



**UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ**

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

FRANCISCA ADILFA DE OLIVEIRA GARCIA

**ESTUDO DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DA AÇÃO HIPOGLICEMIANTE
DA PENTOXIFILINA NO MODELO DE DIABETES MELLITUS INDUZIDO
POR ALOXANO EM RATOS**

**FORTALEZA – CE
2012**

FRANCISCA ADILFA DE OLIVEIRA GARCIA

**ESTUDO DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DA AÇÃO HIPOGLICEMIANTE
DA PENTOXIFILINA NO MODELO DE DIABETES MELLITUS INDUZIDO
POR ALOXANO EM RATOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador (a): Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana

**FORTALEZA – CE
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- G199e Garcia, Francisca Adilfa de Oliveira.
Estudo dos possíveis mecanismos da ação hipoglicemiante da pentoxifilina no modelo de diabetes mellitus induzido por aloxano em ratos. / Francisca Adilfa de Oliveira Garcia. – 2012.
163 f.: il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado). – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Doutorado em Farmacologia, Fortaleza, 2012.
Área de Concentração: Farmacologia.
Orientação: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana.
1. Pentoxifilina. 2. Inflamação. 3. Hemoglobina A Glicosilada. 4. Diabetes Mellitus. I. Título.

CDD 616.462

FRANCISCA ADILFA DE OLIVEIRA GARCIA

ESTUDO DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DA AÇÃO HIPOGLICEMIANTE DA
PENTOXIFILINA NO MODELO DE DIABETES *Mellitus* INDUZIDO POR ALOXANO EM
RATOS

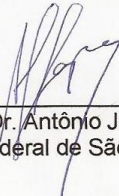
Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau
de Doutor em Farmacologia.

Aprovado em 24/08/2012

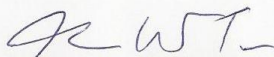
BANCA EXAMINADORA



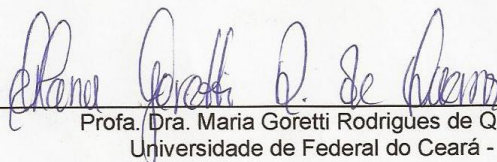
Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Antônio José Lapa
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP



Prof. Dr. Renan Magalhães Montenegro Junior
Universidade Federal do Ceará - UFC



Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz
Universidade de Federal do Ceará - UFC



Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

A Deus, pai de misericórdia.
Aos meus pais, João e Leontina
A minha filha Ana Carolina e ao meu
marido José Aparecido.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra Glauce Socorro de Barros Viana, pela orientação competente, por todos os ensinamentos, pela admirável paixão pela pesquisa, pela mulher firme, corajosa, imponente... que nunca para ou cala.

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito” **Martin Luther King Jr.**

A minha mãe Leontina Mendes Garcia, que certamente teria muito orgulho deste momento. Mãezinha linda que me ensinou tantas coisas, minha “doutora” na arte de amar e cuidar, eu SEMPRE estarei contigo!

“Por mais que ela não lembre que é minha mãe, eu nunca esquecerei que sou sua filha”

Ao meu pai João Coêlho Garcia, viver cercado por tua mansidão e bondade é a herança mais magnífica e valiosa que desfruto todos os dias.

Aos meus irmãos, nove irmãos queridos, que diversificaram meus saberes e compreensões. Em especial a Efigênia Garcia, minha irmã amada, guerreira, bondosa...que linda filha você é! Obrigada pelo amor dedicado a mamãe e lembre-se: sempre estaremos juntas!!!

A minha linda Carol, filha amada que me enche de alegria, que me faz melhor a cada dia. Eu te amo como nunca amei ninguém assim!

A José Aparecido, pelo companheirismo e doçura com que cuida de nós.

“Amar profundamente em uma direção nos torna mais amáveis em todas as outras.” **Madame Swetchine**

Ao Prof. Dr. Antônio José Lapa, pelos primeiros tempos desta caminhada... pelas lições que ficaram.

À Profa. Dra. Teresinha Gonçalves (Teca), por ter me recebido de forma tão cordial em seu laboratório e pela dosagem das citocinas, fundamental para o fechamento da minha pesquisa.

Aos amigos queridos do Laboratório de Biofisiologia da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte: Iri Sandro, Cícero Felipe, Daniel, Beth, Samya, Iana, Natália, Monalisa e Giovanny.

Às minhas lindas, amadas e competentes alunas: Sofia Pinto, Livia Lucetti, Andrezza Cavalcante, Jéssica Rebouças, Teresa Balbino, Hévila Garcia e Walquíria Sousa...vocês foram fundamentais para essa conquista!

As minhas queridas Lucinha, Janice, Xênia, Régia, Cremilda, Luciana, Auri e Fran que compartilharam comigo muitos momentos importantes, com certeza vocês tornaram tudo mais leve e agradável.

Ao sempre estimados Dr. Manoel Salviano Sobrinho e Dr. José Livio Luna Callou, pela importante e duradoura passagem profissional pela Farmace Indústria Químico-Farmacêutica.

Aos amigos de todos os tempos e horas: Isabelle Luna, Eliane Landim, Maria Tereza e Willian Bailo, Maria do Carmo, Zuleide Queiroz, Milana Drumond, Janaína Rebouças, Catiane Landim, Fabi, Ana Luzia e Genebaldo.

À minha amiga, conselheira e irmã de alma Teresa Siqueira...“anjos aparecerão para te iluminar”.

Ao meu querido, hiperativo e visionário Marcondes Macedo Landim.

Ao Sr. Francisco, técnico do Biotério da FMJ, pela atenção depositada aos meus experimentos e aos meus ratos.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, em especial a Aura, pessoa querida, disponível e competente!

A todos que contribuíram para a realização desta pesquisa

“O Senhor é o meu Pastor, nada me faltará. Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente às águas tranqüilas. Refrigera a minha alma, guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu nome.

Salmo 23.

RESUMO

A pentoxifilina (PTX) é um inibidor não-seletivo da fosfodiesterase, com ações antiinflamatórias vasculares e reológicas que podem neutralizar algumas das mudanças no diabetes mellitus (DM) que contribuem para amenizar os seus efeitos secundários como a neuropatia, a retinopatia e a nefropatia. Tendo em vista as propriedades antiinflamatórias da pentoxifilina e o envolvimento da inflamação com o DM, buscou-se investigar seus possíveis efeitos hipoglicemiante e hipolipemiante no modelo de DM induzido por aloxano em ratos. A pentoxifilina (PTX) em estudos pilotos apresentou efeito hipoglicemiante e reduziu os níveis de triglicerídeos em animais com diabetes induzidos por aloxano, nas doses 5, 25, 50 e 100 mg/Kg. A administração oral da associação de pentoxifilina (PTX) com glibenclamida (GLI), PTX5 + GLI2, causou reduções significativas nos níveis plasmáticos de glicose e triglicerídeos em curto e longo prazo, evidenciando que o mecanismo de ação da PTX pode ser explicado via canais de K⁺ATP-dependentes. A administração oral da associação de Pentoxifilina (PTX) com Metformina (MET), PTX5 + MET5, ocasionou uma redução da hiperglicemia apenas a longo prazo, sugerindo não compartilharem o mesmo mecanismo. A PTX não bloqueou a hiperglicemia induzida pelo Diazóxido (DZD), um antagonista da GLI, que inibe a secreção de insulina prolongando o tempo de abertura dos canais de K⁺ATP-dependentes, sugerindo que outros fatores, além do bloqueio de canais de K⁺ATP dependentes, podem estar envolvidos. A redução nos valores de hemoglobina glicada (A1C) e de frutossamina mostraram que o tratamento com PTX50 e com a associação PTX5+GLI2 melhorou o controle glicêmico dos animais em estudo, indicando que esta droga pode inibir o desenvolvimento de lesões micro e macrovasculares advindas do DM. A PTX mostrou um marcante efeito antiinflamatório, melhorando o estado geral dos ratos em experimentação. Reduziu, de forma significativa, o edema de pata nas doses de 50 e 100 mg/Kg, todavia foi visto que o perfil inflamatório no rato diabético tem um padrão diferenciado do rato normal, evidenciando uma amplificação do processo inflamatório no rato diabético quando comparado ao rato normal. Foi visto ainda que os níveis de TNF- α e IL-6 aumentaram de modo significativo após a indução do edema de pata nos ratos diabéticos, entretanto nos ratos

tratados com PTX os níveis teciduais destas citocinas mostraram-se significativamente mais baixos, o que fala a favor de uma evidente ação antiinflamatória da PTX. A PTX mostrou também um importante efeito antioxidante reduzindo, de forma significativa, as liberações de nitrito tecidual e sérica, atuando favoravelmente na redução de radicais livres. O tratamento prolongado com PTX foi eficaz em manter o padrão normal do pâncreas, do fígado e dos rins nos grupos diabéticos tratados com PTX50 e com PTX5+GLI2, indicando uma ação protetora da PTX contra a citotoxicidade induzida pelo aloxano. Os efeitos hipoglicemiante e hipotrigliceridêmico da PTX, aqui demonstrados, podem está correlacionado com sua ação sobre o estresse oxidativo e sobre a *low grade inflammation*, o que torna a PTX um importante alvo terapêutico para o manejo do *diabetes mellitus* na clínica.

Palavras-chave: pentoxifilina, inflamação, hemoglobina glicada, diazóxido e citocinas.

ABSTRACT

Pentoxifylline (PTX) is a non-selective inhibitor of phosphodiesterase with anti-inflammatory vascular and rheological properties. The drug can neutralize some of the changes seen in diabetes mellitus (DM), contributing to attenuate diabetes secondary complications as neuropathy, retinopathy and nephropathy. Considering PTX anti-inflammatory properties and the known involvement of inflammation with DM, we investigated its possible hypoglycemic and hypolipidemic effects in the model of alloxan-induced DM in rats. Pentoxifylline pilot studies in reduced plasma levels of glucose and triglycerides in animals with diabetes induced by alloxan at the doses of 5, 25, 50 and 100 mg/kg. Oral administration of the combination of PTX with glibenclamide (GLI), PTX5 + GLI2, caused significant reductions in plasma levels of glucose and triglycerides in the short and long term, indicating that the mechanism of action of PTX can be explained via K^+ ATP-dependent channels. The oral administration of the combination of pentoxifylline (PTX) with metformin (MET), PTX5+MET5, caused a reduction of only the long term hyperglycemia, suggesting that these two drugs do not share the same mechanism. PTX did not block the hyperglycemia induced by diazoxide (DZD), an antagonist of GLI, which inhibits insulin secretion by prolonging the opening time of the K^+ ATP-dependent-channel. This result suggests that other factors, in addition to the blockade of the K^+ ATP dependent channels, may be involved. The reduction in glycosylated hemoglobin (A1C), and fructosamine showed that treatment with the combination PTX5+GLI2 and PTX50, improved glycemia in the study, indicating that this drug can inhibit the development of macrovascular and microvascular injury resulting from DM. The PTX showed a marked anti-inflammatory effect, improving the general condition of rats subjected to acute inflammation models. PTX reduced significantly, the paw edema at doses of 50 and 100 mg / kg, However, the inflammatory profile in diabetic rats have a different pattern of that seen in non-diabetic rat, showing an amplification of the inflammatory process. We showed that the levels of TNF- α and IL-6 were significantly increased after the induction of paw edema in diabetic rats, but in the rats treated with PTX tissue levels of these cytokines were significantly lower, which indicating a clear anti-inflammatory action of PTX. PTX also showed a significant antioxidant

effect reducing significantly the release of tissue and serum nitrite, acting favorably in the reduction of free radicals. The prolonged treatment with PTX was effective in maintaining the normal histological pattern of the pancreas, liver and kidneys in diabetic groups treated with PTX50 PTX5 + and GLI2, indicating a protective effect of PTX against alloxan-induced cytotoxicity. The hypoglycemic and hypotriglyceridemic effects of PTX, shown here, may correlate with its effect on oxidative stress and on low grade inflammation, making PTX an important candidate for the management of diabetes mellitus in the clinic.

Keywords: pentoxifylline, glibenclamide, anti-inflammatory, glycated hemoglobin, diazoxide and cytokines

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
ALT	Alanina aminotransferase
ALX	Aloxano
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartatoaminotransferase
DAG	Diacilglicerol
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DZD	Diazóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EPM	Erro padrão da média
GLI	Glibenclamida
GLUT	Transportador de membrana específico
GLUT2	Transportador de Glicose tipo 2
GSH	Glutaciona reduzida
HbA1c	Hemoglobina glicada
IDF	Federação Internacional do Diabetes
IL-1	Interleucina –1
IL-1a	Interleucina –1 alfa
IL-1 β	Interleucina -1 beta
IL-4	Interleucina – 4
IL-6	Interleucina – 6
MET	Metformina
mL	Mililitro
mg/dL	Miligramas por decilitro
ND	Nefropatia diabética
NO	Óxido nítrico

OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Proteína C Reativa
pg/mL	Picograma por mililitro
PKC	Proteína quinase C
PTX	Pentoxifilina
PTX+GLI	Pentoxifilina + Glibenclamida
RD	Retinopatia diabética
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SOD	Superóxido dismutase
TNF α	<i>Tumor necrosis factor alfa</i>
U/L	Unidade por litro
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	
1.1	Diabetes <i>mellitus</i> .	17
1.2	Diabetes e Inflamação.	23
1.3	Complicações Micro e Macrovasculares do Diabetes Oriundos da hiperglicemia	27
1.4	Insulina	33
1.5	Diabetes <i>mellitus</i> Experimental	37
1.6	Tratamento Medicamentoso para o DM2	38
1.7	A Pentoxifilina como droga antiinflamatória	41
2	RELEVANCIA E JUSTIFICATIVA	45
3	OBJETIVOS	
3.1	Objetivo Geral	47
3.2	Objetivos Específicos	47
4	MATERIAIS e MÉTODOS	
4.1	Drogas	48
4.2	Animais	49
4.3	Avaliações dos efeitos da PTX e dos hipoglicemiantes GLI e MET sobre os níveis séricos de glicose, triglicerídeos, colesterol, ALT e AST, hemoglobina glicada e frutossamina.	49
4.3.1	Testes Pilotos de curta duração (agudos) com ratos com diabetes induzido por aloxano.	49
4.3.2	Testes de longa duração (crônicos) com ratos com diabetes induzido por aloxano.	50
4.3.3	Atividade hipoglicemiante da Pentoxifilina na Hiperglicemia induzida por Diazóxido.	50
4.4	Efeitos da PTX, da GLI, MET e das associações (PTX + GLI e PTX + MET) sobre o peso e a mortalidade dos ratos diabéticos induzidos por aloxano tratados em curto e longo prazo.	53
4.5	Edema de pata induzido por Carragenina	53
4.5.1	Determinação de Citocinas (TNF- α e IL-6) e Nitrito no homogenato das pata.	55

		15
4.6	Determinação de Citocinas (TNF- α e IL-6) e Nitrito no Soro.	56
4.7	Avaliações Histopatológica do pâncreas, fígado e rins.	57
4.8	Métodos Estatísticos	57
5	RESULTADOS	
5.1	Parâmetros Bioquímicos: glicemia, triglicerídeos, colesterol total e transaminases hepáticas em ratos diabéticos (Seleção de doses/estudo piloto).	58
5.2	Parâmetros bioquímicos: glicemia, triglicerídeos, colesterol total e transaminases hepáticas em ratos diabéticos (Definição as doses para os estudos de associação das drogas)	63
5.3	Associação das drogas: avaliação dos efeitos sobre os níveis plasmáticos de glicose, triglicerídeos, colesterol e transaminases hepáticas em ratos diabéticos.	68
5.3.1	Estudo de associação das drogas - uma semana de tratamento	70
5.3.2	Estudo de associação das drogas – duas semanas de tratamento	74
5.3.3	Estudo de associação das drogas – um mês de tratamento	78
5.3.4	Estudo de associação das drogas – dois meses de tratamento	82
5.3.5	Estudo de associação das drogas – três meses de tratamento	86
5.4	Avaliação do peso e da mortalidade dos ratos diabéticos após tratamento com PTX, GLI e MET e com associações (PTX5 + GLI2 e PTX5 + MET5).	90
5.5	Atividade hipoglicemiante da PTX e da GLI através de dois métodos de rastreio da glicação: hemoglobina glicada e frutossamina.	93
5.5.1	Determinação da hemoglobina glicada, em ratos diabéticos, após dois meses de tratamento com PTX.	94
5.5.2	Determinação da hemoglobina glicada, em ratos diabéticos, após três meses de tratamento com PTX.	96
5.5.3	Determinação de frutossamina em ratos diabéticos após um mês de tratamento com PTX.	98
5.6	Atividade hipoglicemiante da Pentoxifilina na Hiperglicemia induzida por Diazóxido em ratos não diabéticos e diabéticos.	100

5.6.1	Hiperglicemia induzida por Diazóxido (DZD) em ratos não diabéticos	101
5.6.2	Hiperglicemia induzida por Diazóxido (DZD) em ratos diabéticos	102
5.7	Avaliação da atividade antiinflamatória na presença do Diabetes induzido por Aloxano em modelo de inflamação aguda: Edema de Pata.	103
5.7.1	Análise por Elisa de Citocinas (TNF- α e IL-6) e Nitrito no homogenato das patas dos animais diabéticos com edema produzido por carragenina.	105
5.7.2	Análise por Elisa de IL-6 e Nitrito no plasma dos animais diabéticos.	108
5.8	Avaliação Histopatologica do pâncreas, fígado e rins	110
6.0	DISCUSSÃO	114
7.0	CONCLUSOES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	134
	RERERENCIAS	136
	APÊNDICE	156

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes *mellitus*

A prevalência do Diabetes *mellitus* (DM) tem aumentado de forma exponencial ao longo das décadas e transformado a doença em uma das epidemias da saúde pública mundial. Estima-se que são cerca de 10 milhões de pessoas com diabetes no Brasil. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que 3,2 milhões de mortes no mundo são atribuídas todos os anos ao diabetes (IDF, 2007) e, portanto um grande problema de saúde pública afetando cerca de 285 milhões de pessoas no mundo (SHAW et al., 2010).

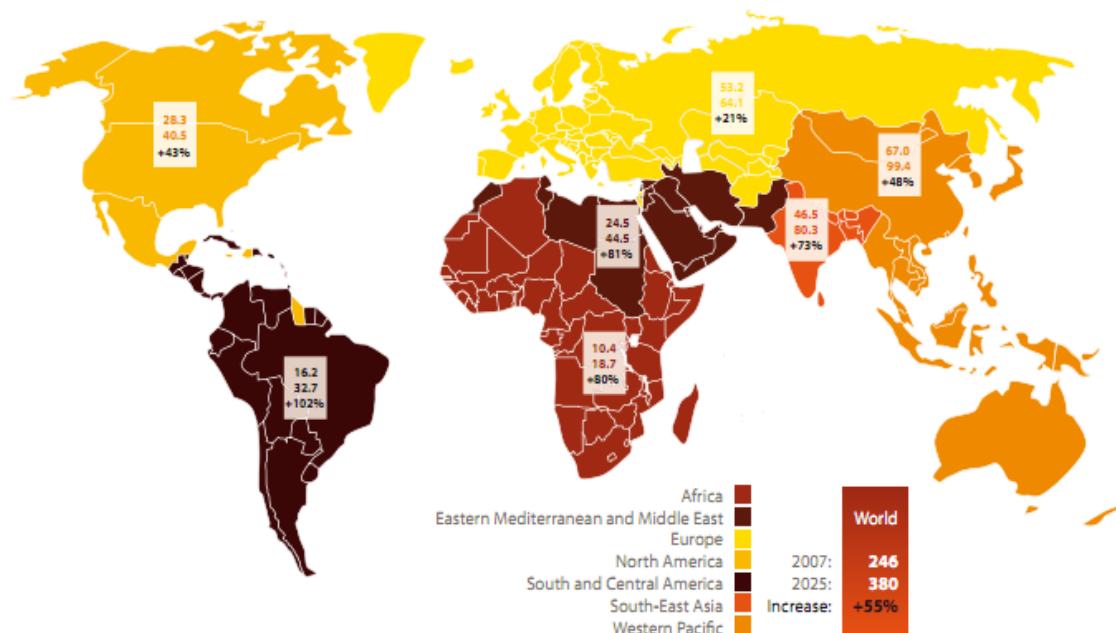
É interessante refletir que na primeira edição do atlas de diabetes da Federação Internacional do Diabetes (IDF), lançado em 2000, a prevalência de DM global estimado era de 151 milhões de pessoas. Na quarta edição, lançado em 2007, a prevalência de diabetes estimado para 2010 aumentou para 285 milhões, representando 6,6% da população adulta do mundo, com uma previsão de que até 2030 o número de pessoas com diabetes terá subido para 438 milhões. Longe de ser uma doença dos países de renda mais alta, o diabetes é uma doença muito associada à pobreza, com o maior ônus a cargo dos países de baixa e média renda e afetando desproporcionalmente os menores grupos socioeconômicos, os mais desfavorecidos e a minoria nos países mais ricos (WILD et al., 2004; WHO, 2006; IDF, 2007).

Especula-se que a maior parte desse crescimento ocorrerá em países em desenvolvimento em razão dos seguintes fatores: crescimento e aumento da faixa etária da população, dietas não saudáveis, obesidade, estilos de vida sedentários e incidência crescente do diabetes *mellitus* tipo 2 em adolescentes e crianças. A OMS também destaca uma importante diferença entre o aumento da prevalência do diabetes em países desenvolvidos versus em países em desenvolvimento. As projeções para 2030 são de que a maioria das pessoas com diabetes nos países desenvolvidos terão 65 anos de idade ou mais, enquanto a maioria dos pacientes com diabetes nos países em desenvolvimento terá de 45 a 64 anos de idade – idades mais produtivas (IDF, 2007).

A Federação Internacional do Diabetes relata substancial variação na distribuição regional do diabetes com o crescimento estimado superior nos países em desenvolvimento (**Figura 1**). A África apresenta o número estimado mais baixo de pessoas com diabetes: 10,4 milhões em 2007, com um crescimento estimado de 80% para 2025. A região do Pacífico Ocidental e o sudeste da Ásia respondem pelos números mais altos, com prevalência de 67,0 milhões e 46,5 milhões, respectivamente, em 2007 e o crescimento estimado para 2025 de 48% e 73% respectivamente. No mesmo ano, as taxas na América do Norte e na Europa eram de 28,3 e 53,2 milhões, e o crescimento estimado para 2025 de 43% e 21% respectivamente. Na América do Sul e Central a prevalência era de 16,2 milhões com uma estimativa de 32,7 milhões para 2025 representando um crescimento estimado de mais de 102%. De um modo global o crescimento estimado do DM de 2007 a 2025 corresponde a mais de 55% da população mundial (IDF, 2007).

Figura 1 - Distribuição Mundial do Diabetes *mellitus*

Global projections for the number of people with diabetes (20-79 age group), 2007-2025 (millions)



Fonte: Diabetes Atlas, third edition, 2007.

O DM está entre as sete doenças de maior mortalidade e morbidade em diferentes grupos populacionais devido as suas complicações crônicas macrovasculares, que podem se manifestar como doença coronariana, vascular cerebral e vascular de membros inferiores e, microvasculares como a nefropatia, retinopatia e neuropatia diabética. A doença macrovascular, representada pelo infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral é a principal causa de mortalidade em pacientes com DM tipo II (DM2) (LEE *et al.*, 2001; MORRIS, 2001).

De acordo com o Comitê Executivo para Diagnóstico e Classificação do DM da American Diabetes Association, a classificação atual do DM toma como referência a etiologia dos distúrbios glicêmicos. A grande maioria dos pacientes diabéticos pertence a uma das duas classes etiopatogênicas: diabetes mellitus tipo 1 (DM 1) e diabetes mellitus tipo 2 (DM 2) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007).

O DM1 antigamente era conhecido como diabetes mellitus insulino dependente (IDDM). Apresenta-se geralmente em crianças, adolescentes e jovens adultos, onde há uma ausência de secreção de insulina devido a uma severa ou total destruição das células β pancreáticas (CNOP *et al.*, 2005). A incidência desta patologia se deve a associação de fatores genéticos, ambientais e imunológicos que são considerados os principais responsáveis pela destruição das células do pâncreas e, conseqüentemente, pela manifestação da doença. Também se verificou que infecções virais podem desencadear o processo auto-imune característico do DM tipo 1 (CNOP *et al.*, 2005; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007).

O DM2 que era conhecido como diabetes mellitus não-insulino dependente (NIDDM) ou diabetes senil é considerado a forma mais comum da doença, afetando aproximadamente 90% dos diabéticos. Caracteriza-se por graus variáveis de resistência tecidual à insulina e uma deficiência relativa na secreção desse hormônio pelas células β pancreáticas, manifestando-se geralmente em pacientes com idade superior a 40 anos e apresenta elevado componente hereditário. Somado a isso, fatores genéticos, ambientais e obesidade contribuem para o surgimento do DM tipo 2 (ARNER *et al.*, 1991; GERICH, 1998; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007). Como

consequência, os pacientes desenvolvem complicações no sistema micro e macrovascular (VÉRICEL, 2004).

Outro tipo de diabetes encontrado com freqüência é o diabetes gestacional que é diagnosticado durante a gestação, podendo ou não persistir após o parto (GANON, 2001). Há também outros tipos específicos de diabetes, porém menos freqüentes e que podem surgir de forma secundária à destruição das células do pâncreas como defeitos genéticos das ilhotas e na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, infecções e efeito colateral de medicamentos e produtos químicos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007).

O DM2 é a forma presente em 90%-95% dos casos e caracteriza-se por defeitos na ação e na secreção da insulina. Em geral ambos os defeitos estão presentes quando a hiperglicemia se manifesta, porém pode haver predomínio de um deles. A maioria dos pacientes com essa forma de DM apresenta sobrepeso ou obesidade, e cetoacidose raramente desenvolve-se espontaneamente, ocorrendo apenas quando associada a outras condições como infecções. O DM2 pode ocorrer em qualquer idade, mas é geralmente diagnosticado após os 40 anos. Os pacientes não são dependentes de insulina exógena para sobrevivência, porém podem necessitar de tratamento com insulina para a obtenção de um controle metabólico adequado (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006).

A resistência à ação insulina é uma anormalidade primária e precoce no curso da doença, sendo esta caracterizada pela diminuição da habilidade da insulina estimular a utilização da glicose pelo músculo e tecido adiposo prejudicando a lipólise induzida por este hormônio (SKYLER, 2004).

A resistência à insulina é um aspecto fundamental da etiologia do diabetes tipo 2 (KAHN, 2000). Dessa forma, a maioria dos pacientes que desenvolve diabetes tipo 2 é resistente à insulina e a hiperglicemia ocorre quando esses pacientes não podem mais suportar o grau de hiperinsulinemia compensatória para prevenir a descompensação bruta da homeostase da glicose (MCLAUGHLIN, 2003). A resistência à insulina vem sendo associada à aterosclerose prevalente (HOWARD 1996), hipertrigliceridemia (MORO, 2003), intolerância a glicose, hiperlipidemia, hiperuricemia, hipertensão (BONORA, 1998) e doença ovariana policística (KAHN, 2000).

Estudos, tanto clínicos como em animais, mostraram que níveis elevados de glicemia resultam numa acumulo de AGEs em tecidos de indivíduos diabéticos. Os AGEs acumulados ligam-se ao receptor celular (RAGE) e esta interação inicia uma cascata de sinalização que envolve um aumento do fator de transcrição NF- κ B. Este processo leva a um aumento adicional de stress oxidativo e produção/secreção de altos níveis de citocinas inflamatórias, tais como IL-6 e TNF- α (SCHMIDT, 1996).

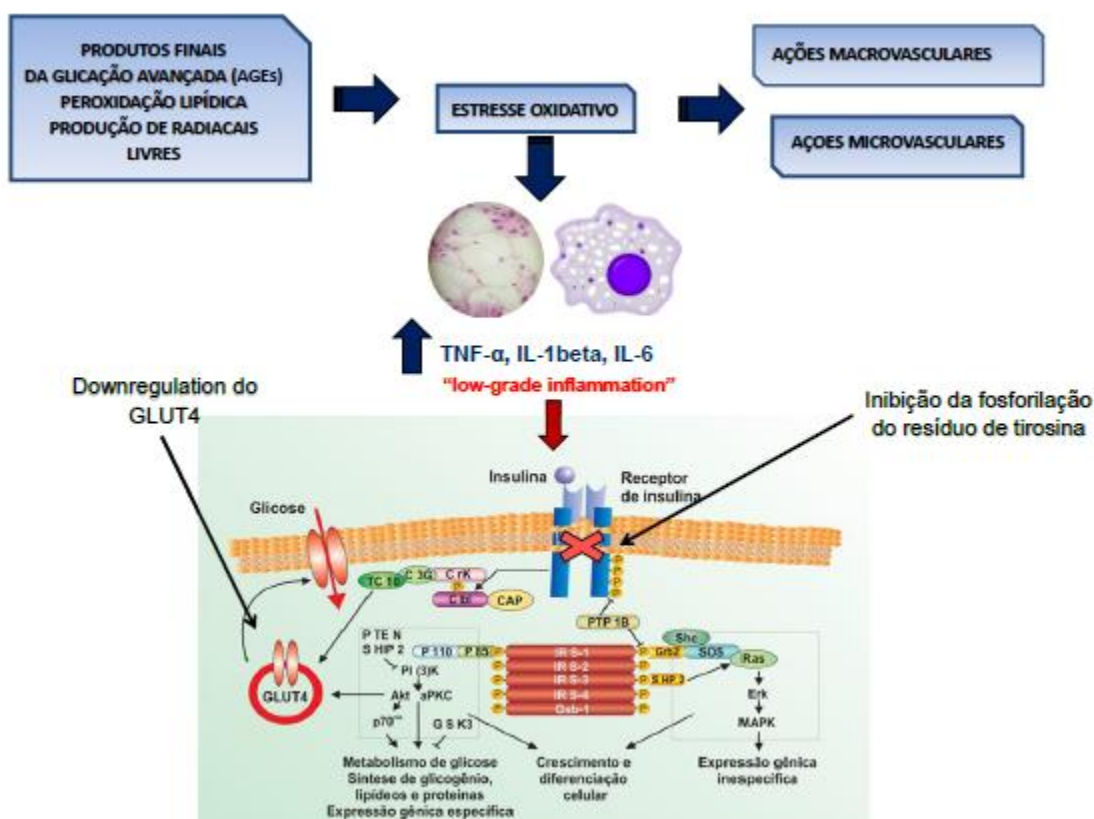
O TNF- α , juntamente com a IL-6, modula a sinalização intracelular de insulina (**Figura 2**). Isso acontece porque ele inibe a fosforilação da tirosina dos IRS e fosforila a porção serina dos mesmos IRS. Uma vez que a serina é fosforilada, os IRS se tornam substratos pobres para o receptor de insulina. Tal bloqueio impede que as interações protéicas funcionem adequadamente na translocação dos GLUTs para a membrana celular e posterior internalização da glicose nas células (PASCHOAL; NAVES; FONSECA, 2007).

Um estudo realizado com humanos demonstrou que a inibição do NF- κ B diminui a ação do TNF- α (LAURENCIKIENE et al, 2007). Outra função desempenhada pelo TNF- α é a ativação do NF- κ B, o que estimulará produção de citocinas pró-inflamatórias (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005). Isso contribui para o ciclo vicioso de inflamação crônica.

A ideia de que a inflamação está associada à resistência à insulina é conhecida há muito tempo (BARON, 1982) e é compatível com o achado de que citocinas induzidas por estresse, como TNF- α , causam resistência à insulina. As cascatas de sinalização reguladas pelo TNF- α são complexas e envolvem muitos pontos de ramificação, inclusive a ativação de várias serina quinases e fatores de transcrição que promovem a apoptose ou a proliferação (BAUD & KARIN, 2001). Uma das ramificações da via de sinalização do TNF- α envolve a ativação da c-Jun N-terminal quinase (Jnk) (AGUIRRE et al, 2000). A Jnk é uma quinase induzida por estresse prototípica que é estimulada por muitos agonistas durante uma inflamação aguda ou crônica. A Jnk fosforila inúmeras proteínas celulares, inclusive IRS-1 e IRS-2, Shc e Gab1. Um papel para a Jnk durante a ação da insulina é forçoso, já que tanto o IRS-1 como o IRS-2 contêm motifs de ligação ao Jnk. Este motif medeia a associação específica da Jnk com o IRS-1, que promove a fosforilação de um resíduo de serina específico que está localizado no lado COOH-terminal do domínio de

ligação à fosfotirosina (PTB – phosphotyrosine-binding) (Ser307 no IRS-1 murino; Ser312 no IRS-1 humano). A fosforilação deste resíduo inibe a função do domínio PTB, que perturba a associação entre o receptor da insulina e o IRS-1 e inibe a fosforilação de tirosina (AGUIRRE et al, 2000).

