmáticos de triglicerídeos, bem como um possível aumento na atividade da LpL, porém se apresenta como uma possibilidade de que a diminuição da glicemia não foi suficiente para tal redução desse parâmetro.

Na literatura é demonstrado que a metformina possui a capacidade de combater a dislipidemia, é sugerido que esse efeito ocorre por meio de diferentes mecanismos, incluindo a diminuição na síntese de lipoproteínas e na produção hepática de glicose, além do aumento na produção de GLP-1. Esses efeitos levam à redução na absorção de lipídeos, na síntese de triglicerídeos e na exportação de lipídeos. A regulação da expressão de genes envolvidos na lipogênese ocorre por meio da proteína SREBP-1c, que é influenciada positivamente pela insulina e negativamente pela AMPK. A ativação da AMPK pela metformina explica sua ação antihiperlipidêmica, que também inclui a inibição da síntese de colesterol e triglicerídeos (Van Stee *et al.*, 2018).

A pentoxifilina tem efeitos variados no perfil lipídico com base em diferentes estudos. Pesquisas indicam que o tratamento com pentoxifilina pode levar a uma diminuição no conteúdo de triglicerídeos hepáticos (Massart. *et al.*, 2012), uma redução nos níveis séricos de triglicérides e ácidos graxos livres (Shirakami *et al.*, 2015) e uma melhora no perfil lipídico ao diminuir os níveis de alanina aminotransferase (Albuquerque *et al.*, 2008). Além disso, a terapia com pentoxifilina em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) resultou em uma diminuição significativa no peso corporal e nos níveis de glicose (Acedo *et al.*, 2015). No entanto, é importante observar que a pentoxifilina não afetou significativamente os níveis de colesterol total ou triglicerídeos em pacientes com NAFLD/NASH (Du *et al.*, 2014). Esses achados sugerem que a pentoxifilina pode ter um impacto benéfico em certos aspectos do perfil lipídico, particularmente em relação aos triglicerídeos

hepáticos e aos marcadores da função hepática.

Os marcadores hepáticos desempenham um papel crucial na avaliação da saúde hepática em indivíduos com diabetes. Estudos demonstram que pacientes com DM tipo 2 geralmente exibem níveis elevados de marcadores hepáticos, como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP) e gama-glutamilttransferase (GGT) (Collier *et al.*, 2023; Nageen, 2022; Shibabaw *et al.*, 2019). Esses marcadores hepáticos elevados em pacientes com DM tipo 2 estão associados à resistência à insulina (IR) e podem servir como preditores de hepatotoxicidade futura (Usha; Kathyayani; Nandith, 2019). Além disso, a resistência à insulina no DM tipo 1 tem sido associada à NAFLD, com indivíduos menos sensíveis à insulina, sendo mais propensos a desenvolver NAFLD (Grzelka-Woźniak *et al.*, 2023). O monitoramento de marcadores hepáticos em indivíduos com diabetes é crucial para a detecção precoce e o tratamento de complicações relacionadas ao fígado, destacando a importância de testes regulares de função hepática em pacientes diabéticos.

Descrevendo de forma mais detalhada, a ALT é um importante marcador por refletir possíveis danos em hepatócitos devido a diversos eventos como: patologias hepáticas ou hepatobiliares, inflamação, necrose ou fibrose na esteatose hepática, cirrose, carcinoma hepatocelular, hepatites virais e insuficiência hepática aguda (Rafter *et al.*, 2012; Sookoian *et al.*, 2015). A enzima ALT age catalisando a transaminação reversível entre a alanina e o alfa-cetoglutarato, gerando piruvato e glutamato, deste modo ele desempenha papel fundamental no metabolismo da glicose e dos aminoácidos. A ALT pode ser dividida em duas isoformas, ALT 1 e ALT 2. A ALT 1 está presente em músculos, tecidos adiposos, rins, cérebro, fígado e mama; enquanto que a ALT 2 é encontrada em altas concentrações nos tecidos adiposos, rins, músculos e cérebro e em pequena quantidade no fígado (Yang, R. *et al.*, 2002; Lindblom *et al.*, 2007). No fígado, a ALT 1 está localizada apenas no citoplasma e retículo endoplasmático; por outro lado, a ALT 2 é preferencialmente localizada na matriz mitocondrial. Assim, tanto ALT 1 quanto ALT 2 podem refletir ruptura dos hepatócitos, bem como disfunção mitocondrial (Rafter *et al.*, 2012; Sookoian *et al.*, 2015). Adicionalmente, sabe-se que o diabetes reduz significativamente a síntese de albumina no fígado e, a partir do tratamento com insulina, é possível restaurar até certo ponto os níveis normais de síntese e secreção de albumina (Chinaka *et al.*, 2018; Peavy; Taylor; Jefferson, 1978).

No atual trabalho se pode observar um aumento nos níveis plasmáticos de ALT e ALP, juntamente a um aumento de AGEs hepáticos, indicando um possível grau de lesão hepática nos ratos diabéticos que pode estar associado ao estresse glicativo, entretanto os níveis séricos de albumina se mantiveram parecidos entre os animais normais e diabéticos, indicando que a função hepática de síntese proteica não foi afetada o suficiente a ponto de interferir na concentração plasmática de albumina.

Os grupos de animais tratados com metformina 250 mg/kg, pentoxifilina 100mg/kg e a terapia combinada de metformina + 25, 50 e 100 mg/kg de pentoxifilina não demonstram efeito protetor, sendo observados valores de ALT similares aos observados nos ratos diabéticos não tratados, indicando que, mesmo com a redução da glicemia em alguns desses grupos, não houve de forma clara a mitigação de injúria dos hepatócitos.

Em trabalho de Figueiredo *et al.* (2020) os animais diabéticos induzidos com STZ que não receberam tratamento apresentaram um aumento nos níveis plasmáticos de ALT, assim como o presente trabalho, portanto corroborando a possibilidade de que prejuízos ou perturbações na integridade de hepatócitos podem ter relação com o quadro de estresse glico-oxidativo observado no fígado, confirmado pelos níveis elevados de AGEs e alterações nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px. Contudo, ao contrário dos resultados obtidos no presente trabalho, Figueiredo *et al.* (2020) observaram uma diminuição nos níveis de ALT em ratos diabéticos tratados com a metformina na dose de 250 mg/kg. Em modelo de ratos obesos alimentados com dieta rica em gordura, Yasmin *et al.* (2021) trataram esses animais com metformina na dose 200 mg/kg durante 8 semanas, no estudo foram determinados os níveis de ALP e ALT após o tratamento, e verificou-se que o tratamento com metformina reduziu significativamente os níveis de ALT no fígado dos ratos, indicando uma diminuição na lesão hepática. Além disso, o tratamento com metformina ajudou a prevenir o aumento dos níveis de ALP no plasma de ratos alimentados com essa dieta, sugerindo um efeito protetor na integridade hepática.

A respeito dos efeitos dos inibidores de PDEs (como a pentoxifilina) sobre os marcadores hepáticos, foi observado na literatura uma capacidade dos inibidores de fosfodiesterases, com destaque para a pentoxifilina, em modelo de doença hepática gordurosa não alcoólica, em diminuir os níveis de biomarcadores como bilirrubina total, ALT, AST, bem como reverter histologicamente os quadros de fibrose, esteatose

e inflamação, tanto a pentoxifilina isolada como também combinada com a metformina, demonstrando assim efeito protetor do tecido hepático (El-Deen *et al.*, 2020; Heeba *et al.*, 2020; Ćulafić *et al.*, 2020).

Outros parâmetros bioquímicos que se alteraram durante esse período de 42 dias de experimento foram a creatinina e o ácido úrico, que se mostraram reduzidos no plasma de animais diabéticos sem tratamento, quando comparados aos animais não diabéticos. A creatinina e o ácido úrico são marcadores importantes utilizados para monitorar a função renal, onde normalmente é o acúmulo dos mesmos no plasma, sendo assim, ao contrário do que foi observado neste trabalho, esses marcadores tendem a estar elevados em quadros de diabetes (McKinney, 2009; Kanbay *et al.*, 2009; Nelson; Cox, 2014; Mulay; Anders, 2016; Chen; Chiaramonte, 2022).

A creatinina sanguínea elevada está associada com insuficiência renal no diabetes e em outras condições nas quais a função renal está comprometida, sendo muitas vezes usada para estimar a taxa de filtração glomerular que está intimamente associada a saúde do órgão (Nelson; Cox, 2014; Chen; Chiaramonte, 2022).

Em ratos diabéticos induzidos por STZ, alterações nos marcadores renais, como creatinina e ácido úrico, foram observadas em vários estudos que demonstraram que ratos com nefropatia diabética (DN) exibem uma elevação significativa nos níveis de creatinina (Rasal *et al.*, 2023). Uma possibilidade para este perfil de comportamento oposto em relação ao nível de creatinina sérica que observamos no presente estudo pode estar ligado a um dos principais sítios de origem desse metabólito, no caso os músculos estriados esqueléticos: devido ao catabolismo proteico muscular que ocorre em decorrência da deficiência de insulina, ocorra uma significativa perda de massa muscular, que consequentemente pode influenciar em uma menor produção de creatinina (Nelson; Cox, 2014). Contudo, devido a falta de uma aferição da massa muscular dos ratos nesse experimento, juntamente com a falta de uma diferença significativa da massa corporal, não se pode comprovar tal hipótese de forma mais assertiva.

Em relação ao ácido úrico, se sabe que ele é um produto do catabolismo das bases púricas, a maior parte dessas bases nitrogenadas é metabolizada no fígado, onde tais bases são convertidas em ácido úrico para excreção. (Nelson; Cox, 2014). Assim como a creatinina, houve uma redução do ácido úrico no plasma dos animais diabéticos; uma das possibilidades pode estar relacionada com uma possível

disfunção hepática, pois assim como dito anteriormente é um dos principais locais onde ocorre sua formação no organismo dos animais, sendo essa possível disfunção corroborada pelos níveis elevados de ALT e ALP no plasma de ratos diabéticos.

A respeito dos tratamentos utilizados, mesmo utilizado apenas a metformina ou pentoxifilina de forma isolada, ou até mesmo de forma combinada, não se observou algum efeito frente aos marcadores hepáticos e renais, sugerindo que a aparente redução da glicemia, quando comparados aos animais diabéticos, não foi suficiente para impedir as complicações decorrentes da deficiência de insulina, onde os possíveis danos gerados estão relacionados a hiperglicemia e ao estresse glicoxidativo, o que parece não ter sido eficientemente revertido pelos tratamentos conduzidos.

Quando comparados os resultados dos tratamentos realizados neste estudo a outros trabalhos presentes na literatura, observa-se que a metformina demonstra capacidade de diminuir os níveis de ureia, ácido úrico e creatinina no plasma, indicando que o fármaco apresenta a capacidade de proteger parcialmente a função renal. O mecanismo desta ação não é certo, possivelmente age de forma indireta ao reduzir os danos oxidativos decorrentes da hiperglicemia prolongada, processos inflamatórios e apoptóticos (Sanz *et al.*, 2008; Ali *et al.*, 2013; Efe *et al.*, 2016; Ling; Kuo, 2018; Siboto *et al.*, 2018; Rapa *et al.*, 2019).

Em trabalho de Al Za'abi *et al.* (2021), é indicado que possivelmente a mitigação das alterações renais após o uso da metformina está relacionada à alteração na velocidade filtração glomerular, diminuição dos níveis de glicose no sangue, pressão arterial, resistência à insulina e comprometimento tubular proximal renal, ideia corroborada pelo trabalho de Pan *et al.* (2016) e Jaikumkao *et al.* (2024) que avaliaram o mesmo desempenho positivo da metformina em DM tipo 2 nas doses de 100 mg/kg por 4 semanas em ratos diabéticos (dieta hiperlipídica/STZ) e 1500 mg/dia por 48 semanas em pacientes respectivamente.

A respeito dos resultados da pentoxifilina, observa-se na literatura que, assim como a metformina, o inibidor de PDE apresenta capacidade de mitigar os efeitos deletérios do estresse glicoxidativo sobre a integridade do tecido renal. Em estudos de DiPetrillo e Gesek (2004), pode-se observar um aumento do peso do tecido renal juntamente a marcadores inflamatórios no diabetes STZ, quadro esse que é revertido pelo uso de 25 mg/kg de pentoxifilina por 20 dias. Outro trabalho que aborda não

somente o uso da pentoxifilina mas também outros PDEIs (sildenafil e milrinona) realizado por Mehanna *et al.* (2017), demonstra o impacto benéfico dos PDEIs na nefropatia diabética em ratos induzidos com STZ, onde foi realizado o tratamento em um período de 15 dias, também indica que tal resultado pode estar relacionado principalmente à capacidade de melhorar a microcirculação capilar renal, à melhora das alterações na função renal e ao efeito redutor da glicose do sildenafil, e às atividades antioxidantes desses fármacos.

Se faz importante ressaltar que, no presente estudo, a metformina foi o fármaco antidiabético selecionado para a realização dos tratamentos de animais diabéticos, sejam os animais do grupo diabético com tratamento isolado (DMET) ou dos grupos diabéticos com tratamento combinado com pentoxifilina (DMP25, DMP50 e DMP100), mesmo sendo o modelo experimental de DM utilizado aquele que mimetiza as alterações observadas no DM tipo 1. A razão pela escolha da metformina está ligada não apenas a sua ação anti-hiperglicêmica, mas também a sua capacidade em diminuir os níveis de AGEs, o que pode auxiliar na promoção de uma diminuição nos níveis de TBARS nesses animais (Beisswenger; Ruggiero, 2000; Figueiredo *et al.*, 2020).

Com relação aos animais diabéticos não tratados (grupo D) presentes nesse estudo, eles apresentaram hiperglicemia, HbA1c elevada e uma diminuição na atividade da PON1, os quais juntamente com o aumento significativo nos níveis de TBARS (plasma e rim) e AGEs (plasma e fígado) reforça o estabelecimento do quadro de estresse glico-oxidativo nesses animais diabéticos.

A hiperglicemia certamente desencadeou, através de diversas vias, o estabelecimento do estresse glico-oxidativo nos animais diabéticos. Ao se realizar o tratamento de ratos diabéticos com 4U/dia de insulina, pode-se constatar uma inibição do estresse glico-oxidativo, através da redução nos níveis de TBARS (plasma e rim) e AGEs (plasma, rim e fígado), além de ser observada manutenção na atividade da PON 1, redução da glicemia e de HbA1c quando comparado ao grupo diabético não tratado. Esses resultados são semelhantes aos demais trabalhos realizados anteriormente pelo laboratório (Arcaro *et al.*, 2014; Assis *et al.*, 2017; Gutierrez *et al.*, 2019; Figueiredo *et al.*, 2020; Roxo *et al.*, 2019).

Outros estudos na literatura forneçam os efeitos inibitórios da insulina no estresse oxidativo por meio de várias vias, como por exemplo: (i) redução nos níveis de mieloperoxidase (MPO), colesterol total e lipoproteína de baixa densidade (LDL)

(Mohammad; Fathi; Allwash, 2021); (ii) diminuição do estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 2, via aumento da relação GSH/GSSG (Bravi *et al.*, 2006); (iii) redução da taxa de excreção urinária de 8-isoprostaglandina-F2, um marcador de estresse oxidativo (Monnier, L. *et al.*, 2010).

No presente estudo, a metformina não demonstrou bons resultados na redução de TBARS e AGEs no fígado dos ratos diabéticos tratados com esse fármaco na dose de 250 mg/kg, entretanto, tanto no plasma quanto nos rins dos animais diabéticos tratados com metformina o fármaco foi capaz de promover uma redução nos níveis de AGEs e TBARS.

Os resultados de Figueiredo *et al.* (2020) corroboraram alguns resultados observados no presente estudo, no plasma e fígado: a metformina (dose de 250 mg/kg/dia) causou uma redução nos níveis dos AGEs, e nos rins levou a uma redução dos níveis de TBARS. Em outro estudo, a metformina na dose de 500 mg/kg por 7 dias foi capaz de reduzir o estresse oxidativo e evitou a peroxidação lipídica (redução de TBARS) em músculos *gastrocnemius* (Vilela *et al.*, 2016). Também em estudos de Erejuwa *et al.* (2011), ao tratarem ratos diabéticos induzidos por STZ com 100 mg/kg de metformina por 4 semanas, os autores observaram que os animais tiveram uma aparente melhoria na capacidade antioxidante via concentrações mais elevadas de GSH e GSSG, bem como houve redução nos níveis de TBARS nos rins.

Em outro trabalho, a metformina na dose de 100 mg/kg/dia por 4 semanas reduziu o estresse oxidativo no plasma e melhorou os níveis de insulina plasmática em ratos diabéticos (induzidos com STZ), possivelmente por meio de seu efeito antihiperlipidêmico (Usman; Abu Bakar; Mohamed, 2016).

No estudo realizado por Raza *et al.* (2004), foram analisadas as alterações na produção de EROs, marcadores de lipoperoxidação, e nas defesas antioxidantes em diferentes tecidos de ratos diabéticos (induzidos com STZ), sendo avaliados depois de um período de 4 semanas da indução. Em relação aos resultados obtidos nos tecidos hepático e renal: (i) no fígado, houve diminuição nos níveis de TBARS na mitocôndria, aumento nos níveis de GSH, aumento na atividade de GST no citoplasma, aumento de 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) tanto na mitocôndria quanto no citoplasma; (ii) nos rins, os níveis de TBARS aumentaram na mitocôndria, houve diminuição nos níveis de GSH e na atividade de GST no citoplasma, aumento de 4-HNE tanto na mitocôndria quanto no citoplasma. Os pesquisadores ressaltaram a importância do

aumento de 4-HNE nos tecidos, o que parece induzir o aumento na atividade de GST. Entretanto, os baixos níveis de GSH no citoplasma das células renais podem comprometer a capacidade de detoxificação dos lipoperóxidos pela GST. Dessa forma, os resultados deste estudo confirmam resultados previamente verificados no fígado e nos rins de animais com diabetes.

Em contraste aos resultados obtidos no plasma e no rim, os animais diabéticos não tratados apresentaram, no fígado, níveis de TBARS menores aos encontrados em fígado de animais normais, não diabéticos. Esta situação pode estar relacionada com as respostas compensatórias relacionadas aos componentes que compõem o sistema da glutathione. Sabe-se que a GSH-Px é capaz de realizar sua ação mesmo em baixas concentrações de GSH, que é um de seus co-substratos. Adicionalmente, existem afinidades diferenciais de certas isoformas de GSH-Px por uma certa diversidade de peróxidos, entre eles estão os peróxidos lipídicos ou produtos secundários da lipoperoxidação, tal como o MDA (Esworthy *et al.*, 1993). Com o estabelecimento do quadro de estresse oxidativo no DM, ocorre um aumento na produção de peróxidos lipídicos, os quais podem estar estimulando os mecanismos de compensação que culminam em aumento na atividade de GSH-Px, com o objetivo de aumentar a detoxificação de peróxidos lipídicos (Brownlee, 2001; Jagdale *et al.*, 2016), o que pode explicar, pelo menos em parte, a redução nos níveis de TBARS em fígado de ratos diabéticos, adicionalmente com o aumento na atividade hepática da enzima GSH-Px neste trabalho.

A enzima glutathione-S-transferase (GST) é uma das principais enzimas presentes no fígado que participam na remoção de produtos resultantes da oxidação dos lipídeos, através da conjugação dos lipoperóxidos com a molécula GSH, aumentando a sua solubilidade em água e facilitando a sua eliminação; dessa forma, a sua ação detoxificante é importante na proteção contra o estresse oxidativo (Kaushik; Kaur, 2003; Torres *et al.*, 2006). Algumas isoenzimas da GST estão envolvidas na conjugação do aldeído 4-HNE com o GSH, sendo um importante via de eliminação deste composto altamente reativo (Schaur *et al.*, 2015). Portanto, uma outra hipótese é que os peróxidos lipídicos estejam sendo produzidos de forma exagerada no fígado de animais diabéticos, devido ao estresse oxidativo; entretanto, esses peróxidos estão sendo eliminados em uma taxa ainda mais eficiente, graças à combinação do aumento das atividades de GSH-Px e GST.