Figura 2. Inflamação X Resistência insulínica



Fonte: Modificado de ZECCHIN et al, 2004.

Nos últimos anos, diversos estudos epidemiológicos e fisiopatológicos demonstraram que indivíduos com resistência à insulina apresentam valores elevados de marcadores inflamatórios, destacando-se a proteína C-reativa (PCR) como o mais citado. Ainda não há consenso quanto ao uso desse marcador como medida adicional para o diagnóstico de resistência à insulina, e a maioria dos estudos aponta vantagens, ainda que reduzidas, de se associar

essa determinação a outros critérios. Para a prática clínica, a utilização de PCR deve seguir as recomendações do Seminário de Marcadores Inflamatórios dos Centros de Prevenção e Controle de Doenças, da American Heart Association (AHA) (SMITH, 2004), as quais, entretanto, não são específicas para situações de resistência à insulina.

Estão com frequência aparecendo na literatura evidências experimentais e epidemiológicas de que a resistência insulínica e o DM 2 são condições que envolvem processo inflamatório (de pouca intensidade). A inflamação, portanto, parece estar envolvida na etiologia destes distúrbios. Corroborado pelo fato que doenças cardiovasculares, a principal complicação da resistência insulínica, e o DM têm a inflamação como um dos principais componentes (BARZILAY & FREEDLAND, 2003). Portanto, a inflamação parece ser um fator comum para a resistência insulínica, o DM e a disfunção endotelial.

1.2 Diabetes e inflamação

No início da doença, a reação inflamatória resulta em um aumento da citocina TNF- α (fator de necrose tumoral) e das interleucinas 1 β (IL1 β) e 6 (IL6) que apresentam uma inter-relação com as proteínas de fase aguda (ROMANO et al., 2001). Com a evolução da doença, a persistência dessas proteínas em níveis acima do normal representa um estado de inflamação crônica leve, que poderia ser um dos fatores responsáveis pela arterosclerose acelerada desta população (SCHALKWIJK et al., 1999; HAYAISHI-OKANO *et al.*, 2002).

Vários mecanismos poderiam induzir um estado inflamatório crônico e moderado no paciente diabético, representado pelo aumento de proteínas de fase aguda, um dos principais seria a baixa insulinemia no sistema porta, o que provocaria um aumento da produção destas proteínas pelo fígado, que normalmente seria inibido pela insulina. Outros mecanismos incluem o aumento do estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia, ativação de macrófagos e a indução de citocinas (SCHALKWIJK *et al.*, 1999).

Uma das conseqüências fisiológicas da hiperglicemia é o fenômeno de glicação não-enzimática e formação de produtos finais da glicação avançada (VLASSARA *et al.*, 1994), estes produtos podem ativar macrófagos a síntese

de interleucina -1 e do TNF- α , que estão relacionados ao aumento de proteínas de fase aguda (VLASSARA *et al.*, 1994).

Na década de 90, quatro linhas de pesquisa levantaram o conceito de que o DM é associado com a ativação do sistema imune inato e com a inflamação, a saber: 1. a ativação da coagulação é parte da resposta inflamatória e fatores da coagulação contribuem para os danos a órgãos, através da formação de microtrombos na microvasculatura (LEVI & CATE, 1999); 2. a aterosclerose envolve um baixo nível de inflamação, que representa uma resposta do endotélio e da parede dos vasos a injúria repetida causada por fatores, tais como LDL oxidado, radicais livres e agentes infecciosos; 3. a obesidade está associada com secreção de citocinas inflamatórias e proteínas, tais como TNF-alfa, leptina, adinopectina e IL-6 (VISSER *et al.*, 1999; FORD, 1999); 4. as citocinas pro-inflamatórias, tais como IL-6 e TNF-alfa, afetam a secreção e a eficiência na resposta da insulina (HOTAMISLIGIL & SPIEGELMAN, 1994, 1996; GREENBERG & MCDANIEL, 2002). É possível, portanto, que agentes inflamatórios façam parte do arsenal terapêutico para o tratamento do DM tipo 2, num futuro não muito distante (SORO-PAAVONEN & FORBES, 2006).

Assim, é importante reafirmar que uma reação inflamatória subclínica precede o início do DM tipo 2 e varias linhas de pesquisa estudam a participação das citocinas inflamatórias IL-1beta, IL-6 e TNF-alfa no desenvolvimento de DM tipo 2 (CARVALHO *et al.*, 2006). As principais fontes de citocinas (adipocinas) são os tecidos adiposos subcutâneo e visceral. Assim, o aumento da massa do tecido adiposo está associado com alterações da produção de adipocina, com o aumento da expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interleucina 6 (IL-6), inibidor do fator ativador de plasminogênio 1 (PAI-1) e diminuição da expressão de adiponectina no tecido adiposo (CARVALHO *et al.*, 2006). É importante ressaltar que a redução da massa de tecido adiposo, por redução de peso, associada a exercício físico, reduz os níveis de TNF-alfa, IL-6 e PAI-1 e aumenta os níveis de adiponectina, melhorando assim tanto a sensibilidade à insulina, quanto à função endotelial.

Tornou-se também claro, em alguns estudos, que a obesidade é caracterizada por uma ampla resposta inflamatória e que alguns mediadores inflamatórios padrões exibem impacto sobre a ação da insulina de maneira

similar a ação do TNF- α na obesidade, em ratos, em gatos e em seres humanos (PICKUP, 2004; DANDONA *et al.*, 2004; MILLER, 1998).

É sabido que os níveis da PCR estão elevados em indivíduos obesos (PROIETTO, 2005; CERIELLO, 2006). Relativamente, poucos estudos sobre a associação de PCR e DM1 têm sido publicados. A PCR tem se mostrado em maiores concentrações em pacientes diabéticos tipo 2 ou com intolerância à glicose que indivíduos controle (MCMILLAN, 1989).

Nos últimos anos muitas evidências reforçam o papel das substâncias secretadas pelos adipócitos, denominadas adipocinas. A leptina foi uma das primeiras adipocinas identificadas. Embora a deficiência de leptina, dada a uma mutação no gene da leptina, seja a causa de uma forma rara de obesidade, a maioria dos obesos humanos têm elevações nos níveis de leptina. A leptina atua também como um hormônio que tem um importante papel tanto da imunidade inativa como na adaptativa e falta à exibição da função da leptina tanto em ratos quanto humanos, causa danos a imunidade (FERNANDES *et al.*, 1978). Adiponectina e resistina são também exemplos das moléculas com atividade imunológica que são produzidas nos adipócitos (BERG *et al.*, 2002; STEPPAN & LAZAR, 2002; FUKUHARA, 2005).

A adiponectina é uma proteína plasmática de aproximadamente 30 KDa, relativamente abundante, que é secretada especificamente pelo tecido adiposo. A adiponectina possui importantes efeitos no metabolismo, tais como efeito antiinflamatórios, anti-aterogênicos e sensibilizadores da insulina. O gene da adiponectina humana localiza-se no cromossoma 3q27, um sítio associado com suscetibilidade a DM2 (KISSEBAH *et al.*, 2000).

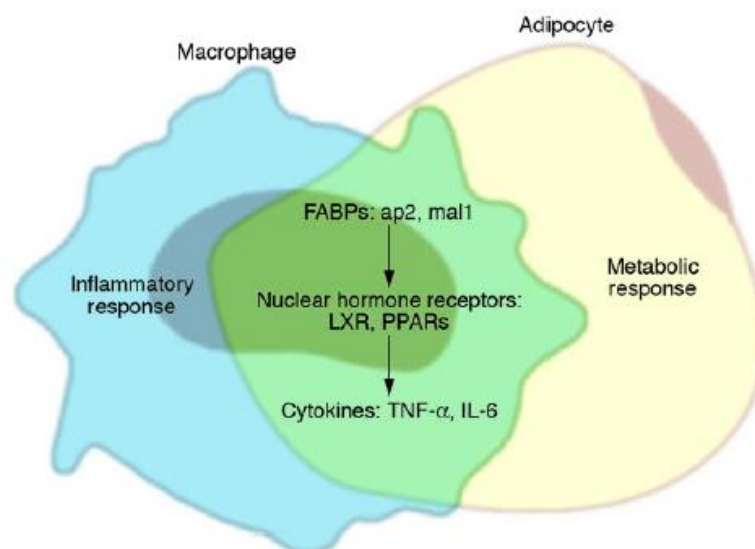
A resistina é uma proteína pertencente a família de proteínas secretórias ricas em cisteína, denominadas “*moléculas semelhantes a resistina*” (RELM – resistin-like molecules) ou “*encontradas em locais de inflamação*” (FIZZ – *found in the inflammatory zone*), foi descoberta em 2001 e representa a mais nova das adipocinas. Ela foi denominada assim pela sua capacidade de promover resistência a insulina (CARVALHO *et al.*, 2006).

Finalmente, os próprios lipídios também participam na regulação coordenada da inflamação e do metabolismo. A Hiperlipidemia na obesidade é responsável, em parte, por induzir à resistência a insulina em tecidos periféricos e a dislipidemia contribui para o desenvolvimento da aterosclerose.

O alto nível de coordenação e interligação entre inflamação e metabolismo é destacado pela sobreposição biológica e pela função de macrófagos e adipócitos na obesidade (**Figura 3**), os macrófagos expressarem muitos, se não a maioria dos genes produtores de “adipócitos” tais como o FABPaP2 adipócito/macrófago (conhecido também como FABP4) e PPAR γ , enquanto os adipócitos expressam muitas proteínas de macrófagos, tais como TNF- α , IL-6, e MMPs (MAKOWSKI *et al.*, 2001; TONTONNOZ *et al.*, 1998 ; BOULOUMIE *et al.*, 2001). As potencialidades funcionais destes dois tipos de células também se sobrepõem, os macrófagos podem armazenar e estocar lipídios tornando-se células ateroscleróticas, pré-adipócitos sob algumas circunstâncias, podem exibir propriedades fagocíticas, antimicrobianas e até mesmo diferenciarem-se em macrófagos em alguns ambientes (COUSIN *et al.*, 1999; CHARRIERE *et al.*, 2003).

Além disso, macrófagos e adipócitos co-localizam-se no tecido adiposo na obesidade. O recente achado que a obesidade está caracterizada pelo acúmulo de macrófagos no tecido adiposo branco fortaleceu a nossa compreensão do desenvolvimento da inflamação do tecido adiposo na obesidade (WEISBERG *et al.*, 2003 ; XU *et al.*, 2003).

Figura 3: integração das respostas metabólicas e imunes nos adipócitos e nos macrófagos através de mecanismos compartilhados.



Como vimos até aqui, hoje já se estabelece como um entendimento científico que a inflamação subclínica crônica é uma parte da Síndrome de Resistência a Insulina (FROHLICH *et al.*, 2000).

Os mecanismos exatos que ligam à resistência a insulina e a inflamação continuam pouco claros. Entretanto, a associação íntima entre a resistência insulínica e a inflamação na aterogênese sugere que as terapias que se dirigem a ambos os parâmetros podem ter benefícios em reduzir complicações macrovasculares relatadas no diabetes. A classe dos tiazolidinedionas, agentes anti-diabéticos orais, têm também propriedades anti-inflamatórias. O tratamento com estes agentes tem uma escala de efeitos anti-aterogênico, incluindo níveis reduzidos de PCR, do fator ativador do plasminogênio (PAI-1), do TNF- α e das espécies reativas do oxigênio. Adicionalmente, o efeito sensibilizador da insulina dos tiazolidinedionas melhora outros fatores da Síndrome da resistência à insulina, incluindo a dislipidemia e a hipertensão (NESTO, 2004).

1.3 Complicações micro e macrovasculares do diabetes oriundos da hiperglicemia

Outro ponto importante é que o DM é uma síndrome clínica heterogênea, caracterizada por anormalidades endócrino-metabólicas, caracterizada clinicamente por vários fatores como cetose, acidose e, em casos mais graves, o coma. O estresse oxidativo pode ser responsável pelos sintomas apresentados pelos pacientes com DM; é definido quando há alteração no balanço pró-oxidante e antioxidante (BELLOMO *et al.*, 1991; NOUROOZ-ZADEH *et al.*, 1995). As alterações por ele causadas podem ocorrer na condução nervosa, na auto-oxidação da glicose sanguínea, na formação de glicosilação avançada e na atividade da enzima aldose redutase (LOW PA *et al.*, 1997).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar as anormalidades estruturais e funcionais associadas à exposição prolongada dos tecidos vasculares à hiperglicemia. O aumento da atividade da via dos polióis, a glicação não-enzimática das proteínas com a produção dos produtos finais da glicação avançada (AGEs – do inglês, *Advanced Glycated End-Products*), o

estresse oxidativo, com o aumento dos radicais livres e as alterações da proteína kinase C, são mencionados na literatura como os principais mecanismos envolvidos nas disfunções endoteliais e na aterogênese, que precedem as graves complicações vasculares presentes no paciente diabético (SCHALKWIJK, 2005).

Entre as teorias que explicam como a hiperglicemia crônica conduz aos danos celulares e teciduais observados nessa doença, a formação dos produtos de AGEs, é considerada uma das mais importantes (BROWNLEE et al, 2001; PEPPA et al, 2003).

Em estudo experimental realizado, utilizando estreptozotocina (STZ), ficou demonstrado que 18 horas após a indução do DM ocorreu dano nas células beta pancreáticas, provavelmente causado pelo desequilíbrio nos sistemas pró e antioxidantes (MELO, 2001).

Os AGEs têm efeitos diretos e indiretos. As atividades diretas incluem a capacidade de alterar a arquitetura da parede dos vasos através da formação de ligações transversais intermoleculares, reduzindo a elasticidade. As atividades indiretas são decorrentes da geração de mediadores da AGE, espécies reativas do oxigênio, que podem levar a uma redução do vasorelaxante endógeno, óxido nítrico (LEI FENG *et al.*, 2005).

Interagindo com o receptor para os AGE (RAGE), os AGEs ampliam seus efeitos biológicos consideravelmente recrutando elementos celulares. A RAGE é um membro da superfamília das imunoglobulinas. Duas conseqüências gerais da ativação celular mediada pelo RAGE incluem a incitação de um fenótipo pro-inflamatório, resultando da expressão dos mediadores (citocinas) e dos efetores (metaloproteinases e do fator tecidual), e a “up regulation” do próprio receptor. O último tem o poder de criar uma retroalimentação positiva para a indução do ligante, expressando mais receptores na superfície da célula com o objetivo de potencializar ciclos subseqüentes de ativação celular (KISLINGER *et al.*, 1999; NEEPER *et al.*, 1992).

Os três mecanismos pelos quais os AGEs causam dano tecidual são: 1) ligação a macromoléculas, 2) interação com receptores específicos e 3) acumulação intracelular (SING et al, 2001). Estes se acumulam no organismo,

sendo responsáveis pelas complicações crônicas do diabetes como retinopatia, nefropatia e neuropatia (LAPOLLA et al, 2004).

Os AGEs podem ser altamente deletérios à integridade e à função dos vasos sanguíneos de diversas maneiras. No interior da parede dos vasos, os AGEs formam ligações cruzadas intra e intermoleculares em proteínas da matriz, “aprisionam” proteínas plasmáticas, causam enrijecimento da vasculatura, extinguem a atividade do óxido nítrico (NO) e da prostaciclina (PGI₂), além de interagirem com receptores para modular grande número de propriedades celulares. Os AGEs não apenas diminuem os níveis desses dois importantes fatores relaxantes derivados do endotélio, mas também induzem a produção do potente vasoconstritor endotelina-1 pelas células endoteliais por meio da ativação do NF-κB. Nas proteínas de baixa densidade plasmáticas (LDL), os AGEs iniciam reações oxidativas que promovem a formação da LDL oxidada (BASTA et al, 2004; GOLDIN et al 2006).

A interação dos AGEs com células que se acumulam nas placas arterioscleróticas, como os fagócitos mononucleares e as células musculares lisas, gera estímulos que intensificam a resposta inflamatória. Adicionalmente, a interação dos AGEs com componentes da parede dos vasos aumenta a permeabilidade vascular, a expressão da atividade pró-coagulante e a geração de ROS, resultando na expressão aumentada de moléculas de adesão leucocitárias endoteliais. Os AGEs modulam os estágios iniciais da aterogênese, desencadeando processo inflamatório-proliferativo e contribuindo para a propagação da inflamação e para a perturbação vascular na doença já estabelecida (BASTA et al, 2004; GOLDIN et al 2006).

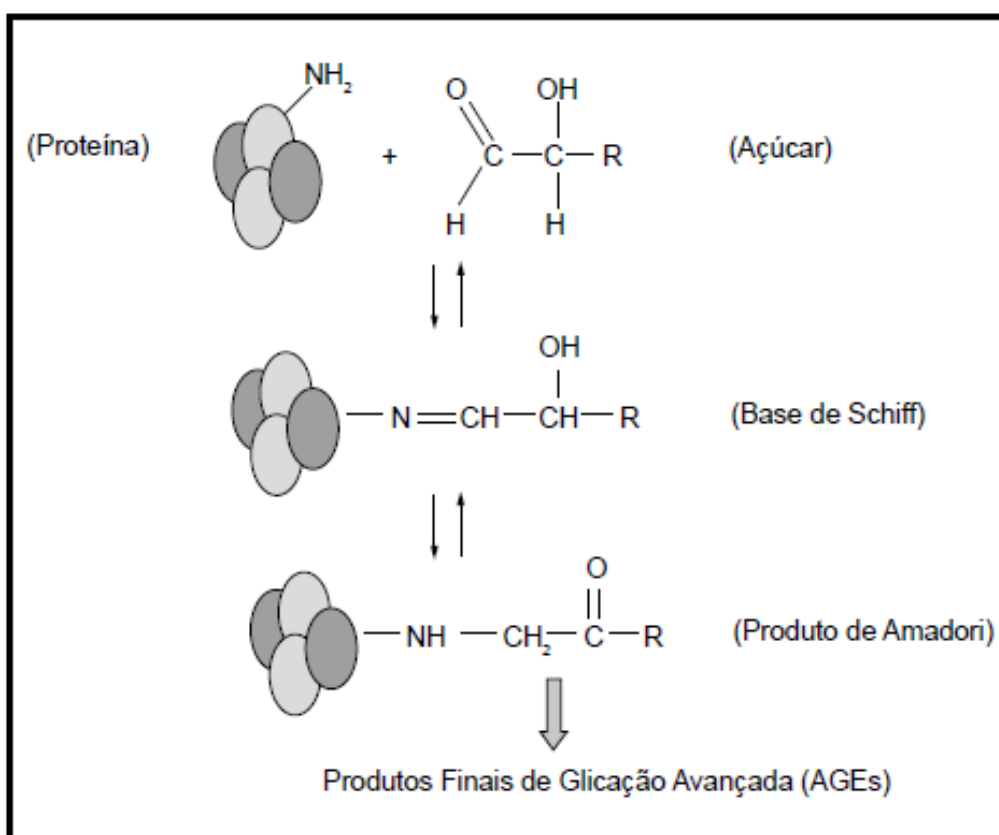
A determinação dos produtos de glicação (produtos de Amadori - **Figura 4**) é rotineiramente analisada através da dosagem da HbA_{1c}, a qual é utilizada para avaliação do controle metabólico nos pacientes diabéticos. A HbA_{1c} origina-se por meio de uma reação irreversível entre a glicose sanguínea e o aminoácido valina N-terminal da cadeia beta da hemoglobina A. A HbA_{1c} representa aproximadamente 80% da fração das hemoglobinas A₁, também chamadas de rápidas, sendo esta denominação resultado do processo de separação eletroforética (SACKS, 1999).

Em um indivíduo não-diabético, cerca de 4% a 6% do total de HbA_{1c} apresenta-se glicada, enquanto que no diabético com descontrole acentuado

esta porcentagem pode atingir níveis duas a três vezes acima do normal (SACKS, 1999).

A dosagem da A1C passou a ser considerado parâmetro essencial na avaliação do controle do DM após a publicação dos resultados de dois grandes estudos clínicos: Diabetes Control and Complications Trial (DCCT), em 1993(6), e UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS), em 1998, relativos ao diabetes *mellitus* tipos 1 e 2 (DM1 e DM2), respectivamente. Esses estudos demonstraram, claramente, que manter o nível de A1C abaixo de 7% no portador de diabetes reduz significativamente o risco de desenvolvimento das complicações micro e macrovasculares da doença em relação ao paciente cronicamente descontrolado (DCCT RESEARCH GRO UP, 1993; UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP, 1998).

Figura 4 - Estágios da glicação não-enzimática das proteínas.



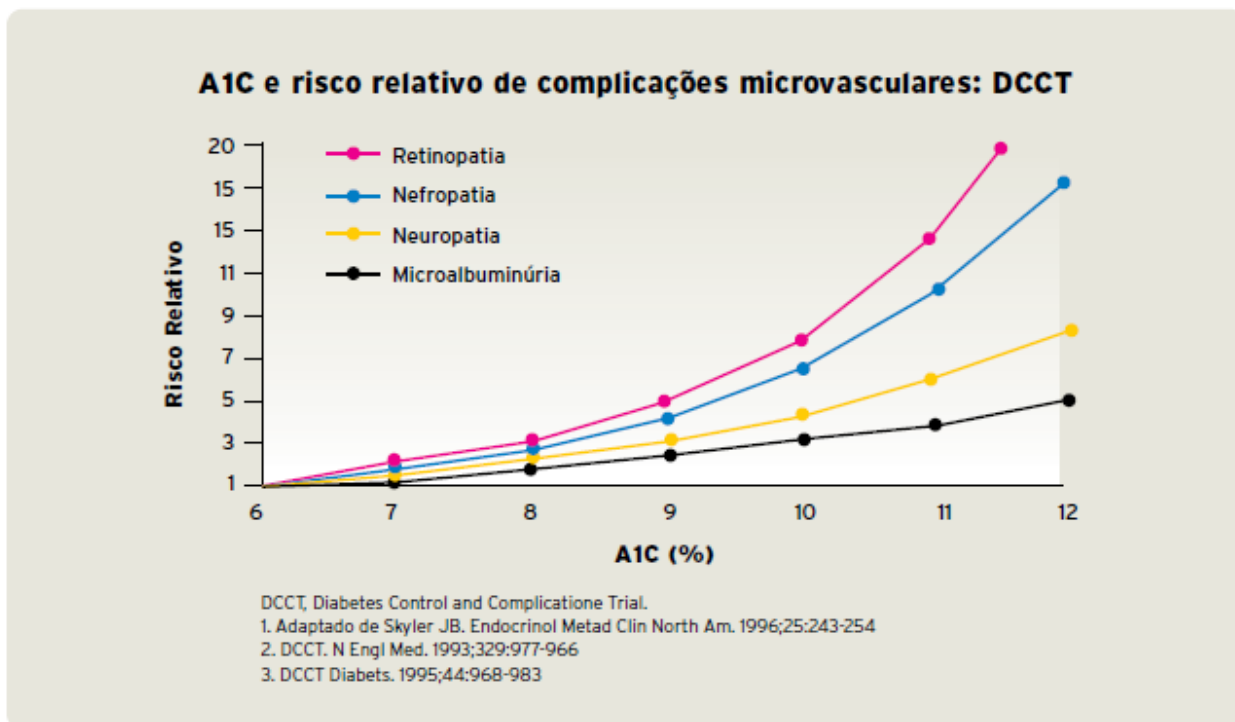
O termo genérico “hemoglobina glicada” refere-se a um conjunto de substâncias formadas com base em reações entre a hemoglobina A (HbA) e alguns açúcares. O termo “hemoglobina glicosilada” tem sido erroneamente utilizado como sinônimo de hemoglobina glicada. O processo de “glicação” de proteínas envolve uma ligação não enzimática e permanente com açúcares redutores como a glicose, ao contrário do processo de “glicosilação”, que envolve uma ligação enzimática e instável (ULRICH & CERAMI, 2001)

A HbA é a forma principal e nativa da hemoglobina, sendo que a HbA0 é o principal componente da HbA. Na prática, esta corresponde à chamada fração não glicada da HbA. Por outro lado, a HbA1 total corresponde a formas de HbA carregadas mais negativamente devido à adição de glicose e outros carboidratos.

Existem vários subtipos de HbA1 cromatograficamente distintos, tais como HbA1a1, HbA1a2, HbA1b e HbA1c. Desses todos, a fração HbA1c, ou apenas A1C, é a que se refere à hemoglobina glicada propriamente dita, cujo terminal valina da cadeia beta está ligado à glicose por meio de uma ligação estável e irreversível.

No decorrer dos anos ou das décadas, a hiperglicemia prolongada promove o desenvolvimento de lesões orgânicas extensas e irreversíveis, afetando os olhos, os rins, os nervos, os vasos grandes e pequenos, assim como a coagulação sanguínea (**Figura 5**).

Figura 5 - A1C e risco relativo de complicações microvasculares: DCCT



Fonte: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. St. Louis, Elsevier Saunders 2006. p.837-901.

Adaptado por Grupo Interdisciplinar de Padronização da Hemoglobina Glicada – A1C, 2009.

Do ponto de vista de recursos laboratoriais de avaliação do controle da glicemia, a glicação da albumina é outro processo decorrente da glicação das proteínas, gerando a chamada “albumina glicada”, analito considerado como melhor marcador do controle glicêmico do que a A1C, uma vez que a glicação da albumina não é afetada pela alteração no tempo de sobrevivência das hemácias, como acontece no teste de A1C, o qual pode ser profundamente influenciado pela presença de processos hemolíticos e de hemoglobinas anormais. Alguns autores consideram que o uso da albumina glicada está especialmente indicado em pacientes com diabetes submetidos à hemodiálise. Entretanto, deve-se ressaltar que os níveis ideais de albumina glicada ainda não foram definitivamente estabelecidos e que os resultados desse teste podem ser influenciados pela presença de proteinúria maciça, doença intestinal perdedora de proteínas ou pelo tratamento com diálise peritoneal (ABE et al, 2008). O teste de albumina glicada reflete a média dos níveis glicêmicos das

últimas duas a três semanas, enquanto que o teste de A1C reflete a média dos níveis glicêmicos dos últimos dois a quatro meses. Não é um teste regularmente disponível na prática laboratorial diária (Grupo Interdisciplinar de Padronização da Hemoglobina Glicada - A1C, 2009)

O teste da frutossamina também tem como base a glicação de proteínas, sendo resultante da interação da glicose plasmática e a lisina, presente na molécula de albumina e de outras proteínas. É mais comumente utilizado na pesquisa experimental do que o teste de albumina glicada. Como a albumina, maior componente da frutossamina, tem meia-vida curta, cerca de 2 a 3 semanas, o teste da frutossamina reflete o controle glicêmico de curto prazo. A utilidade clínica do teste de frutossamina não está bem estabelecida, sendo esse recurso, geralmente, recomendado em situações nas quais o teste de A1C apresente algum problema. Além disso, não há estudos demonstrando a utilidade do teste como marcador do desenvolvimento de complicações relacionadas ao diabetes (ADA, 2008).

Tabela 1 - Correspondência entre níveis de A1C e níveis médios de glicemia

Nível de A1C %	Estudo DCCT	Estudo ADAG
4	65	70
5	100	98
6	135	126
6,5 Meta - SBD	152	140
7 Meta - ADA	170	154
8	205	182
9	240	211
10	275	239
11	310	267
12	345	295

Natahan, DM et al. Translating the A1C Assay into Estimated Average Glucose Values. *Diabetes Care* 31:1-6, 2008.

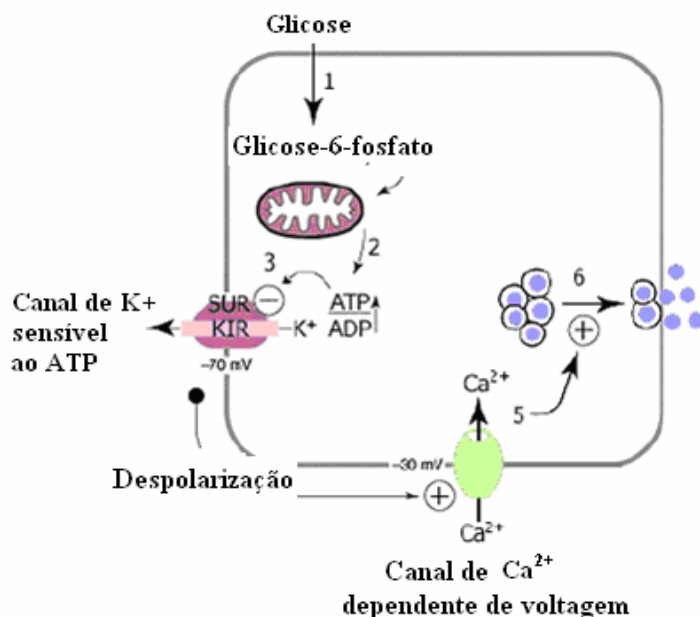
Fonte: Grupo Interdisciplinar de Padronização da Hemoglobina Glicada – A1C, 2009.

1.4 Insulina

A insulina é um hormônio peptídico sintetizado pelas células β pancreáticas das ilhotas de Langerhans a partir de um precursor de 110 aminoácidos, a pré-pró-insulina, que posteriormente, é clivada no retículo endoplasmático dando origem à pró-insulina. Esta é transportada ao complexo de Golgi onde é convertida à insulina. O produto final é composto por duas cadeias peptídicas (A e B) unidas por duas pontes dissulfeto. A cadeia A (α) é formada por 21 resíduos de aminoácidos e a cadeia B (β) possui 30 resíduos (LÊ FLEM et al., 2002).

A secreção de insulina pelas células β inicia-se, basicamente, em função da hiperglicemia. No pâncreas, a glicose é transportada para dentro da célula através de transportadores de glicose tipo 2 (GLUT 2). Dentro da célula existem canais compostos de quatro subunidades $K^+_{IR} 6.2$ (canal de potássio com retificação interna), formando o poro do canal, e quatro subunidades SUR 1 (receptor de sulfoniluréia 1) que é requerida para ativação e regulação. A ligação intracelular de ATP ao $K^+_{IR} 6.2$ fecha o canal, enquanto a abertura dá-se pela ligação de MgADP ao SUR1. O primeiro passo para o metabolismo da glicose é a fosforilação pela enzima glicoquinase, formando glicose-6-fosfato, conseqüentemente produzindo ATP. O aumento da razão ATP/MgADP resultante do metabolismo da glicose fecha o canal, levando a um aumento de carga positiva dentro da célula β , e a conseqüente despolarização da membrana, abrindo canais de cálcio (Ca^{2+}) dependentes de voltagem. O aumento de cálcio intracelular desencadeia a secreção do hormônio (GRIBBLE; REIMANN, 2003; HENQUIN, 2004). A **Figura 06** mostra o mecanismo de secreção de insulina.

Figura 6. Mecanismo de secreção da insulina.



Fonte: Adaptado de DEAN, 2004.

A insulina, uma vez secretada, promove a captação, armazenamento e rápida utilização da glicose pelos tecidos corporais, principalmente o fígado, músculo e tecido adiposo. Em relação ao metabolismo dos carboidratos, altos níveis de insulina estimulam a glicólise para liberação de energia; a glicose que não é imediatamente utilizada é captada pelo fígado e músculo, onde é convertido em glicogênio. No fígado, a insulina estimula a produção de glicogênio através da estimulação da glicogênio sintetase, inibição da glicogênio fosforilase e inibição da gliconeogênese. No músculo, a insulina aumenta a síntese de glicogênio, estimula a glicólise e a captação de glicose por aumentar o número de transportadores de glicose (GLUT-4) na membrana plasmática. No tecido adiposo, a insulina estimula a captação de glicose semelhante ao músculo e promove a lipogênese, aumentando a atividade da lipoproteína lipase, que libera ácidos graxos para a síntese de triglicerídeos e inibe a lipase hormônio-sensível, enzima responsável pela quebra dos estoques de gordura.

Com relação ao metabolismo protéico, a insulina também possui um efeito anabólico, promovendo a entrada de aminoácidos nas células e estimulando a síntese protéica (TAHA; KLIP, 1999; BEARDSALL et al, 2003;

MOORE et al., 2003). A **Tabela 2** representa as ações da insulina no fígado, músculo e tecido adiposo.

Tabela 2. Resumo dos efeitos da insulina sobre o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas no fígado, músculo e tecido adiposo.

Tipo de metabolismo	Células hepáticas	Tecido adiposo	Músculo
Metabolismo de carboidratos	↓ gliconeogênese	↑ captação de glicose	↑ captação de glicose
	↓ glicogenólise	↑ síntese de glicerol	↑ glicólise
	↑ glicólise		↑ glicogênese
	↑ glicogênese		
Metabolismo de lipídios	↑ lipogênese	↑ síntese de triglicerídeos	-----
	↓ lipólise	↑ síntese de ácidos graxos	
Metabolismo de proteínas	↓ degradação das proteínas	-----	↑ captação de aminoácidos
			↑ síntese de proteínas

Onde ↑ significa aumento e ↓ significa diminuição.

Fonte: Adaptado de DEAN (2004).

Durante o jejum, os níveis de insulina na circulação sangüínea diminuem, enquanto o glucagon e outros hormônios contra-regulatórios aumentam. O glucagon, hormônio produzido pelas células α pancreáticas, é um antagonista dos efeitos da insulina, tendo como prioridade fundamental o aumento da glicemia estimulando a quebra de glicogênio e a gliconeogênese. O fígado é o órgão primário responsável pela gliconeogênese, mas após um jejum prolongado (ser humano, 18 h para depleção total do glicogênio hepático), o rim também pode contribuir para a produção de glicose. Embora os níveis de glicose plasmática sejam inicialmente mantidos pela glicogenólise hepática, o glicogênio estocado esgota-se e a contribuição da gliconeogênese

a partir de glicerol, lactato e aminoácidos aumenta progressivamente (TAHA; KLIP, 1999; BEARDSALL et al., 2003; MOORE et al., 2003).

A insulina é o hormônio mais importante que regula o metabolismo energético. Uma deficiência relativa ou absoluta, como no caso do diabetes, leva a severas disfunções nos principais órgãos-alvos da insulina, isto é, fígado, tecido adiposo e músculo (HEI, 1998). A falta de insulina leva ao aumento dos níveis glicêmicos, diminuição da captação de glicose pelos tecidos periféricos e redução da síntese protéica, devido à diminuição do transporte de aminoácidos para o músculo. Além disso, os aminoácidos são utilizados como substrato para a gliconeogênese. A ação lipogênica é perdida, elevando os níveis plasmáticos de ácidos graxos (MOORE et al., 2003; RODEN; BERNROIDER, 2003).

1.5 Diabetes *mellitus* experimental

Os agentes diabetogênicos como o aloxano e estreptozotocina têm sido utilizados em estudos experimentais para indução ao diabetes mellitus, pois estas drogas têm a capacidade de reproduzir em animais de laboratório o quadro de alterações metabólicas e sinais clínicos semelhantes ao diabetes em humanos (MENDES & RAMOS, 1994). Ambos xenobióticos caracterizam-se por seu efeito tóxico seletivo às células das ilhotas de Langerhans do pâncreas (MORDES & ROSSINI, 1981; SZKUDELSKI, 2001).

O aloxano (2,4,5,6-tetraxipirimidina; 5,6-dioxiuracil) é uma substância hidrofílica e instável, com meia vida em pH neutro a 37°C de aproximadamente 2 minutos. A estabilidade aumenta em baixas temperaturas (LENZEN & MUNDAY, 1991). Suas propriedades diabetogênicas foram reportadas por Dunn, Sheehan e McLethie em 1943, quando a droga administrada em coelhos provocou uma necrose específica das ilhotas pancreáticas. Desde então, o aloxano tem sido utilizado como indutor do DM em modelos animais (LENZEN & MUNDAY, 1991).

O aloxano exerce suas ações diabetogênicas quando administrado de forma parenteral: intravenosa, intraperitoneal e subcutânea. A dose de aloxano requerida para indução ao DM depende da espécie de animal, da forma de administração e do status nutricional. Já foi verificado que humanos

apresentam ilhotas de Langerhans mais resistentes ao aloxano quando comparadas as de ratos e camundongos (EIZIRIK et al, 1993).

O mecanismo de ação do aloxano é evidenciado através da repentina elevação na secreção de insulina na presença ou na ausência de glicose. O aloxano atua sobre as células beta do pâncreas, induzindo a liberação maciça de insulina.

Outro aspecto importante é a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) através da redução do aloxano com posterior formação do ácido dialúrico (HEIKKILA et al., 1982; LENZEN & MUNDAY, 1991). Da reação do aloxano e do ácido dialúrico forma-se um radical aloxano intermediário (HA.) e um composto chamado “composto 305”, devido a sua absorção espectrofotométrica máxima ocorrer no comprimento de onda 305 nm. Este agente diabetogênico também reage com dois grupamentos –SH no sítio de ligação da glicose na enzima glicoquinase, resultando na formação de ligações dissulfeto e inativação da glicoquinase (LENZEN & MIRZAIIE-PETRI, 1991).

Um dos alvos das EROs é o DNA das ilhotas pancreáticas que leva a destruição das membranas celulares e indução de quebra no DNA (SAKURAI & OGISO, 1995). Outro importante passo da ação diabetogênica do aloxano são os distúrbios na homeostase intracelular do cálcio (Ca^{2+}), onde foi demonstrado que esta droga eleva a concentração de Ca^{2+} livre citosólico nas células beta do pâncreas, despolarizando as ilhotas de Langerhans (PARK et al., 1995). Desta maneira, a ação tóxica do aloxano sobre as células beta do pâncreas envolve diferentes processos, como a oxidação de grupamentos –SH, inibição da glicoquinase, geração de radicais livres e distúrbios na homeostase intracelular de cálcio, sendo as últimas duas causas as principais responsáveis pela liberação supra fisiológica de insulina e consequente desgaste das ilhotas de Langerhans (KLIBER et al., 1996; SZKUDELSKI, 2001, LENZEN, 2008).

Os ratos com diabetes induzida por aloxano apresentam sintomas idênticos aos pacientes humanos, com danos no sistema ocular, renal, cardíaco, vascular e nervoso, constituindo assim um importante modelo para o estudo de complicações agudas e crônicas do DM (BIESSEL, 2005).

1.6 Tratamento medicamentoso para o DM2

Quando o paciente com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) não responde ou deixa de responder adequadamente às medidas não medicamentosas, um ou mais agentes antidiabéticos devem ser indicados, com o objetivo de controlar a glicemia e promover a queda da hemoglobina glicada (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2003). Os mecanismos de resistência a insulina (RI), a falência progressiva da célula beta, os múltiplos transtornos metabólicos (disglicemia, dislipidemia e inflamação vascular) e as repercussões micro e macrovasculares que acompanham a história natural do DM2 também devem ser objetivos lembrados.

O tratamento do Diabetes deve ter como meta a normoglicemia, devendo dispor de boas estratégias para a sua manutenção em longo prazo. Em verdade, um dos objetivos essenciais no tratamento do DM2 deve ser a obtenção de níveis glicêmicos tão próximos da normalidade quanto e possível alcançar na prática clínica. Os agentes antidiabéticos orais são substâncias que, quando ingeridas, tem finalidade de baixar a glicemia e mantê-la normal (jejum < 100mg/dl e pós-prandial < 140mg/dl) (DIRETRIZES SBD, 2006). Sob esse conceito amplo, de acordo com o mecanismo de ação principal, os antidiabéticos orais podem ser separados em: medicamentos que incrementam a secreção pancreática de insulina (sulfonilureias e glinidas); reduzem a velocidade de absorção de glicídios (inibidores das alfa-glicosidases); diminuem a produção hepática de glicose (biguanidas); e/ou aumentam a utilização periférica de glicose (glitazonas). No entanto, com finalidade prática, os antidiabéticos orais podem ser classificados em duas categorias principais: os que aumentam a secreção de insulina (hipoglicemiantes) e os que não aumentam (anti-hiperglicemiantes) (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Tratamento do DM2 com agentes antidiabéticos

FÁRMACO	PERFIL E MECANISMO DE AÇÃO
Inibidores da alfa-glicosidase	
Arcabose	Retarda a absorção intestinal de glicose. Baixo potencial de redução da A1C (0,5 – 0,8%). Intolerância gastrointestinal. Eficácia associada ao uso pré-prandial para prevenção da hiperglicemia pós-prandial.
Biguanidas	
Metformina	Reduz primariamente a produção hepática de glicose e combate a resistência à insulina. Alto potencial de redução da A1C (2%). Intolerância gastrointestinal. Não causa hipoglicemia. Pode promover discreta perda de peso. Contraindicada na disfunção renal, hepática, pulmonar ou cardíaca, bem como no pré e no pós-operatório e em pacientes submetidos a exames de imagem com contraste.
Glitazona	
Pioglitazona	Combate primariamente à resistência à insulina e reduz a produção hepática de glicose. Aumenta a sensibilidade do músculo, tecido gorduroso e fígado à insulina. Potencial intermediário de redução de A1C (0,5 – 1,4%). Pode promover retenção hídrica e ganho de peso, aumentando o risco de insuficiência cardíaca. Também pode aumentar o risco de fraturas. Promove redução do risco cardiovascular. A França e a Alemanha suspenderam preventivamente a comercialização para avaliar a suspeita de um possível aumento de risco do câncer de bexiga.
Sulfonilureias	
Glimepirida Glibenclamida Clorpropamida Glicazida	Estimulam a produção endógena de insulina pelas células beta pancreáticas, com duração de ação média a prolongada (8 – 24 horas). Úteis para o controle da glicemia de jejum e da glicemia de 24 horas. Alto potencial de redução da A1C (2%). Podem causar hipoglicemia. Clorpropamida e glibenclamida apresentam maior risco de hipoglicemia. Uma alegada ação deletéria em células beta humanas ainda não está estabelecida.
Glinidas	
Repaglinida Nateglinida	Estimulam a produção endógena de insulina pelas células beta pancreáticas, com duração rápida de ação (1-3 horas). Úteis para o controle da hiperglicemia pós-prandial. Potencial intermediário de redução de A1C (1 – 1,5%). Podem promover aumento de peso e hipoglicemia. A repaglinida é mais potente que a nateglinida.
Incretinomiméticos e inibidores da DPP-4	
Exenatida Liraglutida Vildagliptina Sitagliptina Saxagliptina Linagliptina	Nova classe, cujo mecanismo inclui o estímulo das células beta para aumentar a síntese de insulina e a ação nas células alfa do pâncreas reduzindo a produção de glucagon. O glucagon tem efeito de aumentar a glicemia. Potencial médio de redução da A1C (0,5 – 0,8%, dependendo do valor basal da A1C). Não causam hipoglicemia. Intolerância gastrointestinal. Os incretinomiméticos são injetáveis e os inibidores da DPP-4 são para uso oral.

Fonte: Modificado das Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2011).

1.7 A pentoxifilina como droga antiinflamatória

Para testarmos a hipótese de que uma reação inflamatória subclínica precede o início do DM tipo 2 escolhemos a PTX, um fármaco que comprovadamente apresenta atividade antiinflamatória e que também apresenta evidências científicas de minimizar os danos secundários dessa patologia (LEE *et al.*, 2001; MORRIS, 2001; RODRIGUÉZ & GUERRERO, 2008).

Clinicamente, a exploração mais consistente das ações antiinflamatória e imunomoduladora da pentoxifilina se deram apenas nos últimos dez anos. O primeiro trabalho a utilizar o medicamento com este fim foi na redução do processo imunológico de pacientes com esclerose múltipla (RIECKMANN *et al.*, 1996), onde os autores demonstraram que o fármaco modulou a resposta em direção à resposta tipo Th2 com redução do TNF- α e da IL-12 e aumento da IL-10 e da IL-4. No tratamento da insuficiência cardíaca congestiva uma série de artigos demonstrou que o uso da pentoxifilina melhorou a função sistólica de pacientes com insuficiência cardíaca avançada, com melhora dos sintomas clínicos e redução da inflamação sistêmica medida pelo TNF- α e através da PCR (SKUDICKY *et al.*, 2001; SLIWA *et al.*, 2002; PETERS & ESSOP, 2004). A pentoxifilina também demonstrou um bom perfil anti-inflamatório em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca, onde o uso de circulação extracorpórea promove uma ativação importante da resposta inflamatória (BOLDT *et al.*, 2001).

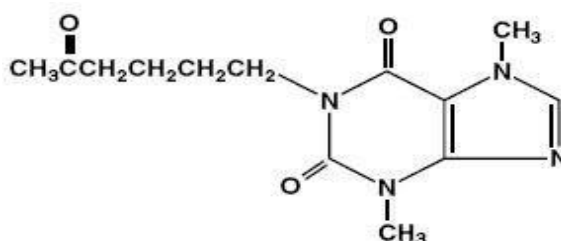
Estudos realizados com a pentoxifilina comprovaram um resultado positivo no tratamento da nefropatia diabética e de outras patologias de base inflamatória (LEYVA-JIMÉNEZ *et al.*, 2009).

Outros motivos que justificam o seu uso para o tratamento de uma doença crônica como o DM é o fato de ser um medicamento clássico e seguro. Sua farmacocinética permite que ele seja rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal, com picos de concentração plasmática atingidos em pouco mais de uma hora, com meia-vida de cerca de quatro horas. A pentoxifilina tem metabolismo predominantemente hepático, sendo inicialmente utilizado em pacientes com claudicação intermitente e doença vascular periférica com um excelente perfil de segurança clínica (FRAMPTON & BROGDEN, 1995). O uso

do medicamento para este fim se justificava pela ação de relaxamento da musculatura vascular (KAMPHUIS et al, 1994) e redução da viscosidade sanguínea, efeito atribuído a sua capacidade de melhorar a flexibilidade da membrana das hemácias e permitir sua passagem por capilares menores que seus diâmetros (ANGELKORT et al, 1969).

A pentoxifilina (PTX), 3,7-dimetil-1(5'-oxo-hexil) (**Figura 7**), é um inibidor não-seletivo da fosfodiesterase, derivado da metilxantina, com efeitos antiinflamatórios e imunomoduladores (RENKE *et al*, 2010), que atua classicamente como agente redutor da viscosidade sangüínea, conhecido por suas ações em doenças oclusivas arteriais periféricas e distúrbios arterio-venosos de natureza aterosclerótica ou diabética. O mecanismo de ação desta droga ainda não foi totalmente esclarecido, mas sabe-se que a redução da viscosidade sangüínea pode ser conseqüência das concentrações diminuídas do fibrinogênio plasmático e inibição da agregação dos eritrócitos e das plaquetas. Acredita-se que a flexibilidade eritrocitária é devida à inibição da fosfodiesterase e ao aumento resultante do AMP cíclico nos glóbulos vermelhos. Também é capaz de inibir a produção de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) por monócitos e linfócitos T in vitro. (LOPRINZI & JATOI, 2004; ANTUNES *et al*, 2008). Esta droga tem sido utilizada em outros estudos, baseada na hipótese de que a mesma é capaz de inibir a produção dessas citocinas pró-inflamatórias (MACDONALD *et al*, 1994; SLIWA *et al*, 1998; COOPER *et al*, 2004; ANTUNES *et al*, 2008), presentes no DM2 desde o início da doença.

Figura 7 – Estrutura química da pentoxifilina



Fonte: dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/fdaDrugI

A PTX possui propriedades antiinflamatórias e imunológicas importantes, com efeitos sobre a redução da migração de neutrófilos e leucócitos (MANDELL, 1988; DE PROST *et al*, 1990). Estes estudos também demonstraram que seu principal efeito antiinflamatório se dava sobre a resposta do tipo Th1, sendo o fármaco considerado um agente supressor da produção do TNF- α (SAMLASKA & WINFIEL, 1994) uma das principais citocinas deste tipo de resposta imunológica. Além deste efeito sobre o TNF- α , posteriormente também foi demonstrado sua ação sobre uma ampla gama de citocinas, sempre promovendo a redução (ao menos *in vitro*) de mediadores pró-inflamatórios, como IL-6, e aumentando a ação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, além da inibição da expressão e atividade da PCR (D'HELLEN COURT *et al*, 1996; RAMANI *et al*, 1994) . O mecanismo pelo qual a pentoxifilina exerce este efeito imunológico ainda não foi totalmente elucidado. Sugerem atuação sobre a transcrição protéica de citocinas pró-inflamatórias. Trabalhos analisaram a expressão do RNA mensageiro do TNF- α em camundongos (KREMSNER *et al*, 1991).

A PTX previne o aumento da permeabilidade microvascular e a formação de edema inibindo os efeitos mediados por polimorfonucleares, com redução na ativação celular, na fagocitose, na adesão endotelial, na redução na quimiotaxia, na produção de superóxido e nas respostas a mediadores inflamatórios (BESSLER, 1986; SULLIVAN e col., 1988; COE *et al*., 1997; MÜLLER *et al*., 1997; SAVAS *et al*., 1997; TÜRKÖZ *et al*., 1997; CLARK *et al*., 2003). Adicionalmente, a pentoxifilina inibe a xantinaoxidase, diminui a produção do PAF, inibe a síntese da fosfolipase A2 e aumenta a produção de PGI2, assim revertendo a vasoconstrição isquêmica (STEEB *et al*., 1992; HAMMERMAN *et al*., 1999; TIRELI *et al*., 2003).

A pentoxifilina é considerada um inibidor da formação de espécies reativas de oxigênio (GAVELLA *et al*., 1991; YOVICH, 1993) e indicada para o tratamento da claudicação intermitente, embora a eficácia clínica da droga para esta indicação permaneça controversa. Tem sido sugerido também que a pentoxifilina pode ser utilizada em doenças que afetam o fluxo sanguíneo para a retina, tais como retinopatia diabética (SONKIN *et al*, 1992; SCHMETTERER *et al*, 1996) ou degeneração macular (KRUGER *et al*, 1998). O efeito

terapêutico da pentoxifilina, nestas condições, pode ser relacionado com o aumento do fluxo sanguíneo capilar e pelo seu efeito vasodilatador direto.

Outro ponto relevante nos estudos da pentoxifilina é que esta parece ser eficaz no tratamento da nefropatia diabética, pois o uso em curto prazo dessa substância resultou em diminuição de proteinúria e de microalbuminúria em diabéticos, bem como em similar resposta quando comparada ao captopril em indivíduos não-hipertensos e diabéticos, com pequenos efeitos colaterais (RODRIGUÉZ & GUERRERO, 2008). Alguns estudos também indicam que a inflamação mediada por citocinas pro-inflamatórias participa da progressão da nefropatia diabética e que o tratamento com a pentoxifilina produziu uma regressão e prevenção na progressão na lesão renal do paciente diabético (LEYVA-JIMÉNEZ *et al.*, 2009) e uma diminuição acentuada da proteinúria nestes pacientes (MCCORMICK *et al.*, 2008).

A pentoxifilina tem demonstrado ainda ser benéfica em desordens imunologicamente mediadas, como por exemplo, na dermatite de contato, hanseníase, artrite reumatóide, câncer e malária (GRANINGER *et al.*, 1991; HUIZINGA *et al.*, 1996; SAMPAIO *et al.*, 1998).

2. RELEVANCIA E JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, estão com frequência aparecendo na literatura evidências experimentais e epidemiológicas de que a resistência insulínica e o DM tipo 2 são condições que envolvem processo inflamatório (de pouca intensidade). Achados científicos confirmam que doença cardiovascular complicação da resistência insulínica e o DM têm a inflamação como um dos principais componentes (BARZILAY & FREEDLAND, 2003).

Vários estudos também vêm fortalecendo a hipótese de que o DM2 é caracterizado por alterações das chamadas proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa (CRP) (PICKUP *et al.*, 1997). Tem se observado que níveis elevados de IL-6 (que estimula a produção de muitas proteínas de fase aguda) aumentam o risco de diabetes (PRADHAN *et al.*, 2001). Além da IL-6, outras citocinas tais como IL-1beta e TNF-alfa constituem mediadores centrais do processo inflamatório no diabetes porque afetam a secreção e a eficiência da resposta a insulina.

Estes dados sugerem que reações inflamatórias não dependem de um único mediador, mas da interação de várias citocinas, condição fundamental para a perpetuação da resposta de fase aguda (GABAY & KUSHNER, 1999). Aumentos nos níveis plasmáticos de IL-6, TNF-alfa e PCR foram observados na obesidade, no DM tipo 2, na hipertensão, na doença das artérias coronárias e na resistência insulínica, sugerindo que a inflamação subclínica exerce papel importante em todas essas condições patológicas o que nos levou, no presente projeto, a focalizar vários paradigmas que, de uma maneira ou de outra, estão envolvidos na fisiopatogenia do DM tipo 2.

A pentoxifilina é um inibidor não-seletivo da fosfodiesterase com ações antiinflamatórias e reológicas que podem neutralizar algumas das mudanças no diabetes que contribuem para amenizar os seus efeitos secundários como a neuropatia, a retinopatia e a nefropatia, complicações crônicas temidas no DM e determinadas por um estado de inflamação subclínica (LEE *et al.*, 2001; MORRIS, 2001; RODRIGUÉZ & GUERRERO, 2008).

O efeito hipoglicemiante da insulina ou dos antidiabéticos orais pode ser potencializado (risco aumentado de hipoglicemia) com o uso concomitante da

pentoxifilina, condição motivadora para a uma investigação dos possíveis mecanismos envolvidos na sua ação hipoglicemiante e corroborada por pesquisas que confirmam a participação do AMPc como mediador da secreção de insulina (SOTOS et al., 1987) e como inibidor da síntese de TNF α *in vitro* (TARNENBAUN e HAMILTON, 1989; TAFFET et al., 1989).

Pesquisas atribuem a pentoxifilina a capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (MACDONALD *et al*, 1994; SLIWA *et al*, 1998; COOPER *et al*, 2004; ANTUNES *et al*, 2008) que estão presentes no DM2 desde o início da doença.

Embora tais achados evidenciem a atividade hipoglicemiante e antiinflamatória da pentoxifilina, os mecanismos envolvidos nessa ação ainda não foram totalmente esclarecidos e/ou correlacionados com o Diabetes. Assim, faz-se necessário verificar seu potencial antiinflamatório/hipoglicemiante frente à glibenclamida e à metformina, drogas de primeira linha para tratamento de pacientes diabéticos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar os mecanismos de ação envolvidos na atividade hipoglicemiante e antiinflamatória da pentoxifilina no diabetes *mellitus* induzido por aloxano em ratos.

3.2 Objetivos específicos

1. Verificar os efeitos da Pentoxifilina (PTX), da Glibenclamida (GLI) e da Metformina (MET) e das associações (PTX + GLI e PTX + MET) sobre os níveis séricos de glicose, de triglicerídeos, de colesterol e das transaminases Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT) em ratos diabéticos induzidos por aloxano tratados em curto e longo prazo.
2. Avaliar o efeito da PTX na glicação de proteínas através de dois métodos de rastreio: hemoglobina glicada e frutossamina.
3. Verificar os efeitos da PTX na hiperglicemia induzida pelo diazóxido (DZD)
4. Verificar os efeitos da PTX, da GLI, da MET e das associações (PTX + GLI ou PTX + MET) sobre o peso e a mortalidade dos ratos diabéticos tratados em curto e longo prazo.
5. Avaliar a atividade antiinflamatória da PTX em modelo de inflamação aguda (edema de pata induzido por carragenina) na presença e na ausência do diabetes induzido por aloxano.
6. Verificar os efeitos da PTX sobre os níveis de nitrito e das citocinas TNF-alfa e IL-6 no plasma de ratos diabéticos.
7. Verificar os efeitos da PTX sobre os níveis de nitrito e das citocinas TNF-alfa e IL-6 em homegenatos de patas de ratos diabéticos com edemas induzidos por carragenina.
8. Estudar, do ponto de vista histológico, possíveis alterações nos rins, fígados e pâncreas de ratos diabéticos na presença e ausência do tratamento com PTX.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo, realizado no Laboratório de Biofisiologia da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ), foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará Campus Medicina Cariri (CEUA - UFC – Cariri) sob número 01/2011 em 04 de abril de 2012. Os experimentos para dosagens das citocina TNF α e IL-6 foram realizados pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

4.1 Drogas

Aloxano, carragenina, etilenodiaminotetracético (EDTA) e diazóxido foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA), pentoxifilina, glibenclamida e metformina do Laboratório EMS.

Determinação de citocinas: Para a dosagem de TNF- α foram utilizados os materiais fornecidos pelo kit da empresa eBioscience, que contém: anticorpo de captura específico, anticorpo de detecção específico, avidina-HRP, padrão, solução substrato tetrametilbenzidina (TMB), placa de 96 poços, coating buffer e assay diluent.

Para a dosagem de IL-6 foram utilizados os materiais fornecidos pelo kit da empresa BD Bioscience, que contém: anticorpo de captura específico, anticorpo de detecção específico, avidina-HRP, padrão, solução substrato tetrametilbenzidina (TMB), placa de 96 poços, coating buffer e assay diluent.

Determinação de nitrito/nitrato pela reação de Griess: A concentração de nitrito/nitrato foi determinada pela reação de Griess após redução enzimática de nitrato a nitrito com a enzima nitrato redutase em solução de redução. Para tal reação foram utilizadas placas de 96 pocos de fundo chato (Nunc-Maxsorp, EUA).

4.2 Animais

Foram utilizados *Rattus norvegicus* de linhagem Wistar albina, machos, adultos pesando entre 200 a 250 g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ), mantidos em repouso por no mínimo 24 horas em caixas de plástico forradas com serragem, em salas

com temperatura ambiente e livre acesso à ração e água, divididos em grupos de 10 animais e sendo distribuídos cinco animais em cada caixa conforme as drogas em estudo.

4.3 Avaliações dos efeitos da pentoxifilina e dos hipoglicemiantes glibenclamida e metformina sobre os níveis séricos de glicose, triglicerídeos, colesterol, transaminases hepáticas, hemoglobina glicada e frutossamina.

4.3.1 Testes Pilotos de curta duração (agudos) com ratos com diabetes induzido por aloxano

Foram utilizados ratos machos Wistar (200 - 250 g) divididos em grupos de 10 animais. O diabetes foi induzido com a administração intravenosa de aloxano (40 mg/kg), através da veia peniana. Após 48 h, coletou-se do plexo retroorbital 1 mL de sangue para avaliação dos seguintes testes bioquímicos: glicemia, triglicerídios, colesterol total e transaminases hepáticas ALT e AST.

Somente os animais que apresentaram glicemia igual ou superior a 200 mg/dL foram submetidos a administração diária via oral de pentoxifilina (PTX) (5, 25, 50 e 100 mg/kg), dos hipoglicemiantes orais glibenclamida ((GLI) 2 e 5 mg/kg) e metformina ((MET) 5 e 50 mg/kg)) e das associações destes (PTX5+GLI2 e PTX5+MET5) por 1 e 2 semanas. Uma hora após a última administração os animais foram pesados, o sangue foi coletado e submetido às mesmas determinações bioquímicas.

4.3.2 Testes de longa duração (crônicos) com ratos com diabetes induzido por aloxano

Foram utilizados ratos machos Wistar (200 - 250 g) divididos em grupos de 10 animais. O diabetes foi induzido com a administração intravenosa de aloxano (40 mg/kg), através da veia peniana. Após 48 h, coletou-se do plexo retroorbital 1ml de sangue para avaliação dos seguintes testes bioquímicos: glicemia, triglicerídios, colesterol total e transaminases hepáticas (ALT e AST).

Somente os animais que apresentaram glicemia igual ou superior a 200 mg/dL foram submetidos a administração diária via oral de PTX (50 mg/kg), dos hipoglicemiantes orais glibenclamida (GLI) e metiformina (MET) (2 e 5 mg/kg respectivamente) e a administração das drogas associadas (PTX5+GLI2 e PTX5+MET5) durante um mês, dois meses e três meses de tratamento. Uma hora após a última administração de cada período os animais foram pesados, o sangue foi coletado e submetido às mesmas determinações bioquímicas, acrescidas das dosagens de frutossamina (após um mês de tratamento) e hemoglobina glicada (após dois e três meses de tratamento).

Determinações bioquímicas: As determinações de glicemia, triglicerídios, colesterol total, as transaminases hepáticas AST (Aspartato aminotransferase) e ALT (Alanina aminotransferase), hemoglobina glicada, frutossamina foram realizadas segundo métodos enzimáticos. **APÊNDICE A.**

4.3.3 Investigação do Mecanismo de Ação via bloqueio de canais de K⁺ ATP-dependentes na hiperglicemia induzida por Diazóxido

Os ensaios foram realizados de acordo com estudos de LEAHY *et al.*, 1994; ZHAO *et al.*, 2005 Grupos de seis a dez ratos Wistar, machos, pesando entre 150 e 250 gramas foram utilizados e divididos em grupos de animais diabéticos (indução com aloxano e tratamento durante 5 dias com as drogas PTX 100 mg/Kg, PTX 50 mg/Kg, GLI 5 mg/Kg e água) e animais não diabéticos. Nos grupos diabéticos apenas ficaram os animais que apresentaram glicemia igual ou superior a 200 mg/dL. Todos os grupos, não diabéticos e diabéticos tratados por cinco dias, após jejum de 12 horas foram divididos em controle normal (CN), controle diabético (CD), PTX100 diabético e não diabético, PTX50 diabético não diabético, GLI5 diabético e não diabético e, após uma hora de tratados foi injetado intraperitonealmente diazóxido (DZ) 250 mg/Kg. O sangue dos animais foi colhido para avaliação da glicemia nos tempos zero (antes da aplicação do DZ), 60, 120 e 180 após a aplicação.



Figura 8 – Indução do Diabetes com Aloxano



Figura 9 – Coleta de sangue pelo plexo retroorbital

4.4 Efeitos da Pentoxifilina (PTX), da Glibenclamida (GLI), da Metformina (MET) e das associações (PTX + GLI e PTX + MET) sobre o peso e a mortalidade dos ratos diabéticos induzidos por aloxano tratados em curto e longo prazo.

Os animais foram pesados semanalmente para adequação da dose durante o tratamento, para o acompanhamento da evolução clínica e da mortalidade.

4.5 Edema de pata induzido por Carragenina

O diabetes foi induzido com a administração intravenosa de aloxano (40 mg/kg), através da veia peniana. Após 48 h, coletou-se do plexo retroorbital 1ml de sangue para avaliação da glicemia e somente os animais que apresentaram glicemia igual ou superior a 200 mg/dL prosseguiram para indução do edema de pata.



Figura 10. Medida do volume da pata traseira de rato em Pletismógrafo (Ugo Basile, Itália).

Fonte:

http://www.ugobasile.com/catalogue/category/pain_and_inflammation/product/7140_plethysmometer.html

Os animais foram tratados por via oral (v.o) com pentoxifilina (50, 100mg/kg), com 5mg/Kg de glibenclamida e com água por 5 (cinco) dias. Antes da indução do edema suas patas traseiras foram estendidas e introduzidas em Pletismógrafo (Ugo Basile, Itália) até à borda póstero-proximal da proeminência do calcanhar para a medida do tempo zero (Tzero). O modelo de edema de pata induzido por carragenina foi realizado segundo o método de Winter et al.(1962). Após uma hora do último tratamento foi realizada uma injeção intraplantar de 40 μ L/pata de uma solução de carragenina a 1% p/v, na pata traseira direita. O volume das patas foi medido nos intervalos de 1, 2, 3, 4, 24h (tempos padrões) e 48 horas, 07 dias, 15dias e 30 dias para avaliação da progressão atípica do edema que acomete os ratos diabéticos, mantendo-os sob tratamento com as drogas já citadas neste modelo. O volume do edema (VE), decorrente de uma reação inflamatória aguda, foi determinado pela diferença entre o volume final (VF) e o volume inicial (VI) das patas.