Adicionalmente, dando um enfoque no processo de glicação, pode se observar

que no presente trabalho houve um aumento nos níveis de AGEs fluorescentes em plasma de ratos diabéticos não tratados (grupo D); tal como dito anteriormente, esse resultado sugere o estabelecimento de estresse glicativo em ratos diabéticos. Com a cronicidade da hiperglicemia, há um aumento na glicação não enzimática de biomoléculas, levando a formação dos AGEs (Rolo; Palmeira, 2006). Corroborando os resultados verificados neste trabalho, em estudos prévios do nosso laboratório de Roxo *et al.* (2019), Figueiredo *et al.* (2020) e Lima *et al.* (2020) houve o encontro de aumentos nos níveis de AGEs fluorescentes plasmáticos em ratos diabéticos sem tratamento.

A redução nos níveis plasmáticos de AGEs nos animais diabéticos tratados com metformina pode ser explicada pelos efeitos antihiperglicemiantes do fármaco. Em adição, existem evidências das ações diretas da metformina sobre compostos intermediários dicarbonílicos, sendo o metilglioxal um desses compostos. A reação entre metformina e metilglioxal gera um composto identificado como triazepinona; quanto mais triazepinona é produzido, maior será a ação da metformina em diminuir os níveis de AGEs (Beisswenger; Ruggiero, 2003). Assim como no plasma, a diminuição nos níveis de AGEs no tecido renal também pode ser atribuída ao potencial da metformina em reagir com o metilglioxal, seja convertendo o metilglioxal presente no tecido ou diminuindo o acúmulo de tal composto que poderia ocorrer durante o processo de filtração glomerular (Lin *et al.*, 2016).

Ainda na literatura outros estudos também observaram redução dos AGEs após o uso da metformina. Liu *et al.* (2020) observaram que o tratamento com 100 mg/kg/dia de metformina durante 4 semanas em camundongos C57BL/6 diabéticos induzidos com STZ pode retardar o desenvolvimento da aterosclerose por meio de diminuição nos níveis de metilglioxal. O estudo sugere que o fármaco esteja estimulando a remoção do metilglioxal, o que reduz a formação de produtos finais de glicação avançada, um efeito mais importante do que a diminuição da glicemia. O estudo também mostrou que a metformina reduziu as concentrações plasmáticas de NE-(carboximetil) lisina.

Com relação aos níveis de AGEs nos rins, no presente trabalho foi observado efeito inibitório significativo da terapia com metformina, sendo os resultados desse parâmetro semelhante aos observados por Ishibashi *et al.* (2012a); eles sugerem que a metformina pode inibir a apoptose e as reações inflamatórias e fibróticas em células tubulares induzidas por AGEs, reduzindo a expressão do

receptor RAGE e suprimindo a geração de EROs por meio da ativação da proteína quinase AMPK. Assim, a metformina parece proteger células tubulares da nefropatia diabética via bloqueio do eixo AGEs-RAGE-EROs. Em outro artigo também realizado por esse mesmo grupo de pesquisa observou-se o efeito protetor da metformina nos rins, o artigo investigou os potenciais efeitos terapêuticos da metformina e do irbesartan na lesão celular tubular proximal induzida por AGEs-RAGE na nefropatia diabética. O estudo demonstrou que a metformina inibiu de forma dose-dependente a formação de albumina sérica bovina modificada por AGEs e reduziu os níveis de RAGE, bem como a geração de espécies reativas de oxigênio, a apoptose, os níveis da proteína quimioatraente de monócitos 1 e os níveis do fator de crescimento transformador β em células tubulares (Ishibashi *et al.*, 2012b).

Entretanto, pode-se verificar no presente trabalho, por um motivo que ainda deve ser elucidado, que não houve efetividade da metformina na redução de eventos de glicação avançada no tecido hepático de ratos diabéticos, sendo um resultado divergente daqueles observados por outros trabalhos do laboratório, como por exemplo Figueiredo *et al.* (2020) que fez uso do mesmo modelo experimental e mesma dose de metformina se distinguindo apenas pelo período de tratamento de 30 dias.

O tratamento de ratos diabéticos com a terapia combinada metformina + pentoxifilina foi eficaz na redução dos níveis plasmáticos de TBARS quando comparados aos não tratados, contudo, não apresentou um resultado aparentemente melhor do que o tratamento isolado (DMET). Tal fato sugere uma falta de sinergia da associação metformina + pentoxifilina em ratos diabéticos no combate à peroxidação lipídica. Ademais, o tratamento de ratos diabéticos com a associação entre metformina e pentoxifilina demonstrou pouca diferença, se comparada a metformina isolada, em termos de diminuição dos níveis de TBARS, onde no plasma e tecidos se apresentou com resultados semelhantes aos animais tratados somente com metformina.

Com relação aos níveis plasmáticos de AGEs todos os grupos diabéticos tratados demonstraram redução dos AGEs quando comparados ao grupo D, com a terapia combinada de pentoxifilina nas doses de 50 e 100 mg/kg + metformina demonstrando reduções mais significativas que o uso da metformina isolada, sendo aqueles mais próximos ao efeito observado no grupo tratado com insulina, todavia, todos os tratamentos alcançaram resultados próximos ao grupo não diabético.

Nos rins, não foram observadas diferenças nos efeitos das terapias combinadas em termos de níveis de AGEs e TBARS em comparação aos animais tratados somente com metformina, sendo o grupo DMP100 dentre as terapias combinadas com melhor resultado, devido ao fato de os grupos DMP25 e DMP50 não terem demonstrado diferença significativa tanto do grupo diabético quanto do não diabético.

Com relação ao fígado, as terapias combinadas demonstram efeitos similares à metformina sozinha em relação aos níveis de TBARS, por outro lado, em relação aos níveis de AGEs apresentou uma redução nos grupos de terapia combinada, indicando que os efeitos antiglicação da pentoxifilina no fígado ainda permanecem significativos, suprimindo deste modo uma deficiência presente na terapia utilizando apenas a metformina.

Na literatura poucos trabalhos abordam a eficácia da associação entre metformina e a pentoxifilina nas disfunções metabólicas. Nos trabalhos de Ćulafić *et al.* (2019), El-deen *et al.* (2020) e Heeba *et al.* (2020), foram abordados os estudos acerca dos efeitos benéficos da combinação metformina e pentoxifilina frente à doença hepática gordurosa não alcoólica e esteatose hepática não alcoólica. Mesmo não sendo um quadro de diabetes, essas doenças hepáticas se assemelham aos sistemas-modelo de obesidade e resistência à insulina causadas pela ingestão de dieta hiperlipídica, além de ser uma possível complicação observada no DM. Nesses estudos, a terapia combinada metformina (500 mg) + pentoxifilina (400 mg) realizada por Ćulafić *et al.* (2019) em pacientes por 24 semanas, a terapia isolada com os inibidores de PDEs pentoxifilina (50 mg/kg/dia), cilostazol (20 mg/kg/dia) e sildenafil (5 mg/kg/dia) realizada por El-deen *et al.* (2020) durante 16 semanas e a terapia combinada metformina (200 mg/kg) + pentoxifilina (50 mg/kg) realizada por Heeba *et al.* (2020) durante 16 semanas, as terapias foram capazes de reduzir os níveis de GSH, NO e MDA, sugerindo que houve uma proteção hepática frente a algum dano oxidativo. No trabalho de Heeba *et al.* (2020), também foram observadas diminuições na expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e do fator nuclear kappa-B (NF- κ B), indicando uma possível inibição de processos inflamatórios. Além desses marcadores, também foi observada redução de colesterol total, triglicerídeos e enzimas hepáticas após o tratamento com metformina e pentoxifilina.

Sobre a pentoxifilina, o efeito benéfico do fármaco na redução dos níveis

glicêmicos dos animais diabéticos pode ter contribuído para a redução observada nos AGEs fluorescentes circulantes e teciduais, principalmente no fígado, e também nos níveis do biomarcador de lesão oxidativa em lipídeos, o TBARS. As melhorias nos biomarcadores de estresse glico-oxidativo em animais tratados com a pentoxifilina 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; (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, J. *et al.*, 2010).

Outros trabalhos realizados no laboratório por Inacio *et al.* (2020) (que trabalhou com a pentoxifilina) e de Oliveira (2021) (que trabalhou com outros inibidores de PDE) observaram redução nos níveis de TBARS e AGEs nos rins, fígado e plasma. No estudo realizado por Oliveira (2021), utilizou-se sistema-modelo *in vivo* de obesidade e resistência à insulina, onde camundongos foram alimentados com dieta hiperlipídica por 7 semanas, e estes foram tratados com inibidores de PDEs, roflumilast ou tadalafil por um período de 7 semanas (totalizando 14 semanas de modelo). Observou-se que os níveis de TBARS no fígado foram menores nos animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com roflumilast ou com tadalafil, quando comparados aos animais alimentados com dieta hiperlipídica e não tratados, demonstrado assim que os inibidores de PDEs possuem potencial protetor quanto aos danos causados pela peroxidação lipídica em tecido hepático. Já nos rins, os animais em dieta hiperlipídica e tratados com roflumilast ou com tadalafil também apresentaram menores níveis de AGEs fluorescentes em relação aos animais alimentados com dieta hiperlipídica e não tratados.

No estudo de de Inácio *et al.* (2020) realizado em nosso laboratório, assim como o trabalho de Oliveira (2021), utilizou-se o sistema-modelo *in vivo* de obesidade e resistência à insulina com camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. O tratamento destes animais com pentoxifilina (50mg/kg), roflumilast (0,5 e 1,0 mg/kg) ou com tadalafil (1,0 e 2,0 mg/kg) promoveu proteção renal, através da prevenção no aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e nos marcadores de lesão glico-oxidativa, AGEs e TBARS. Concomitantemente, após o tratamento com pentoxifilina, houve melhoria na tolerância à glicose e na sensibilidade à insulina; portanto, os autores atribuíram esses efeitos nos níveis de AGEs à melhoria no controle glicêmico dos animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com pentoxifilina.

Conforme demonstrado por Harcourt *et al.* (2011), em estudo utilizando camundongos C57BL/6 obesos, a diminuição nos níveis de AGEs nos rins previne que danos iniciais aos rins evoluam para estágios mais graves de doenças renais, os quais podem ser causados pelo estado de obesidade não controlado.

Outros trabalhos na literatura também observaram alterações nesses parâmetros. Radfar *et al.* (2005) acompanharam 39 pacientes diabéticos do tipo 2 que foram randomizados em um ensaio clínico duplo-cego controlado por placebo. Os pacientes receberam pentoxifilina na dose de 400 mg ou placebo por 14 dias e amostras de sangue foram coletadas no início e no final do estudo para determinação de parâmetros de estresse oxidativo, fator de crescimento epidérmico (EGF), óxido nítrico (NO) e HbA1c. Os resultados mostraram que a pentoxifilina foi eficaz na redução do TBARS plasmático, mas não mostrou nenhum efeito nos níveis plasmáticos de EGF e NO. Em outro estudo são reforçados os potenciais efeitos inibitórios da pentoxifilina, pioglitazona e metformina na formação *in vitro* de produtos finais de glicação avançada (AGE's) e ligações cruzadas em proteínas (*crosslinking* proteico) (Rahbar *et al.*, 2000).

Em outro estudo, ao investigarem os efeitos da pentoxifilina no estresse oxidativo em ratos diabéticos induzidos por STZ com nefropatia diabética, An *et al.* (2015) observaram que o tratamento por 12 semanas com pentoxifilina (doses de 30 e 50 mg/kg/dia) melhorou a função renal e reduziu o dano renal em ratos diabéticos. Especificamente, a pentoxifilina foi capaz de aliviar os danos no tecido renal, reduzir a excreção urinária de proteína e diminuir os níveis séricos de cistatina C. Além disso, a pentoxifilina teve atividade antioxidante, pois reverteu as mudanças nos níveis de SOD e de MDA no soro e nos rins de ratos diabéticos. Níveis de nitrotirosina foram diminuídos pela pentoxifilina, indicando que o fármaco foi capaz de inibir as reações oxidativas em ratos com nefropatia diabética (An *et al.*, 2015).

A paraoxonase 1 (PON 1) circula associada à HDL e desempenha um papel fundamental na proteção de lipoproteínas, especialmente LDL, contra o ataque de espécies reativas de oxigênio. A principal função da PON 1 é hidrolisar peróxidos lipídicos, incluindo ésteres de colesterol e fosfolipídeos (Aviram *et al.*, 2000). Sendo assim, a atividade da PON 1 é de extrema importância e contribui para o potencial anti-aterogênico da HDL (Rozenberg *et al.*, 2003). Atualmente, a PON 1 tem sido considerada uma enzima crucial devido a sua capacidade de hidrolisar vários intermediários oxidados. Dessa forma, PON 1 atua na proteção contra o estresse

oxidativo e na preservação das membranas celulares contra a peroxidação lipídica, o que resulta na redução da aterosclerose (Chistiakov *et al.*, 2017; Shunmoogam *et al.*, 2018).

No atual estudo, pode-se observar uma redução na atividade da PON1 nos ratos diabéticos sem tratamento. Possivelmente, essa diminuição está ocorrendo devido aos processos de glicação e/ou de oxidação da enzima, também pode ser uma consequência de uma possível disfunção hepática, todos esses eventos em decorrência das complicações diabéticas (Sztanek *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2017; Khateeb *et al.*, 2010; Wu, F. *et al.*, 2017; Yamagata *et al.*, 2012).

De acordo com os resultados de nosso estudo, animais diabéticos tratados com metformina + pentoxifilina (nas doses de 50 e 100 mg/kg) mantiveram e/ou aumentaram a atividade da PON1, quando comparados aos ratos diabéticos. A expressão da paraoxonase é influenciada por vários fatores. Tem sido demonstrado que a ativação da proteína quinase AMPK aumenta a expressão de PON1. Em estudo de MA *et al.* (2017), foi demonstrado que a ativação farmacológica da AMPK utilizando A-769662, AICAR, metformina ou IMM-H007 melhora a funcionalidade da lipoproteína HDL em camundongos com deficiência de ApoE. A ativação da AMPK aumenta o transporte reverso do colesterol, o que é mediado pela regulação positiva das proteínas ABCA1 e ABCG1 em macrófagos, e dos receptores sequestradores de classe B tipo I e LCAT no fígado. A lipoproteína HDL de camundongos, após a ativação da AMPK, exibiu maiores atividades antioxidante e anti-inflamatória, conforme indicado pelo menor índice inflamatório da HDL, menor atividade da mieloperoxidase e maior atividade da PON1. Além disso, a ativação da AMPK induziu a polarização dos macrófagos ao estado M2 e reduziu a peroxidação lipídica plasmática, a produção de citocinas inflamatórias e a formação de placa aterosclerótica. Essas descobertas sugerem que a ativação da AMPK aumenta as propriedades anti-aterogênicas do HDL por meio da regulação positiva da expressão de PON1 (Ma *et al.*, 2017; Arii *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2013; Fuhrman *et al.*, 2008).

Também foi observado em nosso estudo, que ratos diabéticos STZ tratados com metformina, sozinha, apresentaram manutenção na atividade de PON1, o que também foi previamente observado pelos trabalhos de nosso grupo de Figueiredo *et al.* (2020) e Roxo *et al.* (2019) que utilizaram dose de 250 mg/kg/dia de metformina. Em estudo de Meaney *et al.* (2015), os autores observaram que o tratamento com 850 mg/kg de metformina de pacientes com síndrome metabólica no período de 1 ano leva

a um aumento na atividade da PON1. O estudo de Meaney *et al.* (2015) também observou uma redução na espessura íntima média da carótida, um marcador de aterosclerose subclínica, o que prediz o desenvolvimento da placa aterosclerótica carotídea; deste modo, os resultados sugerem que existe efeito protetor da metformina no âmbito vascular.

Adicionalmente aos resultados abordados anteriormente, também foram avaliados alguns biomarcadores relacionados aos sistemas antioxidantes endógenos nos tecidos hepático e renal, sendo esses marcadores as enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px. Avaliando inicialmente os resultados observados no fígado e rim nos grupos experimentais induzidos ao diabetes e sem tratamento, pode-se observar que as atividades das enzimas SOD e CAT foram reduzidas nesse grupo experimental. Essa redução da atividade de SOD e CAT é algo já observado em outros trabalhos de nosso laboratório, em modelos experimentais de DM tipo 1 e DM tipo 2 (Figueiredo *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2020; Assis *et al.*, 2017; Oliveira, 2021; Inacio *et al.*, 2020; Costa, M. *et al.*, 2020). Existem diversos fatores que podem levar à redução da atividade das enzimas antioxidantes durante o estresse oxidativo. Alguns dos motivos incluem:

I) Excesso de espécies reativas de oxigênio: durante o estresse oxidativo, há um aumento na produção de EROs, os quais podem sobrecarregar as enzimas antioxidantes, ocasionando um desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e compostos oxidantes, levando sua redução de atividade das enzimas antioxidantes (Ighodaro; Akinloye, 2018; Pisoschi; Pop, 2015). Em estudo realizado por Ahmadvand *et al.* (2014) foi observado que o diabetes pode levar a uma diminuição nas atividades de enzimas antioxidantes, como GSH-Px e CAT; eles utilizaram ratos diabéticos tipo 1 induzidos por aloxana, onde se averiguou que as atividades de GSH-Px e CAT foram significativamente reduzidas no soro, fígado e rim em comparação com ratos controle. A diminuição das atividades das enzimas antioxidantes no diabetes pode contribuir para o aumento do estresse oxidativo, o que pode levar a danos às células e teciduais (Romão, 2016). Essas observações indicam como o diabetes pode interromper o funcionamento normal das enzimas antioxidantes, que são importantes para manter o equilíbrio redox celular e proteger contra danos oxidativos.

II) Deficiência de cofatores: alguns cofatores são essenciais para o funcionamento adequado das enzimas antioxidantes, como por exemplo o selênio para a enzima GSH-Px. Uma deficiência desses cofatores pode resultar na redução

da atividade dessas enzimas (Ighodaro; Akinloye, 2018).

III) Diminuição na expressão gênica: devido ao fato de durante o estresse oxidativo, a expressão dos genes que codificam as enzimas antioxidantes poder ser inibida, levando à redução de sua produção e atividade (Pisoschi; Pop, 2015). O estado de estresse oxidativo pode estar interferindo na expressão das enzimas antioxidantes através de danos ao material genético, tem-se o conhecimento que os oxidantes produzidos no estresse oxidativo são capazes de gerar danos a macromoléculas celulares, entre elas o DNA e RNA (Krishnamurthy *et al.*, 2024), deste modo, diminuindo a síntese das enzimas e consequentemente diminuindo a atividade das enzimas. Tendo em vista que em estudo de Chen *et al.* (2012) foi observado que variações genéticas nessas enzimas podem aumentar o risco de condições relacionadas ao estresse oxidativo, como diabetes e doenças cardiovasculares, há a possibilidade de que dano ao material genético pode estar relacionado a diminuição da atividade das enzimas SOD e CAT quando comparados ao grupo não diabético, contudo estudos futuros são necessários para investigar melhor se ocorre tal ligação e quanto ela colabora para esse cenário.

IV) Danos estruturais nas enzimas, onde as mesmas podem ser alteradas, por exemplo, pela glicação proteica, via modificações pós-traducionais, assim como ocorre na albumina na circulação ou na hemoglobina nas hemácias. Essas enzimas podem ser alvo de glicação por açúcares redutores e/ou compostos dicarbonílicos (como por exemplo, metilglioxal) produzidos em excesso no DM, resultando em uma sequência de reações e rearranjos estruturais levando à sua inativação, redução da atividade antioxidante e/ou culminar na formação dos AGEs, os quais se acumulam no organismo ao longo do tempo e contribuem para a progressão do estresse glico-oxidativo (Sindhu *et al.*, 2004; Shin, A.; Oh; Park, 2006; Yang, H. *et al.*, 2011; Rajendran *et al.*, 2014; Volpe *et al.*, 2018). Nas figuras 15,17 e 18 pode-se observar níveis de AGEs e TBARS elevados, tanto no plasma quanto nos tecidos dos animais diabéticos, indicando o estabelecimento do estresse glico-oxidativo, que por sua vez podem estar relacionados com as alterações das atividades enzimáticas da SOD e CAT observadas nas figuras 19 e 20. Mesmo não conhecendo com detalhes os mecanismos acionados, os danos gerados pelos precursores de AGEs e/ou EROs possivelmente provocam essa redução das atividades antioxidantes e agravamento do quadro de estresse glico-oxidativo.