4.5.1 Análise por Elisa de Citocinas (TNF- α e IL-6) e Nitrito no homogenato das patas

Foram utilizados ratos machos Wistar (200 - 250 g) divididos em grupos de 10 animais. O diabetes foi induzido com a administração intravenosa de aloxano (40 mg/kg), através da veia peniana. Após 05 dias de tratamento com a pentoxifilina nas doses 50 e 100 mg/Kg e com a droga clássica glibenclamida (5 mg/Kg) foi realizada a indução do edema de pata com carragenina. O volume das patas foi medido nos intervalos de 1, 2, 3, 4 e 24 horas, após o último tratamento. Após este período os animais foram sacrificados por decapitação e uma amostra de 5 mm de suas patas traseiras direitas retiradas e adicionadas a uma solução de PBS. O homogenato da pata foi obtido através de trituração com Polytron e então centrifugado e o sobrenadante foi retirado para a realização dos experimentos. As dosagens das citocinas foram seguidas de acordo com as instruções dos fabricantes (eBioscience para TNF- α e BD Bioscience para IL-6).

Um volume de 48 μ L do anticorpo de captura (anti-TNF- α ou anti-IL-6) foi diluído em 12 mL da solução coating buffer. Foram plaqueados 100 μ L dessa mistura numa placa de 96 poços, onde ficou armazenada a 4°C *overnight*. No dia seguinte o anticorpo de captura diluído foi aspirado e feitas 5 lavagens com durações de 1 minuto cada, com a solução de lavagem (PBS + Tween-20). Após as lavagens foram plaqueados 200 μ L de assay diluent por poço e esperado 1 hora em temperatura ambiente. Passado esse tempo foram realizadas novas lavagens e 100 μ L das amostras incubadas. A curva padrão foi feita nas concentrações iniciais de 2000 pg/mL para TNF- α e 5000 pg/mL para IL-6. Após as amostras incubadas, foi esperado um tempo de 2 horas sob temperatura ambiente. Passado esse tempo foram realizadas novas lavagens e adicionados 100 μ L da solução de anticorpo de detecção (48 μ L do anticorpo em 12mL de assay diluent) e deixada em repouso por 1 hora sob temperatura ambiente. Após 1 hora, foi realizada uma nova série de lavagens e adicionados 100 μ L da solução de avidina-HRP (48 μ L de avidina-HRP em 12mL de assay diluent) e deixada em repouso durante 30 minutos. Transcorrido o tempo foram realizadas novas lavagens e adicionados 100 μ L da solução substrato durante

15 minutos. Após esse tempo foram adicionados 50µL de ácido sulfúrico 10% e feita a leitura no leitor de ELISA em 450nm.

A concentração de nitrito/nitrato foi determinada pela reação de Griess após redução enzimática de nitrato a nitrito com a enzima nitrato redutase em solução de redução. Para tal reação foram utilizadas placas de 96 pocos de fundo chato (Nunc-Maxsorp, EUA) onde foram depositados 50µL de cada amostra em duplicata. A redução de nitrato nas amostras de plasma foi realizada pela incubação com tampão de redução contendo nitrato redutase (Sigma, EUA) a 37°C por aproximadamente 18 horas. Seguiu-se a detecção do nitrito com a adição 50µL de reagente de Griess (preparado pela mistura de volumes iguais de sulfanilamida a 1% em H₃PO₄ a 2,5% e 0,1% de naitiletenodiamida em água). Após 10 minutos, absorbância foi medida a 540nm usando um leitor automático de microplacas. As concentrações de nitrito foram calculadas por extrapolação para uma curva padrão de NaNO₂ e os dados expressos em µmoles de nitrito e nitrato.

4.6 Análise por Elisa de Citocinas (TNF-α e IL-6) e Nitrito no Soro

Foram utilizados ratos machos Wistar (200 - 250 g) divididos em grupos de 10 animais. O diabetes foi induzido com a administração intravenosa de aloxano (40 mg/kg), através da veia peniana. Após 48 h, coletou-se do plexo retroorbital 1ml de sangue para avaliação da glicemia sanguínea. Somente os animais que apresentaram glicemia igual ou superior a 200 mg/dL foram submetidos a administração diária via oral de PTX (25, 50 e 100 mg/kg), e glibenclamida (GLI 5 mg/kg) durante 01 semana. Uma hora após a última administração coletou-se do plexo retroorbital 1ml de sangue. Para a obtenção do soro, o sangue foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante utilizado para a realização dos experimentos (glicemia e dosagem de citocinas).

Um volume de 48µL do anticorpo de captura (anti-TNF-α ou anti-IL-6) foi diluído em 12 mL da solução coating buffer. Foram plaqueados 100µL dessa mistura numa placa de 96 poços, onde ficou armazenada a 4°C *overnight*. No dia seguinte o anticorpo de captura diluído foi aspirado e feitas 5 lavagens com durações de 1 minuto cada, com a solução de lavagem (PBS + Tween-20).

Após as lavagens foram plaqueados 200µL de assay diluent por poço e esperado 1 hora em temperatura ambiente. Passado esse tempo foram realizadas novas lavagens e 100µL das amostras incubadas. A curva padrão foi feita nas concentrações iniciais de 2000pg/mL para TNF-α e 5000pg/mL para IL-6. Após as amostras incubadas, foi esperado um tempo de 2 horas sob temperatura ambiente. Passado esse tempo foram realizadas novas lavagens e adicionados 100µL da solução de anticorpo de detecção (48µL do anticorpo em 12mL de assay diluent) e deixada em repouso por 1 hora sob temperatura ambiente. Após 1 hora, foi realizada uma nova série de lavagens e adicionados 100µL da solução de avidina-HRP (48µL de avidina-HRP em 12mL de assay diluent) e deixada em repouso durante 30 minutos. Transcorrido o tempo foram realizadas novas lavagens e adicionados 100µL da solução substrato durante 15 minutos. Após esse tempo foram adicionados 50µL de ácido sulfúrico 10% e feita a leitura no leitor de ELISA em 450nm.

A dosagem de nitrito foi realizada através da metodologia de Griess. 50µL das amostras foram plaqueadas numa placa de 96 poços. A curva padrão foi realizada com uma solução de nitrito a 100µM. Sob proteção da luz, foram adicionados 50µL do reagente de Griess e esperados 10 minutos. Após esse período as amostras foram lidas em leitor de ELISA em 540nm.

4.7 Avaliações histopatológica do pâncreas, fígado e rins

Para análise morfológica dos órgãos do grupo controle negativo (ratos não diabéticos), dos ratos diabéticos, dos grupos tratados com pentoxifilina (5, 50 mg/kg), dos grupos tratados com glibenclamida e metiformina (5mg/kg) e dos grupos tratados pela associação entre essas drogas, ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados por inalação em éter e seus órgãos foram retirados e mantidos em frasco de vidro, contendo formalina tamponada (pH 7,4), durante 3 dias, e em seguida submetidos ao processamento histológico para preparação das lâminas. Os fragmentos dos segmentos, fixados em formalina tamponada e foram desidratados por uma bateria de álcool etílico com concentração crescente (70%, 80%, 90% e álcool

absoluto), diafanizados em xilol, emblocados em parafina e cortados por micrótomo, em cortes com espessura de 5 μ m. As secções obtidas foram secadas em estufa a 37°C e coradas com hematoxilina e eosina. A análise histopatológica foi realizada no Departamento de Morfologia da UFC, Ceará.

4.8 Métodos Estatísticos

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados foram analisados por meio da análise de dois modos: **1.** Através de Teste t pareado avaliando-se o antes e o depois do tratamento em cada grupo. **2.** Através da análise de variância simples dos grupos pós tratados seguida pelo teste de Newman-Keuls (como teste *post hoc*). Os valores foram considerados significativos a partir de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Parâmetros Bioquímicos: glicemia, triglicerídeos, colesterol total e transaminases hepáticas em ratos diabéticos (Seleção de doses/estudo piloto).

O diabetes foi induzido com uma única injeção de aloxano (40 mg/Kg) por via intravenosa. Após 48 horas, os ratos diabéticos (glicemia \geq 200 mg/dL) foram selecionados para o estudo e iniciou-se no dia zero o tratamento que durou cinco dias com a pentoxifilina nas doses usuais de 25, 50 e 100 mg/Kg e com as drogas de referência glibenclamida 5 mg/Kg e metformina 50 mg/Kg. Neste último dia (5º dia) o sangue foi coletado para as determinações da glicemia, triglicerídeos, colesterol total e transaminases hepáticas

A administração oral da pentoxifilina durante uma semana reduziu a hiperglicemia (mg/dL) causada pelo aloxano de forma significativa, nas doses 100 mg/kg na ordem de 43,53% *** $p < 0,001$ (359,54 \pm 18,85 para 203,01 \pm 9,31), 50 mg/kg 54,69% (408,34 \pm 22,20 para 185,01 \pm 17,35) e 25 mg/Kg 34,49% ** $p < 0,01$ (376,22 \pm 11,47 para 246,47 \pm 19,03). Os fármacos de referência apresentaram as reduções mais significativas, a glibenclamida 5mg/Kg reduziu os níveis de glicemia 64,77% *** $p < 0,001$ (440,35 \pm 24,84 para 155,13 \pm 18,33) e a metformina 48,59% *** $p < 0,001$ (340,13 \pm 23,36 para 174,86 \pm 22,91) e o controle diabético manteve a hiperglicemia (338,91 \pm 31,46 para 369,22 \pm 29,30) conforme **Tabela 4**.

Sobre as concentrações de triglicerídeos (mg/dL), a pentoxifilina 100 mg/Kg reduziu os níveis plasmáticos na ordem de 66,39% *** $p < 0,001$ (499,24 \pm 63,99 para 167,77 \pm 30,47), na dose de 50 mg/Kg 63,49% *** $p < 0,001$ (436,93 \pm 64,03 para 159,49 \pm 24,13) e na dose 25 mg/Kg na ordem de 38,58% ** $p < 0,01$ (415,45 \pm 38,23 para 255,16 \pm 23,05). A glibenclamida 5 mg/kg reduziu na ordem de 62,76% *** $p < 0,001$ (413,54 \pm 47,89 para 153,99 \pm 23,90), a metformina na ordem de 80,26% *** $p < 0,001$ (370,94 \pm 39,51 para 81,63 \pm 8,85) e o controle diabético manteve a trigliceridemia em (536,58 \pm 46,29 para 495,42 \pm 49,87) conforme. **Tabela 4**.

Os valores de redução de colesterol total e das transaminases hepáticas ALT e AST pela pentoxifilina e glibenclamida não foram estatisticamente significativos, entretanto a metformina mostrou uma redução na ordem de 36,95% $**p < 0,01$ ($73,23 \pm 5,91$ para $46,17 \pm 3,26$). Não houve alteração nos níveis de colesterol, ALT e AST para o controle diabético, nem no tempo zero (48 horas após a administração de aloxando) nem após o tratamento de 5 dias com o veículo (água). **Tabela 4.**

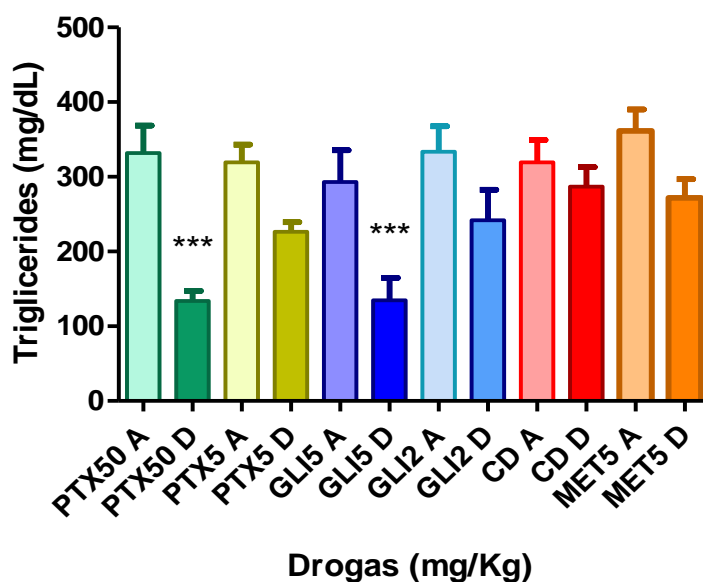


Figura 11. Efeito do tratamento de cinco dias (agudo) com pentoxifilina sobre a glicemia em ratos diabéticos.

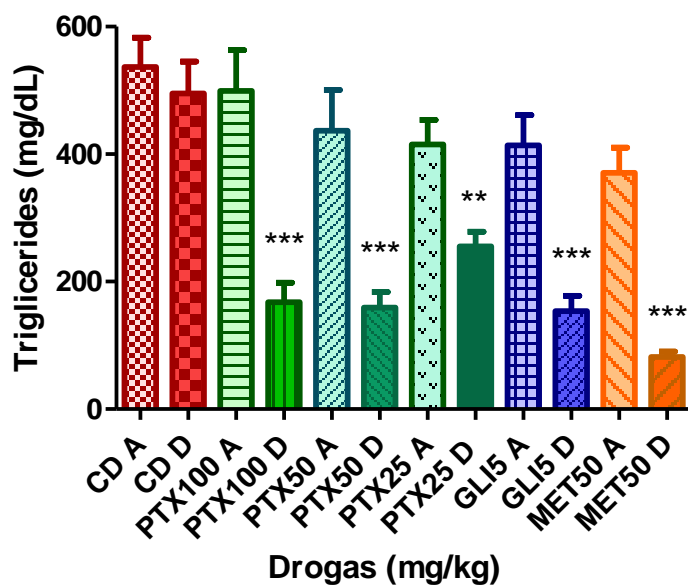


Figura 12. Efeito do tratamento de uma semana com pentoxifilina sobre as concentrações plasmáticas de triglicérides em ratos diabéticos.

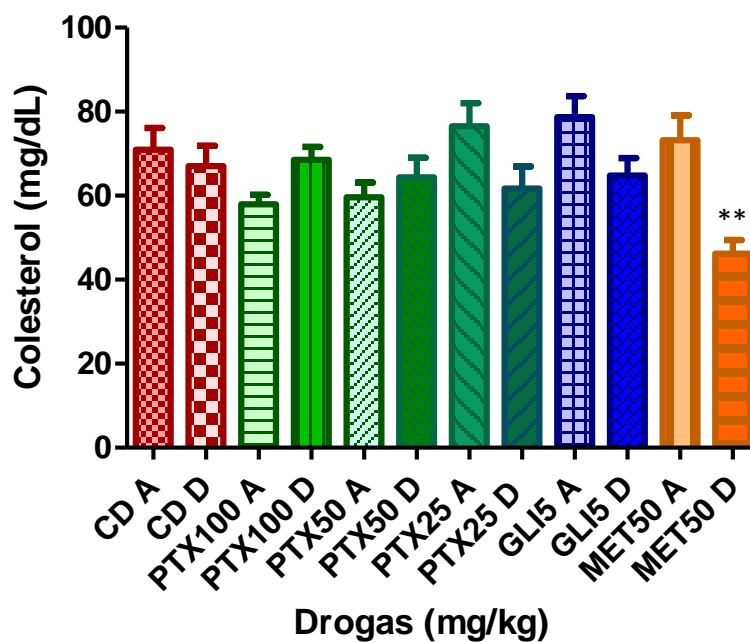


Figura 13. Efeito do tratamento de uma semana com pentoxifilina sobre o colesterol total em ratos diabéticos.

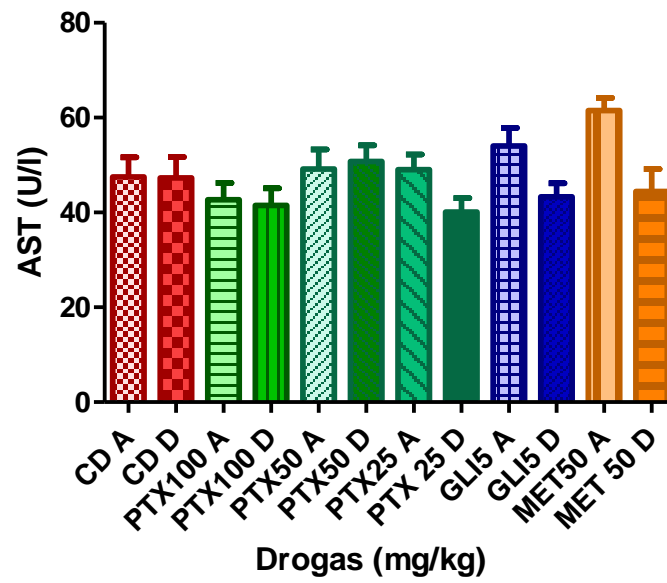


Figura 14. Efeito do tratamento de uma semana com pentoxifilina sobre as concentrações plasmáticas de AST em ratos diabéticos.

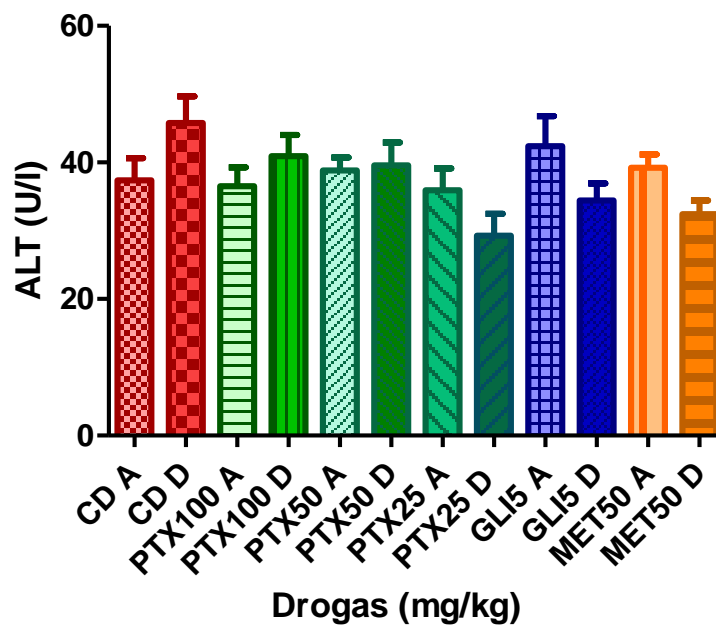


Figura 15. Efeito do tratamento de uma semana com pentoxifilina sobre as concentrações plasmáticas de ALT em ratos diabéticos.

Tabela 4. Efeito da Pentoxifilina, Glibenclamida e Metformina (Estudo Piloto - cinco dias de tratamento) sobre os níveis de glicemia, de triglicerídeos, de colesterol e de transaminases (TGO e TGP) em modelo de diabetes induzido por aloxano em ratos. Significativo após teste t pareado (*p<0,05, **p<0,01 e *p<0,001).**

Grupos (mg/Kg, vo)	Glicemia Média ± EPM (mg/dL)	Triglicerídeos Média ± EPM (mg/dL)	Colesterol Média ± EPM (mg/dL)	AST Média ± EPM (U/l)	ALT Média ± EPM (U/l)
CD A	338,91 ± 31,46	536,58 ± 46,29	70,95 ± 5,15	47,56 ± 4,13	37,38 ± 3,25
CD D	369,22 ± 29,30	495,42 ± 49,87	67,07 ± 4,77	47,33 ± 4,35	45,79 ± 3,87
PTX100 A	359,54 ± 18,85	499,24 ± 63,99	57,98 ± 2,26	42,67 ± 3,56	36,53 ± 2,74
PTX100 D	203,01 ± 9,31***	167,77 ± 30,47***	68,51 ± 3,09	41,47 ± 3,64	40,94 ± 3,08
PTX50 A	408,34 ± 22,20	436,93 ± 64,03	59,63 ± 3,50	49,14 ± 4,15	38,81 ± 1,94
PTX50 D	185,01 ± 17,35***	159,49 ± 24,13***	64,37 ± 4,67	50,77 ± 3,37	39,56 ± 3,38
PTX25 A	376,22 ± 11,47	415,45 ± 38,23	76,57 ± 5,43	49,00 ± 3,26	35,92 ± 3,19
PTX25 D	246,47 ± 19,03**	255,16 ± 23,05**	61,68 ± 5,27	40,11 ± 2,89	29,28 ± 3,20
GLI5 A	440,35 ± 24,84	413,54 ± 47,89	78,72 ± 4,97	54,00 ± 3,81	42,38 ± 4,41
GLI5 D	155,13 ± 18,33***	153,99 ± 23,90***	64,78 ± 4,19	43,28 ± 2,89	34,44 ± 2,48
MET50 A	340,13 ± 23,36	370,94 ± 39,51	73,23 ± 5,91	61,47 ± 2,67	39,20 ± 1,98
MET50 D	174,86 ± 22,91***	81,63 ± 8,85***	46,17 ± 3,26**	44,43 ± 4,76	32,40 ± 2,04

Os valores representam médias±EPM para os níveis de glicemia, de triglicerídeos, de colesterol e de transaminases (TGO e TGP) (n=8 a 30 ratos). Número de animais especificados em parêntese. CD=controle diabético; PTX 100=pentoxifilina 100mg/Kg; PTX50=pentoxifilina 50 mg/Kg; PTX25=pentoxifilina 25 mg/Kg; GLI5=glibenclamida 5mg/Kg e MET50=metformina 50 mg/Kg. A=antes do diabetes e D=depois do diabetes. Valores para o controle normal após 30 dias de acompanhamento: glicemia (87,5±3.3 para 95.4±13.8), triglicerídeos (90.1±12.3 para 130.7±6.3), colesterol (52.9±3.5 para 82.2±3.61), AST (68.8±5.1 para 45,3±3.2) e ALT (32.6±3.22 para 42.6±1.98).

5.2 Parâmetros bioquímicos: glicemia, triglicerídeos, colesterol total e transaminases hepáticas em ratos diabéticos (Definição das doses para os estudos de associação das drogas)

O diabetes foi induzido com uma única injeção de aloxano (40 mg/Kg) por via intravenosa. Após 48 horas, os ratos diabéticos (glicemia \geq 200 mg/dL) foram selecionados para o estudo. Neste estudo, antes de iniciar os estudos de associação (potencialização), decidiu-se por testar o tratamento com baixas doses das drogas isoladas, usando a pentoxifilina, a glibenclamida e a metformina nas doses 5 mg/Kg, 2 mg/Kg e 5 mg/Kg respectivamente. Dos estudos anteriores a dose de 50 mg/Kg da pentoxifilina apresentou o melhor resultado hipoglicêmico e seguirá nos próximos estudos para efeito comparativo. No último dia (5º dia) o sangue foi coletado para as determinações da glicemia, triglicerídeos, colesterol total e transaminases hepáticas.

A administração oral da PTX50 durante uma semana reduziu a hiperglicemia induzida por aloxano na ordem 54,69% *** $p < 0,001$ (408,34 \pm 22,20 para 185,01 \pm 17,34), a PTX5 apresentou uma redução inferior, todavia estatisticamente significativa, na ordem 28,78% * $p < 0,05$ (371,19 \pm 30,60 para 264,35 \pm 16,66). A GLI5 obteve uma redução de 62,20% *** $p < 0,001$ (410,42 \pm 21,43 para 155,13 \pm 18,33) e a GLI2 manteve os níveis glicêmicos originais (375,57 \pm 26,61 para 322,49 \pm 29,07). A MET5 apresentou uma redução na ordem 28,78% * $p < 0,05$ (334,75 \pm 21,29 para 259,37 \pm 14,44). O controle diabético também não modificou os níveis de glicemia (342,81 \pm 23,35 para 373,33 \pm 21,60). **Tabela 5.**

Sobre os níveis de triglicerídeos, mg/dL, a PTX50 reduziu os níveis plasmáticos na ordem de 59,66% *** $p < 0,001$ (332,02 \pm 36,52 para 133,93 \pm 13,22) e a PTX5 na ordem de 29,21% * $p < 0,05$ (319,27 \pm 24,09 para 226,00 \pm 13,11). A GLI5 causou uma redução na ordem de 63,71% *** $p < 0,001$ (293,32 \pm 42,41 para 134,91 \pm 29,96) e a GLI2 apresentou uma redução inferior de 27,45% * $p < 0,05$ (333,46 \pm 34,27 para 241,92 \pm 40,97). A MET5 apresentou uma redução de 24,74% * $p < 0,05$ (361,55 \pm 28,45 para 272,08 \pm 24,70). O controle diabético também não modificou os níveis de triglicerídeos (319,24 \pm 29,94 para 286,91 \pm 26,41) **Tabela 5.**

Os valores de redução de colesterol total e das transaminases hepáticas ALT e AST pela pentoxifilina e glibenclamida não foram estatisticamente significativos. Não houve alteração nos níveis de colesterol, ALT e AST para o grupo controle, nem no tempo zero (48 horas após a administração de aloxano) nem após o tratamento de 5 (cinco) dias com o veículo (água) **Tabela 5.**

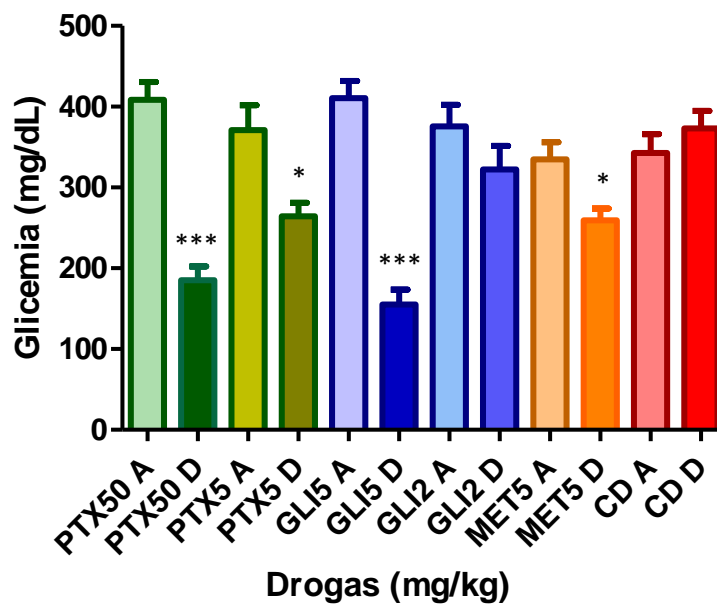


Figura 16. Efeito do tratamento com pentoxifilina, com glibenclamide e com metformina em baixas doses sobre a glicemia em ratos diabéticos.

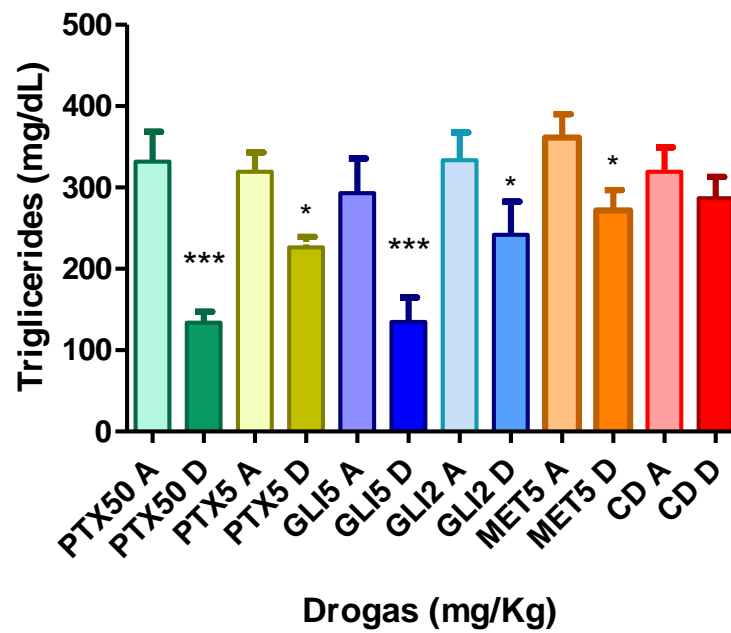


Figura 17. Efeito do tratamento com pentoxifilina, com glibenclamide e com metformina em baixas doses sobre a concentração plasmática de triglicérides em ratos diabéticos.

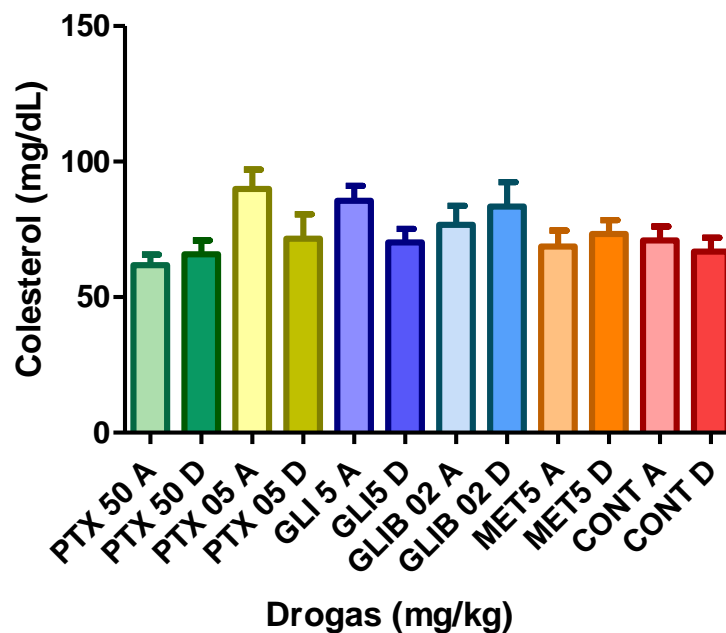


Figura 18. Efeito do tratamento com pentoxifilina em múltiplas doses sobre a concentração plasmática de colesterol nos ratos diabéticos.

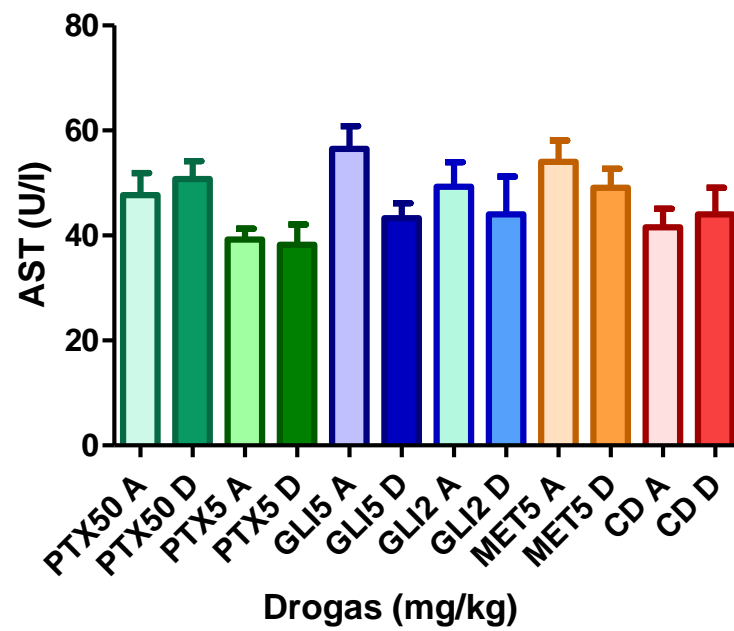


Figura 19. Efeito do tratamento com pentoxifilina, com glibenclamida e com metformina em baixas doses sobre a concentração plasmática de AST em ratos diabéticos.

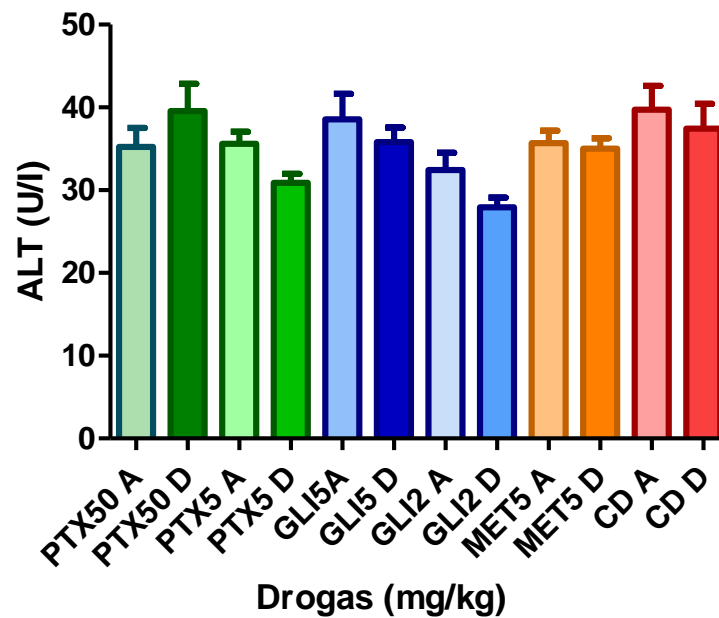


Figura 20. Efeito do tratamento com pentoxifilina, com glibenclamida e com metformina em baixas doses sobre a concentração plasmática de ALT em ratos diabéticos.

Tabela 5. Efeito do tratamento com Pentoxifilina, com Glibenclamida e com Metformina em baixas doses (cinco dias de tratamento) sobre os níveis de glicemia, de triglicerídeos, de colesterol e de transaminases (TGO e TGP) em modelo de diabetes induzido por aloxano em ratos. Significativo após teste t pareado (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Grupos (mg/Kg, vo)	Glicemia Média \pm EPM (mg/dL)	Triglicerídeos Média \pm EPM (mg/dL)	Colesterol Média \pm EPM (mg/dL)	AST Média \pm EPM (U/l)	ALT Média \pm EPM (U/l)
CD A	342,81 \pm 23,35	319,24 \pm 29,94	70,95 \pm 5,15	41,55 \pm 3,54	39,72 \pm 2,86
CD D	373,33 \pm 21,60	286,91 \pm 26,41	66,83 \pm 5,14	44,00 \pm 5,12	35,60 \pm 2,99
PTX50 A	408,34 \pm 22,20	332,02 \pm 36,52	61,79 \pm 3,84	47,69 \pm 4,20	35,22 \pm 2,30
PTX50 D	185,01 \pm 17,34***	133,93 \pm 13,22***	65,80 \pm 5,14	50,76 \pm 3,37	39,54 \pm 3,32
PTX5 A	371,19 \pm 30,60	319,27 \pm 24,09	89,97 \pm 7,08	39,25 \pm 2,03	35,60 \pm 1,44
PTX5 D	264,35 \pm 16,66*	226,00 \pm 13,11*	71,53 \pm 9,09	38,25 \pm 3,82	30,90 \pm 1,09
GLI5 A	410,42 \pm 21,43	293,32 \pm 42,41	85,61 \pm 5,48	56,50 \pm 4,35	38,58 \pm 3,06
GLI5 D	155,13 \pm 18,33***	134,91 \pm 29,96***	70,25 \pm 4,97	43,28 \pm 2,88	35,83 \pm 1,71
GLI2 A	375,57 \pm 26,61	333,46 \pm 34,27	76,67 \pm 7,04	49,33 \pm 4,60	32,42 \pm 2,10
GLI2 D	322,49 \pm 29,07	241,92 \pm 40,97*	83,40 \pm 9,00	44,00 \pm 7,27	27,93 \pm 1,18
MET5 A	334,75 \pm 21,29	361,55 \pm 28,45	68,70 \pm 5,88	54,00 \pm 4,12	35,70 \pm 1,49
MET5 D	259,37 \pm 14,44*	272,08 \pm 24,70*	73,35 \pm 5,05	49,11 \pm 3,59	35,00 \pm 1,25

Os valores representam médias \pm EPM para os níveis de glicemia, de triglicerídeos, de colesterol e de transaminases (TGO e TGP) (n=7 a 29 ratos). Número de animais especificados em parêntese. CD=controle diabético; PTX50=pentoxifilina 50 mg/Kg; PTX5=pentoxifilina 5 mg/Kg; GLI5=glibenclamida 5mg/Kg; GLI2=glibenclamida 2mg/Kg e MET5=metformina 5 mg/Kg. A=antes do diabetes e D=depois do diabetes. Valores para o controle normal após 30 dias de acompanhamento: glicemia (87,5 \pm 3.3 para 95.4 \pm 13.8), triglicerídeos (90.1 \pm 12.3 para 130.7 \pm 6.3), colesterol (52.9 \pm 3.5 para 82.2 \pm 3.61), AST (68.8 \pm 5.1 para 45,3 \pm 3.2) e ALT (32.6 \pm 3.22 para 42.6 \pm 1.98).

5.3 Associação das drogas: avaliação dos efeitos do tratamento, agudo e crônico sobre os níveis plasmáticos de glicose, triglicerídeos, colesterol e transaminases hepáticas em ratos diabéticos.

No estudo anterior as doses de 5 mg/Kg de pentoxifilina e 2 mg/Kg glibenclamida apresentaram baixo efeito terapêutico sobre a glicemia plasmática nos ratos diabéticos tratados no decorrer de uma semana. O mesmo efeito foi observado para a metformina 5 mg/Kg. Tais doses foram definidas como subdoses e foram associadas com a pentoxifilina 5 mg/Kg nos estudos com o objetivo de identificar o possível mecanismo de ação hipoglicemiante da pentoxifilina.

A administração oral da associação de PTX5+GLI2 durante uma semana reduziu significativamente ($***p<0,001$) a hiperglicemia ($319,16 \pm 55,52$ para $138,71 \pm 9,15$), obtendo resultados glicêmicos semelhantes para duas semanas ($373,56 \pm 28,95$ para $112,62 \pm 13,09$), 1 (um) mês ($345,25 \pm 45,88$ para $116,13 \pm 14,49$), 2 (dois) meses ($334,85 \pm 22,67$ para $100,26 \pm 12,83$) e 3 (três) meses ($289,97 \pm 22,14$ para $67,44 \pm 1,30$). A associação PTX5+GLI2 também reduziu os níveis de triglicerídeos na seguinte seqüência uma semana ($301,73 \pm 48,28$ para $150,48 \pm 14,20$), duas semanas ($321,75 \pm 46,88$ para $105,99 \pm 14,29$), 1 (um) mês ($297,42 \pm 68,04$ para $87,04 \pm 4,82$), 2 (dois) meses ($319,50 \pm 34,88$ para $148,63 \pm 16,26$) e 3 (três) meses ($272,33 \pm 24,78$ para $150,91 \pm 8,68$). Os resultados evidenciam um importante sinergismo entre as drogas, fato também evidenciado na diminuição dos sinais típicos do diabetes e nas características físicas dos ratos a longo prazo. A pentoxifilina 5 mg/Kg e a glibenclamida 2 mg/Kg, de forma isolada, mostraram uma importante redução nos níveis glicêmicos com o aumento do tempo de tratamento.

A administração oral da associação de PTX5+MET5 ocasionou uma redução da hiperglicemia menos significativa quando comparada com a associação PTX5+GLI2. Após a primeira e segunda semana de tratamento não foram evidenciadas reduções nos níveis glicêmicos, Nestes períodos a MET5 apresentou reduções da ordem de 22,5% $*p<0,05$ ($334,75 \pm 21,28$ para $259,37 \pm 14,44$) após a primeira semana e 34,39% $**p<0,01$ ($371,30 \pm 26,92$ para $243,59 \pm 24,34$) após a segunda semana de tratamento.

Conforme o aumento do tempo de tratamento percebe-se uma redução dos níveis glicêmicos com o uso da associação PTX5+MET5 na ordem de 25,90% $*p<0,05$ ($313,30 \pm 19,29$ para $232,15 \pm 27,62$) após um mês e 20,93% $*p<0,05$ ($347,57 \pm 15,66$ para $274,81 \pm 20,32$) após dois meses e uma redução não significativa nos níveis glicêmicos após três meses. Uma vez que nestes mesmos períodos de tratamento a

MET5 determinou reduções da ordem de 22,16% * $p < 0,05$ ($337,18 \pm 18,71$ para $262,44 \pm 21,63$) após um mês, 17,85% * $p < 0,05$ ($326,19 \pm 16,31$ para $267,97 \pm 19,53$) após dois meses e 21,77% ns ($299,38 \pm 21,78$ para $234,19 \pm 46,74$) após três meses, não houve ação sinérgica entre as drogas, fato também observado na exacerbação dos sinais do diabetes mellitus para este grupo.

Os valores para triglicérides também não foram uniformes para os grupos MET5 e PTX+GLI2. Os valores de redução de colesterol total e das transaminases hepáticas ALT e AST não foram estatisticamente significativos para as drogas em nenhum período estudado. Também não houve alteração nos níveis de colesterol, ALT e AST para o grupo controle, nem no tempo zero (48 horas após a administração de aloxano) nem após todos os períodos de tratamento **(Tabelas 6, 7, 8, 9 e 10)**.

5.3.1 Estudo de associação das drogas - uma semana de tratamento

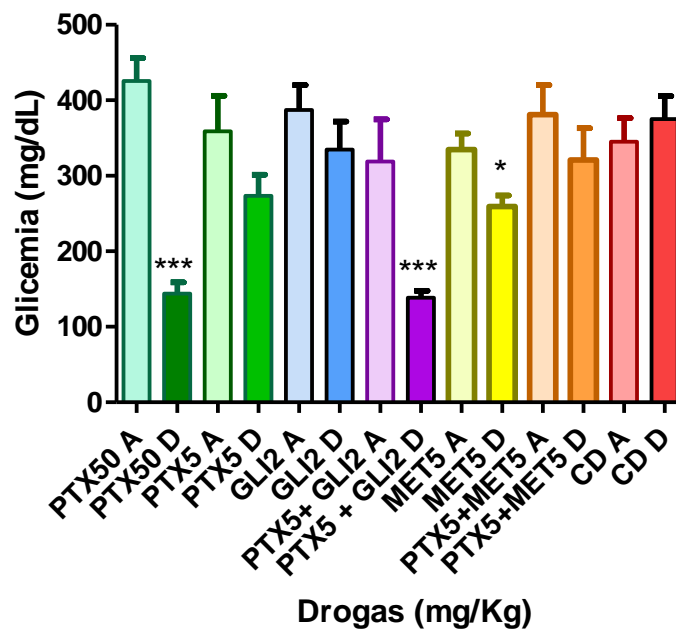


Figura 21. Efeito do tratamento das associações de pentoxifilina com glibenclamida e com metformina sobre a glicemia plasmática em ratos diabéticos.

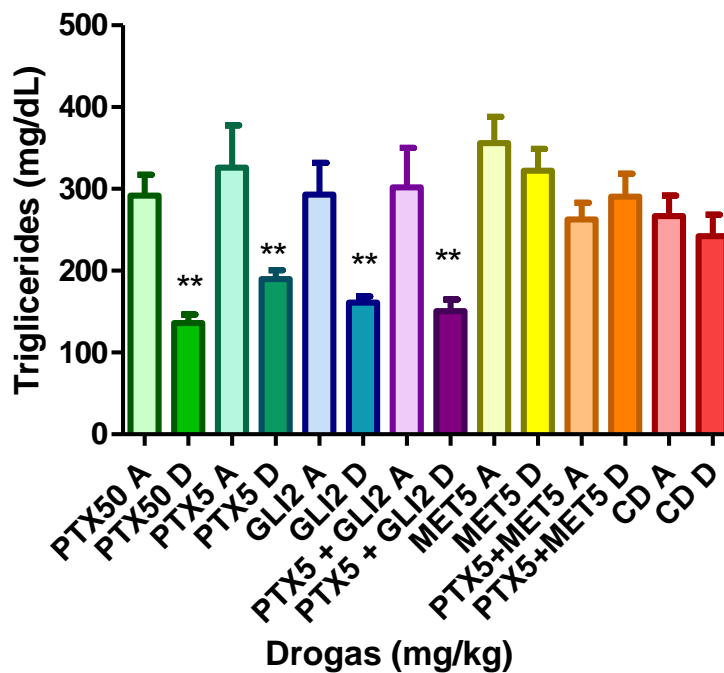


Figura 22. Efeito do tratamento das associações de pentoxifilina com glibenclamida e com metformina sobre os níveis de triglicerídeos plasmáticos em ratos diabéticos.

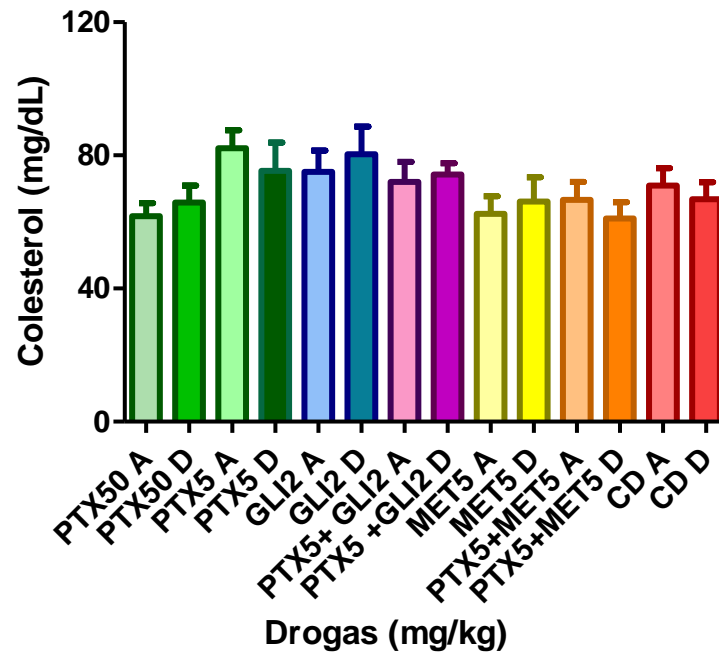


Figura 23. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com glibenclamida e com metformina sobre a concentração plasmática de colesterol em ratos diabéticos.

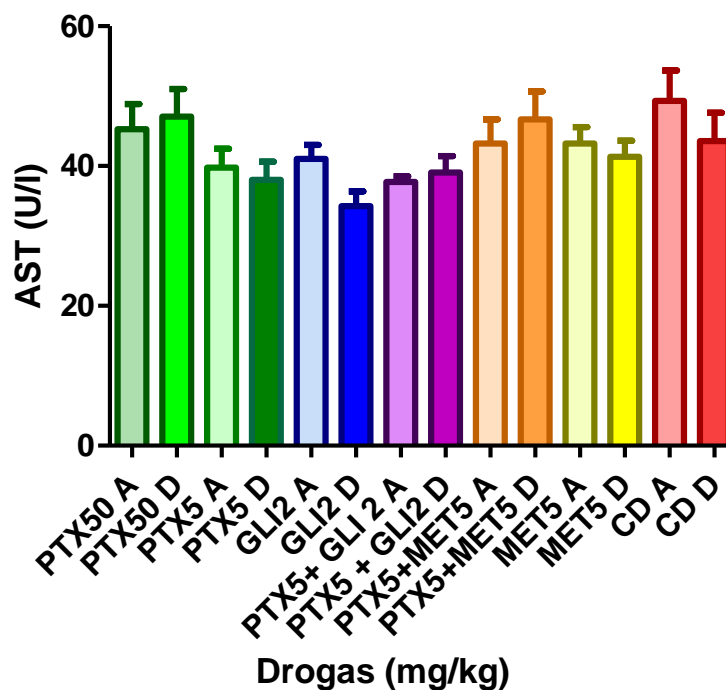


Figura 24. Efeito do tratamento da associação da pentoxifilina com glibenclamida e com a metformina sobre a concentração plasmática de AST em ratos diabéticos.

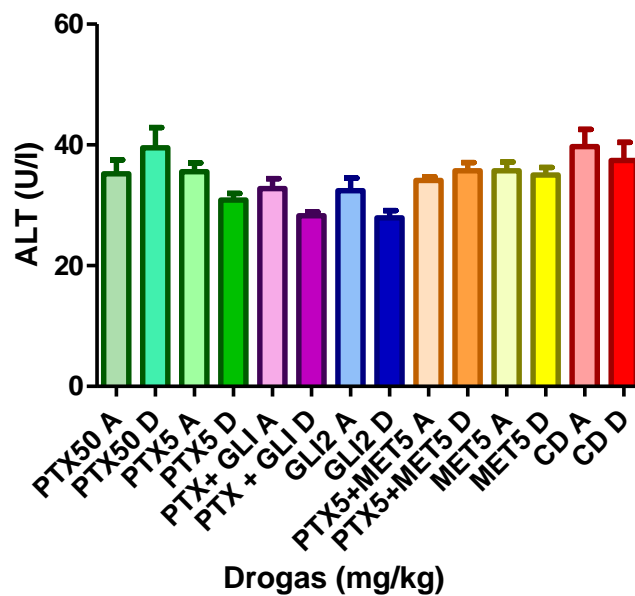


Figura 25. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com glibenclamida e com metformina sobre a concentração plasmática de ALT em ratos diabéticos.

Tabela 6. Efeito do tratamento com Pentoxifilina (estudo de potencialização – uma semana) sobre os níveis de glicemia, de triglicerídeos, de colesterol e de transaminases (TGO e TGP) em ratos com diabetes induzido por aloxano. Significativo após teste t pareado (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001).

Grupos (mg/Kg, vo)	Glicemia Média ± EPM (mg/dL)	Triglicerídeos Média ± EPM (mg/dL)	Colesterol Média ± EPM (mg/dL)	AST Média ± EPM (U/l)	ALT Média ± EPM (U/l)
CD A	345,05 ± 31,60	267,07 ± 24,84	70,95 ± 5,15	49,33 ± 4,33	39,72 ± 2,86
CD D	375,40 ± 30,41	242,44 ± 26,45	66,83 ± 5,14	43,55 ± 4,06	37,44 ± 2,99
PTX50 A	425,44 ± 30,58	291,75 ± 25,74	61,79 ± 3,84	45,27 ± 3,60	35,22 ± 2,30
PTX50 D	143,85 ± 15,23***	135,91 ± 10,67**	65,80 ± 5,14	47,08 ± 3,92	39,54 ± 3,32
PTX5 A	358,91 ± 46,96	326,10 ± 51,75	82,14 ± 5,44	39,80 ± 2,69	35,60 ± 1,44
PTX5 D	273,67 ± 27,69	189,99 ± 10,69**	75,37 ± 8,51	38,00 ± 2,65	30,90 ± 1,09
PTX5+GLI2 A	319,16 ± 55,52	301,73 ± 48,28	72,07 ± 5,95	37,71 ± 0,80	32,78 ± 1,64
PTX5 +GLI2 D	138,71 ± 9,15***	150,48 ± 14,20 **	74,22 ± 3,39	39,08 ± 2,33	28,25 ± 0,68
GLI2 A	387,33 ± 32,98	293,18 ± 38,56	75,09 ± 6,33	41,00 ± 2,04	32,41 ± 2,10
GLI2 D	334,99 ± 36,71	161,21 ± 7,18**	80,32 ± 8,36	34,28 ± 2,07	27,92 ± 1,18
MET5 A	334,75 ± 21,28	356,18 ± 32,11	62,42 ± 5,33	43,20 ± 2,37	35,70 ± 1,50
MET5 D	259,37 ± 14,44*	322,40 ± 26,39	66,14 ± 7,31	41,33 ± 2,28	35,00 ± 1,25
PTX5+MET5 A	381,13 ± 38,91	264,52 ± 20,55	66,62 ± 5,46	43,22 ± 3,43	34,11 ± 0,59
PTX5+MET5 D	321,18 ± 42,08	290,77 ± 27,60	61,03 ± 4,92	46,66 ± 3,98	35,70 ± 1,36

Os valores representam médias±EPM para os níveis de glicemia, de triglicerídeos, de colesterol e de transaminases (TGO e TGP) (n=7 a 18 ratos). Número de animais especificados em parêntese. CD=controle diabético; PTX 50=pentoxifilina 50 mg/Kg; PTX5=pentoxifilina 5 mg/Kg; GLI2=glibenclamida 2 mg/Kg; PTX5+GLI2=pentoxifilina 5 mg/Kg + glibenclamida 2 mg/Kg; MET5=metformina 5 mg/Kg; PTX5+MET5=pentoxifilina 5 mg/Kg + Metformina 5 mg/Kg. A=antes do diabetes e D=depois do diabetes. Valores para o controle normal após 30 dias de acompanhamento: glicemia (87,5±3.3 para 95.4±13.8), triglicerídeos (90.1±12.3 para 130.7±6.3), colesterol (52.9±3.5 para 82.2±3.61), AST (68.8±5.1 para 45,3±3.2) e ALT (32.6±3.22 para 42.6±1.98).

5.3.2 Estudo de associação das drogas – duas semanas de tratamento

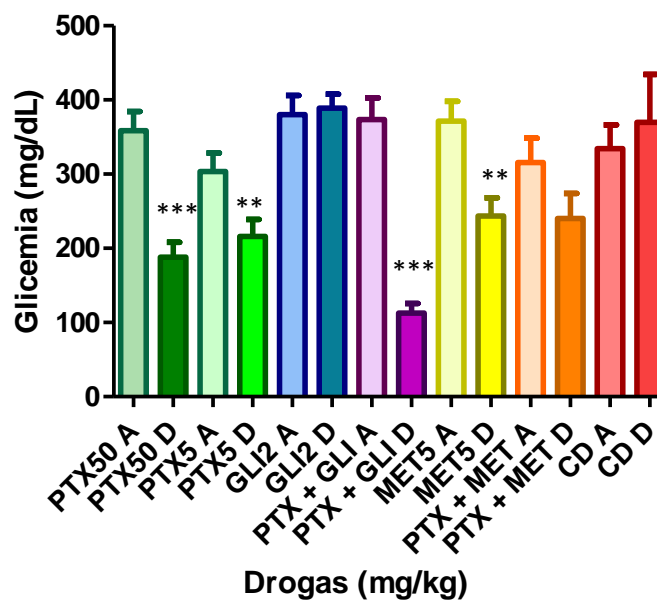


Figura 26. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com as drogas clássicas glibenclamida e metformina sobre a glicemia plasmática em ratos diabéticos.

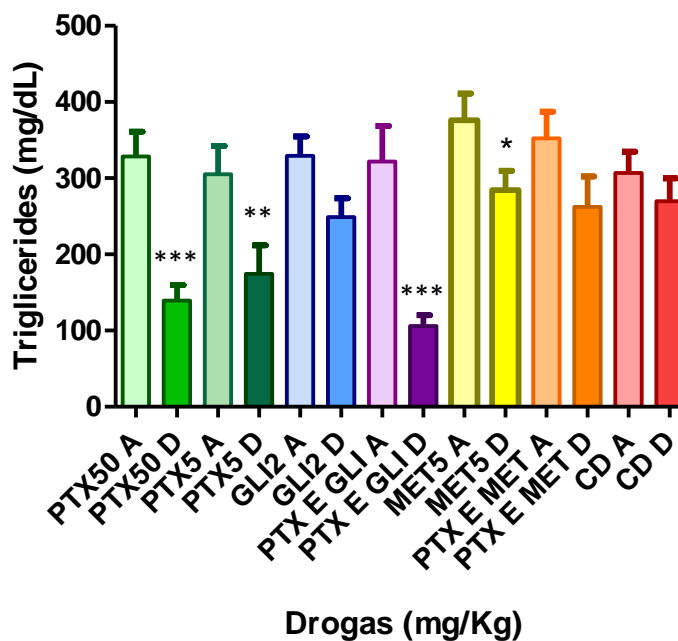


Figura 27. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com as drogas clássicas glibenclamida e metformina sobre as concentrações plasmáticas de triglicérides em ratos diabéticos.

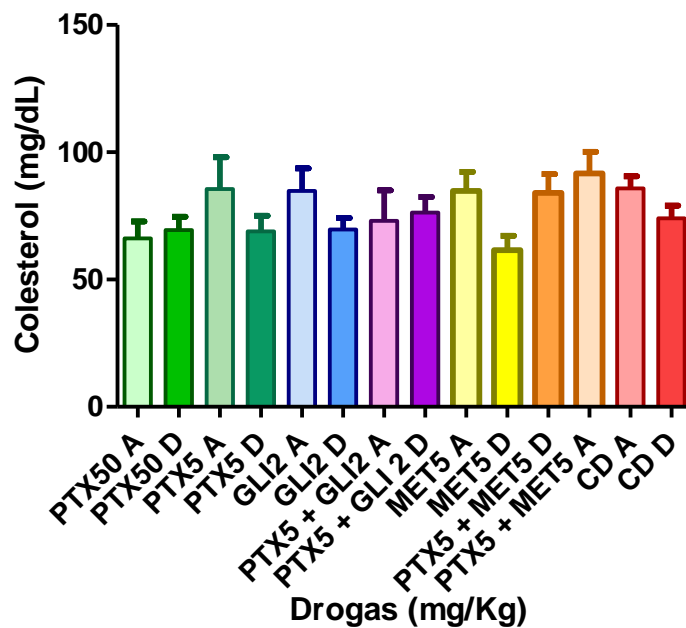


Figura 28. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com as drogas clássicas glibenclamida e metformina sobre a concentração plasmática de colesterol em ratos diabéticos.

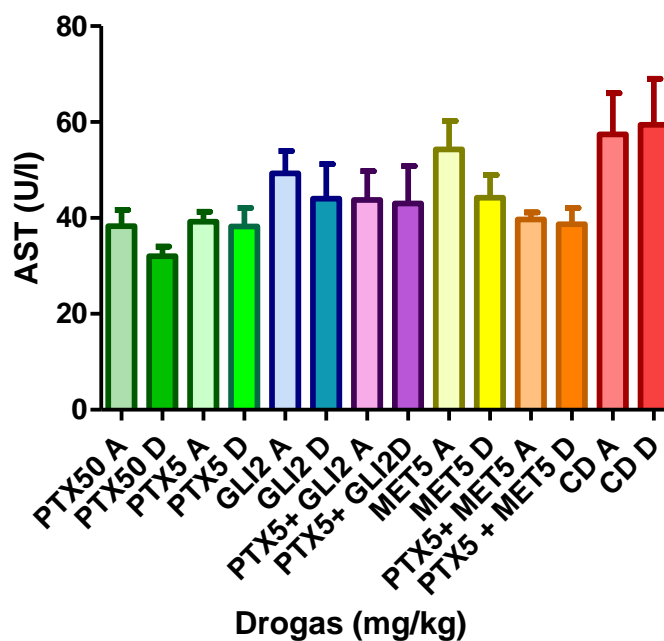


Figura 29. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com glibenclamida sobre a concentração plasmática de AST em ratos diabéticos.

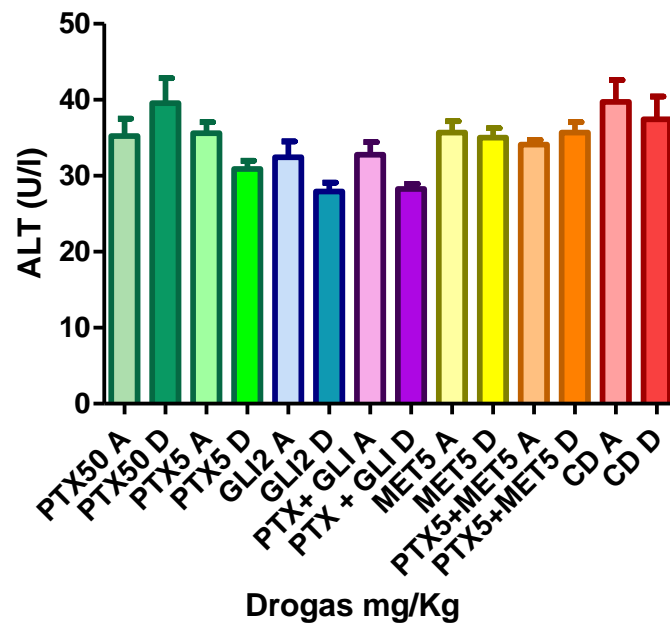


Figura 30. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com glibenclamida sobre a concentração plasmática de ALT em ratos diabéticos.

Tabela 7. Efeito do tratamento com Pentoxifilina (estudo de potencialização – duas semanas) sobre os níveis de glicemia, de triglicerídeos, de colesterol e de transaminases (TGO e TGP) em ratos com diabetes induzido por aloxano. Significativo após teste t pareado (*p<0,05, **p<0,01 e *p<0,001).**

Grupos (mg/Kg, vo)	Glicemia Média ± EPM (mg/dL)	Triglicerídeos Média ± EPM (mg/dL)	Colesterol Média ± EPM (mg/dL)	AST Média ± EPM (U/l)	ALT Média ± EPM (U/l)
CD A	334,43 ± 32,03	306,79 ± 28,19	85,77 ± 4,77	57,43 ± 8,59	39,72 ± 2,86
CD D	369,75 ± 64,54	269,66 ± 29,92	74,01 ± 5,05	59,42 ± 9,61	37,44 ± 2,99
PTX50 A	358,54 ± 25,88	328,71 ± 32,15	66,22 ± 6,54	38,33 ± 3,36	35,22 ± 2,30
PTX50 D	188,10 ± 20,13***	139,43 ± 20,36***	69,43 ± 5,21	33,00 ± 2,00	39,54 ± 3,32
PTX5 A	303,53 ± 24,97	305,04 ± 37,31	85,62 ± 12,39	39,25 ± 2,03	35,60 ± 1,45
PTX5 D	215,98 ± 22,81**	174,40 ± 37,30**	68,88 ± 6,16	38,25 ± 3,82	30,90 ± 1,09
PTX5+GLI2 A	373,56 ± 28,95	321,75 ± 46,88	73,09 ± 12,00	43,75 ± 6,03	32,78 ± 1,64
PTX5 +GLI2 D	112,62 ± 13,09***	105,99 ± 14,29***	76,35 ± 6,14	43,00 ± 7,81	28,25 ± 0,68
GLI2 A	380,34 ± 25,87	329,50 ± 25,10	84,82 ± 8,90	84,82 ± 8,90	32,42 ± 2,10
GLI2 D	388,86 ± 18,90	249,16 ± 24,29	69,71 ± 4,43	49,33 ± 4,60	27,92 ± 1,18
MET5 A	371,30 ± 26,92	376,02 ± 34,85	84,82 ± 7,47	54,28 ± 5,98	35,70 ± 1,49
MET5 D	243,59 ± 24,34**	284,23 ± 25,70	61,53 ± 5,67	44,25 ± 4,73	35,00 ± 1,25
PTX5+MET5 A	315,54 ± 32,82	352,17 ± 35,21	91,72 ± 8,47	39,66 ± 1,50	34,11 ± 0,59
PTX5+MET5 D	240,08 ± 33,84*	262,37 ± 40,10	84,05 ± 7,34	38,67 ± 3,41	35,70 ± 1,36

Os valores representam médias±EPM para os níveis de glicemia, de triglicerídeos, de colesterol e de transaminases (TGO e TGP) (n=6 a 16 ratos). Número de animais especificados em parêntese. CD=controle diabético; PTX 50=pentoxifilina 50 mg/Kg; PTX5=pentoxifilina 5 mg/Kg; GLI2=glibenclamida 2 mg/Kg; PTX5+GLI2=pentoxifilina 5 mg/Kg + glibenclamida 2 mg/Kg; MET5=metformina 5 mg/Kg; PTX5+MET5=pentoxifilina 5 mg/Kg + Metformina 5 mg/Kg. A=antes do diabetes e D=depois do diabetes. Valores para o controle normal após 30 dias de acompanhamento: glicemia (87,5±3.3 para 95.4±13.8), triglicerídeos (90.1±12.3 para 130.7±6.3), colesterol (52.9±3.5 para 82.2±3.61), AST (68.8±5.1 para 45,3±3.2) e ALT (32.6±3.22 para 42.6±1.98).

5.3.3 Estudo de associação das drogas – um mês de tratamento

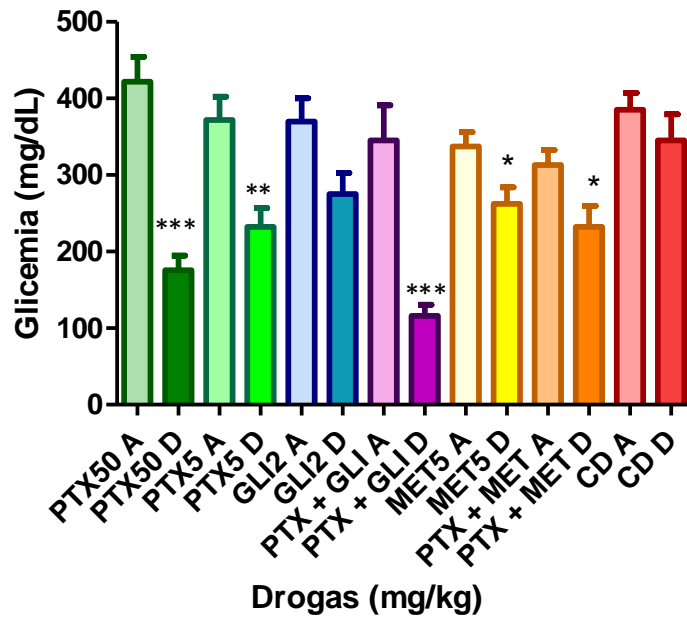


Figura 31. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com as drogas clássicas glibenclamida e metformina sobre a glicemia plasmática em ratos diabéticos.