Esses são apenas alguns dos possíveis motivos que poderiam levar à redução

das atividades das enzimas antioxidantes durante o estresse oxidativo. É importante ressaltar que a regulação dessas enzimas é complexa e envolve diversos outros fatores, logo estudos que aprofundem melhor a respeito dos mecanismos relacionados a interferência do estresse oxidativo e a atividade enzimática são necessários para maior compreensão e desenho de estratégias para a reversão de tal quadro.

Concentrando-se agora nos resultados alcançados utilizando a metformina isoladamente como tratamento, foi observado neste trabalho que, no fígado, o fármaco não gerou efeito protetor significativo, de modo a não se diferenciar de forma relevante dos resultados observados nos animais diabéticos não tratados. Tal resultado aponta para que possivelmente as vias responsáveis por tal alteração não estão ligadas aos mecanismos de ação e efeitos do fármaco. Outro motivo pode ser o fato de o fígado ser um órgão importante no metabolismo de carboidratos e lipídeos, e assim sofre um maior acúmulo dos produtos da glicação e lipoperoxidação, tal hipótese sendo corroborada pelos níveis de AGEs e TBARS hepáticos, e juntamente com o período extenso de experimento (42 dias) e assim de exposição do órgão a uma situação de estresse glico-oxidativo, levaram possivelmente a taxas de glicação de enzimas antioxidantes que culminaram na incapacidade do fármaco de agir de forma significativa no quadro com relação a redução da atividade enzimática.

Ainda no tecido hepático, no tratamento com pentoxifilina combinada com a metformina pode se observar resultados similares aos obtidos através da terapia apenas com metformina. Em trabalho realizado em nosso laboratório por Oliveira (2021) com o modelo de obesidade e resistência a insulina em camundongos tratados por 14 semanas, foi observado em grupos tratados com inibidores de PDEs roflumilast (0,5 e 1,0 mg/kg) e tadalafil (1,0 e 2,0 mg/kg) resultado da atividade das enzimas antioxidantes no tecido hepático semelhantes ao presente trabalho, indicando possivelmente que os mecanismos pelos os quais a pentoxifilina, assim como os PDEs utilizados por Oliveira (2021), não estão relacionadas diretamente com as vias mais comuns de reestabelecimento hepático dos níveis normais de atividade enzimática. Outra possibilidade que se apresenta é que, devido a cronicidade do quadro de diabetes e estresse glico-oxidativo, os processos que acarretam na diminuição da atividade antioxidante enzimática se tornam muito maiores do que a capacidade do fármaco de proteger as enzimas de processos de glicação de proteína no fígado, deste modo não conseguindo gerar uma manutenção da atividades das

enzimas.

Por outro lado, no tecido renal, as atividades enzimáticas da SOD e CAT do grupo tratado com metformina foram semelhantes as observadas no grupo N, o que sugere que, possivelmente, houve um efeito do fármaco em algum mecanismo presente nos rins, que diferente do fígado, possibilitou de forma direta ou indireta a proteção das atividades enzimáticas da SOD e CAT. Em trabalho de Figueiredo *et al.* (2020) pode-se observar um comportamento da CAT semelhante ao observado nesse trabalho, onde o grupo tratado com metformina apresentou uma atividade maior que dos ratos diabéticos não tratados, indicando algum grau de proteção por parte do fármaco.

Complementar a isso também pode-se visualizar no tecido renal que a terapia combinada de pentoxifilina + metformina também apresentou proteção das atividades enzimáticas da SOD e CAT, sendo no caso da CAT a dose de 100 mg/kg com melhor desempenho, contudo, a combinação não se demonstrou superior a terapia isolada nesse ponto, tendo resultados próximos do grupo DMET para as atividades enzimáticas da SOD e CAT. Em trabalho de Inacio *et al.* (2020) se utilizou a pentoxifilina na dose 50 mg/kg de como tratamento de camundongos como obesidade e resistência a insulina durante 14 semanas, e observou-se que o fármaco apresentou um poder de proteger as atividades das enzimas antioxidantes nos rins. Assim como a metformina, a pentoxifilina apresentou em outros trabalhos a capacidade de conservar a atividade dessas enzimas, contudo ao se comparar os resultados dos grupos de tratamento, não se observa um indício claro de um efeito sinérgico ou adicional na proteção do parâmetro em discussão, bem como não se tem como confirmar quais dos fármacos apresentam maior influência nos valores observados durante o teste.

Por fim, a respeito da GSH-Px foi observado um aumento na atividade enzimática em ratos diabéticos que não receberam tratamento, quando comparados ao grupo normal. Esse aumento que ocorreu tanto no tecido hepático quanto no tecido renal, e isso pode indicar um possível efeito compensatório do sistema antioxidante frente ao estado de estresse glico-oxidativo. Outra possibilidade, que já foi descrita anteriormente na discussão desse trabalho, é que os peróxidos lipídicos estejam sendo produzidos de forma exagerada no fígado de animais diabéticos, devido ao estresse oxidativo; entretanto, esses peróxidos estão sendo eliminados em uma taxa ainda mais eficiente, graças à combinação do aumento das atividades de GSH-Px e

GST (Brownlee, 2001; Kaushik; Kaur, 2003; Torres *et al.*, 2006; Schaur *et al.*, 2015; Jagdale *et al.*, 2016).

Em relação ao tratamento observamos uma tendência, principalmente no rim, dos animais tratados com insulina de manter um nível de atividade mais próxima do resultado visto no grupo N, indicando possivelmente que o tratamento poderia ter reduzido o quadro de estresse oxidativo quando comparado aos demais grupos, e consequentemente mitigou possíveis efeitos, seja efeito compensatório ou de uso de lipoperóxidos como co-substrato. Adicionalmente, foi também observado que o tratamento com metformina não causou diferença significativa na atividade de GSH-Px no grupo D, sendo esse perfil ainda mais definido no tecido renal. Juntamente a isso, obtivemos uma atividade elevada dos grupos de tratamento combinado, DMP50 e DMP100, tanto no fígado quanto no rim, quando comparados aos demais grupos. Uma possível hipótese para essa atividade enzimática tão elevada pode estar ligada a um efeito de compensação, o que nesse contexto se encontra mais acentuado em relação aos demais grupos diabéticos, ou um efeito relacionado a aumento na expressão gênica dessa enzima por ação desses fármacos, especialmente a pentoxifilina.

Em trabalho realizado por Naghdi *et al.* (2022), foi observado em ratos diabéticos induzidos com STZ um aumento na atividade da CAT e a diminuição das enzimas SOD e GPx no tecido cardíaco, quando comparados aos animais não induzidos ao diabetes. Os animais tratados com a metformina nas doses de 300 e 500

mg/kg demonstraram um perfil de conservação das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GSH-Px), mantendo assim níveis semelhantes aos animais não diabéticos; segundo o trabalho isso se dá devido a possível capacidade da metformina diminuir a produção de ERO através da inibição do complexo respiratório I mitocondrial e do aumento da atividade da via das pentoses fosfato (Naghdi *et al.*, 2022; Nesti; Natali, 2017). Outro mecanismo citado em seu trabalho relaciona os resultados ao efeito regulatório do fator Nrf-2, onde se foi observado anteriormente uma regulação positiva de Nrf-2 pela metformina (Kotha; Luthria, 2019; Onken; Driscoll, 2010). Naghdi *et al.* (2022) levanta a hipótese da relação entre os resultados observados por eles e um possível mecanismo que envolve o Nrf-2, portanto, o aumento dependente de Nrf-2 na transcrição de GSH-Px e SOD pode ser uma causa do aumento na atividade de SOD e GSH-Px observado em ratos diabéticos tratados em seu trabalho.

Comparando os resultados observados nesse trabalho com o estudo de Naghdi *et al.* (2022) não se pode identificar uma possível ação dessa via dependente de Nrf-2 no fígado devido a falta de diferenciação dos resultados do tratamento quando comparado ao diabético não tratado; em contrapartida, nos rins é possível identificar uma diferenciação dos resultados do tratamento quando comparado ao diabético não tratado, deste modo pode-se haver uma relação com tal mecanismo assim como apontado por Naghdi *et al.* (2022).

Zamanian *et al.* (2023) corrobora a hipótese da ligação da metformina com o fator de transcrição Nrf-2; o trabalho dele é realizado no contexto de casos de câncer, contudo ele demonstra a ligação de Nrf-2 e o fármaco. No trabalho, é destacado que a metformina é um fármaco antidiabético que regula os níveis elevados de glicose no sangue e tem propriedades terapêuticas adicionais, como efeitos anticâncer, antioxidantes, anti-inflamatórios e neuroprotetores, tais benefícios são alcançados modulando a via de sinalização do fator Nrf-2. O fármaco reduz a expressão de Nrf-2 em células cancerosas, inibe a apoptose de células tumorais, evita a oxidação de células tumorais por meio de uma via independente de AMPK, reduz os níveis de proteína Nrf-2 em células cancerosas por meio de um mecanismo independente de KEAP1, estimula processos antioxidantes para prevenir o estresse oxidativo e melhorar o comprometimento da angiogênese no diabetes mellitus gestacional (Zamanian *et al.*, 2023). Adicionalmente, um trabalho realizado por Abbaszadeh *et al.* (2018) relata que a metformina possui a capacidade de ativar AMPK que, por sua vez, estimula a expressão e a atividade de enzimas antioxidantes, a ativação da AMPK pela metformina leva à regulação positiva do Nrf-2, regulando a expressão de enzimas antioxidantes.

Outra possibilidade a respeito de proteção à atividade das enzimas antioxidantes está relacionado ao efeito da metformina em reduzir os genes pró-apoptóticos através da regulação negativa de fatores FOXO3 (que participam da expressão de genes pró-apoptóticos como Bax). Isso se torna interessante devido ao fato de o diabetes induzir a apoptose e danos nos cardiomiócitos através da produção aumentada de EROs, esse aumento dos níveis de EROs em condições hiperglicêmicas reduz a ativação de AKT, levando à expressão de genes pró-apoptóticos, resultando na expressão elevada dos genes caspase-3 e Bax e aumento da proporção de Bax/Bcl-2 (Naghdi *et al.*, 2022; Nesti; Natali, 2017).

A respeito dos efeitos antioxidantes da pentoxifilina, pode se observar em um trabalho realizado por Gholami *et al.* (2021) um aumento significativo da atividade enzimática da CAT e GSH-Px no tecido cardíaco de camundongos, sendo as doses de 50 e 100 mg/kg as que apresentaram melhores resultados, tal perfil se assemelha ao observado em nosso trabalho onde, principalmente na atividade da GSH-Px, as maiores doses foram as que apresentaram um aumento mais acentuado. Corroborando tais resultados, Wang, Y. *et al.* (2020) indicaram em seu trabalho, onde foi avaliada a capacidade antioxidante e promoção de biogênese mitocondrial para melhora em déficits comportamentais, uma possível interação entre a pentoxifilina e o fator Nrf-2, regulando positivamente o Nrf-2, bem como promovendo a biogênese mitocondrial ao regular positivamente o receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissoma e o coativador gama 1-alfa (PGC-1 α).

Adicionalmente as informações já citadas anteriormente sobre o sistema antioxidante e os efeitos dos fármacos metformina e pentoxifilina sobre o mesmo temos demonstrados em vários estudos uma correlação entre a AMPK e a atividade das enzimas antioxidantes. Foi demonstrado que a ativação da AMPK aumenta a expressão das principais enzimas antioxidantes, como a Mn-SOD e a CAT, particularmente em resposta a compostos como o resveratrol e a metformina, que são conhecidos por ativar as vias de sinalização da AMPK. Essa regulação da expressão das enzimas antioxidante pela AMPK pode ser por meio da regulação da via Nrf-2 como dito anteriormente, que é vital para a defesa antioxidante, indicando uma interação complexa entre a AMPK e os mecanismos antioxidantes celulares (Chhunchha; Kubo; Singh, 2022; Hee *et al.* 2014).

Em trabalho de Chhunchha *et al.* (2022) é demonstrado usando uma variedade de linhas celulares epiteliais de lente derivados de camundongos e humanos, que a metformina pode restaurar respostas antioxidantes deterioradas e seu impacto adverso em células/tecidos/órgãos devido o envelhecimento e o estresse oxidativo, por meio da reativação do eixo AMPK/Bmal1/Nrf-2/antioxidante, eixo que quando ativado age positivamente no processo de transcrição das enzimas antioxidantes e reestabelecendo o equilíbrio redox. Adicionalmente a isso Hee *et al.* (2014) sugerem uma das diversas formas pela qual a AMPK que foi ativada por resveratrol pode agir no sistema antioxidante, eles sugerem que a AMPK fosforila diretamente o FoxO1 humano em Thr649 in vitro e através desse mecanismo é o aumento na transcrição

dependente de FoxO1 de Mn-SOD e a CAT.

Outro trabalho também indica outras formas pela qual a AMPK pode influenciar no sistema antioxidante, em um estudo realizado analisando pequenas artérias intrarrenais isoladas dos rins de pacientes com tumor renal e ratos Wistar foi observado pelos pesquisadores que a ativação da AMPK com o ativador seletivo A769662 (potente vaso dilatador) leva a uma redução na produção de EROs, especificamente da Nox4 e Nox2. Ao diminuir os níveis de ROS, a ativação da AMPK pode aumentar a atividade das enzimas antioxidantes, pois um menor estresse oxidativo pode levar a uma melhor função dessas enzimas (Rodríguez *et al.*, 2020).

Em trabalho de Colombo e Moncada (2009) é indicado o papel crucial da AMPK- α 1 em regular a expressão de enzimas antioxidantes nas células endoteliais vasculares, particularmente nas células endoteliais da veia umbilical humana. Essa regulação foi observada ao se silenciar a AMPK- α 1 levando a uma redução significativa na expressão dos principais genes antioxidantes, incluindo SOD-Mn, CAT, gama-glutamilcisteína sintase (GGCs) e tioredoxina. Essa redução na expressão de enzimas antioxidantes se correlaciona com o aumento de EROs e maiores taxas de apoptose em células silenciadas para AMPK- α 1, indicando que a mesma é essencial para manter as defesas antioxidantes. Com isso pode-se identificar que a ativação da AMPK- α 1 pelas EROs mitocondriais, independente das alterações da AMP, está envolvida em uma via de sinalização que melhora o estado antioxidante das células endoteliais. No geral, a AMPK serve como um mediador fundamental na regulação das enzimas antioxidantes, ressaltando sua importância na defesa celular contra danos oxidativos, sendo assim os efeitos antioxidantes associados a metformina e pentoxifilina pode ocorrer por meio da ativação farmacológica do AMPK que irá agir como mediador do processo de transcrição das enzimas antioxidantes através da ativação de fatores como Nrf-2 e FOXO1.

Com relação ao fígado, assim como a terapia isolada, a combinação com a pentoxifilina não apresentou diferença significativa nas enzimas antioxidantes, contudo, há trabalhos que indicam efeitos do fármaco nesse órgão. Hamouda *et al.* (2022) mostraram no fígado de camundongos com esteato-hepatite não alcoólica que o tratamento com pentoxifilina (100 mg/kg) diminuiu significativamente os níveis de LDL-C, colesterol total, triglicérides, GSH-Px, SOD, MDA, glicose, insulina e HOMA-IR. Além disso, a pentoxifilina aumentou a expressão do gene da AMPK no fígado. Além disso, o tratamento com pentoxifilina diminuiu a expressão da caspase-8 e da

serina/treonina- protefna quinase 3 que interage com o receptor (RIPK3), os quais estão relacionados ao processo de apoptose, bem como a expressão do fator nuclear kappa B (NF- κ B), da interleucina-6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Outros trabalhos na literatura confirmam sua atividade antioxidante no tecido hepático de ratos eutanasiados 4h e 24h após indução de processo inflamatório, protegendo a atividade de SOD e preservando os níveis de GSH, no trabalho em questão eles constataram potencial da pentoxifilina na dose de 50mg/kg no tratamento de lesões hepáticas provocadas por inflamação (Vircheva *et al.* , 2010).

De acordo com o artigo de An *et al.* (2015), foi avaliada a doença renal em ratos diabeticos induzidos por STZ que foram tratados por 12 semanas com pentoxifilina (doses de 30 e 50 mg/kg/dia), onde se observou que os níveis de MDA aumentaram e os de SOD diminuíram gradualmente à medida que a doença progride. Os resultados do estudo mostraram que a administração de pentoxifilina foi capaz de reduzir de forma significativa os níveis de MDA no sangue e nos rins de ratos, além de aumentar os níveis de SOD, se assemelhando ao resultado obtido em nosso trabalho. Outro fenômeno observado no estudo foi a nitrosilação de proteínas, que ocorre quando EROs interagem com proteínas durante o processo de inativação do óxido nítrico, as espécies reativas de oxigênio produzem produtos citotóxicos, como o peroxinitrito, que reagem com resíduos de tirosina de proteínas, formando nitrotirosina. O estudo também constatou uma significativa redução na expressão de nitrotirosina nos rins dos ratos após o tratamento com altas doses de pentoxifilina, sugerindo que a pentoxifilina também pode regular de forma negativa a expressão de nitrotirosina. Adicionalmente a esses resultados, em trabalho realizado por Yang, R. *et al.* (2015), foram apresentados dados que corroboram esses achados; no trabalho, animais que estavam recebendo 50 mg/kg pentoxifilina tiveram uma redução, após aproximadamente 48h da indução de lesão renal aguda induzida por contraste, no conteúdo de MDA renal e na atividade da NADPH oxidase, enquanto houve aumento na atividade da SOD renal, indicando que o fármaco possui efeito protetor no tecido renal.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam que a metformina e a pentoxifilina possuem potencial no combate às complicações diabéticas, sendo capazes de aparentemente melhorar a glicemia e atenuar o estresse glico-oxidativo. A terapia combinada entre esses fármacos não se mostrou significativamente superior ao uso de forma separada dos fármacos. Mesmo não revertendo as alterações observadas em parâmetros como o perfil lipídico, marcadores de função hepática e renal, os tratamentos foram capazes de promover melhorias nos níveis de AGEs fluorescentes no plasma, fígado e nos rins. Além disso, os tratamentos demonstraram preservação na atividade da enzima antioxidante PON 1, o que pode ser relevante na prevenção de complicações cardiovasculares. Este estudo contribui para o avanço no tratamento do diabetes e suas complicações, fornecendo evidências para futuras pesquisas que visem o reposicionamento da pentoxifilina ou sua combinação com outros fármacos para o tratamento de disfunções metabólicas.

8. REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH, A. *et al.* Metformin; a mini-review to its antioxidative and anti-inflammatory properties. **Journal of Renal Injury Prevention**, v. 7, n. 1, p. 7-10, 2018. DOI: <https://doi.org/10.15171/jrip.2018.02>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/323208594_Metformin_a_mini-review_to_its_antioxidative_and_anti-inflammatory_properties. Acesso em: 26 ago 2024.
- ACEDO, S. C. *et al.* Role of pentoxifylline in non-alcoholic fatty liver disease in high-fat diet-induced obesity in mice. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 24, p.2551-2558, 2015. DOI: <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i24.2551>. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v7/i24/2551.htm>. Acesso em: 26 ago 2024.
- ADIGA, U.; KATHYAYANI, P.; NANDITH, P. B. Association of Insulin Based Insulin Resistance with Liver Biomarkers in Type 2 Diabetes Mellitus, **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 1199-1205, 2019. DOI: <https://dx.doi.org/10.22207/JPAM.13.2.60>. Disponível em: <https://microbiologyjournal.org/association-of-insulin-based-insulin-resistance-with-liver-biomarkers-in-type-2-diabetes-mellitus/>. Acesso em: 26 ago 2024
- AHMADVAND, H. *et al.* Amelioration of altered serum, liver, and kidney antioxidant enzymes activities by sodium selenite in alloxan-induced diabetic rats. **Reports of Biochemistry & Molecular Biology**. v. 3, n. 1,p.14-20, 2014. PMCID: PMC4757084. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4757084/>. Acesso em: 26 ago 2024.
- AHMED, D., *et al.* Antidiabetic, renal/hepatic/pancreas/cardiac protective and antioxidant potential of methanol/dichloromethane extract of Albizzia lebbeck Benth. stem bark (ALEx) on streptozotocin induced diabetic rats. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 14, p. 243, 2014.DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-243>. Disponível em: <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-14-243>. Acesso em: 26 ago 2024.
- ALBUQUERQUE, R. M. *et al.* Effects of cilostazol and pentoxifylline on forearm reactive hyperemia response, lipid profile, oxidative stress, and inflammatory markers in patients with intermittent claudication. **Angiology**, v. 59, p. 549-558, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1177/0003319707309656>.Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0003319707309656>. Acesso em: 26 ago 2024.
- ALCALAY, Y. *et al.* Popeye domain containing 1 (Popdc1/Bves) is a caveolae-associated protein involved in ischemia tolerance. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e71100, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071100>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0071100> Acesso em: 26 ago 2024.
- ALDRIDGE, W. N. Serum esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination.