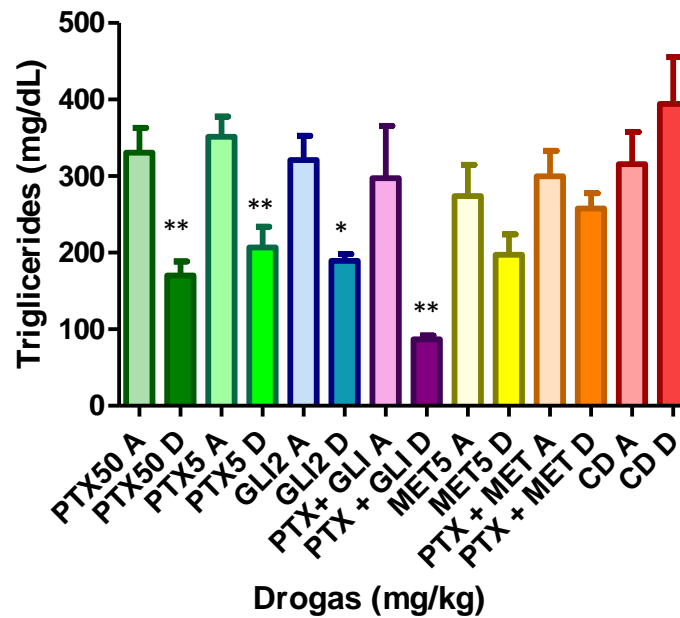


Figura 32. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com as drogas clássicas glibenclamida e metformina sobre as concentrações plasmáticas de triglicérides nos ratos diabéticos.

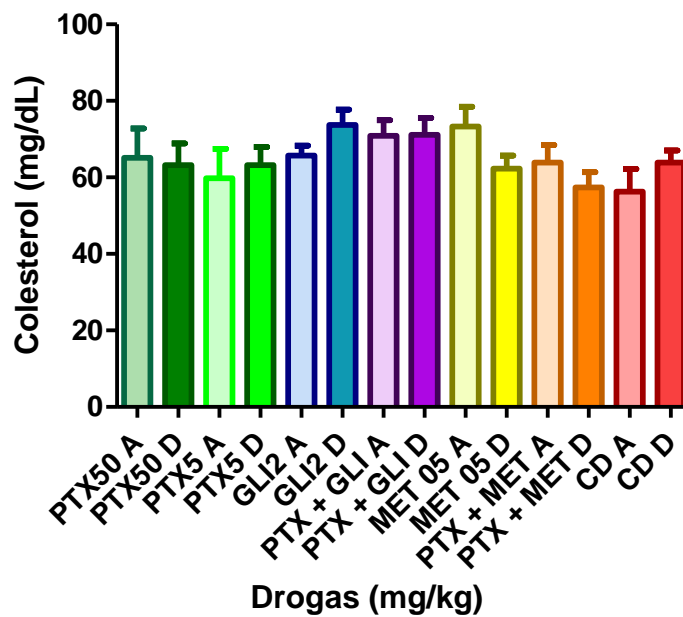


Figura 33. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com as drogas clássicas glibenclamida e metformina sobre as concentrações plasmáticas de colesterol em ratos diabéticos.

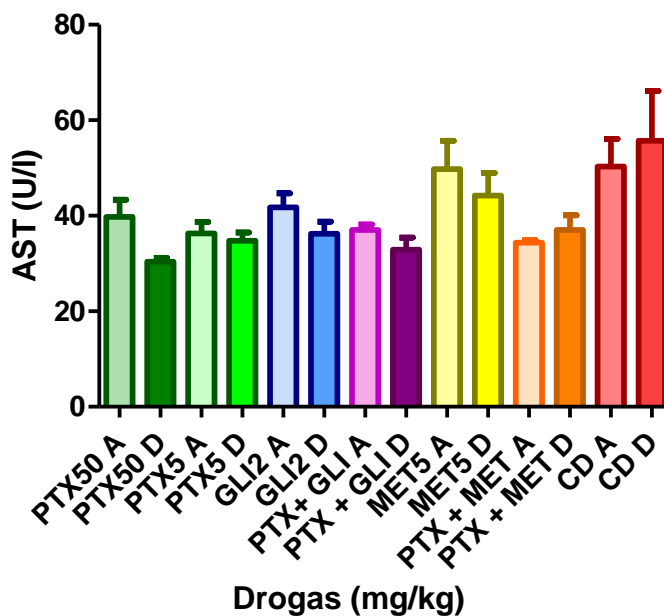


Figura 34. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com as drogas clássicas glibenclamida e metformina sobre as concentrações plasmáticas de AST em ratos diabéticos.

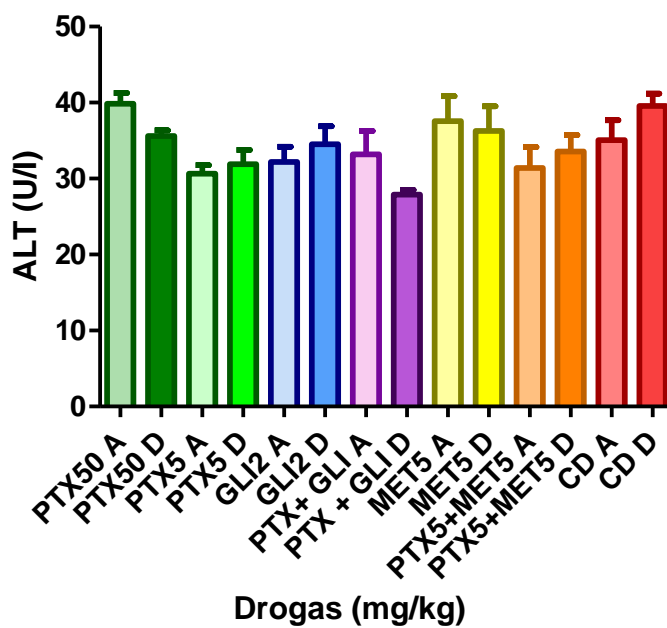


Figura 35. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com as drogas clássicas glibenclamida e metformina sobre as concentrações plasmáticas de ALT em ratos diabéticos.

Tabela 8. Efeito do tratamento com Pentoxifilina (estudo de potencialização – um mês) sobre os níveis de glicemia, de triglicerídeos, de colesterol e de transaminases (TGO e TGP) em ratos com diabetes induzido por aloxano. Significativo após teste t pareado (*p<0,05, **p<0,01 e *p<0,001).**

Grupos (mg/Kg, vo)	Glicemia Média ± EPM (mg/dL)	Triglicérides Média ± EPM (mg/dL)	Colesterol Média ± EPM (mg/dL)	AST Média ± EPM (U/l)	ALT Média ± EPM (U/l)
CD A	385,36 ± 21,78	315,73 ± 42,03	56,27 ± 5,94	50,33 ± 5,74	35,07 ± 2,60
CD D	345,26 ± 34,11	394,17 ± 61,37	63,91 ± 3,11	55,66 ± 10,47	39,57 ± 1,61
PTX50 A	421,93 ± 32,50	330,69 ± 32,45	65,13 ± 7,66	39,75 ± 3,59	39,86 ± 1,42
PTX50 D	175,71 ± 19,24***	170,41 ± 18,17**	63,23 ± 5,61	30,33 ± 2,39	35,60 ± 0,74
PTX5 A	371,83 ± 30,64	351,47 ± 26,11	59,81 ± 7,64	36,30 ± 2,39	30,64 ± 1,11
PTX5 D	232,20 ± 24,88**	206,91 ± 26,89**	63,23 ± 4,72	34,75 ± 1,72	31,90 ± 1,85
PTX5 + GLI2 A	345,25 ± 45,88	297,42 ± 68,04	70,87 ± 4,08	37,00 ± 1,19	33,16 ± 3,10
PTX5 + GLI2 D	116,13 ± 14,49***	87,04 ± 4,82**	71,11 ± 4,39	32,87 ± 2,59	27,92 ± 0,58
GLI2 A	369,69 ± 30,31	320,97 ± 31,63	65,68 ± 2,65	41,75 ± 2,96	32,16 ± 2,03
GLI2 D	275,05 ± 27,48	189,51 ± 8,56*	73,73 ± 3,99	36,25 ± 2,49	34,50 ± 2,37
PTX5 + MET5 A	313,30 ± 19,29	299,65 ± 33,62	63,84 ± 4,61	34,36 ± 0,55	31,42 ± 2,73
PTX5 + MET5 D	232,15 ± 27,62*	257,60 ± 20,00	57,34 ± 4,08	37,00 ± 3,13	33,58 ± 2,16
MET5 A	337,18 ± 18,71	274,03 ± 40,66	73,31 ± 5,12	49,75 ± 5,96	37,56 ± 3,29
MET5 D	262,44 ± 21,53*	197,10 ± 26,95	62,25 ± 3,45	44,25 ± 4,72	36,28 ± 3,22

Os valores representam médias±EPM para os níveis de glicemia, de triglicerídeos, de colesterol e de transaminases (TGO e TGP) (n=7 a 12 ratos). Número de animais especificados em parêntese. CD=controle diabético; PTX 50=pentoxifilina 50 mg/Kg; PTX5=pentoxifilina 5 mg/Kg; GLI2=glibenclamida 2 mg/Kg; PTX5+GLI2=pentoxifilina 5 mg/Kg + glibenclamida 2 mg/Kg; MET5=metformina 5 mg/Kg; PTX5+MET5=pentoxifilina 5 mg/Kg + Metformina 5 mg/Kg. A=antes do diabetes e D=depois do diabetes. Valores para o controle normal após 30 dias de acompanhamento: glicemia (87,5±3.3 para 95.4±13.8), triglicerídeos (90.1±12.3 para 130.7±6.3), colesterol (52.9±3.5 para 82.2±3.61), AST (68.8±5.1 para 45,3±3.2) e ALT (32.6±3.22 para 42.6±1.98).

5.3.4 Estudo de associação das drogas – dois meses de tratamento

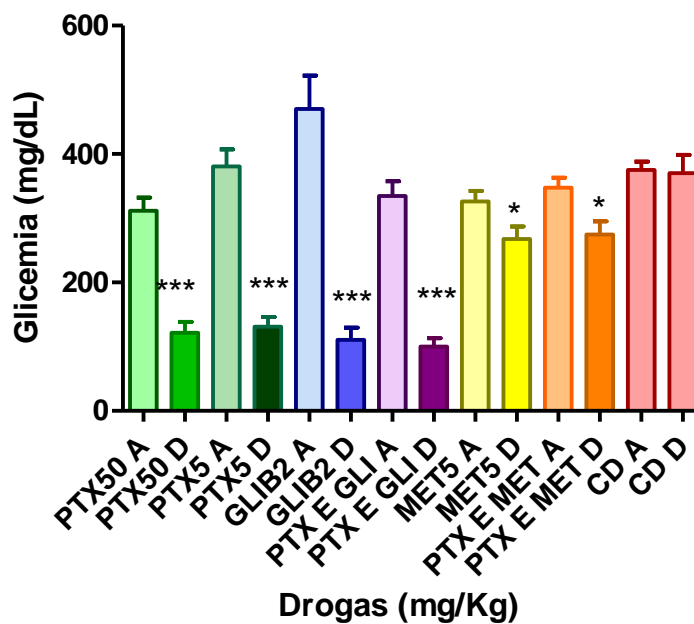


Figura 36. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com as drogas clássicas glibenclamida e metformina sobre a glicemia plasmática em ratos diabéticos.

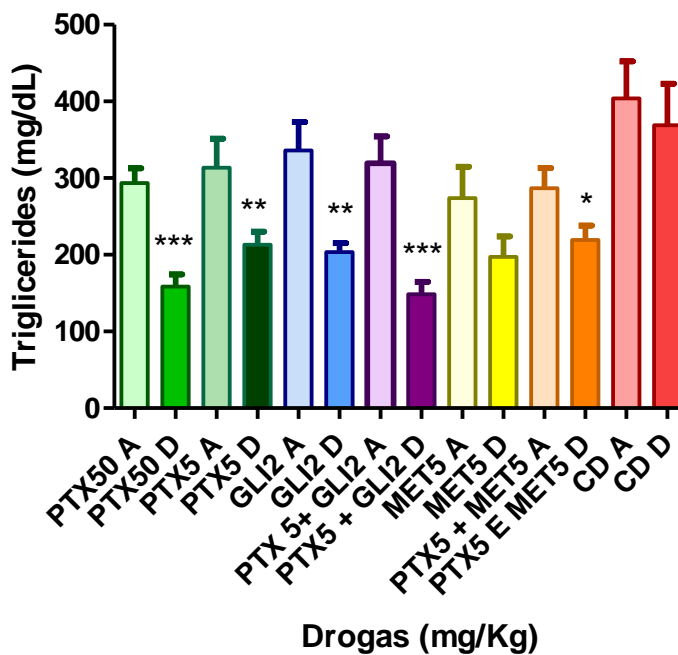


Figura 37. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com as drogas clássicas glibenclamida e metformina sobre as concentrações plasmáticas de triglicérides em ratos diabéticos.

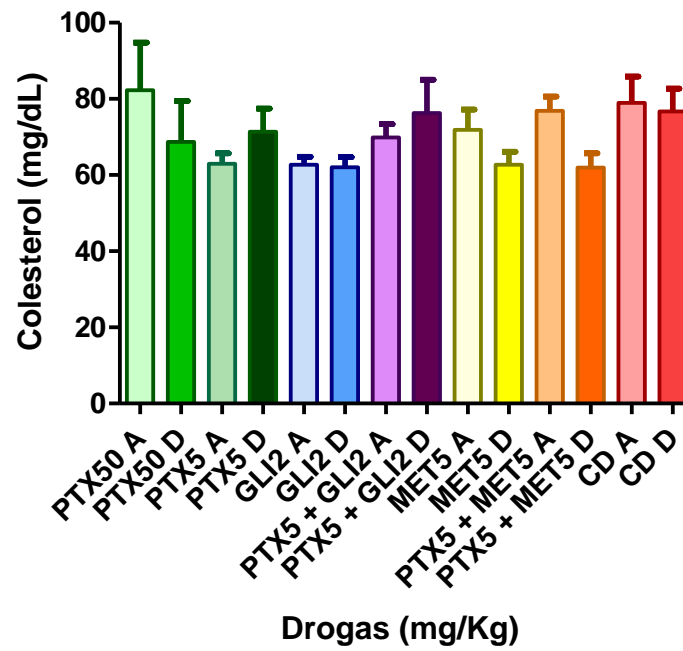


Figura 38. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com as drogas clássicas glibenclamida e metformina sobre as concentrações plasmáticas de colesterol em ratos diabéticos.

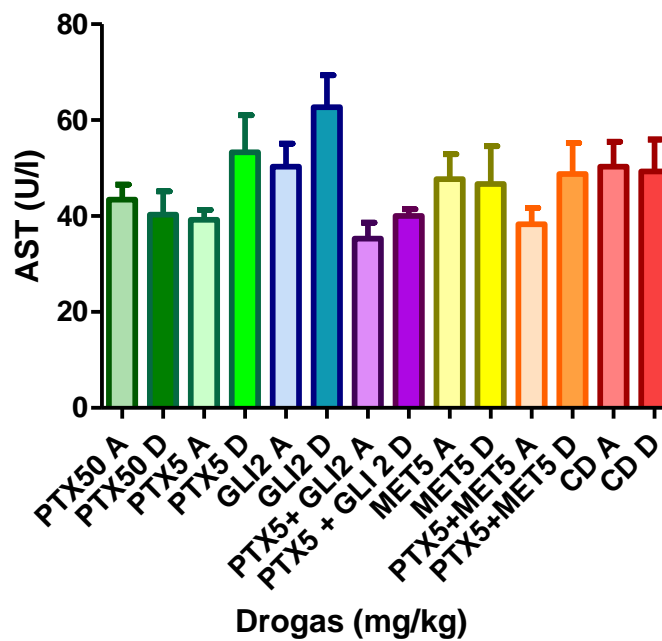


Figura 39. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com as drogas clássicas glibenclamida e metformina sobre as concentrações plasmáticas de AST em ratos diabéticos.

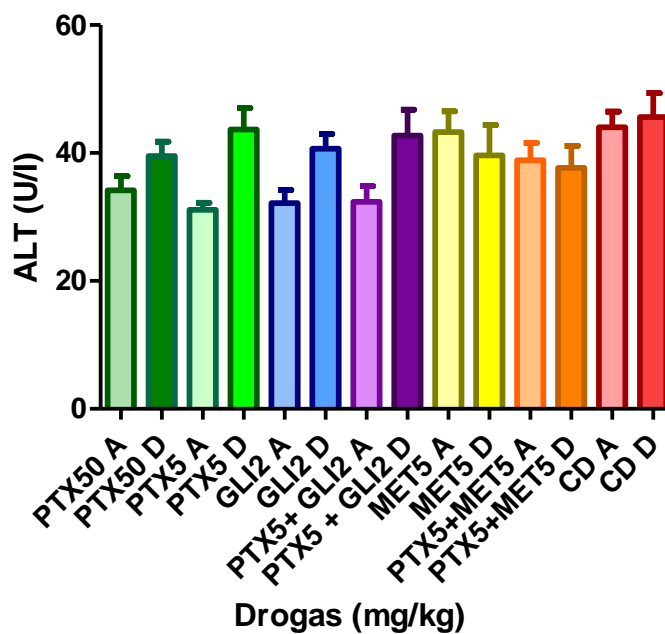


Figura 40. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com as drogas clássicas glibenclamida e metformina sobre as concentrações plasmáticas de ALT nos ratos diabéticos.

Tabela 9. Efeito do tratamento com Pentoxifilina (estudo de potencialização – dois meses) sobre os níveis de glicemia, de triglicerídeos, de colesterol e de transaminases (TGO e TGP) em ratos com diabetes induzido por aloxano. Significativo após teste t pareado (*p<0,05, **p<0,01 e *p<0,001).**

Grupos (mg/Kg, vo)	Glicemia Média ± EPM (mg/dL)	Triglicérides Média ± EPM (mg/dL)	Colesterol Média ± EPM (mg/dL)	AST Média ± EPM (U/l)	ALT Média ± EPM (U/l)
CD A	375,07 ± 13,07	404,08 ± 48,04	78,97 ± 6,91	50,33 ± 5,17	44,00 ± 2,48
CD D	370,33 ± 28,26	368,91 ± 54,12	76,75 ± 5,93	49,33 ± 6,06	45,64 ± 3,71
PTX50 A	311,71 ± 20,32	293,68 ± 19,21	82,30 ± 12,53	43,42 ± 3,16	34,16 ± 2,19
PTX50 D	121,83 ± 16,70***	158,64 ± 15,90***	68,73 ± 10,73	40,28 ± 4,90	39,50 ± 2,28
PTX5 A	380,97 ± 26,40	313,64 ± 37,81	62,94 ± 2,79	39,25 ± 2,03	31,12 ± 1,07
PTX5 D	131,39 ± 14,87***	213,10 ± 16,93**	71,35 ± 6,11	53,33 ± 7,69	43,68 ± 3,33
GLIB2 A	470,20 ± 51,93	336,14 ± 36,88	62,68 ± 2,11	50,33 ± 4,74	32,18 ± 2,04
GLIB2 D	110,69 ± 19,17***	203,73 ± 11,33**	62,04 ± 2,65	62,67 ± 6,72	40,67 ± 2,31
PTX E GLI A	334,85 ± 22,67	319,50 ± 34,88	69,87 ± 3,50	35,33 ± 3,33	32,37 ± 2,44
PTX E GLI D	100,26 ± 12,83***	148,63 ± 16,26***	76,25 ± 8,00	40,00 ± 1,46	42,71 ± 4,07
MET5 A	326,19 ± 16,31	274,03 ± 40,66	71,86 ± 5,36	47,67 ± 5,22	43,28 ± 3,23
MET5 D	267,97 ± 19,53*	197,10 ± 26,95*	62,73 ± 3,39	46,67 ± 7,91	39,64 ± 4,73
PTX E MET A	347,57 ± 15,66	286,84 ± 26,22	76,87 ± 3,80	38,33 ± 3,36	38,86 ± 2,72
PTX E MET D	274,81 ± 20,32*	219,45 ± 18,58	61,97 ± 3,71	48,78 ± 6,47	37,69 ± 3,44

Os valores representam médias±EPM para os níveis de glicemia, de triglicerídeos, de colesterol e de transaminases (TGO e TGP) (n=7 a 22 ratos). Número de animais especificados em parêntese. CD=controle diabético; PTX 50=pentoxifilina 50 mg/Kg; PTX5=pentoxifilina 5 mg/Kg; GLI2=glibenclamida 2 mg/Kg; PTX5+GLI2=pentoxifilina 5 mg/Kg + glibenclamida 2 mg/Kg; MET5=metformina 5 mg/Kg; PTX5+MET5=pentoxifilina 5 mg/Kg + Metformina 5 mg/Kg. A=antes do diabetes e D=depois do diabetes. Valores para o controle normal após 30 dias de acompanhamento: glicemia (87,5±3.3 para 95.4±13.8), triglicerídeos (90.1±12.3 para 130.7±6.3), colesterol (52.9±3.5 para 82.2±3.61), AST (68.8±5.1 para 45,3±3.2) e ALT (32.6±3.22 para 42.6±1.98).

5.3.5 Estudo de associação das drogas – três meses de tratamento

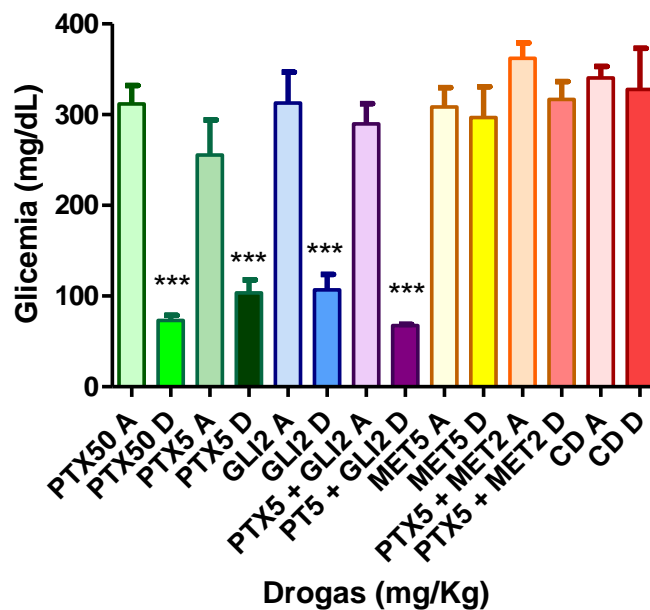


Figura 41. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com as drogas clássicas glibenclamide e metformina sobre as concentrações glicêmicas em ratos diabéticos.

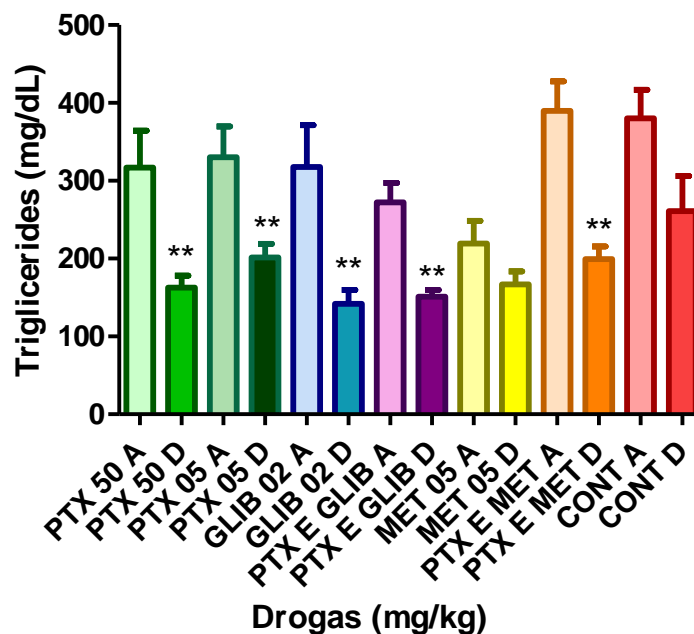


Figura 42. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com as drogas clássicas glibenclamide e metformina sobre as concentrações plasmáticas de triglicérides em ratos diabéticos

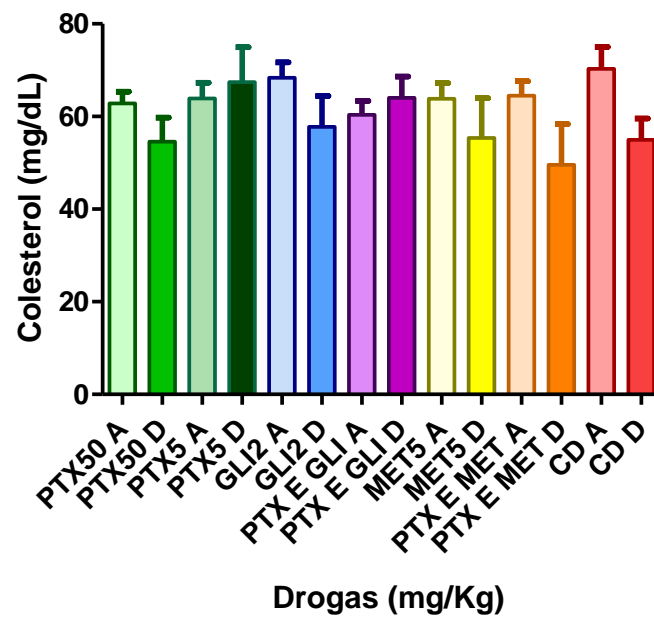


Figura 43. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com as drogas clássicas glibenclamida e metformina sobre as concentrações plasmáticas de colesterol em ratos diabéticos

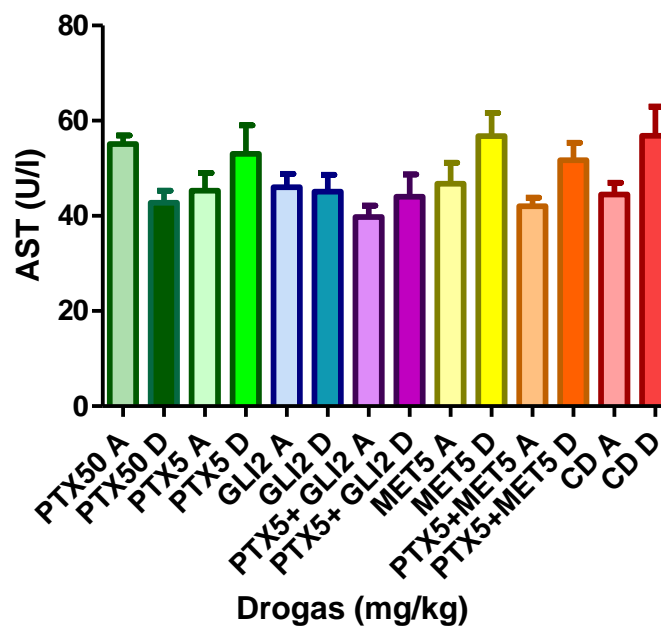


Figura 44. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com as drogas clássicas glibenclamida e metformina sobre as concentrações plasmáticas de AST em ratos diabéticos.

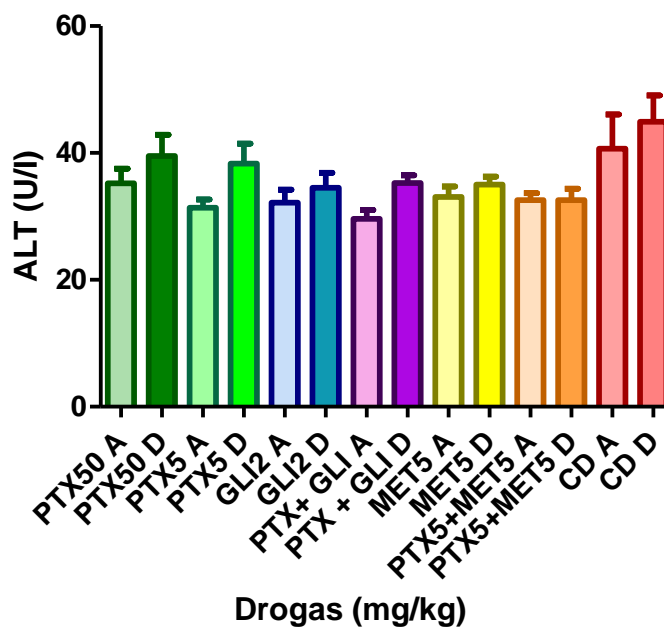


Figura 45. Efeito do tratamento da associação de pentoxifilina com as drogas clássicas glibenclamida e metformina sobre as concentrações plasmáticas de ALT em ratos diabéticos.

Tabela 10. Efeito do tratamento com pentoxifilina (estudo de potencialização – três meses) sobre os níveis de glicemia, de triglicerídeos, de colesterol e de transaminases (TGO e TGP) em ratos com diabetes induzido por aloxano. Significativo após teste t pareado (*p<0,05, **p<0,01 e *p<0,001).**

Grupos (mg/Kg, vo)	Glicemia Média ± EPM (mg/dL)	Triglicérides Média ± EPM (mg/dL)	Colesterol Média ± EPM (mg/dL)	AST Média ± EPM (U/l)	ALT Média ± EPM (U/l)
CD A	340,47 ± 12,78	380,41 ± 36,28	70,28 ± 4,77	44,50 ± 2,45	40,66 ± 5,13
CD D	327,75 ± 45,38	260,87 ± 45,38	54,97 ± 4,62	56,86 ± 6,09	44,94 ± 4,14
PTX50 A	311,71 ± 20,32	316,68 ± 47,75	62,81 ± 2,55	55,07 ± 1,85	35,22 ± 2,30
PTX50 D	73,20 ± 5,63***	162,86 ± 15,11**	54,55 ± 5,24	42,76 ± 2,51	39,54 ± 3,32
PTX5 A	255,60 ± 38,54	330,35 ± 39,42	63,90 ± 3,41	45,33 ± 3,70	31,35 ± 1,32
PTX5 D	103,41 ± 14,33***	201,65 ± 17,35**	67,44 ± 7,50	53,00 ± 6,04	38,33 ± 3,16
PTX5 + GLI2 A	289,97 ± 22,14	272,33 ± 24,78	60,36 ± 3,00	39,80 ± 2,39	29,65 ± 1,36
PT5 + GLI2 D	67,44 ± 1,30***	150,91 ± 8,68**	64,00 ± 4,62	44,00 ± 4,68	35,25 ± 1,20
GLI2 A	312,74 ± 34,00	317,65 ± 53,83	68,36 ± 3,34	46,00 ± 2,80	32,17 ± 2,03
GLI2 D	106,86 ± 16,88***	141,71 ± 18,26**	57,75 ± 6,69	45,12 ± 3,52	34,50 ± 2,37
PTX5 + MET2 A	364,58 ± 18,91	389,73 ± 38,10	64,50 ± 3,14	42,00 ± 1,86	32,55 ± 1,11
PTX5 + MET2 D	345,28 ± 5,00	199,55 ± 16,01	49,60 ± 8,75	51,66 ± 3,70	32,60 ± 1,80
MET5 A	299,38 ± 21,78	219,17 ± 29,26	63,85 ± 3,38	46,80 ± 4,39	33,10 ± 1,64
MET5 D	234,19 ± 46,74	167,08 ± 16,55**	55,38 ± 8,58	56,75 ± 4,91	35,00 ± 1,25

Os valores representam médias±EPM para os níveis de glicemia, de triglicerídeos, de colesterol e de transaminases (TGO e TGP) (n=6 a 12 ratos). Número de animais especificados em parêntese. CD=controle diabético; PTX 50=pentoxifilina 50 mg/Kg; PTX5=pentoxifilina 5 mg/Kg; GLI2=glibenclamida 2 mg/Kg; PTX5+GLI2=pentoxifilina 5 mg/Kg + glibenclamida 2 mg/Kg; MET5=metformina 5 mg/Kg; PTX5+MET5=pentoxifilina 5 mg/Kg + Metformina 5 mg/Kg. A=antes do diabetes e D=depois do diabetes. Valores para o controle normal após 30 dias de acompanhamento: glicemia (87,5±3.3 para 95.4±13.8), triglicerídeos (90.1±12.3 para 130.7±6.3), colesterol (52.9±3.5 para 82.2±3.61), AST (68.8±5.1 para 45,3±3.2) e ALT (32.6±3.22 para 42.6±1.98).