Biochemical Journal, v. 53, n. 1, p. 110-117, 1953. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj0530110>. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article-abstract/53/1/110/47882/Serum-esterases-1-Two-types-of-esterase-A-and-B?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 26 ago 2024.

ALI, B.H. *et al.* New model for adenine-induced chronic renal failure in mice, and the effect of gum acacia treatment thereon: Comparison with rats. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 68, p. 384–393, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.05.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1056871913002517?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago 2024.

AMBADE, A.; MANDREKAR, P. Oxidative stress and inflammation: essential partners in alcoholic liver disease. **Internacional Journal of Hepatology**, v. 2012, 853175, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/853175>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2012/853175>. Acesso em: 26 ago 2024.

AMORIM, R. G. *et al.* Kidney Disease in Diabetes Mellitus: Cross-Linking between Hyperglycemia, Redox Imbalance and Inflammation. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 112, n. 5, p. 577–587, 2019. DOI: <https://doi.org/10.5935/abc.20190077>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abc/a/8DSdzvT5sd4tbTFM6N6PZCD/?lang=en>. Acesso em: 26 ago 2024.

AMUNJELA, J. N.; SWAN, A. H.; BRAND, T. The role of the Popeye domain containing gene family in organ homeostasis. **Cells**, v. 8, n. 12, p. 1594, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells8121594>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/12/1594>. Acesso em: 26 ago 2024.

AN, Z. M. *et al.* Effects and clinical significance of pentoxifylline on the oxidative stress of rats with diabetic nephropathy. **Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]**, v. 35, n. 3, p. 356-361, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11596-015-1437-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11596-015-1437-y>. Acesso em: 26 ago 2024.

ANTINOZZI, C.; SGRO, P.; DI LUIGI, L. Advantages of phosphodiesterase type 5 inhibitors in the management of glucose metabolism disorders: A clinical and translational issue. **International Journal of Endocrinology**, v. 2020, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/7078108>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2020/7078108>. Acesso em: 26 ago 2024.

ANTUNES, M. M.; BAZOTTE, R. B. Efeitos da metformina na resistência insulínica: aspectos fisiopatológicos e mecanismos de ação farmacológica. **SaBios- Revista De Saúde E Biologia**, v. 10, n. 3, p.105–112, 2015. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/EFEITOS-DA-METFORMINA-NA-RESIST%C3%80NCIA-INSUL%C3%80NICA%3A-E-Antunes-Bazotte/82bb8d627721ee1ed57face298ba5d86fa02a792>. Acesso em: 26 ago 2024.

ARCARO, C.A.; *et al.* Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and

antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic rats. **PloSOne**, v. 9, n. 12, e-113993, 2014. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Piperine,-a-Natural-Bioenhaner,-Nullifies-the-and-Arcaro-Gutierrez/35cb5881ab5e9bcbfc42677de2a7f4d74e404eac>. Acesso em: 26 ago 2024.

ARCARO, C. A. *et al.* Involvement of cAMP/EPAC/Akt signaling in the antiproteolytic effects of pentoxifylline on skeletal muscles of diabetic rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 124, n. 3, p. 704-716, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00499.2017>. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/jappphysiol.00499.2017>. Acesso em: 26 ago 2024.

ARIL, K. *et al.* Role of protein kinase C in pitavastatin-induced human paraoxonase I expression in Huh7 cells. **Metabolism**, v. 59, n. 9, p.1287-1293, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.12.003>. Disponível em: [https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495\(09\)00507-1/abstract](https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495(09)00507-1/abstract). Acesso em: 26 ago 2024.

ARTHUR, J. R. The glutathione peroxidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.57, 1825–1835, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1007/PL00000664>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/PL00000664>. Acesso em: 26 ago. 2024.

ASLAM, M.; LADILOV, Y. Emerging role of cAMP/AMPK signaling. **Cells**, v. 11, n. 2, p. 308, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells11020308>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/2/308>. Acesso em: 26 ago 2024.

ASSIS, R. P. *et al.* 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, p. 332, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18040332>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/4/332>. Acesso em: 26 ago 2024.

AVIRAM, M. *et al.* Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. **Circulation**, v. 101, n. 21, p. 2510-2517, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.21.2510>. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/01.cir.101.21.2510>. Acesso em: 26 ago 2024.

AYALA, T. S. **A hiperglicemia altera o perfil inflamatório e imunometabólico de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos**. 2019. Tese (Doutorado em Fisiopatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2019. doi:10.11606/T.9.2019.tde-07052019-143006. Acesso em: 26 ago 2024.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014 p. 360438, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/360438>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2014/360438>. Acesso em: 26 ago 2024.

AZEVEDO, M. F. *et al.* Clinical and Molecular Genetics of the Phosphodiesterases (PDEs). **Endocrine Reviews**, v. 35, n. 2, p. 195-233, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1210/er.2013-1053>. Disponível em: <https://academic.oup.com/edrv/article/35/2/195/2354677?login=false>. Acesso em: 26 ago 2024.

BAEK, I. J. *et al.* Tissue expression and cellular localization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) mRNA in male mice. **Journal of molecular histology**, v. 38, p. 237-244, 2007. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10735-007-9092-7>. Acesso em: 26 ago 2024.

BAILLIE, G. S.; TEJEDA, G. S.; KELLY, M. P. Therapeutic targeting of 3,5- cyclic nucleotide phosphodiesterases: inhibition and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 10, p. 770-796, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0033-4>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41573-019-0033-4>. Acesso em: 26 ago 2024.

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L.T. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 940–950, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302008000600005>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abem/a/tYzW8XKJFvn5GTb638YY68R/>. Acesso em: 26 ago 2024.

BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, jul. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rn/a/Fvg4wkYjZPgSfs95f4chVjx/#>. Acesso em: 26 ago 2024.

BASELT, R. C. **Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man**. 10th ed. Biomedical Publications; Seal Beach, CA, USA: Forensic Science, Medicine and Pathology, v. 11, p. 147, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12024-014-9602-3>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12024-014-9602-3>. Acesso em: 26 ago 2024.

BAVIERA, A. M., *et al.* Pentoxifylline inhibits Ca²⁺-dependent and ATP proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle from acutely diabetic rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 292, n. 3, p. E702-8, 2007. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/epdf/10.1152/ajpendo.00147.2006>. Acesso em: 26 ago 2024.

BAYKARA, M. *et al.* Pentoxifylline treatment for protecting diabetic retinopathy in children with type 1 diabetes. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 1-2, p. 19-24, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1515/jpem-2012-0166>. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/jpem-2012-0166/html>. Acesso em: 26 ago 2024.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269771903708?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago 2024.

BEAVO, J. A.; BRUNTON, L. L. Cyclic nucleotide research—still expanding after half a century. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 9, p. 710-717, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm911>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm911>. Acesso em: 26 ago 2024.

BEERS JUNIOR, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 195, n. 1, p. 133-140, 1952. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)50881-X/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)50881-X/pdf). Acesso em: 26 ago 2024.

BEISSWENGER, P.; RUGGIERO-LOPEZ, D. Metformin inhibition of glycation processes. **Diabetes & Metabolism**, v. 29, n. 4, p. 6S95-6S103, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1262-3636\(03\)72793-1](https://doi.org/10.1016/S1262-3636(03)72793-1). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1262363603727931?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago 2024.

BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 488- 520, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.5>. Disponível em: <https://pharmrev.aspetjournals.org/content/58/3/488>. Acesso em: 26 ago 2024.

BEREZIN, A. Metabolic memory phenomenon in diabetes mellitus: achieving and perspectives. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 10, n. 2, p. S176- S183, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2016.03.016>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1871402116300054?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago 2024.

BEVAN, E. G.; WALLER, P. C.; RAMSAY, L. E. Pharmacological Approaches to the Treatment of Intermittent Claudication. **Drugs & Aging**, v. 2, n. 2, p. 125-136, 1992. DOI: <https://doi.org/10.2165/00002512-199202020-00006>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.2165/00002512-199202020-00006>. Acesso em: 26 ago 2024.

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**, v. 288, n. 5, p. 1212-1217, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5922>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X01959224?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago 2024.

BIERHAUS, A. *et al.* AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. **Cardiovascular Research**, v. 37, n. 3, p. 586-600, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(97\)00233-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(97)00233-2).

Disponível em:

<https://academic.oup.com/cardiovascres/article/37/3/586/319620?login=false>. Acesso em: 26 ago 2024.

BOUCHOUCHA, M.; UZZAN, B.; COHEN, R. Metformin and digestive disorders.

Diabetes & Metabolism, v. 37, n. 2, p. 90-96, 2011. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.diabet.2010.11.002>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1262363610002430?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago 2024.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D. Glucose and reactive oxygen species. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 5, p. 561-568, 2002. DOI:

<https://doi.org/10.1097/00075197-200209000-00016>. Disponível em:

[https://journals.lww.com/co-](https://journals.lww.com/co-clinicalnutrition/abstract/2002/09000/glucose_and_reactive_oxygen_species.16.aspx)

[clinicalnutrition/abstract/2002/09000/glucose_and_reactive_oxygen_species.16.aspx](https://journals.lww.com/co-clinicalnutrition/abstract/2002/09000/glucose_and_reactive_oxygen_species.16.aspx).

Acesso em: 26 ago 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica:**

diabetes mellitus / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília, DF: Ministério da Saúde, v.1, n.36, p.

160, 2013. Disponível em: [https://www.gov.br/conitec/pt-](https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/pdf/caderno_atencao_basica36.pdf/view)

[br/midias/pdf/caderno_atencao_basica36.pdf/view](https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/pdf/caderno_atencao_basica36.pdf/view). Acessado em: 26 ago 2024

BRAVI, M. C. *et al.* Insulin decreases intracellular oxidative stress in patients with

type 2 diabetes mellitus. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 55, n. 5, p. 691-5, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2006.01.003>.

Disponível em: [https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495\(06\)00041-2/abstract](https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495(06)00041-2/abstract). Acessado em: 26 ago 2024

BROWN, S. H. J. *et al.* Implementing fluorescence anisotropy screening and crystallographic analysis to define PKA isoform-selective activation by cAMP

analogs. **ACS chemical biology**, v. 8, n. 10, p. 2164-2172, 2013. DOI:

<https://doi.org/10.1021/cb400247t>. Disponível em:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cb400247t>. Acessado em: 26 ago 2024

BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 147-152, 2004.

DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI22422>. Disponível em:

<https://www.jci.org/articles/view/22422>. Acessado em: 26 ago 2024

BROWNLEE, M. Biochemistry and Molecular Cell Biology of Diabetic Complications.

Nature, n. 414, p. 813–820, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1038/414813a>. Disponível

em: <https://www.nature.com/articles/414813a>. Acessado em: 26/08/2024.

BURK, R. F. *et al.* Glutathione peroxidase-3 produced by the kidney binds to a population of basement membranes in the gastrointestinal tract and in other

tissues. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 301, n. 1, p. G32-G38, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00064.2011>.

Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpgi.00064.2011>.

Acessado em: 26 ago 2024.

CAHN, A.; CEFALU, W. T. Clinical Considerations for Use of Initial Combination Therapy in Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 39, n. 2, p. S137- S145, 2016. DOI: <https://doi.org/10.2337/dcS15-3007>. Disponível em: https://diabetesjournals.org/care/article/39/Supplement_2/S137/30104/Clinical-Considerations-for-Use-of-Initial. Acessado em: 26 ago 2024.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484-490, 1985. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)13062-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)13062-4). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0076687985130624?via%3Dihub>. Acessado em: 26 ago 2024.

CERIELLO, A.; IHNAT, M. A.; THORPE, J. E. The “Metabolic Memory”: is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 2, p. 410-415, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1824>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jcem/article/94/2/410/2597928?login=false>. Acessado em: 26 ago 2024.

CHABORY, E. *et al.* Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 7, p. 2074-2085, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI38940>. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/38940>. Acessado em: 26 ago 2024.

CHAKRABORTY, A.; CHOWDHURY, S.; BHATTACHARYA, M. Effect of metformin on oxidative stress, nitrosative stress and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes patients. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 93, n. 1, p. 56-62, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2010.11.030>. Disponível em: [https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227\(10\)00582-6/abstract](https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227(10)00582-6/abstract). Acessado em: 26 ago 2024.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 192–208, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-003-3206-5>. Acessado em: 26 ago 2024.

CHEN, S.; CHIARAMONTE, R. [Creatinine] can change in an unexpected direction due to the volume change rate that interacts with kinetic GFR: Potentially positive paradox. **Physiological Reports**, v. 10, n. 3, 2022. DOI: <https://doi.org/10.14814/phy2.15172>. Disponível em: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.14814/phy2.15172>. Acessado em: 26 ago 2024.

CHEN, H. *et al.* Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD), glutathione peroxidase-1 (GPX1), and catalase (CAT) contribute to elevated plasma triglyceride levels in Chinese patients with type 2 diabetes or diabetic cardiovascular disease. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 363, p.

85–91, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11010-011-1160-3>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-011-1160-3>. Acessado em: 26 ago 2024.

CHENG, C. C. *et al.* Interleukin-6 upregulates paraoxonase 1 gene expression via an AKT/NF- κ B- dependent pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 437, n. 1, p. 55-61, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.034>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X13010218?via%3Dihub>. Acessado em: 26 ago 2024.

CHHUNCHHA, B.; KUBO, E.; SINGH, D. P. Obligatory Role of AMPK Activation and Antioxidant Defense Pathway in the Regulatory Effects of Metformin on Cellular Protection and Prevention of Lens Opacity. **Cells**, v. 11, n. 19, p. 3021-3021, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells11193021>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/19/3021>. Acessado em: 26 ago 2024.

CHILELLI, N. C.; BURLINA, S.; LAPOLLA, A. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: a “glycoxidation-centric” point of view. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 23, n. 10, p. 913-919, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2013.04.004>. Disponível em: [https://www.nmcd-journal.com/article/S0939-4753\(13\)00092-6/abstract](https://www.nmcd-journal.com/article/S0939-4753(13)00092-6/abstract). Acessado em: 26 ago 2024.

CHINAKA, N. C. *et al.* Restoration of Liver Function Status in High Fat Diet Streptozotocin Induced NIDDM in Wistar Rats by Antioxidant Supplementation. **Molecular Biology**, v. 08, n.01, 2018. DOI: <https://doi.org/10.4172/2168-9547.1000228>. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Restoration-of-Liver-Function-Status-in-High-Fat-in-Chinaka-Cc/45e3e4cc491909822182104f0a2dcd87c906dacb>. Acessado em: 26 ago 2024.

CHISTIAKOV, D. A. *et al.* Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. **Biochimie**, v. 132, p. 19-27, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.10.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030090841630284X?via%3Dihub>. Acessado em: 26 ago 2024.

CHOI, D. E. *et al.* Pretreatment of sildenafil attenuates ischemia-reperfusion renal injury in rats. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 297, n. 2, p. 362-370, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90609.2008>. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajprenal.90609.2008>. Acesso em: 26 ago 2024.

CHOW, F. Y. *et al.* Intercellular adhesion molecule-1 deficiency is protective against nephropathy in type 2 diabetic db/db mice. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 16, n. 6, p. 1711- 22, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1681/ASN.2004070612>. Disponível em: https://journals.lww.com/jasn/fulltext/2005/06000/intercellular_adhesion_molecule_1_deficiency_is.24.aspx2008. Acesso em: 26 ago 2024.

CODOÑER-FRANCH, P. *et al.* Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. **Translational Research**, v. 158, p. 369–384, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2011.08.004> Disponível em: [https://www.translationalres.com/article/S1931-5244\(11\)00264-7/abstract](https://www.translationalres.com/article/S1931-5244(11)00264-7/abstract). Acesso em: 26 ago 2024.

COLLIER, A. *et al.* Liver fibrosis markers and all cause mortality in people with type 2 diabetes: A population based study (The Ayrshire Diabetes Outcomes Cohort (ADOC) Study). **diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 25, n. 9, p. 2659-2668, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1111/dom.15153>. 004. Disponível em: <https://dom-pubs.pericles-prod.literatumonline.com/doi/10.1111/dom.15153>. Acesso em: 26 ago 2024.

COLOMBO, S. L.; MONCADA, S. AMPK α 1 regulates the antioxidant status of vascular endothelial cells.. **Biochemical Journal**, p. 421, n. 2, p.163-169, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1042/BJ20090613>. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article-abstract/421/2/163/44963/AMPK-1-regulates-the-antioxidant-status-of?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 26 ago 2024.

COSTA, A. D. T.; GARLID, K. D. Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKC ϵ , ROS, and MPT. **American journal of physiology: Heart and circulatory physiology**, v. 295, n. 2, p. H874-82, 2008. doi: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01189.2007>. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpheart.01189.2007>. Acesso em: 26 ago. 2024.

COSTA, B. B. da; MOREIRA, T. A. Principais aspectos fisiopatológicos e clínicos presentes no Diabetes mellitus tipo I (autoimune). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, p. e153101421773, 2021. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i14.21773>. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/21773>. Acesso em: 26 ago 2024.

COSTA, L. G. *et al.* Serum paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 103, n. 1, p. 66-76, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(90\)90263-T](https://doi.org/10.1016/0041-008X(90)90263-T). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0041008X9090263T?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago. 2024.

COSTA, M. C. *et al.* Trigonelline and curcumin alone, but not in combination, counteract oxidative stress and inflammation and increase glycation product detoxification in the liver and kidney of mice with high-fat diet-induced obesity. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 76, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108303>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0955286319304504?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago. 2024.

COSENTINO-GOMES, D.; ROCCO-MACHADO, N.; MEYER-FERNANDES, J. R. Cell signaling through protein kinase C oxidation and activation. **International**

Journal of Molecular Sciences. v. 13, n. 9, p. 10697-10721, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms130910697>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/13/9/10697>. Acesso em: 26 ago. 2024.

COOK, J. G. H. Creatinine assay in the presence of protein. **Clinica Chimica Acta**, v. 32, n. 3, p. 485-486, 1971. DOI: [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(71\)90452-9](https://doi.org/10.1016/0009-8981(71)90452-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0009898171904529?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago. 2024.

CROUCH, S. P.; FLETCHER, J. Effect of ingested pentoxifylline on neutrophil superoxide anion production. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 11, p. 4504-4509, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.60.11.4504-4509.1992>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.60.11.4504-4509.1992>. Acesso em: 26 ago. 2024.

ĆULAFIĆ, M. *et al.* Pentoxifylline with metformin treatment improves biochemical parameters in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of Medical Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 290-298, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2478/jomb-2019-0043>. Disponível em: <https://doaj.org/article/d66e88b5e1e4448b951c2ae7a54d77e0>. Acesso em: 26 ago. 2024.

DEFRONZO, R. A. *et al.* Type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 15019, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrdp201519>. Acesso em: 26 ago. 2024.

DELAUNAY, M. *et al.* The role of cyclic AMP signaling in cardiac fibrosis. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 69, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9010069>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/1/69>. Acesso em: 26 ago. 2024.

DELL, R. B.; HOLLERAN, S.; RAMAKRISHNAN, R. Sample Size Determination. **Ilar Journal**, v. 43, n. 4, p. 207-213, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1093/ilar.43.4.207>. Disponível em: <https://academic.oup.com/ilarjournal/article/43/4/207/981703?login=false>. Acesso em: 26 ago. 2024.

DIMO, T. *et al.* Effect of *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) stem bark methylene chloride/methanol extract on streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 110, n. 3, p. 434-8, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.020>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874106005514?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago. 2024.