5.4 Avaliação do peso e da mortalidade dos ratos diabéticos após tratamento com Pentoxifilina (PTX), Glibenclamida (GLI) e Metformina (MET) e com associações (PTX5 + GLI2 e PTX5 + MET5).

O ganho ou a redução ponderal para cada esquema de tratamento foi registrado. Os pesos, em gramas, de todos os ratos formadores de cada grupo de tratamento foram medidos no dia zero (T0 – início do tratamento) e no fim de cada período de tratamento (1 semana, 2 semanas e 4 semanas, 8 semanas e 12 semanas).

A variação no peso corporal e a mortalidade dos animais diabéticos tratados com PTX50, PTX5, GLI2, PTX5+GLI2, MET5, PTX5+MET5 e água, durante os períodos experimentais, é demonstrada na **Tabela 11**. Percebe-se que na primeira semana existe uma redução de peso em praticamente todos os grupos sendo mais acentuada no grupo diabético induzido não tratado 16,21% ($228,15 \pm 4,55$ para $191,17 \pm 1,72$), neste período percebe-se também a maior mortalidade dos grupos, ocorrida após as 24 horas da indução do diabetes com aloxano, seguindo a partir daí com mortes eventuais.

Após os três meses de tratamento tem-se o seguinte quadro de perdas e ganhos ponderais; PTX50 com ganho de 27,19% ($225,30 \pm 3,31$ para $286,57 \pm 12,73$), PTX5 com ganho de 1,24% ($216,80 \pm 4,63$ para $219,50 \pm 5,08$), PTX5+GLI2 com ganho de 42,29% ($227,90 \pm 2,28$ para $324,29 \pm 6,54$), GLI2 com perda de 5,32% ($232,90 \pm 4,32$ para $220,50 \pm 5,89$), MET5 com perda de 27,36% ($221,67 \pm 2,37$ para $161,00 \pm 3,85$), PTX5+MET5 com perda de 25,69% ($224,36 \pm 2,71$ para $166,71 \pm 3,29$) e o controle diabético (água) com perda de 28,47% ($224,54 \pm 4,49$ para $160,60 \pm 2,52$).

A análise estatística do peso corporal (Teste de Duncan) demonstrou que os grupos MET5, PTX5+MET5 e o placebo (água) não possuem diferenças estatisticamente significantes entre si ($p > 0,07$).

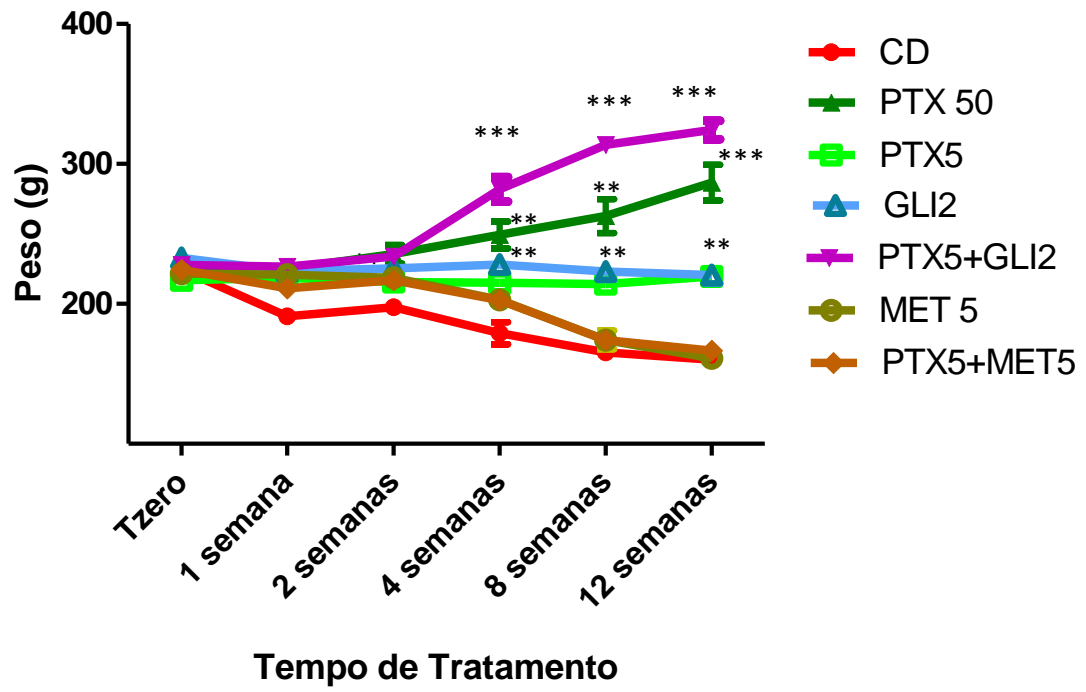


Figura 46. Curva ponderal dos ratos diabéticos tratados com pentoxifilina, glibenclamida e metformina. Significativo após Análise de Variância (ANOVA) seguido de teste de *Student Newman-Keuls*. (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Tabela 11. Avaliação do peso e da mortalidade de ratos com diabetes induzido por aloxano e tratados com pentoxifilina, glibenclamida e metformina durante 3 (três) meses. Significativo após Análise de Variância (ANOVA) seguido de teste de *Student Newman-Keuls*. (**p<0,01 e ***p<0,001).

GRUPOS DROGAS (mg/Kg)	GANHO OU A REDUÇÃO PONDERAL						MORTALIDADE %
	TZERO	1 (UMA) SEMANA	2 (DUAS) SEMANAS	4 (QUATRO) SEMANAS	8 (OITO) SEMANAS	12 (DOZE) SEMANAS	
	MÉDIA±EPM (N)	MÉDIA±EPM	MÉDIA±EPM	MÉDIA±EPM	MÉDIA±EPM	MÉDIA±EPM	
CD	224,54 ± 4,49 (13)	191,17 ± 1,72 (6)	197,50 ± 3,16 (6)	179,00 ± 7,96 (5)	165,40 ± 3,07 (5)	160,60 ± 3,52 (5)	61,54%
PTX 50	225,30 ± 3,31 (10)	225,00 ± 3,08 (8)	235,50 ± 6,71 (8)	249,25 ± 9,59 (8)**	262,75 ± 12,10 (8)**	286,57 ± 12,73 (7)***	30%
PTX5	216,80 ± 4,63 (10)	218,50 ± 6,04 (6)	215,67 ± 5,66 (6)	215,00 ± 6,31 (6)**	214,17 ± 5,23 (6)**	219,50 ± 5,08 (6)**	40%
GLI2	232,90 ± 4,32 (10)	223,33 ± 3,79 (6)	225,33 ± 2,94 (6)	228,00 ± 3,37 (6)**	223,00 ± 5,89 (6)**	220,50 ± 5,89 (6)**	40%
PTX5+GLI2	227,90 ± 2,28 (10)	226,71 ± 3,62 (7)	233,86 ± 4,12 (7)	281,86 ± 8,82 (7)***	313,71 ± 3,27 (7)***	324,29 ± 6,54 (7)***	30%
MET5	221,67 ± 2,37 (12)	220,83 ± 5,58 (6)	218,67 ± 5,04 (6)	202,83 ± 3,51 (6)	174,17 ± 6,63 (6)	161,00 ± 3,85 (6)	50%
PTX5+MET5	224,36 ± 2,71 (14)	211,00 ± 2,03 (9)	216,75 ± 3,04 (8)	202,71 ± 1,64 (7)	174,14 ± 5,62 (7)	166,71 ± 3,29 (7)	50%

Os valores representam médias±EPM do número de animais especificados em parêntese. CD=controle diabético; PTX 50=pentoxifilina 50 mg/Kg; PTX5=pentoxifilina 5 mg/Kg; GLI2=glibenclamida 2 mg/Kg; PTX5+GLI2=pentoxifilina 5 mg/Kg + glibenclamida 2 mg/Kg; MET5=metformina 5 mg/Kg; PTX5+MET5=pentoxifilina 5 mg/Kg + Metformina 5 mg/Kg. A=antes e D=depois.

5.5 Atividade hipoglicemiante da PTX e da GLI através de dois métodos de rastreamento da glicação: hemoglobina glicada e frutossamina.

Os resultados, analisados por ANOVA seguidos do teste Student-Newman-Keuls, mostraram que após os dois meses de tratamento, a pentoxifilina na dose de 50 mg/kg reduziu a dosagem da hemoglobina glicada (HBA1c) para o valor médio(%) de $4,57 \pm 0,49$ e sua associação com a glibenclamida (PTX5+GLI2) reduziu ainda mais ($2,44 \pm 0,39$) os níveis HBA1c. Esses valores são significativos quando comparados com os ratos tratados apenas com água ($12,00 \pm 1,01$) e com glibenclamida 2 mg/kg ($6,66 \pm 0,89$). Outro fato que traduz o importante sinergismo entre essas drogas dar-se pela o resultado da HBA1c dos ratos tratados com PTX5+GLI2 é semelhante ao valor encontrado para os ratos normais não tratados ($2,13 \pm 0,68$).

Os resultados mostraram que após os três meses de tratamento, a pentoxifilina na dose de 50 mg/kg demonstrou valor médio(%) de $4,72 \pm 0,51$ na dosagem da hemoglobina glicada (HBA1c) e sua associação da dose de 5 mg/Kg com a glibenclamida 2 mg/Kg (PTX5+GLI2) mostrou um valor semelhante de $4,82 \pm 0,57$ nos níveis HBA1c, valores significativos quando comparados com os ratos diabéticos não tratados ($9,58 \pm 0,87$), com os ratos tratados com a glibenclamida 2 mg/kg ($8,10 \pm 0,71$) e com metiformina 2 mg/kg ($8,77 \pm 0,70$). **(Tabelas 12 a 15).**

Os resultados da dosagem de frutossamina mostraram que após cinco semanas de tratamento, a pentoxifilina na dose de 50 mg/kg demonstrou valor médio sérico ($\mu\text{mol/L}^2$) de $200,63 \pm 17,18$ na dosagem da frutossamina e sua associação da dose de 5 mg/Kg com a glibenclamida 2 mg/Kg (PTX5+GLI2) mostrou um resultado ainda inferior de $155,47 \pm 9,88$ nos níveis frutossamina, valores significativos quando comparados com os ratos tratados apenas com água ($343,20 \pm 34,92$) e com glibenclamida 2 mg/kg ($255,02 \pm 28,74$). **(Tabelas 16 e 17).**

5.5.1 Determinação da hemoglobina glicada após dois meses de tratamento com PTX.

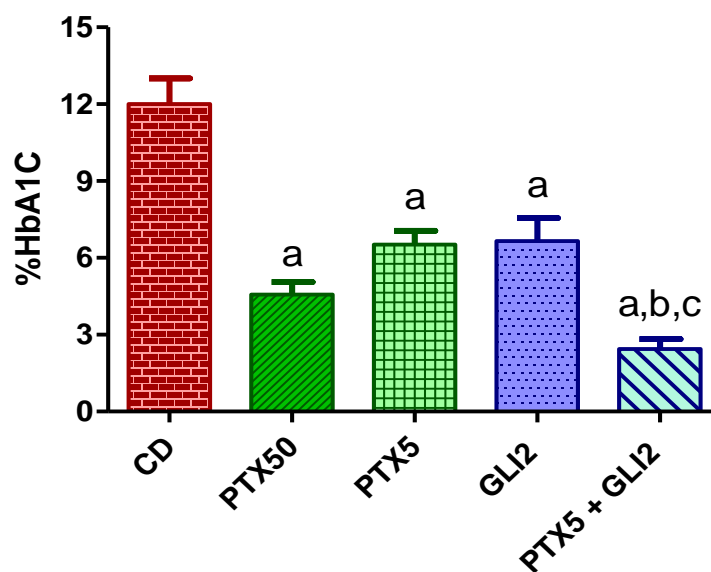


Figura 47. Avaliação da hemoglobina glicada após 2 meses de tratamento de ratos diabéticos com pentoxifilina e glibenclamida. ** $p < 0,001$ (PTX50 vs CD); * $p < 0,05$ (PTX5 vs CD e GLI2 vs CD); *** $p < 0,001$ (PTX5 + GLI2 vs CD; PTX5 + GLI2 vs PTX5; PTX5 + GLI2 vs GLI2) após Análise de Variância (ANOVA) seguido de teste de *Student Newman-Keuls*.

Tabela 12. Efeito do tratamento prolongado (2 meses) com pentoxifilina sobre as concentrações de Hemoglobina Glicada (HbA1C) em ratos com diabetes induzido por aloxano.

Grupos (mg/Kg, vo) (N)	HbA1C % ± EPM
CD (6)	12,00 ± 1,01
PTX50 (7)	4,57 ± 0,49 ^a
PTX5 (14)	6,51 ± 0,54 ^a
GLI2 (10)	6,66 ± 0,89 ^a
PTX5 + GLI2 (9)	2,44 ± 0,39 ^{a,b,c}

Os valores representam médias±EPM dos níveis de hemoglobina glicada. O número de animais encontra-se especificado em parêntese. CD=controle diabético; PTX 50=pentoxifilina 50 mg/Kg; PTX5=pentoxifilina 5 mg/Kg; GLI2=glibenclamida 2 mg/Kg; PTX5+GLI2=pentoxifilina 5 mg/Kg + glibenclamida 2 mg/Kg. Valor da hemoglobina glicada do controle normal não tratado (2,13 ± 0,68, n=5)

Tabela 13. Efeito do tratamento prolongado (2 meses) com pentoxifilina sobre as concentrações de Glicemia e Hemoglobina Glicada (HbA1C) em ratos com diabetes induzido por aloxano.

Glicemia X Hemoglobina Glicada		
Grupos (mg/Kg, vo) (N)	Glicemia Média ± EPM (mg/dL)	HbA1C %± EPM
CD (10)	370,33 ± 28,26	12,00 ± 1,01
PTX50 (7)	121,83 ± 16,70	4,57 ± 0,49
PTX5 (16)	131,39 ± 14,87	6,51 ± 0,54
GLIB2 (10)	110,69 ± 19,17	6,66 ± 0,89
PTX E GLI (14)	100,26 ± 12,83	2,44 ± 0,39

Os valores representam médias±EPM dos níveis de glicemia e de hemoglobina glicada. O número de animais encontra-se especificado em parêntese. CD=controle diabético; PTX 50=pentoxifilina 50 mg/Kg; PTX5=pentoxifilina 5 mg/Kg; GLI2=glibenclamida 2 mg/Kg; PTX5+GLI2=pentoxifilina 5 mg/Kg + glibenclamida 2 mg/Kg. Valor da hemoglobina glicada do controle normal não tratado (2,13 ± 0,68, n=5)

5.5.2 Determinação da hemoglobina glicada em ratos diabéticos após três meses de tratamento com PTX.

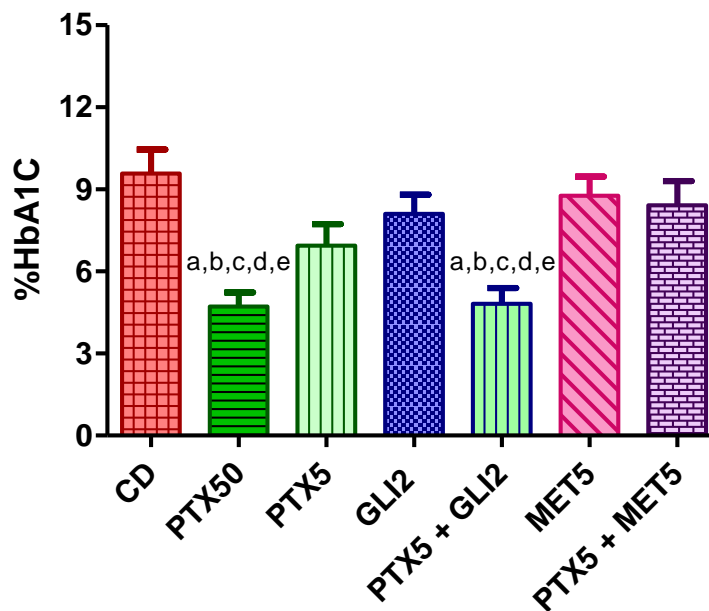


Figura 48. Avaliação da hemoglobina glicada após 3 meses de tratamento de ratos diabéticos com pentoxifilina e glibenclamida. * $p < 0,05$ (PTX50 vs PTX5) e PTX5 + GLI2 vs PTX5); ** $p < 0,01$ (PTX50 vs CD, PTX50 vs GLI2, PTX50 vs MET5, PTX50 vs PTX5 + MET5); ** $p < 0,01$ (PTX5 + GLI2 vs CD, PTX5 + GLI2 vs GLI2, PTX5 + GLI2 vs MET5 e PTX5 + GLI2 vs PTX5 + MET5) após Análise de Variância (ANOVA) seguido de teste de *Student Newman-Keuls*.

Tabela 14. Efeito do tratamento prolongado (3 meses) com pentoxifilina sobre as concentrações de Hemoglobina Glicada (HbA1C) em ratos com diabetes induzido por aloxano.

Grupos (mg/Kg, vo) (N)	HbA1C %± EPM
CD (7)	9,58 ± 0,87
PTX50 (6)	4,72 ± 0,51 ^{a,b,c,d,e}
PTX5 (9)	6,94 ± 0,78
GLIB 02 (7)	8,10 ± 0,71
PTX5+GLI2 (8)	4,82 ± 0,57 ^{a,b,c,d,e}
MET5 (6)	8,77 ± 0,70
PTX5+MET5 (5)	8,42 ± 0,89

Os valores representam médias±EPM dos níveis de hemoglobina glicada. O número de animais encontra-se especificado em parêntese. CD=controle diabético; PTX 50=pentoxifilina 50 mg/Kg; PTX5=pentoxifilina 5 mg/Kg; GLI2=glibenclamida 2 mg/Kg; PTX5+GLI2=pentoxifilina 5 mg/Kg + glibenclamida 2 mg/Kg; MET5=metformina 5 mg/Kg; PTX5+MET5=pentoxifilina 5 mg/Kg + Metformina 5 mg/Kg. Valor da hemoglobina glicada do controle normal não tratado (2,13 ± 0,68, n=5)

Tabela 15. Efeito do tratamento prolongado (3 meses) com pentoxifilina sobre as concentrações de Glicemia e Hemoglobina Glicada (HbA1C) em ratos com diabetes induzido por aloxano.

Glicemia X Hemoglobina Glicada		
Grupos (mg/Kg, vo)	Glicemia Média ± EPM (mg/dL)	HbA1C %± EPM
CD	327,75 ± 45,38	9,58 ± 0,87
PTX50	73,20 ± 5,63	4,72 ± 0,51
PTX5	103,41 ± 14,33	6,94 ± 0,78
PT5 + GLI2	67,44 ± 1,30	4,82 ± 0,57
GLI2	106,86 ± 16,88	8,10 ± 0,71
PTX5 + MET2	345,28 ± 5,00	8,42 ± 0,89
MET5	234,19 ± 46,74	8,77 ± 0,70

Os valores representam médias±EPM dos níveis de glicemia e de hemoglobina glicada. CD=controle diabético; PTX 50=pentoxifilina 50 mg/Kg; PTX5=pentoxifilina 5 mg/Kg; GLI2=glibenclamida 2 mg/Kg; PTX5+GLI2=pentoxifilina 5 mg/Kg + glibenclamida 2 mg/Kg; MET5=metformina 5 mg/Kg; PTX5+MET5=pentoxifilina 5 mg/Kg + Metformina 5 mg/Kg. Valor da hemoglobina glicada do controle normal não tratado (2,13 ± 0,68, n=5)

5.5.3 Determinação da frutosamina em ratos diabéticos após um mês de tratamento com PTX.

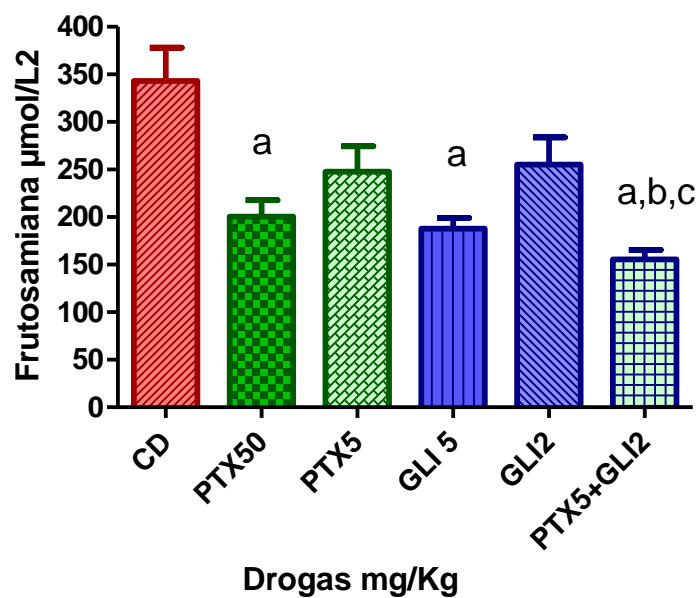


Figura 49. Avaliação da Frutosamiana após 1 mês de tratamento de ratos diabéticos com pentoxifilina e glibenclamida. PTX50 vs CD ($*p<0,05$); GLI5 vs CD ($*p<0,05$); PTX5+GLI2 vs CD ($**p<0,01$); $*p<0,05$ (PTX5+GLI2 vs GLI2, PTX5+GLI2 vs PTX5), após Análise de Variância (ANOVA) seguido de teste de *Student Newman-Keuls*.

Tabela 16. Efeito do tratamento de médio prazo (1 mês) com pentoxifilina sobre as concentrações de Frutosamina em ratos com diabetes.

Grupos (mg/Kg, vo) (N)	Frutosamina ($\mu\text{mol/L2}$) % \pm EPM
CD (6)	343,20 \pm 34,92
PTX50 (9)	200,63 \pm 17,18 ^a
PTX5 (6)	247,94 \pm 26,41
GLI2 (7)	255,02 \pm 28,74
GLI5 (5)	187,95 \pm 11,25 ^a
PTX+GLI2 (7)	155,47 \pm 9,88 ^{a,b,c}

Os valores representam médias \pm EPM dos níveis de frutosamina. O número de animais encontra-se especificado em parêntese. CD=controle diabético; PTX 50=pentoxifilina 50 mg/Kg; PTX5=pentoxifilina 5 mg/Kg; GLI2=glibenclamida 2 mg/Kg; GLI5=glibenclamida 5 mg/Kg e PTX5+GLI2=pentoxifilina 5 mg/Kg + glibenclamida 2 mg/Kg.

Tabela 17. Efeito do tratamento de médio prazo (1 mês) da pentoxifilina sobre os níveis de glicemia e de Frutosamina em ratos com diabetes. Glibenclamida (2 e 5 mg/Kg) foi o fármaco de referência.

Glicemia X Frutosamina		
Grupos (mg/Kg, vo)	Glicemia Média \pm EPM (mg/dL)	Frutosamina % \pm EPM
CD	345,26 \pm 34,11	343,20 \pm 34,92
PTX50	175,71 \pm 19,24	200,63 \pm 17,18
PTX5	232,20 \pm 24,88	247,94 \pm 26,41
GLI2	275,05 \pm 27,48	255,02 \pm 28,74
GLI5	185,02 \pm 14,70	187,95 \pm 11,25
PTX + GLI	116,13 \pm 14,49	155,47 \pm 9,88

Os valores são médias \pm EPM dos níveis de glicemia e frutosamina. CD=controle diabético; PTX 50=pentoxifilina 50 mg/Kg; PTX5=pentoxifilina 5 mg/Kg; GLI2=glibenclamida 2 mg/Kg; GLI5=glibenclamida 5 mg/Kg e PTX5+GLI2=pentoxifilina 5 mg/Kg + glibenclamida 2 mg/Kg.

5.6 Determinação do mecanismo de ação da PTX via bloqueio de canais de K^+ na hiperglicemia induzida por Diazóxido (DZD) em ratos diabéticos e não diabéticos.

Conforme visto nos estudos de potencialização a pentoxifilina (PTX), quando associada a glibenclamida (GLI), reduziu, de forma significativa, os níveis glicêmicos em todos os períodos de tratamento pré-determinados. Com a finalidade de melhor esclarecer o mecanismo de ação da PTX, introduziu-se neste estudo o diazóxido (DZD), um agente anti-hipertensivo que causa hiperglicemia como efeito secundário por impedir o fechamento ou prolongar o tempo de abertura dos canais de potássio sensíveis ao ATP na membrana da célula beta pancreática.

Os resultados, analisados por ANOVA seguidos do teste Student-Newman-Keuls, mostraram que a hiperglicemia provocada pelo DZD **em ratos normais** não foi revertida pela PTX 50 mg Kg em nenhum dos tempos estudados (uma hora: $111,83 \pm 5,67$; duas horas: $123,67 \pm 6,25$; três horas: $137,67 \pm 11,33$) quando comparada com a GLI, que manteve um patamar normoglicêmico em todos os tempos estudados (uma hora: $57,17 \pm 2,86$; duas horas: $53,00 \pm 2,05$; três horas $49,33 \pm 3,21$). **Tabela 18.**

Os resultados também mostraram que **em ratos com diabetes** induzida pelo aloxano o estímulo hiperglicêmico ocasionado pelo DZD não foi antagonizado por PTX ou GLI em nenhum dos tempos estudados. PTX (uma hora: $294,00 \pm 25,92$; duas horas $351,86 \pm 22,89$). GLI (uma hora: $301,40 \pm 28,92$; duas horas: $318,34 \pm 18,34$). **Tabela 19.**

5.6.1 Hiperglicemia induzida por Diazóxido (DZD) em ratos não diabéticos.

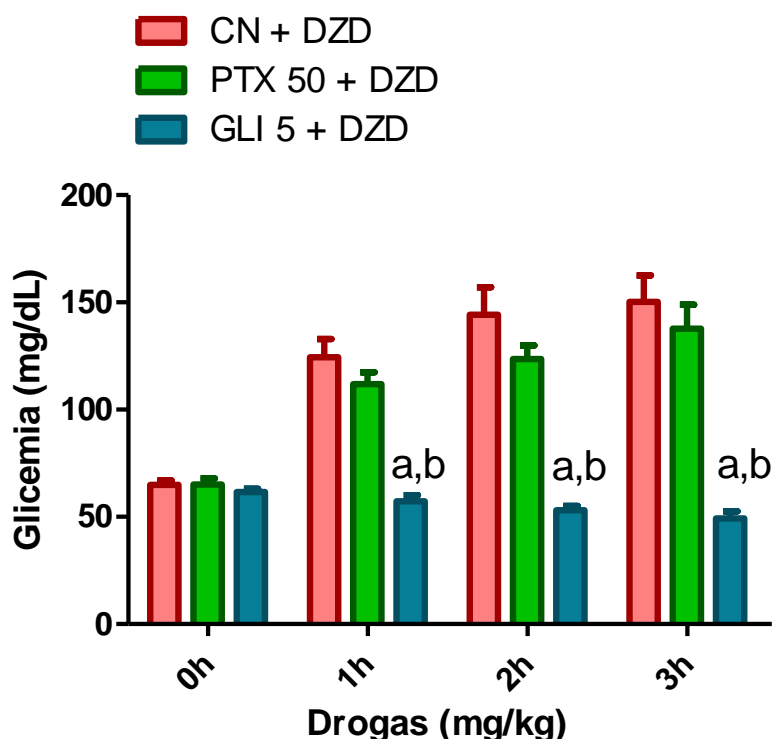


Figura 50. Avaliação da pentoxifilina e da glibenclamida na curva glicêmica com Diazóxido em ratos não diabéticos. *** $p < 0,001$ para 1h, 2h e 3h ((GLI 5 + DZD)^c vs (CN + DZD)^a); ((GLI 5 + DZD)^c vs PTX50+ DZD)^b). (a) após Análise de Variância (ANOVA) seguido de teste de *Student Newman-Keuls*.

Tabela 18. Avaliação da Pentoxifilina (PTX) e Glibenclamida (GLI) na curva glicêmica com Diazóxido (DZD) em ratos não diabéticos. A glicemia foi avaliada no tempo zero (T0) após jejum de 12 horas. Logo em seguida os animais foram pré-tratados por via oral com PTX 50 mg/Kg, GLI 5 mg/Kg e água. Uma hora após foram tratados com DZD 250 mg/Kg/ i.p.

Grupos (mg/Kg, vo) (N)	Glicemia (mg/dL) Média ± EPM			
	0 hora	1 hora	2 horas	3 horas
CN + DZD (6)	64,83±2,14	124,33±8,59	144±12,67	150,33±12,24
PTX 50 + DZD (6)	65,17±2,70	111,83±5,67	123,67±6,25	137,67±11,33
GLI 5 + DZD (6)	61,50±1,54	57,17±2,86 ^{a,b}	53,00±2,05 ^{a,b}	49,33±3,21 ^{a,b}

Os valores representam médias±EPM dos níveis glicêmicos. O número de animais encontra-se especificado em parêntese. CN+DZD=controle normal + diazóxido; PTX50+DZD=pentoxifilina 50 mg/Kg + diazóxido; GLI5+DZD=glibenclamida 5 mg/Kg + diazóxido.

5.6.2 Hiperglicemia induzida por Diazóxido (DZD) em ratos diabéticos.

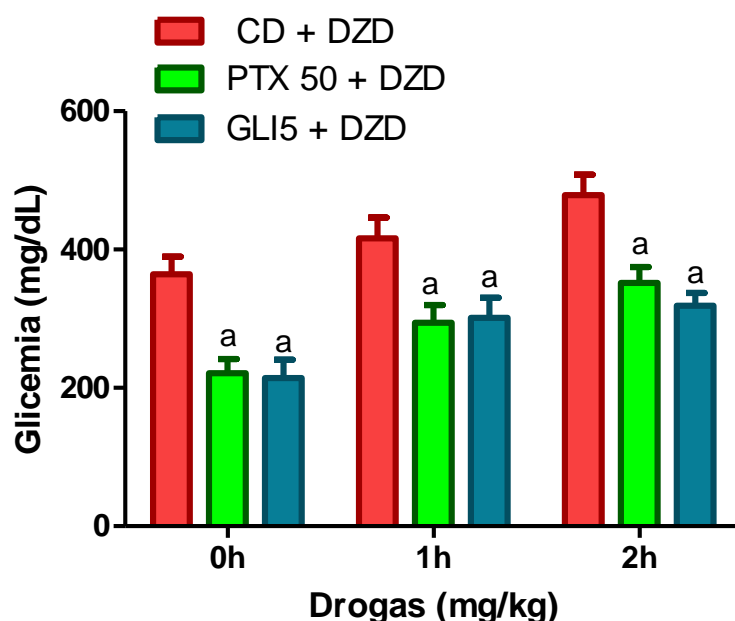


Figura 51. Avaliação da pentoxifilina e da glibenclamida na curva glicêmica com Diazóxido em ratos diabéticos. *** $p < 0,001$ para 0h ((PTX 50 + DZD)^b vs (CD + DZD)^a) e ((GLI 5 + DZD)^c vs (CD + DZD)^a); * $p < 0,05$ para 1h ((PTX 50 + DZD)^b vs (CD + DZD)^a) e ((GLI 5 + DZD)^c vs (CD + DZD)^a) e * $p < 0,05$ para 2h ((PTX 50 + DZD)^b vs (CD + DZD)^a) e ** $p < 0,01$ para 2h ((GLI 5 + DZD)^c vs (CD + DZD)^a) após Análise de Variância (ANOVA) seguido de teste de *Student Newman-Keuls*.