DIPETRILLO, K.; GESEK, F. A. Pentoxifylline ameliorates renal tumor necrosis factor expression, sodium retention, and renal hypertrophy in diabetic rats. **American Journal of Nephrology**, v. 24, n. 3, p. 352-359, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1159/000079121>. Disponível em: <https://karger.com/aj/article-abstract/24/3/352/25132/Pentoxifylline-Ameliorates-Renal-Tumor-Necrosis?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 26 ago. 2024.

DOMVRI, K. *et al.* Potential synergistic effect of phosphodiesterase inhibitors with chemotherapy in lung cancer. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 18, p. 3648, 2017. DOI: <https://doi.org/10.7150/jca.21783>. Disponível em: <https://www.jcancer.org/v08p3648.htm>. Acesso em: 26 ago. 2024.

DONATE-CORREA, J. *et al.* Pentoxifylline for Renal Protection in Diabetic Kidney Disease. A Model of Old Drugs for New Horizons. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 3, p. 287, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm8030287>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0383/8/3/287>. Acesso em: 26 ago. 2024.

DONATH, M. Y. *et al.* Inflammation in obesity and diabetes: islet dysfunction and therapeutic opportunity. **Cell Metabolism**, v. 17, p. 860–872, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.001>. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131\(13\)00189-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1550413113001897%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131(13)00189-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1550413113001897%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 26 ago. 2024.

DONNELLY, K. L.; SMITH, C. I.; SCHWARZENBERG, S. J.; JESSURUN, J.; BOLDT, M. D.; PARKS, E. J. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1343-1351, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI23621>. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/23621>. Acesso em: 26 ago. 2024.

DREVET, J. R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 250, n. 1-2, p. 70-79, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.027>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0303720705004739?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago. 2024.

DRINGEN, R. *et al.* Peroxide detoxification by brain cells. **Journal of Neuroscience Research**, v. 79, n. 1-2, p. 157-65, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1002/jnr.20280>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jnr.20280>. Acesso em: 26 ago. 2024.

DU, J. *et al.* Effects of pentoxifylline on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 2, p. 569-577, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i2.569>. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i2/569.htm>. Acesso em: 26 ago. 2024.

DUBOIS, C. *et al.* Exposure of *Caenorhabditis elegans* to Dietary N-Carboxymethyllysine Emphasizes Endocytosis as a New Route for Intestinal Absorption of Advanced Glycation End Products. **Nutrients**, v. 13, p. 4398, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu13124398>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/13/12/4398>. Acesso em: 26 ago. 2024.

EFE, O. *et al.* Metformin improves urine concentration in rodents with nephrogenic diabetes insipidus. **JCI Insight**, v. 1, p. e88409, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.88409>. Disponível em:

<https://insight.jci.org/articles/view/88409>. Acesso em: 26 ago. 2024.

EL-DEEN, R. M. *et al.* Comparative effectiveness of phosphodiesterase 3, 4, and 5 inhibitors in amelioration of high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver in rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 34, n. 3, p. 353-364, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/fcp.12530>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/fcp.12530>. Acesso em: 26 ago. 2024.

EMEL'YANOV, M. O. *et al.* Rapid suppression of multidrug resistance of leukemic cells by oxidative stress. **Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology**, v. 4, n. 2, p. 212-219, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1990747810020133>. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Rapid-suppression-of-multidrug-resistance-of-cells-Emel%E2%80%99yanov-Kim/bb88a85ecbb6fe6cf3a1b2979ef4d9b3147835ac>. Acesso em: 26 ago. 2024.

EMMENDOERFFER, A. *et al.* Role of inflammation in chemical-induced lung cancer. **Toxicology Letters**, v. 15, n. 112-113, p. 185-91, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(99\)00285-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(99)00285-4). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378427499002854?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago. 2024.

EREJUWA, O. O.; SULAIMAN, S. A.; AB WAHAB, M. S.; SIRAJUDEEN, K. N. S.; SALLEH, M. S. M.; GURTU, S. Glibenclamide or metformin combined with honey improves glycemic control in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 2, p. 244, 2011. DOI: <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.244>. Disponível em: <https://www.ijbs.com/v07p0244.htm>. Acesso em: 26 ago. 2024.

ESWORTHY, R. S. *et al.* Reactivity of plasma glutathione peroxidase with hydroperoxide substrates and glutathione. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 307, n. 1, p. 29-34, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1555>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003986183715559?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago. 2024.

ETSUO, N. *et al.* Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 668-676, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.072>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X05017766?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago. 2024.

ETOH, T. *et al.* Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventive insulin treatment. **Diabetologia**, v. 46, p. 1428-37, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1205-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00125-003-1205-6>. Acesso em: 26 ago. 2024.

EVELSON, P. *et al.* Hepatic morphological changes and oxidative stress in chronic

streptozotocin-diabetic rats. **Annals of hepatology**, v. 4, n. 2, p. 115-120, 2005. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)32074-5](https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)32074-5). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1665268119320745>. Acesso em: 26 ago. 2024.

FELIG, P.; BERGMAN, M. The endocrine Pancreas: diabetes mellitus. **Endocrinology and Metabolism**, v. 19, p. 1107-1250, 1995.

FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G. P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 2, p. 153–164, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.09.030>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584906006952?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago. 2024.

FIGUEIREDO, I. D. *et al.* Lycopene Improves the Metformin Effects on Glycemic Control and Decreases Biomarkers of Glycoxidative Stress in Diabetic Rats. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 13, p. 3117-3135, 2020. DOI: <https://doi.org/10.2147/DMSO.S265944>. Disponível em: <https://www.dovepress.com/lycopene-improves-the-metformin-effects-on-glycemic-control-and-decrea-peer-reviewed-fulltext-article-DMSO>. Acesso em: 26 ago. 2024.

FISHMAN, S. L.; SONMEZ, H.; BASMAN, C.; SINGH, V.; PORETSKY, L. The Role of Advanced Glycation End-Products in the Development of Coronary Artery Disease in Patients with and without Diabetes Mellitus: A Review. **Molecular Medicine**, v.24, p. 59, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0060-3>. Disponível em: <https://molmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s10020-018-0060-3>. Acesso em: 26 ago. 2024.

FLORA, S. J. S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metallloid exposure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, p. 191–206, 2009. DOI: <https://doi.org/10.4161/oxim.2.4.9112>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.4161/oxim.2.4.9112>. Acesso em: 26 ago. 2024.

FORGIONE, M. A. *et al.* Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. **American journal of physiology-heart and ircularatory physiology**, v. 282, n. 4, p. H1255-H1261, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00598.2001>. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpheart.00598.2001>. Acesso em: 26 ago. 2024.

FRANCIS, S. H.; CORBIN, J. D. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 36, n. 4, p. 275-328, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408369991239213>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408369991239213>. Acesso em: 26 ago. 2024.

FREITAS, J. P.; FILIPE, P. M. Pentoxifylline: A hydroxyl radical

scavenger. **Biological Trace Element Research**, v. 47, p. 307-311, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02790131>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02790131>. Acesso em: 26 ago. 2024.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 97-112, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>. Acesso em: 26 ago. 2024.

FROLDI, G. *et al.* Comparative Evaluation of the Antiglycation and Anti- α -Glucosidase Activities of Baicalein, Baicalin (Baicalein 7-O-Glucuronide) and the Antidiabetic Drug Metformin. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 10, p.214, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102141>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/10/2141>. Acesso em: 26 ago. 2024.

FROESE, A. *et al.* Popeye domain containing proteins are essential for stress-mediated modulation of cardiac pacemaking in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 3, p. 1119-1130, 2012. DOI: 10.1172/JCI59410. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/59410>. Acesso em: 26 ago. 2024.

FUHRMAN, B. *et al.* Urokinase plasminogen activator upregulates paraoxonase 2 expression in macrophages via an NADPH oxidase-dependent mechanism. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, N. 7, p. 1361–1367, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.166041>. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/atvbaha.108.166041>. Acesso em: 26 ago. 2024.

GANGJI, A. S. *et al.* A systematic review and meta-analysis of hypoglycemia and cardiovascular events: a comparison of glyburide with other secretagogues and with insulin. **Diabetes Care**, v. 30, n. 2, p. 389-94, 2007. DOI: <https://doi.org/10.2337/dc06-1789>. Disponível em: <https://diabetesjournals.org/care/article/30/2/389/28340/A-Systematic-Review-and-Meta-Analysis-of>. Acesso em: 26 ago. 2024.

GAO, Y. Cyclic GMP Signaling. In: **Biology of Vascular Smooth Muscle: Vasoconstriction and Dilatation**. Singapore: Springer Nature Singapore, p. 247-266, 2022.

GARCIA, F. A. O. *et al.* Pentoxifylline reduces the inflammatory process in diabetic rats: relationship with decreases of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase. **Journal of Inflammation**, v.12, p. 33, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12950-015-0080-5>. Disponível em: <https://journal-inflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12950-015-0080-5>. Acesso em: 26 ago. 2024.

GARCIA, F. A. O. *et al.* Pentoxifylline decreases glycemia levels and TNF- α , iNOS and COX-2 expressions in diabetic rat pancreas. **SpringerPlus**, v. 3, n. 283, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-283>. Disponível em: <https://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/2193-1801-3-283>. Acesso em:

26 ago. 2024.

GENUTH, S. *et al.* Skin Advanced Glycation End Products Glucosepane and Methylglyoxal Hydroimidazolone Are Independently Associated with Long-Term Microvascular Complication Progression of Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 64, p. 266–278, 2015. DOI: <https://doi.org/10.2337/db14-0215>. Disponível em: <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/64/1/266/34668/Skin-Advanced-Glycation-End-Products-Glucosepane>. Acesso em: 26 ago. 2024.

GERALDES, P. *et al.* Activation of PKC- δ and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. **Nature Medicine**, v. 15, n.11, p. 1298–1306, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.2052>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nm.2052>. Acesso em: 26 ago. 2024.

GERALDES, P.; KING, G. L. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. **Circulation Research**, v. 106, n. 8, p. 1319–1331, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.217117>. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.110.217117>. Acesso em: 26 ago. 2024.

GHOLAMI, A. *et al.* Pentoxifylline attenuates arsenic trioxide-induced cardiac oxidative damage in mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/6406318>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2021/6406318>. Acesso em: 26 ago. 2024.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. **Circulation Research**, v. 107, n. 9, p. 1058-1070, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>. Acesso em: 26 ago. 2024.

GILL, S. S.; NARENDRA, T. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and Biochemistry**, v. 48, n.12, p. 909-30, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0981942810001798?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago. 2024.

GILLINGS, D. B. Pentoxifylline and intermittent claudication: review of clinical trials and cost-effectiveness analyses. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 25 (Suppl 2), p. S44- 50, 1995. Disponível em: https://journals.lww.com/cardiovascularpharm/Abstract/1995/00252/Pentoxifylline_and_Intermittent_Claudication_.10.aspx. Acesso em: 26 ago. 2024.

GÓTH, L.; RASS, P.; PÁY, A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. **Molecular Diagnosis**, v. 8, p.141–149, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF03260057>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF03260057>. Acesso em: 26 ago. 2024.

GOTTSCHLING, H. D.; PUSCH, H.; MICHAELIS, D. Evaluation of metabolic control

in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients by estimation of serum fructosamine. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 95, n. 1, p. 129-136, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0029-1210945>. Disponível em: <https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0029-1210945>. Acesso em: 26 ago. 2024.

GREGORIO, F. *et al.* Low dose metformin in the treatment of type II non-insulin-dependent diabetes: clinical and metabolic evaluations. **Acta Diabetologia Latina**, v. 27, n. 2, p.139-155, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02581286>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02581286>. Acesso em: 26 ago. 2024.

GROSS, J. L. *et al.* Diabetes Mellito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquivos Brasileiros De Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 16–26, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302002000100004>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abem/a/vSbC8y888VmqqdF7cSST44G/>. Acesso em: 26 ago. 2024.

GRZELKA-WOŹNIAK, A. *et al.* Indirect insulin resistance markers are associated with nonalcoholic fatty liver disease in type 1 diabetes. **Polish Archives of Internal Medicine**, v. 133, n. 5, p. 16404, 2023. DOI: <https://doi.org/10.20452/pamw.16404>. Disponível em: <https://www.mp.pl/paim/issue/article/16404/>. Acesso em: 26 ago. 2024.

GUMIENICZEK, A. *et al.* Antioxidative and anti-inflammatory effects of repaglinide in plasma of diabetic animals. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 2, p.162-6, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.02.019>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043661805000526?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago. 2024.

GUTIERRES, V. O. *et al.* Curcumin improves the effect of a reduced insulin dose on glycemic control and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 4, p. 976-988, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.6291>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.6291>. Acesso em: 26 ago. 2024.

HAMOUDA, A. O. *et al.* Pentoxifylline and its association with kaempferol improve NASH-associated manifestation in mice through anti-apoptotic, anti-necroptotic, antioxidant, and anti-inflammatory mechanisms. **European Review for Medical & Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 23, 2022. DOI: https://doi.org/10.26355/eurrev_202212_30535. Disponível em: <https://www.europeanreview.org/article/30535>. Acesso em: 26 ago. 2024.

HAO, Y. *et al.* Activation of PKA via asymmetric allosteric coupling of structurally conserved cyclic nucleotide binding domains. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 3984, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11930-2>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-11930-2>. Acesso em: 26 ago. 2024.

HARCOURT, B. E *et al.* Targeted reduction of advanced glycation improves renal function in obesity. **Kidney International**. v. 80, n. 2, p.190- 8, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/ki.2011.57>. Disponível em: <https://www.kidney->

international.org/article/S0085-2538(15)55018-7/fulltext. Acesso em: 26 ago. 2024.

HARDY, R.; PRYDE, K. AMPK and the PI3K-MTORC2-AKT axis shape the mitochondrial integrated-stress-response. **Available at SSRN 3611285**, 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3611285>. Disponível em: https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3611285. Acesso em: 26 ago. 2024.

HEEBA, G. H. *et al.* Combined treatments with metformin and phosphodiesterase inhibitors alleviate nonalcoholic fatty liver disease in high-fat diet fed rats: a comparative study. **Canadian Journal of Hysiology and Pharmacology**, v. 98, n. 8, p. 498-505, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjpp-2019-0487>. Disponível em: <https://cdnsiencepub.com/doi/10.1139/cjpp-2019-0487>. Acesso em: 26 ago. 2024.

HEGELE, R. A. Multidimensional regulation of lipoprotein lipase: impact on biochemical and cardiovascular phenotypes¹. **Journal of Lipid Research**, v. 57, n. 9, p. 1601-1607, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1194/jlr.C070946>. Disponível em: [https://www.jlr.org/article/S0022-2275\(20\)30927-5/fulltext](https://www.jlr.org/article/S0022-2275(20)30927-5/fulltext). Acesso em: 26 ago. 2024.

HEPGÜL, G. *et al.* Preventive effect of pentoxifylline on acute radiation damage through antioxidant and anti-inflammatory pathways. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 55, p. 617-625, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10620-009-0780-x>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10620-009-0780-x>. Acesso em: 26 ago. 2024.

HIDALGO, F. J.; ZAMORA, R. Interplay between the maillard reaction and lipid peroxidation in biochemical systems. **Annals New York Academy of Sciences.**, v. 1043, p. 284-289, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1196/annals.1333.039>. Disponível em: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1196/annals.1333.039>. Acesso em: 26 ago. 2024.

HINDLE, E. J. *et al.* Serum fructosamine and glycated hemoglobin measurements in diabetic control. **Archives of Disease in Childhood**, v. 61, p. 113–117, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1136/adc.61.2.113>. Disponível em: <https://adc.bmj.com/content/61/2/113>. Acesso em: 26 ago. 2024.

HJERRILD, M. *et al.* Identification of phosphorylation sites in protein kinase A substrates using artificial neural networks and mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v. 3, n. 3, p. 426-433, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1021/pr0341033>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/pr0341033>. Acesso em: 26 ago. 2024.

HOLD, G. L.; EL-OMAR, E. M. Genetic aspects of inflammation and cancer. **Biochemical Journal**, v. 410, p. 225–35, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1042/BJ20071341>. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article-abstract/410/2/225/43456/Genetic-aspects-of-inflammation-and-cancer?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 26 ago. 2024.

HUANG, C. *et al.* Cellular basis of diabetic nephropathy: II. The transforming growth

factor-beta system and diabetic nephropathy lesions in type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 51, p. 3577–81, 2002. DOI: <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.12.3577>. Disponível em: <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/51/12/3577/34267/Cellular-Basis-of-Diabetic-NephropathyII-The>. Acesso em: 26 ago. 2024.

HUEBSCHMANN, A. G. *et al.* Diabetes and advanced glycoxidation end products. **Diabetes Care**, v. 29, n. 6, p. 1420- 32, 2006. DOI: <https://doi.org/10.2337/dc05-2096>. Disponível em: <https://diabetesjournals.org/care/article/29/6/1420/24929/Diabetes-and-Advanced-Glycoxidation-End-Products>. Acesso em: 26 ago. 2024.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v.54, n.4, p.287-293, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090506817301550>. Acesso em: 26 ago. 2024.

INACIO, M. D. *et al.* Pentoxifylline mitigates renal glycoxidative stress in obesemice by inhibiting AGE/RAGE signaling and increasing glyoxalase levels. **Life Sciences**, v. 258, p. 118-196, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118196>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320520309486?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago. 2024.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 10th ed. Brussels, Belgium; 2021. Disponível em: <https://www.diabetesatlas.org>, cap. 3. p. 34- 62, 2021.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Type 1 diabetes estimates in children and adults**, IDF ATLAS REPORTS 2022. Disponível em: <https://www.diabetesatlas.org>, 2022.

ISHIBASHI, Y. *et al.* Metformin inhibits advanced glycation end products (AGEs)-induced renal tubular cell injury by suppressing reactive oxygen species generation via reducing receptor for AGEs (RAGE) expression. **Hormone and Metabolic Research**, v. 44, n. 12, p. 891-5, 2012a. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0032-1321878>. Disponível em: <https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0032-1321878>. Acesso em: 26 ago. 2024.

ISHIBASHI, Y. *et al.* Beneficial effects of metformin and irbesartan on advanced glycation end products (AGEs)-RAGE-induced proximal tubular cell injury. **Pharmacological Research**, v. 65, n. 3, p. 297-302, 2012b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.11.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043661811002805?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago. 2024.

JACOBSEN, I. B.; HENRIKSEN, J. E.; BECK-NIELSEN, H. The Effect of Metformin in Overweight Patients with Type 1 Diabetes and Poor Metabolic Control. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 105, n. 3, p. 145-149, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00380.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-7843.2009.00380.x>. Acesso em: 26 ago. 2024.

JAGDALE, A. D. *et al.* Strong inhibition of the polyol pathway diverts glucose flux to protein glycation leading to rapid establishment of secondary complications in diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 30, n. 3, p. 398-405, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.01.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1056872716000039?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago. 2024.

JAGER, J. de *et al.* Long term treatment with metformin in patients with type 2 diabetes and risk of vitamin B-12 deficiency: randomised placebo controlled trial. **BMJ(Clinical Research Ed.)**, v. 340, n. 4, p. c2181, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.c2181>. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/340/bmj.c2181>. Acesso em: 26 ago. 2024.

JAİKUMKAO, K. *et al.* Dapagliflozin and metformin in combination ameliorates diabetic nephropathy by suppressing oxidative stress, inflammation, and apoptosis and activating autophagy in diabetic rats. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1870, n. 1, p. 166912, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2023.166912>. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/340/bmj.c2181>. Acesso em: 26 ago. 2024.

JAY, D.; HITOMI, H.; GRIENDLING, K. K. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 2, p. 183-92, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.06.018>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584905003503?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago. 2024.

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**, v. 127, n. 1, p. 87-95, 1983. DOI: [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(83\)90078-5](https://doi.org/10.1016/0009-8981(83)90078-5). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0009898183900785?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago. 2024.

JOHANNIS, M., *et al.* AMPK antagonizes hepatic glucagon-stimulated cyclic AMP signalling via phosphorylation-induced activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 4B. **Nature communications**, v. 7, p. 10856, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms10856>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms10856>. Acesso em: 26 ago. 2024.

JULL, A. B. *et al.* Pentoxifylline for treating venous leg ulcers. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 12, p. CD001733, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001733.pub2>. Disponível em:

<https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD001733.pub2/full>. Acesso em: 26 ago. 2024.

JUNOD, A. *et al.* Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 126, n. 1, p. 201–205, 1967. DOI: <https://doi.org/10.3181/00379727-126-32401>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3181/00379727-126-32401>. Acesso em: 26 ago. 2024.

KALLIDONIS, P. *et al.* Combination therapy with alpha-blocker and phosphodiesterase-5 inhibitor for improving lower urinary tract symptoms and erectile dysfunction in comparison with monotherapy: a systematic review and meta-analysis. **European urology focus**, v. 6, n. 3, p. 537-558, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.euf.2019.05.007>. Disponível em: [https://www.eurofocus.europeanurology.com/article/S2405-4569\(19\)30144-0/abstract](https://www.eurofocus.europeanurology.com/article/S2405-4569(19)30144-0/abstract). Acesso em: 26 ago. 2024.

KANBAY, M.; GOLDSMITH, D.; AKCAY, A.; COVIC, A. Phosphate – The Silent Stealthy Cardiorenal Culprit in All Stages of Chronic Kidney Disease: A Systematic Review. **Blood Purification**, v. 27, n. 2, p. 220–230, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1159/000197562>. Disponível em: <https://karger.com/bpu/article/27/2/220/48340/Phosphate-The-Silent-Stealthy-Cardiorenal-Culprit>. Acesso em: 26 ago. 2024.

KAORU, A. *et al.* Role of protein kinase C in pitavastatin-induced human paraoxonase I expression in Huh7 cells. **Metabolism Clinical and Experimental**, v.59, n, 9, p. 1287-1293, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.12.003>. Disponível em: [https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495\(09\)00507-1/abstract](https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495(09)00507-1/abstract). Acesso em: 26 ago. 2024.

KARATUG, A. *et al.* Alterations in kidney tissue following zinc supplementation to STZ-induced diabetic rats. **J Trace Elem Med Biol**, v. 27, n. 1, p. 52-57, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.07.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0946672X12001162?via%3Diuhub>. Acesso em: 26 ago. 2024.

KARUPPANAPANDIAN, T. *et al.* Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, p. 709-725, 2011. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Reactive-oxygen-species-in-plants%3A-their-signal-and-Karuppanapandian-Moon/fd3f994834b77764eb9c8c4e91be8e7c6cfd94d2>. Acesso em: 26 ago. 2024.

KAUSHIK, S.; KAUR, J. Chronic cold exposure affects the antioxidant defensesystem in various rat tissues. **Clinica Chimica Acta**, v. 333, p. 69-77, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00171-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00171-2). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009898103001712?via%3Diuhub>. Acesso em: 26 ago. 2024.

KERAVIS, T.; LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as

targets of the intracellular signalling network: benefits of pde inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 5, p. 1288-1305, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01729.x>. Disponível em:

<https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5381.2011.01729.x>.

Acesso em: 26 ago. 2024.

KHATEEB, J. *et al.* Paraoxonase 1 (PON1) expression in hepatocytes is upregulated by pomegranate polyphenols: a role for PPAR-gamma pathway.

Atherosclerosis, v. 208, n. 1, p. 119-25, 2010. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.08.051>. Disponível em:

[https://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150\(09\)00713-8/abstract](https://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150(09)00713-8/abstract).

Acesso em: 26 ago. 2024.

KIM, H. J.; JEONG, M. S., JANG, S. B. Molecular Characteristics of RAGE and Advances in Small-Molecule Inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 6904, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22136904>.

Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/13/6904>. Acesso em: 26 ago. 2024.

KNIGHT, W.; YAN, C. Cardiac Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: function, regulation, and therapeutic prospects. **Hormone and Metabolic Research**, v. 44, n. 10, p. 766-775, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0032-1321870>. Disponível em:

<https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0032-1321870>.

Acesso em: 26 ago. 2024.

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**, v. 82, n. 3, p. 292-300, 1944. Disponível em: <https://jpet.aspetjournals.org/content/82/3/292>.

Acesso em: 26 ago. 2024.

KOTHA, R. R.; LUTHRIA, D. L. Curcumin: biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. **Molecules**, v. 24, n. 16, p. 2930, 2019. DOI:

<https://doi.org/10.3390/molecules24162930>. Disponível em:

<https://www.mdpi.com/1420-3049/24/16/2930>. Acesso em: 26 ago. 2024.

KRISHNAMURTHY, H. *et al.* Oxidative Stress: Mechanisms, Quantification and its role in human aging. **ScienceOpen Preprints**. 2024. DOI:

<https://doi.org/10.14293/PR2199.000699.v1>. Disponível em:

<https://www.scienceopen.com/hosted-document?doi=10.14293/PR2199.000699.v1>.

Acesso em: 26 ago. 2024.

KRYUKOV, G. V. *et al.* Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science**, v. 300, n. 5624, p. 1439-1443, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1083516>.

Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1083516>. Acesso em: 26 ago. 2024.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970. DOI:

<https://doi.org/10.1038/227680a0>. Disponível em:
<https://www.nature.com/articles/227680a0#citeas>. Acesso em: 26 ago. 2024.

LAITEERAPONG, N. *et al.* The Legacy Effect in Type 2 Diabetes: impact of early glycemic control on future complications (the diabetes ; aging study). **DiabetesCare**, v. 42, n. 3, p. 416-426, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2337/dc17-1144>. Disponível em: <https://diabetesjournals.org/care/article/42/3/416/36136/The-Legacy-Effect-in-Type-2-Diabetes-Impact-of>. Acesso em: 26 ago. 2024.

LAPOLLA, A. *et al.* Enzymatic digestion and mass spectrometry in the study of advanced glycation and products/peptides. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 15, p. 496-509, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2003.11.014>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044030503008705?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago. 2024.

LAPOLLA, A.; TRALDI, P.; FEDELE, D. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 103-115, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.09.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009912004002450?via%3Di+hub>. Acesso em: 26 ago. 2024

LAYSECA-ESPINOSA, E.; SÁNCHEZ-MADRID, F.; GONZÁLEZ-AMARO, R. Phosphodiesterase Inhibitors as Immunomodulatory Drugs. **Inmunología**, v. 22, n. 1, p. 39-52, 2003. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Phosphodiesterase-Inhibitors-as-Immunomodulatory-Layseca-Espinosa-S%C3%A1nchez%E2%80%90Madrid/c7376151b644f4883586e5a3e653a6d495d144d2>. Acesso em: 26 ago. 2024.

LEE, S. B. *et al.* The AMPK–Parkin axis negatively regulates necroptosis and tumorigenesis by inhibiting the necrosome. **Nature Cell biology**, v. 21, n. 8, p. 940-951, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0356-8>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41556-019-0356-8>. Acesso em: 26 ago. 2024.

LEITE, N. C. *et al.* Histopathological stages of nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: prevalences and correlated factors. **Liver International**, v. 31, n. 5, p. 700-706, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02482.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1478-3231.2011.02482.x>. Acesso em: 26 ago. 2024.

LEVINE, R. L. *et al.* Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymology**, v. 233, p. 346-357, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0076687994330409?via%3Di+hub>. Acesso em: 26 ago. 2024.

LEVITZKI, A. Regulation of adenylate cyclase by hormones and G-proteins. **FEBS Letters**, v. 211, n. 2, p. 113-118, 1987. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)81419-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)81419-9). Disponível em:

<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/0014-5793%2887%2981419-9>. Acesso em: 26 ago. 2024.

LEVY, D.; REICHERT, C. O.; BYDLOWSKI, S. P. Paraoxonases Activities and Polymorphisms in Elderly and Old-Age Diseases: An Overview. **Antioxidants**, v.8, n.5, p. 118, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox8050118>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3921/8/5/118>. Acesso em: 26 ago. 2024.

LI, C. *et al.* LKB1-AMPK axis negatively regulates ferroptosis by inhibiting fatty acid synthesis. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 187, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00297-2>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-020-00297-2>. Acesso em: 26 ago. 2024.

LI, T. *et al.* Association of metformin monotherapy or combined therapy with cardiovascular risks in patients with type 2 diabetes mellitus. **Cardiovascular Diabetology**, v. 20, n. 1, p. 30, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12933-020-01202-5>. Disponível em: <https://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12933-020-01202-5>. Acesso em: 26 ago. 2024.

LIANG, H. *et al.* Glutathione peroxidase 4 differentially regulates the release of apoptogenic proteins from mitochondria. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 3, p. 312-320, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.012>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584909002913?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago. 2024.

LIMA, T. F. O. *et al.* Curcumin, alone or in combination with aminoguanidine, increases antioxidant defenses and glycation product detoxification in streptozotocin-diabetic rats: A therapeutic strategy to mitigate glycoxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/1036360>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2020/1036360>. Acesso em: 26 ago. 2024.

LIN, J. A. *et al.* Glycative stress from advanced glycation end products (AGEs) and dicarbonyls: An emerging biological factor in cancer onset and progression. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, n. 8, p. 1850- 1864, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500759>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201500759>. Acesso em: 26 ago. 2024.

LINDBLOM, P. *et al.* Isoforms of alanine aminotransferases in human tissues and serum—differential tissue expression using novel antibodies. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 466, n. 1, p. 66-77, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.07.023>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003986107003554?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago. 2024.

LING, J.; SÖLL, D. Severe oxidative stress induces protein mistranslation through impairment of an aminoacyl-tRNA synthetase editing site. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 4028-4033, 2010. DOI:

<https://doi.org/10.1073/pnas.1000315107>. Disponível em:
<https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1000315107>. Acesso em: 26 ago. 2024.

LING, X. C.; KUO, K. L. Oxidative stress in chronic kidney disease. **Renal Replacement Therapy**, v. 4, p. 53, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41100-018-0195-2>. Disponível em: <https://rrtjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41100-018-0195-2>. Acesso em: 26 ago. 2024.

LIU, A., *et al.* Metformin Delays the Development of Atherosclerosis in Type 1 Diabetes Mellitus via the Methylglyoxal Pathway. **Diabetes Therapy**, v. 11, n. 3 p. 633– 642, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13300-020-00761-w>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13300-020-00761-w> Acesso em: 26 ago. 2024.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)52451-6/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)52451-6/pdf). Acesso em: 26 ago. 2024.

LUCCHESI, A. N.; CASSETTARI, L. L.; SPADELLA, C. S. Alloxan-Induced Diabetes Causes Morphological and Ultrastructural Changes in Rat Liver that Resemble the Natural History of Chronic Fatty Liver Disease in Humans. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015, p. 11, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/494578>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2015/494578>. Acesso em: 26 ago. 2024.

LUC, K. *et al.* Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 70, n. 6, p. 809-824, 2019. DOI: <https://doi.org/10.26402/jpp.2019.6.01>. Disponível em: https://jpp.krakow.pl/journal/archive/12_19/pdf/10.26402/jpp.2019.6.01.pdf. Acesso em: 26 ago. 2024.

LUGNIER, C. *et al.* Cyclic nucleotide phosphodiesterases: new targets in the metabolic syndrome? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 208, p. 107475, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107475>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0163725820300036?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago. 2024.

LUKENS, F. D. Alloxan diabetes. **Physiological reviews**, v. 28, n. 3, p. 304– 330, 1948. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.1948.28.3.304>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0163725820300036?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago. 2024.

LUND, S. S. *et al.* Effect of Adjunct Metformin Treatment in Patients with Type-1 Diabetes and Persistent Inadequate Glycaemic Control. A Randomized Study. **Plos One**, v. 3, n. 10, p. e3363, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003363>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0003363>. Acesso em: 26 ago. 2024.

MA, A. *et al.* AMPK activation enhances the anti-atherogenic effects of high density

lipoproteins in apoE^{-/-} mice. **Journal of Lipid Research**, v. 58, n. 8, p. 1536-1547, 2017. DOI: 10.1194/jlr.M073270. Disponível em: [https://www.jlr.org/article/S0022-2275\(20\)33781-0/fulltext](https://www.jlr.org/article/S0022-2275(20)33781-0/fulltext). Acesso em: 26 ago. 2024.

MADONNA, R.; DE CATERINA, R. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes-part I: pathways of vascular disease in diabetes. **Vascular Pharmacology**, v. 54, p. 68-74, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vph.2011.03.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1537189111000309?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago. 2024.

MARCINIAK, S. J. *et al.* CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. **Genes & Development**, v.18, p. 3066–77, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1101/gad.1250704>. Disponível em: <https://genesdev.cshlp.org/content/18/24/3066>. Acesso em: 26 ago. 2024.

MASSART, J. *et al.* Pentoxifylline aggravates fatty liver in obese and diabetic ob/ob mice by increasing intestinal glucose absorption and activating hepatic lipogenesis. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 5, p. 1361-1374, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01580.x>. Disponível em: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5381.2011.01580.x> Acesso em: 26 ago. 2024.

MATULEF, K.; ZAGOTTA, W. N. Cyclic nucleotide-gated ion channels. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 19, n. 1, p. 23-44, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.110701.154854>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.cellbio.19.110701.154854>. Acesso em: 26 ago. 2024.

MAZUR, A. An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 164, n. 1, p. 271-289, 1946. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)43068-2/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)43068-2/pdf). Acesso em: 26 ago. 2024.

MCKINNEY, T. D. Use of creatinine and cystatin C for monitoring renal function and directing antiretroviral therapy. **Nephrology Nursing Journal**, v. 34, n. 5, p. 489-496, 2009.

MCCARTY, M. F.; O'KEEFE, J. H.; DINICOLANTONIO, J. J. Pentoxifylline for vascular health: a brief review of the literature. **Open Heart**, v. 3, n. 1, p. e000365, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1136/openhrt-2015-000365>. Disponível em: <https://openheart.bmj.com/content/3/1/e000365>. Acesso em: 26 ago. 2024.

MEANEY, E. *et al.* Does metformin increase paraoxonase activity in patients with metabolic syndrome? Additional data from the MEFISTO study. **Clinical and Translational Sciences**, v. 5, n. 3, p. 265-268, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1752-8062.2012.00391.x>. Disponível em: <https://ascpt.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1752-8062.2012.00391.x>. Acesso em: 26 ago. 2024.

MEHANNA, O. M. *et al.* Effect of phosphodiesterase inhibitors on renal functions and oxidant/antioxidant parameters in streptozocin-induced diabetic rats. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 124, n. 5, p. 424–429, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/13813455.2017.1419267>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13813455.2017.1419267>. Acesso em: 26 ago. 2024.

MENESES, M. J. *et al.* Paraonase-1 as a Regulator of Glucose and Lipid Homeostasis: Impact on the Onset and Progression of Metabolic Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p. 4049, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20164049>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/16/4049>. Acesso em: 26 ago. 2024.

MILLER, R. A., *et al.* Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. **Nature**, v. 494, n. 7436, p. 256-60, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature11808>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature11808>. Acesso em: 26 ago. 2024.

MIRCIA, E. *et al.* Kinetic Modelling of Drug Release from Pentoxifylline Matrix Tablets based on Hydrophilic, Lipophilic and Inert Polymers. **Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae**, v. 62, n. 2, p. 5-12, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1515/afpuc-2015-0026>. Disponível em: <https://sciendo.com/article/10.1515/afpuc-2015-0026>. Acesso em: 26 ago. 2024.

MOHAMMAD, J. A.; FATHI, Z. H.; ALLWASH. T. A. Assessment the effects of insulin on adiponectin, nitric oxide, myeloperoxidase and lipid profile in type 1 diabetic patients. **Pharmacia**, v. 68, n. 2, p. 313-319, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3897/pharmacia.68.e63449>. Disponível em: <https://pharmacia.pensoft.net/article/63449/>. Acesso em: 26 ago. 2024.

MOHD NOR, N. A., *et al.* The Role of Polyphenol in Modulating Associated Genes in Diabetes-Induced Vascular Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6396, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23126396>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/12/6396>. Acesso em: 26 ago. 2024.

MOLINA, D. K., HARGROVE, V. M. Handbook of Forensic Toxicology for Medical Examiners. **2nd ed. CRC Press**; Boca Raton, FL, USA: Taylor; Francis Group; New York, NY, USA: 2019. DOI: <https://doi.org/10.4324/9781351260602>. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.4324/9781351260602/handbook-forensic-toxicology-medical-examiners-molina-veronica-hargrove>. Acesso em: 26 ago. 2024.

MONNIER, V. M. Intervention against the Maillard reaction in vivo. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 419, n. 1, p. 1-15, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.08.014>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003986103004363?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago. 2024.

MONNIER, L. *et al.* Regulation of oxidative stress by glycaemic control: evidence for an independent inhibitory effect of insulin therapy. **Diabetologia**, v. 53, n. 3, p. 562–571, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1574-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00125-009-1574-6>. Acesso em: 26 ago. 2024.

MORAN, A. *et al.* Insulin resistance during puberty: results from clamp studies in 357 children. **Diabetes**, v. 48, n. 10, p. 2039-2044, 1999. DOI: <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.10.2039>. Disponível em: <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/48/10/2039/11432/Insulin-resistance-during-puberty-results-from>. Acesso em: 26 ago. 2024.

MORÓN, Ú. M; CASTILLA-CORTÁZAR, I. Protection against oxidative stress and “IGF-IDeficiency Conditions”. **Antioxidant Enzyme. InTech**, v. 89, 2012. DOI: <https://doi.org/10.5772/51047>. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/39564>. Acesso em: 26 ago. 2024.

MROZ, J. R. Clinical Enzimology. In: Anderson SC, Cockayne S. **Clinical Chemistry Concepts & Applications**, v. 11, p. 179-202, 2003.

MULAY, S. R.; ANDERS, H. J. Crystallopathies. **New England Journal of Medicine**, v. 374, p. 2465–2476, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1601611>. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1601611>. Acesso em: 26 ago. 2024.

MYSTEK, P., *et al.* G γ and G α identity dictate a G-protein heterotrimer plasma membrane targeting. **Cells**, v. 8, n. 10, p. 1246, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells8101246>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/10/1246>. Acesso em: 26 ago. 2024.

NADEAU, K. J. *et al.* Effects of low dose metformin in adolescents with type I diabetes mellitus: a randomized, double-blinded placebo-controlled study. **Pediatric Diabetes**, v. 16, n. 3, p. 196-203, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/pedi.12140>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pedi.12140>. Acesso em: 26 ago. 2024.

NAGEEN, A. The Biochemical Pattern of Liver Function Tests in Adult Patients of Diabetes and the Association with Hypoglycemic Medications. **Pakistan Armed Forces Medical Journal**, v. 72, n. 4, p. 1245-48, 2022. DOI: <https://doi.org/10.51253/pafmj.v72i4.7681>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/366040911_The_Biochemical_Pattern_of_Liver_Function_Tests_in_Adult_Patients_of_Diabetes_and_the_Association_with_Hypoglycemic_Medications. Acesso em: 26 ago. 2024.

NAGHDI, A. *et al.* Effects of curcumin and metformin on oxidative stress and apoptosis in heart tissue of type 1 diabetic rats. **Journal of Cardiovascular and Thoracic Research**, v. 14, n. 2, p. 128, 2022. DOI: <https://doi.org/10.34172/jcvtr.2022.23>. Disponível em: <https://jcvtr.tbzmed.ac.ir/Article/jcvtr-30507>. Acesso em: 26 ago. 2024.

NAHAR, N. *et al.* Protective effects of *Labisia pumila* against neuropathy in a diabetic rat model. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 21, p. 1–11, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40200-021-00905-0>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40200-021-00905-0>. Acesso em: 26 ago. 2024.

NAKHLEH, A.; SHEHADEH, N. Hypoglycemia in diabetes: An update on pathophysiology, treatment, and prevention. **World Journal of Diabetes**, v. 12, n. 12, p. 2036-2049, 2021. DOI: <https://doi.org/10.4239/wjd.v12.i12.2036>. Disponível em: <https://www.wjnet.com/1948-9358/full/v12/i12/2036.htm>. Acesso em: 26 ago. 2024.

NEGREIROS-LIMA, G. L. *et al.* Cyclic AMP regulates key features of macrophages via PKA: recruitment, reprogramming and efferocytosis. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 128, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9010128>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/1/128>. Acesso em: 26 ago. 2024.

NELSON, D. L; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger** [recurso eletrônico]; [tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga, *et al.*] ; revisão técnica: Carlos Termignoni, *et al* – 6. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre : Artmed, p. 946-948, 2014.

NESTI, L.; NATALI, A. Metformin effects on the heart and the cardiovascular system: A review of experimental and clinical data. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 27, n. 8, p. 657-669, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2017.04.009>. Disponível em: [https://www.nmcd-journal.com/article/S0939-4753\(17\)30094-7/abstract](https://www.nmcd-journal.com/article/S0939-4753(17)30094-7/abstract). Acesso em: 26 ago. 2024.

NG, Y. Y. *et al.* 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. DOI: <https://doi.org/10.1159/000150600>. Disponível em: <https://karger.com/ajnr/article-abstract/29/1/43/25628/Pentoxifylline-Inhibits-Transforming-Growth-Factor?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 26 ago. 2024.

NOBLANC, A. *et al.* Glutathione peroxidases at work on epididymal spermatozoa: an example of the dual effect of reactive oxygen species on mammalian male fertilizing ability. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 641-650, 2011. DOI: <https://doi.org/10.2164/jandrol.110.012823>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2164/jandrol.110.012823>. Acesso em: 26 ago. 2024.

NOH, H., KING, G. L. The role of protein kinase C activation in diabetic nephropathy. **Kidney International**, v. 72, p. S49–S53, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002386>. Disponível em: [https://www.kidney-international.org/article/S0085-2538\(15\)52551-9/fulltext](https://www.kidney-international.org/article/S0085-2538(15)52551-9/fulltext). Acesso em: 26 ago. 2024.

NOWOTNY, K. *et al.* Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. **Biomolecules**, v. 5, n. 1, p. 194-222, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom5010194>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218->

273X/5/1/194. Acesso em: 26 ago. 2024.

OGUNTIBEJU, O. O. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 11, n. 3, p. 45-63, 2019. PMCID: PMC6628012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6628012/pdf/ijppp0011-0045.pdf>. Acesso em: 26 ago. 2024.

ONKEN, B.; DRISCOLL, M. Metformin induces a dietary restriction–like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. **PloS one**, v. 5, n. 1, p. e8758, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008758>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0008758>. Acesso em: 26 ago. 2024.

OLIVEIRA, J. O. **Efeitos dos inibidores de fosfodiesterases, roflumilast e tadalafil, sobre as alterações fisio-metabólicas e biomarcadores do estresse glico- oxidativo em modelo de obesidade e resistência à insulina**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2021. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/215072>, 2021. Acesso em: 26 ago 2024.

OMORI, K.; KOTERA, J. Overview of PDEs and Their Regulation. **Circulation Research**, v. 100, n. 3, p. 309-327, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000256354.95791.f1>. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.0000256354.95791.f1>. Acesso em: 26 ago 2024.

OTT, C. *et al.* Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biology**. v. 2, p.411-29, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.016>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231713001043?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago 2024.

PAN, Q. *et al.* Comparison of acarbose and metformin on albumin excretion in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. **Medicine**, v. 95, p. e3247, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003247>. Disponível em: https://journals.lww.com/md-journal/fulltext/2016/04050/comparison_of_acarbose_and_metformin_on_albumin.42.aspx. Acesso em: 26 ago 2024.

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**, v. 7, n. 5-6, p. 293-309, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1515/bmc-2016-0021>. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/bmc-2016-0021/html>. Acesso em: 26 ago 2024.

PEAVY, D. E.; TAYLOR, J. M.; JEFFERSON, L. S. Correlation of albumin production rates and albumin mRNA levels in livers of normal, diabetic, and insulin-treated

diabetic rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75.n. 12, p. 5879–5883, 1978. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.75.12.5879>. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.75.12.5879>. Acesso em: 26 ago 2024.

PEDERSEN, O. *et al.* The effects of metformin on adipocyte insulin action and metabolic control in obese subjects with type 2 diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 6, n. 3, p. 249-256, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.1989.tb01156.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1464-5491.1989.tb01156.x>. Acesso em: 26 ago 2024.

PETERS, T.; BIAMONT, G.T.; DOUMAS, B.T. Albumin in serum. In: FAULKNER, W. R.; MEITES, S., eds. *Selected methods of clinical chemistry*, Washington: **AACC Press**, v. 9, p. 319, 1982.

PINTO, R. S. *et al.* Advanced Glycation End Products: A Sweet Flavor That Embitters Cardiovascular Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2404, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23052404>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/5/2404>. Acesso em: 26 ago 2024.

PIRO, S. *et al.* Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress. **Metabolism**, v.51, p. 1340–7, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1053/meta.2002.35200>. Disponível em: [https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495\(02\)00088-4/abstract](https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495(02)00088-4/abstract). Acesso em: 26 ago 2024.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523415300039?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago 2024.

POLHILL, T. S. *et al.* Short-term peaks in glucose promote renal fibrogenesis independently of total glucose exposure. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 287, n. 2, p. F268-F273, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00084.2004>. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajprenal.00084.2004>. Acesso em: 26 ago 2024.

PRYOR, R.; CABREIRO, F. Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. **Biochemical Journal**, v. 471, n. 3, p. 307-322, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1042/BJ20150497>. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article-abstract/471/3/307/48644/Repurposing-metformin-an-old-drug-with-new-tricks?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 26 ago 2024.

RADFAR, M. *et al.* 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**, v. 59, p. 302-6, 2005.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2005.05.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0753332205000880?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago 2024.

RADI, R. *et al.* Detection of catalase in rat heart mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 32, p. 22028-34, 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54740-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54740-2). Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)54740-2/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)54740-2/fulltext). Acesso em: 26 ago 2024.

RAFTER, I. *et al.* Isoform-specific alanine aminotransferase measurement can distinguish hepatic from extrahepatic injury in humans. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 30, n. 5, p. 1241-1249, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1106>. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2012.1106>. Acesso em: 26 ago 2024.

RAHBAR, S. *et al.* Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. **Clinica Chimica Acta**, v. 301, p. 65-77, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(00\)00327-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(00)00327-2). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009898100003272?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago 2024.

RAJAMANI, U. *et al.* The hexosamine biosynthetic pathway can mediate myocardial apoptosis in a rat model of diet-induced insulin resistance. **Acta Physiologica**, v. 202, p. 151-157, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02275.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-1716.2011.02275.x>. Acesso em: 26 ago 2024.

RAJENDRAN, P. *et al.* Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 332–347, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009898114002629?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago 2024.

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.

RAPA, S. F. *et al.* Inflammation and oxidative stress in chronic kidney disease-potential therapeutic role of minerals, vitamins and plant-derived metabolites. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 263, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21010263>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/1/263>. Acesso em: 26 ago 2024.

RASAL, P. B. *et al.* Ameliorative effect of lycopene alone and in combination with co-enzyme Q10 in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in experimental rats. **International journal of plant based pharmaceuticals**, v. 3, n. 1, p. 123-130, 2023. DOI: <https://doi.org/10.29228/ijpbp.24>. Disponível em: <https://doaj.org/article/b78ec22935dc4bb593369bdf8a1346d0>. Acesso em: 26 ago. 2024.

RAVINDRAN, S. *et al.* Nephroprotective Effects of Metformin in Diabetic Nephropathy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 4, p. 731-742, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.25598>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.25598>. Acesso em: 26 ago 2024.

RAYMAN, M. P. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, n. 4, p. 527-542, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1079/PNS2005467>. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/proceedings-of-the-nutrition-society/article/selenium-in-cancer-prevention-a-review-of-the-evidence-and-mechanism-of-action/4513FC73B7861A08AF6E98355715BC5D>. Acesso em: 26 ago 2024.

RAZA, H. *et al.* Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic rats: tissue-specific variations and roles in oxidative stress. **Diabetes**, v. 53, n. 1, p. 185-194, 2004. DOI: <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.1.185>. Disponível em: <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/53/1/185/11604/Elevated-Mitochondrial-Cytochrome-P450-2E1-and>. Acesso em: 26 ago. 2024.

REGNELL, S. E.; LERNMARK, A. Hepatic steatosis in type 1 diabetes. **The review of diabetic studies: RDS**, v. 8, n. 4, p. 454, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1900/rds.2011.8.454>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3359690/>. Acesso em: 26 ago 2024.

REICHERT, C. O.; LEVY, D.; BYDLOWSKI, S. P. Paraoxonase Role in Human Neurodegenerative Diseases. **Antioxidants**, v. 10, n. 1, p. 11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox10010011>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/1/11>. Acesso em: 26 ago 2024.

RENA, G.; HARDIE, D. G.; PEARSON, E. R. The mechanisms of action of metformin. **Diabetologia**, v. 60, n. 9, p. 1577-1585, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00125-017-4342-z>. Acesso em: 26 ago 2024.

RICHY, F. F. *et al.* Incidence of Lactic Acidosis in Patients With Type 2 Diabetes With and Without Renal Impairment Treated With Metformin: a retrospective cohort study. **Diabetes Care**, v. 37, n. 8, p. 2291-2295, 2014. DOI: <https://doi.org/10.2337/dc14-0464>. Disponível em: <https://diabetesjournals.org/care/article/37/8/2291/29727/Incidence-of-Lactic-Acidosis-in-Patients-With-Type>. Acesso em: 26 ago 2024.

RICHTER, R. J.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Determination of Paraoxonase 1 Status Without the Use of Toxic Organophosphate Substrates. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v. 1, n. 2, p. 147-152, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.108.811638>. Disponível em:

<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCGENETICS.108.811638>. Acesso em: 26 ago 2024.

RIFAI, N.; WARNICK, G. R. Lipids, lipoproteins, Apolipoproteins, and other cardiovascular risk factors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, v. 4, p. 903-81, 2006. <https://doi.org/10.18535/jmscr/v5i6.94>. Acesso em: 26 ago 2024.

ROCHETTE, L. *et al.* Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n.9, p. 2709-2729, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.05.017>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304416514002153?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago 2024.

RODRÍGUEZ, C. *et al.* Activation of the AMP-related kinase (AMPK) induces renal vasodilatation and downregulates Nox-derived reactive oxygen species (ROS) generation. **Redox Biology**, v.34, p. 101575, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101575>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231720305541?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago 2024.

ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 212, n. 2, p. 167-178, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.01.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041008X06000287?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago 2024.

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

ROOIJ, J. *et al.* Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. **Nature**, v. 396, n. 6710, p. 474-477, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1038/24884>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/24884>. Acesso em: 26 ago 2024.

ROXO, D. F. *et al.* Curcumin combined with metformin decreases glycemia and dyslipidemia and, increases paraoxonase activity in diabetic rats. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 11, n. 1, p. 33, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13098-019-0431-0>. Disponível em: <https://dmsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13098-019-0431-0>. Acesso em: 26 ago 2024.

ROSEN, D. R. *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. **Nature**, v. 362, n. 6415, p. 59-62, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1038/362059a0>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/362059a0>. Acesso em: 26 ago 2024.

ROZENBERG, O. *et al.* Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 6, p. 774- 784, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01429-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01429-6). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584902014296?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago 2024.

RUSH, J. W. E.; SANDIFORD, S. D. Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. **Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 5, p. 345-351, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(03\)00039-0](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(03)00039-0). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009912003000390?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago 2024.

RUTTER, W. C. *et al.* Nephrotoxicity during vancomycin therapy in combination with piperacillin-tazobactam or cefepime. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 2, p. 10.1128/aac. 02089-16, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.02089-16>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.00314-17>. Acesso em: 26 ago 2024.

SALTIEL, A. R. *et al.* Insulin signaling in health and disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 131, n. 1, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI142241>. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/142241>. Acesso em: 26 ago 2024.

SAMLASKA, C. P.; WINFIELD, E. A. Pentoxifylline. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 30, n. 4, p. 603-621, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(94\)70069-9](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(94)70069-9). Disponível em: [https://www.jaad.org/article/S0190-9622\(94\)70069-9/abstract](https://www.jaad.org/article/S0190-9622(94)70069-9/abstract). Acesso em: 26 ago 2024.

SANCHEZ-RANGEL, E.; INZUCCHI, S. E. Metformin: clinical use in type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 60, n. 9, p. 1586-1593, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4336-x>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00125-017-4336-x>. Acesso em: 26 ago 2024.

SANZ, A. B *et al.* Mechanisms of renal apoptosis in health and disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 19, p. 1634–1642, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1681/ASN.2007121336>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00125-017-4336-x>. Acesso em: 26 ago 2024.

SARABHAI, T. *et al.* 222-OR: Metformin Reduces Fasting Glycemia in Well-Controlled Type 2 Diabetes by Promoting Aerobic Glycolysis Independent of Decreasing Endogenous Glucose Production. **Diabetes**, v.72 (Supplement_1), 2023. DOI: <https://doi.org/10.2337/db23-222-OR>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00125-017-4336-x>. Acesso em: 26 ago 2024.

SARNBLAD, S.; KROON, M.; AMAN, J. Metformin as additional therapy in adolescents with poorly controlled type 1 diabetes: randomised placebo-controlled

trial with aspects on insulin sensitivity. **European Journal of Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 323-329, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1530/eje.0.1490323>. Disponível em: <https://academic.oup.com/ejendo/article-abstract/149/4/323/6753381?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: 26 ago 2024.

SATAPATHY, S. K. *et al.* Beneficial effects of pentoxifylline on hepatic steatosis, fibrosis and necroinflammation in patients with non-alcoholic steatohepatitis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 22, n. 5, p. 634-8, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04756.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1440-1746.2006.04756.x>. Acesso em: 26 ago 2024.

SCHALKWIJK, C. G.; STEHOUWER, C. D. A. Methylglyoxal, a Highly Reactive Dicarbonyl Compound, in Diabetes, Its Vascular Complications, and Other Age-Related Diseases. **Physiological Reviews**, v. 100, n. 1, p. 407-461, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2019>. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00001.2019>. Acesso em: 26 ago 2024.

SCHAUR, R. J. *et al.* 4-Hydroxy-nonenal—A Bioactive Lipid Peroxidation Product. **Biomolecules**, v. 5, n. 4, p. 2247-2337, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom5042247>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/5/4/2247>. Acesso em: 26 ago 2024.

SCHINDLER, R. F. *et al.* The Popeye domain containing genes: essential elements in heart rate control. **Cardiovascular diagnosis and therapy**, v. 2, n. 4, p. 308, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-3652.2012.12.01>. Disponível em: <https://cdt.amegroups.org/article/view/1289>. Acesso em: 26 ago 2024.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269768900924?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago 2024.

SEYER-HANSEN, K. Renal hypertrophy in experimental diabetes: Relation to severity of diabetes. **Diabetologia**, v. 13, n. 2, p. 141-143, 1977. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00745142>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00745142>. Acesso em: 26 ago 2024.

SCHAAN, B. D. O papel da proteína quinase C no desenvolvimento das complicações vasculares do diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiros De Endocrinologia & Metabologia**, v.47, n.6, p. 654-662, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302003000600006>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abem/a/zyyStGjCsv3QNGjrrhrJ9Hy/>. Acesso em: 26 ago 2024.

SHIN, A. H.; OH, C. J.; PARK, J. W. Glycation-induced inactivation of antioxidant enzymes and modulation of cellular redox status in lens cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 29, p. 577-581, 2006. DOI:

<https://doi.org/10.1007/BF02969268>. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02969268>. Acesso em: 26 ago 2024.

SHIN, S. K. *et al.* Oxidative stress resulting from the removal of endogenous catalase induces obesity by promoting hyperplasia and hypertrophy of white adipocytes.

Redox Biology, v. 37, 101749, 2020. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101749>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221323172030954X?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago 2024.

SHUNMOOGAM, N.; NAIDOO, P.; CHILTON, R. Paraoxonase (PON)-1: a brief overview on genetics, structure, polymorphisms and clinical relevance.

Vascular Health and Risk Management, v. 14, p. 137, 2018. DOI:

<https://doi.org/10.2147/VHRM.S165173>. Disponível em:

<https://www.dovepress.com/paraoxonase-pon-1-a-brief-overview-on-genetics-structure-polymorphisms-peer-reviewed-fulltext-article-VHRM>. Acesso em: 26 ago 2024.

SHIBABAW, T. *et al.* Assessment of liver marker enzymes and its association with type 2 diabetes mellitus in Northwest Ethiopia. **BMC Research Notes**, v. 12, n. 1, p. 707, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4742-x>. Disponível em:

<https://bmcresearchnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-019-4742-x>. Acesso em: 26 ago 2024.

SHIRAKAMI, Y. *et al.* Pentoxifylline prevents nonalcoholic steatohepatitis-related liver pre-neoplasms by inhibiting hepatic inflammation and lipogenesis. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 25, p. 206-215, 2015.

DOI: <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000172>. Disponível em:

https://journals.lww.com/eurjcancerprev/abstract/2016/05000/pentoxifylline_prevents_nonalcoholic.6.aspx. Acesso em: 26 ago 2024.

SIBOTO, A. *et al.* The Effects of *Momordica balsamina* Methanolic Extract on Kidney Function in STZ-Induced Diabetic Rats: Effects on Selected Metabolic Markers, **Journal of Diabetes Research**, 7341242, p. 8, 2018. DOI:

<https://doi.org/10.1155/2018/7341242>. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2018/7341242>. Acesso em: 26 ago 2024.

SILVER, M. R.; KROBOTH, P. D. Pentoxifylline in end-stage renal disease.

Drug Intelligence and Clinical Pharmacy, v. 21, n. 12, p. 976-978, 1987. DOI:

<https://doi.org/10.1177/106002808702101209>. Disponível em:

<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/106002808702101209>. Acesso em: 26 ago 2024.

SINDHU, R. K. *et al.* Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapies.

Clinical and Experimental Hypertension, v. 26, p. 43-53, 2004. DOI:

<https://doi.org/10.1081/CEH-120027330>. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/CEH-120027330>. Acesso em: 26 ago 2024.

SINGH, V. *et al.* Combined potentiating action of phytochemical(s) from *Cinnamomum tamala* and *Aloe vera* for their anti-diabetic and insulinomimetic effect using in vivo rat and in vitro NIH/3T3 cellculture system. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 5, p. 2542- 2563, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1448-3>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-014-1448-3>. Acesso em: 26 ago 2024.

SINGH, A. K; SINGH, R.; CHAKRABORTY, P. P. Diabetes Monotherapies versus Metformin-Based Combination Therapy for the Treatment of Type 2 Diabetes. **International Journal of General Medicine**, v. 14, p. 3833-3848, 2021. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJGM.S295459>. Disponível em: <https://www.dovepress.com/diabetes-monotherapies-versus-metformin-based-combination-therapy-for-peer-reviewed-fulltext-article-IJGM>. Acesso em: 26 ago 2024.

SMITH, S. A.; NEWBY, A. C.; BOND, M. Ending restenosis: inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by cAMP. **Cells**, v. 8, n. 11, p. 1447, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells8111447>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/11/1447>. Acesso em: 26 ago 2024.

SOMPONG, W. *et al.* A comparative study of ferulic acid on different monosaccharide-mediated protein glycation and oxidative damage in bovine serum albumin. **Molecules**, v. 18, n. 11, p. 13886-13903, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules181113886>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/18/11/13886>. Acesso em: 26 ago 2024.

SOOKOIAN, S. *et al.* Genetic variation in transmembrane 6 superfamily member 2 and the risk of nonalcoholic fatty liver disease and histological disease severity. **Hepatology**, v. 61, n. 2, p. 515-525, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.27556>. Disponível em: https://journals.lww.com/hep/abstract/2015/02000/genetic_variation_in_transmembrane_6_superfamily.19.aspx. Acesso em: 26 ago 2024.

STUMP, C. S.; CLARK, S. E.; SOWERS, J. R. Oxidative Stress in Insulin-Resistant Conditions. **Treatments in Endocrinology**, v. 4, n. 6, p. 343-351, 2005. DOI: <https://doi.org/10.2165/00024677-200504060-00003>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.2165/00024677-200504060-00003>. Acesso em: 26 ago 2024.

SUBASHBABU, P.; PRABUSEENIVASAN, S.; IGNACIMUTHU, S. Cinnamaldehyde - A potential antidiabetic agent. **Phytomedicine**, v. 14, p. 15-22, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.11.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944711306001772?via%3Diuhub>. Acesso em: 26 ago 2024.

SZTANEK, F. *et al.* Decreased paraoxonase 1 (PON1) lactonase activity in hemodialyzed and renal transplanted patients. A novel cardiovascular biomarker in end-stage renal disease. **Nephrology, dialysis, transplantation: official**

publication of the **European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 27, n. 7, p.2866-72, 2012. DOI:

<https://doi.org/10.1093/ndt/gfr753>. Disponível em

<https://academic.oup.com/ndt/article/27/7/2866/1846133?login=false>. Acesso em: 26 ago 2024.

TANG, W. X. *et al.* Early protective effect of mitofusion 2 overexpression in STZ-induced diabetic rat kidney. **Endocrine**, v. 41, n. 2, p. 236–247, 2012. DOI:

<https://doi.org/10.1007/s12020-011-9555-1>. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s12020-011-9555-1>. Acesso em: 26 ago 2024.

THOMAS, B. K. *et al.* Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 711, p. 193-201, 2011. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.12.016>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0027510711000030?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago 2024.

THOMAS, I.; GREGG, B. Metformin; a review of its history and future: from lilac to longevity. **Pediatric Diabetes**, v. 18, n. 1, p. 10-16, 2017. DOI:

<https://doi.org/10.1111/pedi.12473>. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pedi.12473>. Acesso em: 26 ago 2024.

THORNALLEY, P. J. The Enzymatic Defence against Glycation in Health, Disease and Therapeutics: A Symposium to Examine the Concept. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, p. 1341–1342, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1042/bst0311341>.

Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article-abstract/31/6/1341/64503/The-enzymatic-defence-against-glycation-in-health?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 26 ago 2024.

THORNALLEY, P. J.; RABBANI, N. Progress in Uremic Toxin Research: Highlights and Hotspots of Protein Glycation in End-Stage Renal Disease. **Seminars in Dialysis**, v. 22, p. 400–404, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1525-139X.2009.00589.x>.

Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1525-139X.2009.00589.x>. Acesso em: 26 ago 2024.

THRASHER, J. Pharmacologic Management of Type 2 Diabetes Mellitus: Available Therapies. **The American Journal Medicine**, v. 130, n.6S, p. S4-S17, 2017. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2017.04.004>. Disponível em:

[https://www.amjmed.com/article/S0002-9343\(17\)30457-6/fulltext](https://www.amjmed.com/article/S0002-9343(17)30457-6/fulltext). Acesso em: 26 ago 2024.

TONELLI, C.; CHIO, I. I. C.; TUVESON, D. A. Transcriptional Regulation by Nrf-2. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 29, n. 17, p. 1727-1745, 2018. DOI:

<https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>. Disponível em:

<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2017.7342>. Acesso em: 26 ago 2024.

TORRES, M. C. L.; SOARES, N. F. F.; PEREIRA, J. A. M. Extração, purificação e avaliação da atividade da glutathione S-transferase de fígado bovino. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 2, p. 302-307, 2006. DOI:

<https://doi.org/10.1590/S1413-70542006000200016>. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/cagro/a/NpMmscKC8Bt7K93yzhKGnpx/?lang=pt>. Acesso em:
 26 ago 2024.

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**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>. Disponível em:
<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.76.9.4350>. Acesso em: 26 ago 2024.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. **Journal of Clinical Pathology**, v. 22, n. 2, p. 246-246, 1969. DOI: <https://doi.org/10.1136/jcp.22.2.246-b>. Disponível em:
<https://jcp.bmj.com/content/22/2/246.2>. Acesso em: 26 ago 2024.

URSINI, F. *et al.* Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. **Science**, v. 285, n. 5432, p. 1393-1396, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.285.5432.1393>. Disponível em:
<https://www.science.org/doi/10.1126/science.285.5432.1393>. Acesso em: 26 ago 2024.

USMAN, U. Z.; ABU BAKAR, A. B.; MOHAMED, M. Metformin Reduces Oxidative Stress Status and Improves Plasma Insulin Level in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences**, v. 6, n. 4, p.120–125, 2016. DOI:10.6000/1927-5951.2016.06.04.1. Disponível em:
<https://www.semanticscholar.org/paper/Metformin-Reduces-Oxidative-Stress-Status-and-Level-Usman-Bakar/6a9bee16d4988704ce23d3627420349e2a486fa3>. Acesso em: 26 ago 2024.

VALENCIA, W. M.; PALACIO, A.; TAMARIZ, L.; FLOREZ, H. Metformin and ageing: improving ageing outcomes beyond glycaemic control. **Diabetologia**, v.60, n. 9, p. 1630-1638, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4349-5>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00125-017-4349-5>. Acesso em: 26 ago 2024.

VAN BUREN, P.; LEWINTER, M. M. Heart failure as a consequence of diabetic cardiomyopathy. In: Heart Failure: A Companion to Braunwald's Heart Disease. **WB Saunders**, p. 408-418, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-5895-3.10026-9>.

VAN STEE, M. F.; DE GRAAF, A. A.; GROEN, A. K. Actions of metformin and statins on lipid and glucose metabolism and possible benefit of combination therapy. **Cardiovascular Diabetology**, v. 17, n. 1, p. 94, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0738-4>. Disponível em:
<https://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12933-018-0738-4>. Acesso em: 26 ago 2024.

VAN TASSELL, B. W. *et al.* Combination therapy with β -adrenergic receptor antagonists and phosphodiesterase inhibitors for chronic heart failure. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug**

Therapy, v. 28, n. 12, p. 1523-1530, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1592/phco.28.12.1523>. Disponível em: <https://accpjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1592/phco.28.12.1523>. Acesso em: 26 ago 2024.

VAKILZADEH, N. *et al.* Acute hyperglycemia increases renal tissue oxygenation as measured by BOLD-MRI in healthy overweight volunteers. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 150, p. 138-143, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.03.009>. Disponível em: [https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227\(19\)30093-2/abstract](https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227(19)30093-2/abstract). Acesso em: 26 ago 2024.

VENU, V. K. P. *et al.* Metformin Prevents Hyperglycemia-Associated, Oxidative Stress-Induced Vascular Endothelial Dysfunction: essential role for the orphan nuclear receptor human nuclear receptor 4a1 (nur77). **Molecular Pharmacology**, v. 100, n. 5, p. 428-455, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1124/molpharm.120.000148>. Disponível em: <https://molpharm.aspetjournals.org/content/100/5/428>. Acesso em: 26 ago 2024.

VERDERESE, J. P.; YOUNOSSI, Z. Interaction of Type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, n. 5, p. 405-407, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1586/17474124.2013.811047>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/17474124.2013.811047>. Acesso em: 26 ago 2024.

VILELA, D. D. *et al.* The Role of Metformin in Controlling Oxidative Stress in Muscle of Diabetic Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 6978625-6978625, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/6978625>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2016/6978625>. Acesso em: 26 ago 2024.

VIRCHEVA, S. *et al.* In vivo effects of pentoxifylline on enzyme and non-enzyme antioxidant levels in rat liver after carrageenan-induced paw inflammation. **Cell Biochemistry and Function**, v. 28, n. 8, p. 668-672, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbf.1705>. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbf.1705>. Acesso em: 26 ago 2024.

VOLPE, C. M. O. *et al.* Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 2, p. 119, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0135-z>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41419-017-0135-z>. Acesso em: 26 ago 2024.

WAHLANG, B. *et al.* Role of cAMP and phosphodiesterase signaling in liver health and disease. **Cellular Signalling**, v. 49, p. 105-115, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.06.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0898656818301256?via%3Diuhub>. Acesso em: 26 ago 2024.

WAJCHENBERG, B. L. Disfunção Endotelial no Diabetes do Tipo 2. **Arquivos**

Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v. 46, n. 5, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302002000500004>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abem/a/dvf3BSMHfD5JSNTRg8nzHxR/#>. Acesso em: 26 ago 2024.

WANG, F. *et al.* AMPK-mTOR-ULK1 axis activation-dependent autophagy promotes hydroxycamptothecin-induced apoptosis in human bladder cancer cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 5, p. 4302-4315, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.29307>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.29307>. Acesso em: 26 ago 2024.

WANG, Y. *et al.* Pentoxifylline enhances antioxidative capability and promotes mitochondrial biogenesis for improving age-related behavioral deficits. **Aging (Albany NY)**, v. 12, n. 24, p. 25487, 2020. DOI: <https://doi.org/10.18632/aging.104155>. Disponível em: <https://www.aging-us.com/article/104155/text>. Acesso em: 26 ago 2024

WASSEF, L.; KELLY, D. J.; GILBERT, R.E. Epidermal growth factor receptor inhibition attenuates early kidney enlargement in experimental diabetes. **Kidney International**, v. 66, n. 5, p. 1805-14, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00955.x>. Disponível em: [https://www.kidney-international.org/article/S0085-2538\(15\)50270-6/fulltext](https://www.kidney-international.org/article/S0085-2538(15)50270-6/fulltext). Acesso em: 26 ago 2024.

WAY, K. J.; KATAI, N.; KING, G. L. Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. **Diabetic Medicine**, v. 18, p. 945–59. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.0742-3071.2001.00638.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.0742-3071.2001.00638.x>. Acesso em: 26 ago 2024.

WELT, K. *et al.* Ultrastructural, immunohistochemical and biochemical investigations of the rat liver exposed to experimental diabetes and acute hypoxia with and without application of Ginkgo extract. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 55, n. 5, p. 331–345, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1078/0940-2993-00337>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0940299304701797?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago 2024.

WINDMEIER, C.; GRESSNER, A. M. Pharmacological aspects of pentoxifylline with emphasis on its inhibitory actions on hepatic fibrogenesis. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 29, n. 2, p. 181-196, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(96\)00314-X](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(96)00314-X). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030636239600314X?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago 2024.

WROBLEWSKI, F.; LADUE, J. S. Serum Glutamic Pyruvic Transaminase in Cardiac and Hepatic Disease. **Experimental Biology and Medicine**, v. 91, n. 4, p. 569-571, 1956. DOI: <https://doi.org/10.3181/00379727-91-22330>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3181/00379727-91-22330>. Acesso em: 26 ago 2024.

WU, D.; WU, C.; ZHONG, Y. The association between paraoxonase 1 activity and

the susceptibilities of diabetes mellitus, diabetic macroangiopathy and diabetic microangiopathy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 9, p. 4283-4291, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcmm.13711>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jcmm.13711>. Acesso em: 26 ago 2024.

WU, F. *et al.* FGF21 ameliorates diabetic cardiomyopathy by activating the AMPK-paraoxonase 1 signaling axis in mice. **Clinical Science**, v. 131, n. 15, p. 1877-1893, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1042/CS20170271>. Disponível em: <https://portlandpress.com/clinsci/article/131/15/1877/72447/FGF21-ameliorates-diabetic-cardiomyopathy-by>. Acesso em: 26 ago 2024.

WU, J. *et al.* Pentoxifylline alleviates high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis and early atherosclerosis in rats by inhibiting AGE and RAGE expression. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 10, p. 1367-75, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1038/aps.2010.110>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/aps2010110>. Acesso em: 26 ago 2024.

YAMAGATA, K. *et al.* β -carotene reverses the IL-1 β -mediated reduction in paraoxonase-1 expression via induction of the CaMKKII pathway in human endothelial cells. **Microvascular Research** v. 84, n. 3, p. 297-305, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2012.06.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0026286212001185?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago 2024.

YANG, H. *et al.* Oxidative stress and diabetes mellitus. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1773-1782, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1515/cclm.2011.250>. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm.2011.250/html>. Acesso em: 26 ago 2024.

YANG, R. Z. *et al.* cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping, and functional expression of a novel human alanine aminotransferase. **Genomics**, v. 79, n. 3, p. 445-450, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1006/geno.2002.6722>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0888754302967224?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago 2024.

YANG, S. K. *et al.* Preventive effect of pentoxifylline on contrast-induced acute kidney injury in hypercholesterolemic rats. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 9, n. 2, p. 384-388, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2014.2132>. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2014.2132>. Acesso em: 26 ago 2024.

YARWOOD, S. J. Special issue on “New Advances in Cyclic AMP Signalling”—an editorial overview. **Cells**, v. 9, n. 10, p. 2274, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9102274>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/10/2274>. Acesso em: 26 ago 2024.

YASMIN, T. *et al.* Metformin treatment reverses high fat diet- induced non-alcoholic fatty liver diseases and dyslipidemia by stimulating multiple antioxidant and anti-inflammatory pathways. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 28, p. 101168,

2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.101168>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405580821002624?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago 2024.

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis, **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 5944–5972, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.101168>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405580821002624?via%3Dihub>. Acesso em: 26 ago 2024.

YU, W. *et al.* Glycation of paraoxonase 1 by high glucose instigates endoplasmic reticulum stress to induce endothelial dysfunction in vivo. **Scientific Reports**, v.7, p. 45827, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep45827>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep45827>. Acesso em: 26 ago 2024.

YUMNAM, S.; SUBEDI, L.; KIM, S. Y. Glyoxalase System in the Progression of Skin Aging and Skin Malignancies. **International Journal of Molecular Sciences** v. 22, p. 310, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22010310>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/1/310>. Acesso em: 26 ago 2024.

YUN, H. *et al.* AMP-activated protein kinase mediates the antioxidant effects of resveratrol through regulation of the transcription factor FoxO1. **FEBS Journal**, v. 281, n. 19, p. 4421–4438, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/febs.12949>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/1/310>. Acesso em: 26 ago 2024.

XUE, M. *et al.* Transcriptional control of glyoxalase 1 by Nrf-2 provides a stress-responsive defence against dicarbonyl glycation. **Biochemical Journal**, v.443, n. 1, p. 213–222, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1042/BJ20111648>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/1/310>. Acesso em: 26 ago 2024.

ZACCOLO, M.; MOVSESIAN, M. A. cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. **Circulation research**, v. 100, n. 11, p. 1569–1578, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.106.144501>. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.106.144501>. Acesso em: 26 ago 2024.

ZAMANIAN, M. Y. *et al.* The Therapeutic Activities of Metformin: Focus on the Nrf-2 Signaling Pathway and Oxidative Stress Amelioration. **Current Molecular Pharmacology**, v. 16, n. 3, p. 331–345, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1874467215666220620143655>. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/article/124640>. Acesso em: 26 ago 2024.

ZHANG, M., *et al.* Therapeutic potentials of pentoxifylline for treatment of cardiovascular diseases. **Experimental & Clinical Cardiology**, v. 9, n. 2, p. 103–111, 2004. PMID: 19641695. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2716262/>. Acesso em: 26 ago 2024.

ZHOU, S. *et al.* Renoprotective effect of atorvastatin on STZ-diabetic rats through attenuating kidney-associated dysmetabolism. **European Journal of**

Pharmacology, v. 740, p. 9-14, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.06.055>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014299914005068?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago 2024.

ZILIN, S. *et al.* The determination of AGE-peptides by flow injection assay, a practical marker of diabetic nephropathy. **Clinica Chimica Acta**, v. 313, n. 1-2, p. 69-75, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00651-9](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00651-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009898101006519?via%3Di> hub. Acesso em: 26 ago 2024.

ZUO, H. *et al.* A-kinase anchoring proteins diminish TGF- β 1/cigarette smoke-induced epithelial-to-mesenchymal transition. **Cells**, v. 9, n. 2, p. 356, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9020356>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/2/356>. Acesso em: 26 ago 2024.

ANEXO A: Alterações relativas em biomarcadores plasmáticos, hepáticos e renais de metabolismo de carboidratos e lipídios, danos oxidativos e defesas antioxidantes em ratos diabéticos STZ após 42 dias de tratamento com metformina e pentoxifilina individualmente ou combinados.

Comparações							
Parâmetros	Dvs N	DI4UvsD	DMETvsD	DP100vsD	DMP25 vsD	DMP50 vsD	DMP100 vsD
ΔPeso	↓ 50%	↑ 126 %	--	--	--	--	--
Peso corporal (AUC)	↑ 20%	↑ 22%	--	--	--	--	--
Fígado (g)	↑ 24%	↓ 15%	--	--	--	--	--
Rim(g)	↑ 50%	↓ 25%	--	--	--	--	--
Glicemia (AUC)	↑ 387%	↓ 69%	--	--	--	--	--
Hemoglobina glicada	↑ 127%	↓ 41%	--	↓ 12%	--	--	--
Frutosamina	↑ 86%	↓ 38%	--	--	--	--	--
Triglicerídeos	↑ 84%	↓ 58%	--	--	--	--	--
Colesterol total	↑ 19%	↓ 21%	--	--	--	--	--
Colesterol-HDL	--	--	--	--	--	↑ 21%	--
Albumina	--	↑ 12%	--	--	--	--	--
ALT	↑ 147%	↓ 55%	--	--	--	--	--
ALP	↑ 399%	↓ 74%	--	--	--	--	--
Creatinina	↓ 20%	--	--	--	--	--	--
Ácido úrico	↓ 17%	--	--	--	--	--	↑ 25%
Ureia	↑ 41%	--	--	--	--	--	--
AGEs-Plasma	↑ 61%	↓ 65%	↓ 35 %	--	↓ 41%	↓ 51%	↓ 39%
AGEs-Fígado	↑ 79%	↓ 57%	--	↓ 61%	↓ 49%	↓ 55%	↓ 62%
AGEs -rim	↑ 26%	↓ 25%	↓ 21 %	↓ 20%	--	--	↓ 25%
TBARS-plasma	↑ 97%	↓ 67%	--	--	--	--	--

Comparações							
Parâmetros	Dvs N	DI4UvsD	DMETvsD	DP100vsD	DMP25 vsD	DMP50 vsD	DMP100 vsD
TBARS-Fígado	↓ 47%	↑ 62%	--	--	--	--	--
TBARS-Rim	↑ 66%	↓ 43%	↓ 24%	↓ 24%	↓ 26%	↓ 26%	↓ 26%
PON 1	↓ 24%	↑ 27%	--	↑ 39%	--	↑ 21%	↑ 30%
SOD-Fígado	↓ 26%	--	--	--	--	--	--
SOD-Rim	↓ 28%	↑ 43%	↑ 33%	↑ 43%	↑ 32%	↑ 39%	↑ 42%
CAT-Fígado	↓ 49%	↑ 35%	--	--	--	--	--
CAT-Rim	↓ 31%	↑ 48%	↑ 45%	↑ 43%	--	--	↑ 40%
GSH-Px-fígado	↑ 76%	--	--	--	--	↑ 34%	↑ 61 %
GSH-Px-Rim	↑ 148%	↓ 55%	--	--	--	↑ 41%	↑ 46%

As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. As porcentagens do grupo D foram comparados ao grupo N, as porcentagens dos grupos DI4U, DMET, DP100, DMP25, DMP50 e DMP100 D foram comparados ao grupo D. Setas em vermelho indicam que houve diferença estatística entre o grupo D e os demais grupos.

ANEXO B: Alterações relativas (%) em biomarcadores plasmáticos, hepáticos e renais de metabolismo de carboidratos e lipídios, danos oxidativos e defesas antioxidantes em ratos diabéticos STZ após 42 dias de tratamento com metformina e pentoxifilina individualmente ou combinados, com ênfase nos efeitos quando os fármacos estão em combinados.

Comparações						
Parâmetros	DMETvs DMP25	DMETvs DMP50	DMETvs DMP100	DP100vsD MP25	DP100vsD MP50	DP100vsD MP100
AGEs- Fígado	↓ 50%	↓ 56%	↓ 62%	--	--	--
PON 1	--	--	--	↓ 30%	--	--
GSH-Px- fígado	--	↑ 32%	--	--	--	--
GSH-Px- Rim	--	↑ 30%	↑ 35%	--	↑ 33%	↑ 38%

As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. As porcentagens dos grupos DMP25, DMP50 e DMP100 foram DMET e DP100. Setas em vermelho indicam que houve diferença estatística entre o grupo os grupos que estão sendo comparados..

ANEXO C: CEUA/FCF/CAr nº 20/2022**C E R T I F I C A D O**

Certificamos que a proposta intitulada **“Terapia combinada entre metformina e pentoxifilina e as alterações em marcadores do estresse glico-oxidativo no diabetes mellitus”**, registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAr: 20/2022, sob a responsabilidade do pesquisador André Luiz Ferreira de Freitas, 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 aprovada “ad referendum” pela Coordenadora da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara UNESP no dia 14 de julho de 2023.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Outubro de 2024
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar e Rato heterogênico - piloto Wistar
Nº de animais	116
Peso/Idade	150g / 3 a 4 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – UNESP- Campus Botucatu
Registro CIAEP	02.00082.2019

Araraquara, 14 de julho de
2023.

Prof. Dr. Cauê Benito
ScarimVice-Coordenador da
CEUA