Tabela 19. Avaliação da Pentoxifilina (PTX) e Glibenclamida (GLI) na curva glicêmica com Diazóxido (DZD) em ratos diabéticos. A glicemia foi avaliada no tempo zero (T0) após jejum de 12 horas. Logo em seguida os animais foram pré-tratados por via oral com PTX 50 mg/Kg, GLI 5 mg/Kg e água. Uma hora após foram tratados com tratados com DZD 250 mg/Kg/ i.p.

Grupos (mg/Kg, vo) (N)	Glicemia (mg/dL) Média ± EPM		
	0 hora	1 hora	2 horas
CD + DZD (6)	364,00 ± 25,78	416,33±30,01	478,83±29,20
PTX 50 + DZD (7)	221,00±20,52 ^a	294,00±25,92 ^a	351,86 ± 22,89 ^a
GLI 5 + DZD (5)	214,00±26,66 ^a	301,40±28,92 ^a	318,34±18,34 ^a

Os valores representam médias±EPM do número de animais especificados em parêntese. CD+DZD=controle diabético + diazóxido; PTX50+DZD=pentoxifilina 50 mg/Kg + diazóxido; GLI5+DZD=glibenclamida 5 mg/Kg + diazóxido.

5.7 Avaliação da atividade antiinflamatória na presença do Diabetes induzido por Alozano em modelo de inflamação aguda: Edema de Pata

O edema induzido por carragenina é um fenômeno temporal e multimediado, que envolve a participação de uma diversidade de mediadores inflamatórios, como aminas biogênicas (histamina e serotonina), na primeira fase (1-2 h), responsáveis pelo desenvolvimento dos eventos vasculares, e uma segunda fase (3-6 h), mantida por outros mediadores, como citocinas (IL-1 e TNF- α), prostaglandinas e óxido nítrico (Di ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971). Com base na natureza bifásica do edema induzido por carragenina e no efeito inibitório da fase tardia, tem sido relatado que a segunda fase deste edema é sensível a drogas antiinflamatórias utilizadas na prática clínica (ALCARAZ; JIMENEZ, 1988).

O efeito antiinflamatório da pentoxifilina foi avaliado com o método do edema de pata induzido por carragenina. Os resultados (**Tabela 20**) demonstraram que a pentoxifilina, na quarta hora (T4h), nas doses 50 e 100 mg/kg reduziu significativamente (* $p < 0,05$), o volume da pata ($1,29 \pm 0,07$ (40,28%) e $1,46 \pm 0,08$ (32,41%) quando comparada com o controle diabético ($2,16 \pm 0,09$), com a droga hipoglicemiante glibenclamida na dose de 5 mg/Kg ($1,86 \pm 0,23$ (13,89%) e com controle normal ($1,87 \pm 0,06$ (13,42%)). Não houve diferença significativa, na quarta hora, entre o controle normal, o controle diabético e a glibenclamida. Todavia, verificamos que possivelmente, pela condição *low grade inflammation*, houve um aumento e prolongamento do edema dos ratos diabéticos na presença e na ausência das drogas em estudos, acentuada nos ratos diabéticos não tratados ou tratados com glibenclamida, uma vez que a maior expressão inflamatória foi verificada nas 24 horas (T24h), onde os resultados mostraram que a pentoxifilina, nas doses 50 e 100 mg/kg reduziu significativamente (** $p < 0,001$), o volume da pata ($1,48 \pm 0,14$ (56,21%) e $1,57 \pm 0,16$ (53,55%)) quando comparada com o controle diabético ($3,38 \pm 0,19$) e com a droga hipoglicemiante clássica glibenclamida na dose de 5 mg/Kg (* $p < 0,05$) ($2,60 \pm 0,19$ (23,07%)), neste mesmo período percebe-se que no controle normal houve uma regressão do edema voltando praticamente para o volume apresentado na primeira hora. Uma condição atípica identificada neste experimento é que enquanto houve reversão nos ratos não diabéticos do volume basal da pata injetada após 48 horas, nos ratos diabéticos não tratados, mesmo que de pequena intensidade, esse edema prevalece por cerca de 30 dias, dados não mostrados neste trabalho devido os valores discrepantes nas medidas do edema.

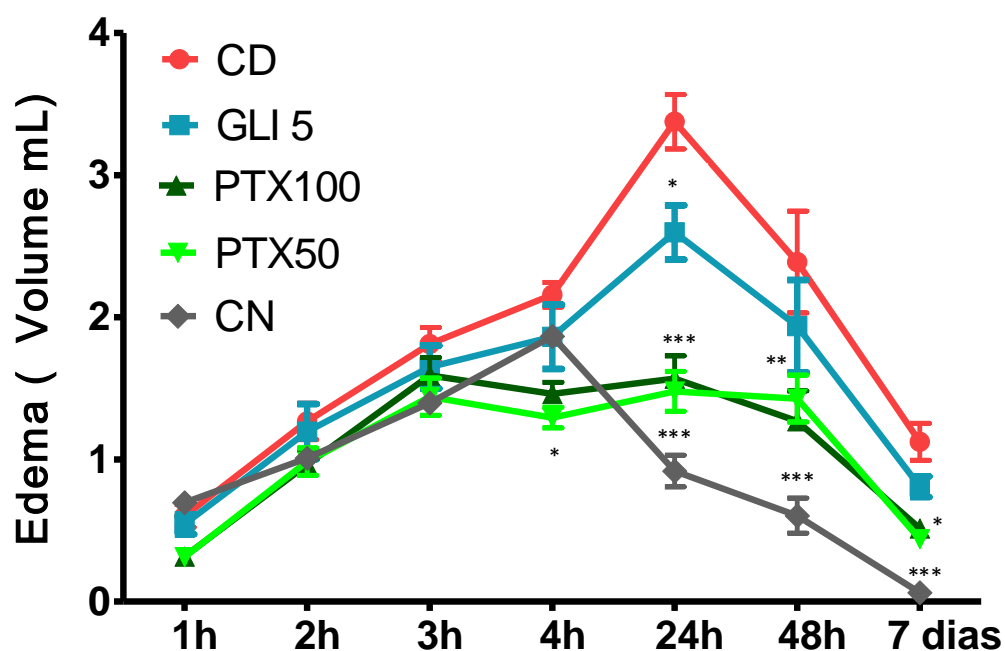


Figura 52. Efeito antiinflamatório da pentoxifilina sobre edema de pata induzido por carragenina em ratos diabéticos. Significativo após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman-Keuls (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; e *** $p < 0,001$).

Tabela 20. Efeitos da pentoxifilina sobre o edema de pata induzido por carragenina. Glibenclamida (5 mg/kg) foi o fármaco de referência. Significativo após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman-Keuls (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; e *** $p < 0,001$).

Grupos (mg/Kg, vo) (N)	Volume do edema (mL) Média±EPM			
	4 horas	24 horas	48 horas	7 dias
CD (9)	2,16±0,09	3,38±0,19	2,39±0,36	1,12±0,13
CN (10)	1,87±0,06	0,92±0,11***	0,61±0,12***	0,06±0,02***
GLI 5 (9)	1,86±0,23	2,60±0,19*	1,94±0,33	0,81±0,07
PTX100 (13)	1,46±0,08*	1,57±0,16***	1,27±0,21**	0,52±0,04*
PTX50 (10)	1,29±0,07*	1,48±0,14***	1,43±0,16**	0,44±0,03*

Os valores representam médias±EPM do número de animais especificados em parêntese. CD=controle diabético; CN=controle normal; GLI5=glibenclamida 5mg/Kg; PTX100=pentoxifilina 100 mg/Kg; PTX50=pentoxifilina 50 mg/Kg.

5.7.1 Análise por Elisa de Citocinas (TNF- α e IL-6) e Nitrito no homogenato das patas dos animais diabéticos com edema produzido por carragenina.

Com o objetivo de verificar a participação ativa das citocinas TNF α e IL-6 e produção de nitrito na inflamação subclínica relatada no Diabetes mellitus associamos num único modelo dois modelos experimentais, indução do diabetes com aloxano (diabetes experimental) e indução de edema de pata com carragenina (inflamação aguda). Este modelo nos permitiu visualizar e medir o edema, além de quantificar, no homogenato das patas, as principais citocinas envolvidas no processo inflamatório estudado.

Os resultados (**Tabela 21**) mostraram que os ratos tratados com a pentoxifilina na dose 50 mg/kg apresentaram uma redução significativa nos níveis de IL-6 e TNF- α respectivamente $***p < 0,001$ ($100,95 \pm 4,38$ e $22,00 \pm 0,76$) quando comparados com os ratos tratados com a glibenclamida 5 mg/kg ($209,22 \pm 2,08$ e $36,85 \pm 3,52$ pg/100 mg) e com o grupo dos animais diabéticos não tratados ($2002,95 \pm 21,37$ e $43,51 \pm 1,33$ pg/100 mg). Todavia a pentoxifilina na dose 100 mg/kg mostrou o melhor resultado na redução dos níveis de TNF- α $***p < 0,001$ ($12,53 \pm 0,21$ pg/100 mg) quando comparado com o demais grupos. Na concentração de nitrito no tecido das patas a PTX na dose 100 mg/Kg reduziu, de forma significativa, a liberação de nitrito tecidual em 25,09%, todavia os resultados foram contraditórios para a PTX 50 mg/Kg (**Tabela 22**).

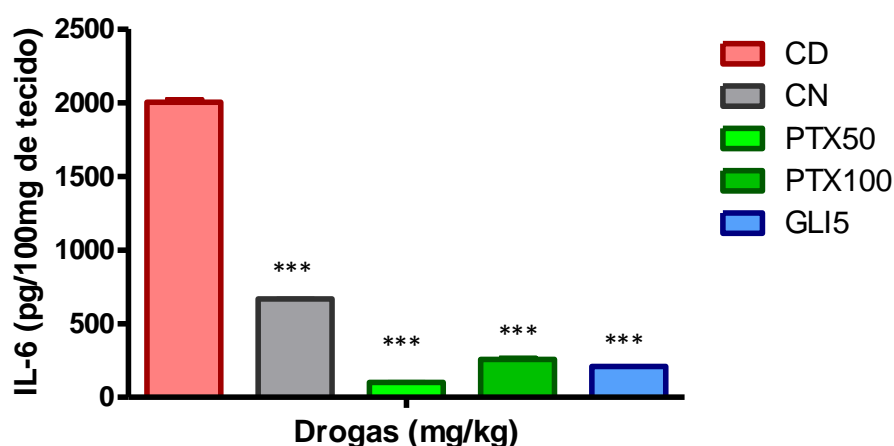


Figura 53. Avaliação dos níveis de IL-6 em homogenato de patas de ratos diabéticos e não diabéticos

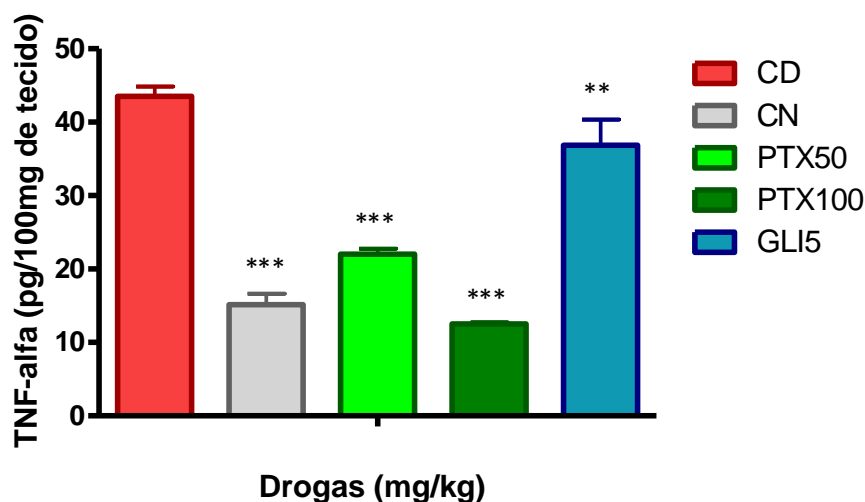


Figura 54. Avaliação dos níveis de TNF- α em homogenato de patas de ratos diabéticos e não diabéticos

Tabela 21: Dosagem de citocinas em homogenatos da pata de ratos diabéticos com uma semana de tratamento com as drogas pentoxifilina e glibenclamida. Análise de Variância ANOVA seguido do teste de Bonferroni, com nível de significância de 0,001%. Resultados expressos em (média \pm desvio padrão). (n=3).

Grupos Experimentais	Citocinas (pg/100 mg de tecido) (Média \pm EPM)	
	IL-6	TNF- α
CN	667,23 \pm 3,12+	15,13 \pm 1,50+
CD	2002,95 \pm 21,37*	43,51 \pm 1,33*
PTX50	100,95 \pm 4,38*+†	22,00 \pm 0,76
PTX100	256,97 \pm 13,21*+†	12,53 \pm 0,21+
GLI5	209,22 \pm 2,08*+	36,85 \pm 3,52

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CN ($p < 0,01$)

+ Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CD ($p < 0,01$)

† Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo GLI ($p < 0,01$)

Os valores representam médias \pm EPM dos níveis de citocinas. O número de animais encontra-se especificado em parêntese. CN=controle normal; CD=controle diabético; PTX50=pentoxifilina 50 mg/Kg; PTX100=pentoxifilina 100 mg/Kg e GLI5=glibenclamida 5mg/Kg;

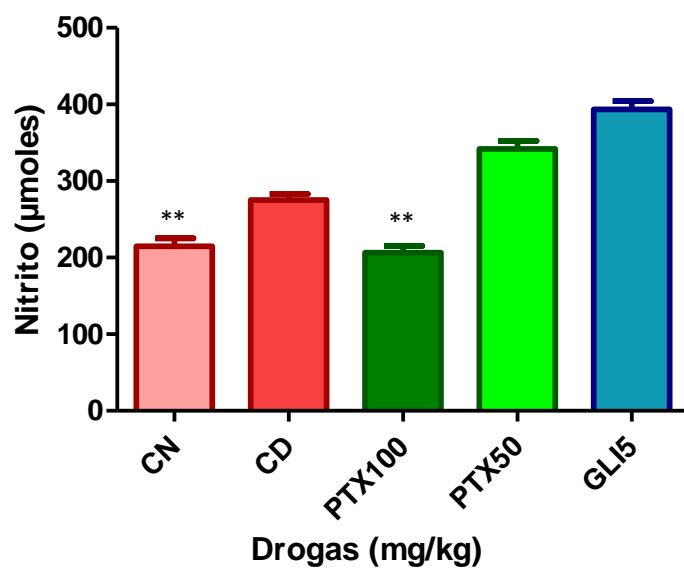


Gráfico 55. Avaliação dos níveis de Nitrito em homogenato de patas de ratos diabéticos e não diabéticos.

Tabela 22. Dosagem de Nitrito em homogenatos de patas de ratos diabéticos com uma semana de tratamento. Análise de Variância ANOVA seguido do teste de Bonferroni, com nível de significância de 0,001%. Resultados expressos em (média \pm desvio padrão). (n=3)

Nitrito (µMol)	
Grupos Experimentais	(Média \pm EPM)
CN	214,9 \pm 17,7
CD	275,3 \pm 13,9*
PTX50	342,2 \pm 17,6
PTX100	206,6 \pm 15,1*†
GLI5	393,6 \pm 18,7

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CN ($p < 0,01$)

+ Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CD ($p < 0,01$)

† Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo GLI ($p < 0,01$)

Os valores representam médias \pm EPM dos níveis de nitrito. O número de animais encontra-se especificado em parêntese. CN=controle normal; CD=controle diabético; PTX50=pentoxifilina 50 mg/Kg; PTX100=pentoxifilina 100 mg/Kg e GLI5=glibenclamida 5mg/Kg;

5.7.2 Análise por Elisa de IL-6 e Nitrito no plasma dos animais diabéticos

Os resultados (**Tabela 23**) mostraram que os ratos tratados com Glibenclamida na dose 5 mg/kg apresentaram uma redução significativa nos seguintes níveis de IL-6 ($36,85 \pm 3,52$) quando comparados com o Controle diabético ($49,06 \pm 6,33$ pg/mL). Não houve diferença significativa da PTX nas doses 25,50 e 100 mg/Kg quando comparados com o controle diabético. Já em relação a concentração plasmática de nitrito os resultados inverteram-se, a pentoxifilina nas doses 25, 50 e 100 apresentou, respectivamente, uma redução dose efeito nos níveis plasmáticos de nitrito $p < 0,001$ ($8,52 \pm 0,34$; $7,58 \pm 0,58$ e $6,18 \pm 0,30$), quando comparada com o controle diabético ($13,68 \pm 0,57$), enquanto a Glibenclamida apresentou uma redução bem menor, embora significativa $p < 0,01$ ($11,07 \pm 0,75$). (**Tabela 24**).

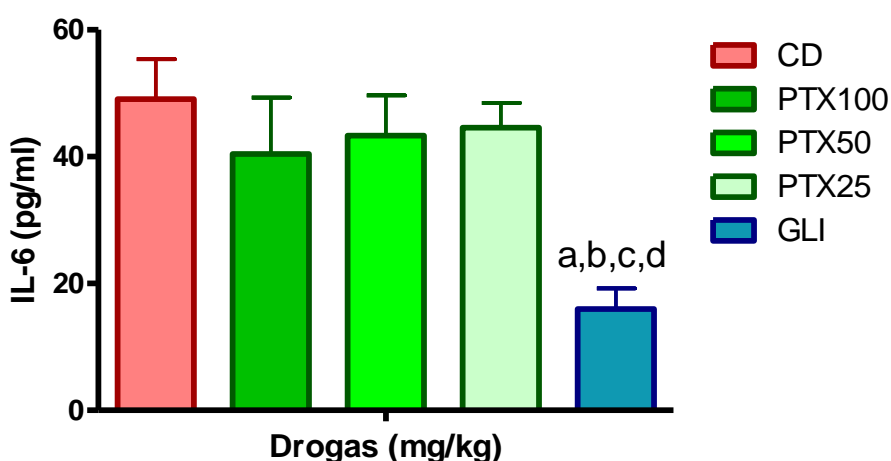


Figura 56. Avaliação dos níveis de IL-6 no plasma dos ratos diabéticos.

Tabela 23. Dosagem da citocina IL-6 plasmática de ratos diabéticos com uma semana de tratamento com as drogas pentoxifilina e glibenclamida. Análise de Variância ANOVA seguido do teste de Bonferroni, com nível de significância de 0,001%. Resultados expressos em (média \pm desvio padrão).

Citocina IL-6 (pg/mL de soro)	
(Média \pm EPM)	
Grupos Experimentais	IL-6
CD (n=5)	49,06 \pm 6,33
PTX25 (n=8)	44,57 \pm 3,91†
PTX50 (n=9)	43,32 \pm 6,35†
PTX100 (n=10)	40,41 \pm 8,93†
GLI5 (n=4)	15,96 \pm 3,27*

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CD ($p < 0,001$)

† Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo GLI ($p < 0,001$)

Os valores representam médias \pm EPM dos níveis de citocinas. O número de animais encontra-se especificado em parêntese. CD=controle diabético; PTX25=pentoxifilina 25 mg/Kg; PTX50=pentoxifilina 50 mg/Kg; PTX100=pentoxifilina 100 mg/Kg e GLI5=glibenclamida 5mg/Kg;

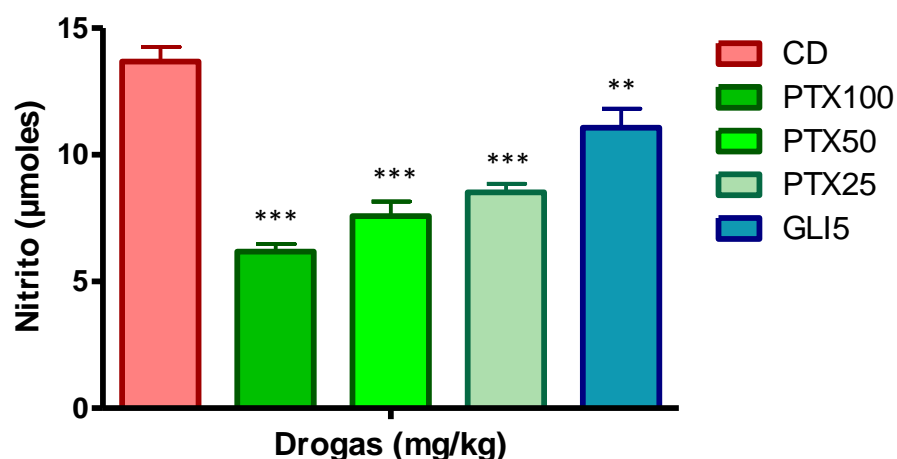


Figura 57. Avaliação dos níveis de Nitrito no plasma dos ratos diabéticos.

Tabela 24: Dosagem de Nitrito do soro de ratos diabéticos com uma semana de tratamento. Resultados expressos em (média ± desvio padrão).

Nitrito (µMol do soro)	
Grupos Experimentais	(Média±EPM)
CD (n=5)	13,68±0,57
PTX25 (n=7)	8,52±0,34*†
PTX50 (n=7)	7,58±0,58*†
PTX100 (n=7)	6,18±0,30*†
GLI5 (n=5)	11,07±0,75*

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CD ($p < 0,001$)

† Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo GLI ($p < 0,001$)

Os valores representam médias±EPM dos níveis de citocinas. O número de animais encontra-se especificado em parêntese. CD=controle diabético; PTX25=pentoxifilina 25 mg/Kg; PTX50=pentoxifilina 50 mg/Kg; PTX100=pentoxifilina 100 mg/Kg e GLI5=glibenclamida 5mg/Kg;

5.8 Avaliação Histopatológica do pâncreas, fígado e rins

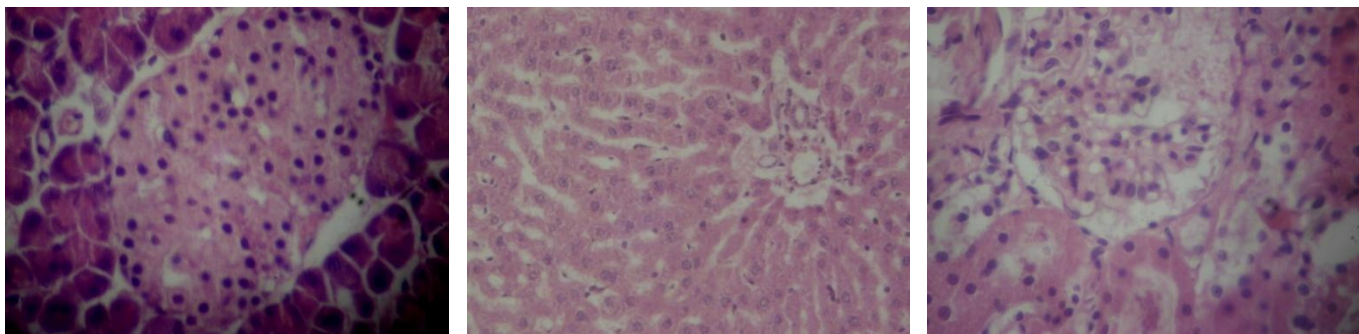


Figura 58. Controle Normal (CN): pâncreas, fígado e rim, respectivamente (HE 100x)

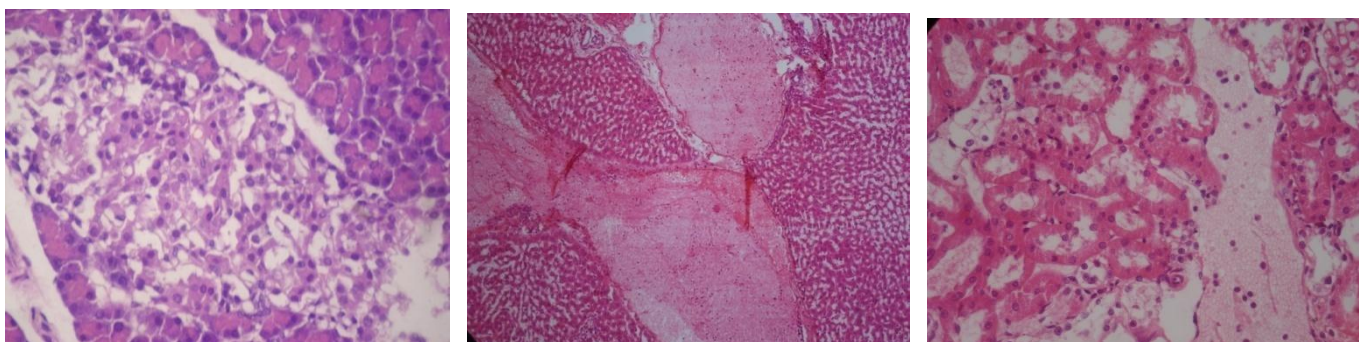


Figura 59. Controle diabético (CD): pâncreas, fígado e rim, respectivamente (HE 400x). **PÂNCREAS** – amostra representada por pâncreas exócrino com células centro-acinares. Poucas ilhotas de Langerhans em meio a escasso tecido conjuntivo frouxo intersticial. Presença de vasos sanguíneos dilatados e ectásicos. **FÍGADO** – dilatação da veia centrolobular e do espaço porta; hemorragia sinusoidal e presença de pigmentos de hemossiderina. **RIM** – microssecções de rim mostrando estrutura glomerular mantida, porém com moderada hipocelularidade. Vacuolização isométrica do epitélio tubular, células inflamatórias no espaço intertubular e congestão vascular.

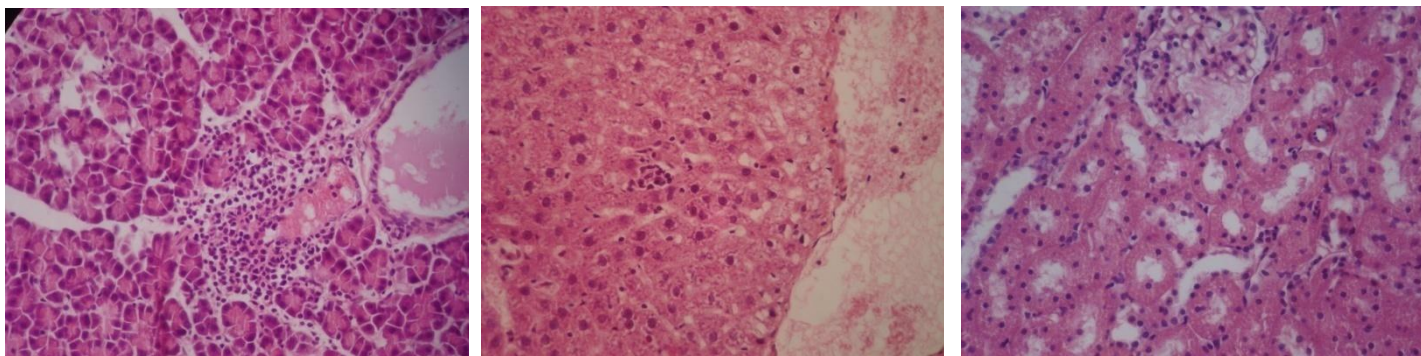


Figura 60. Grupo tratado com PTX50: pâncreas, fígado e rim, respectivamente (HE 400x). **PÂNCREAS** – amostra representada por pâncreas exócrino com células centro-acinares. Ilhotas de Langerhans com algumas células substituídas por material amorfo hialino, em meio a tecido conjuntivo frouxo intersticial com alguns vasos sanguíneos ectásicos. **FÍGADO** – dilatação da veia centrolobular, discreta tumefação celular de hepatócitos, células de Kupffer. **RIM** – microsecções de rim mostrando estrutura glomerular mantida, porém com discreta hipocelularidade e discreta tumefação celular do epitélio tubular.

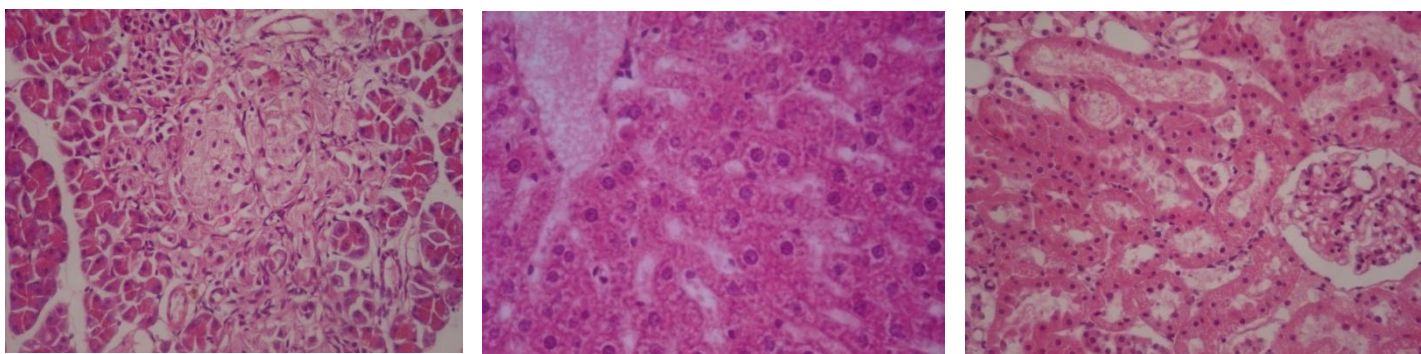


Figura 61. Grupo tratado com PTX5: pâncreas, fígado e rim, respectivamente (HE 400x). **PÂNCREAS** – amostra representada por pâncreas exócrino com células centro-acinares. Poucas ilhotas de Langerhans, com alta substituição por material amorfo hialino. Ducto interlobular em meio a tecido conjuntivo frouxo intersticial com vasos sanguíneos ectásicos. **FÍGADO** – microsecções de fígado constituída por cordões de hepatócitos com moderada tumefação celular e dilatação da veia centrolobular. **RIM** – microsecções de rim mostrando estrutura glomerular mantida, porém alguns com discreta hipocelularidade, moderada tumefação celular do epitélio tubular e presença de material eosinofílico na luz dos ductos proximais e distais.

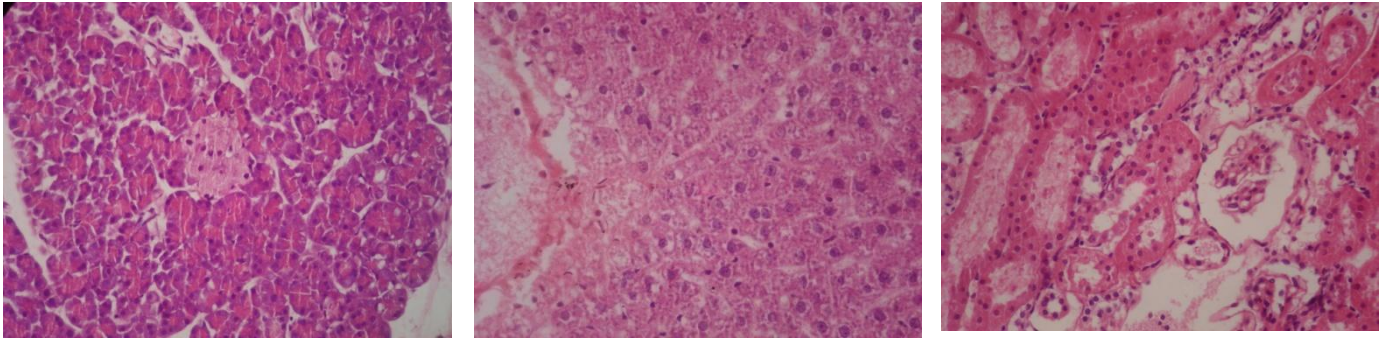


Figura 62. Grupo tratado com PTX5+GLI2: pâncreas, fígado e rim, respectivamente (HE 400x). **PÂNCREAS** – amostra representada por pâncreas exócrino com células centro-acinares. Ilhotas de Langerhans de aspecto normal, ducto interlobular em meio a tecido conjuntivo frouxo intersticial com vasos sanguíneos por vezes ectásicos. **FÍGADO** – microsecções de fígado constituída por cordões de hepatócitos com intensa tumefação celular, congestão da veia centrolobular, hiperplasia das células de Kupffer focal. **RIM** – microsecções de rim mostrando estrutura glomerular mantida, porém alguns com discreta hipocelularidade.

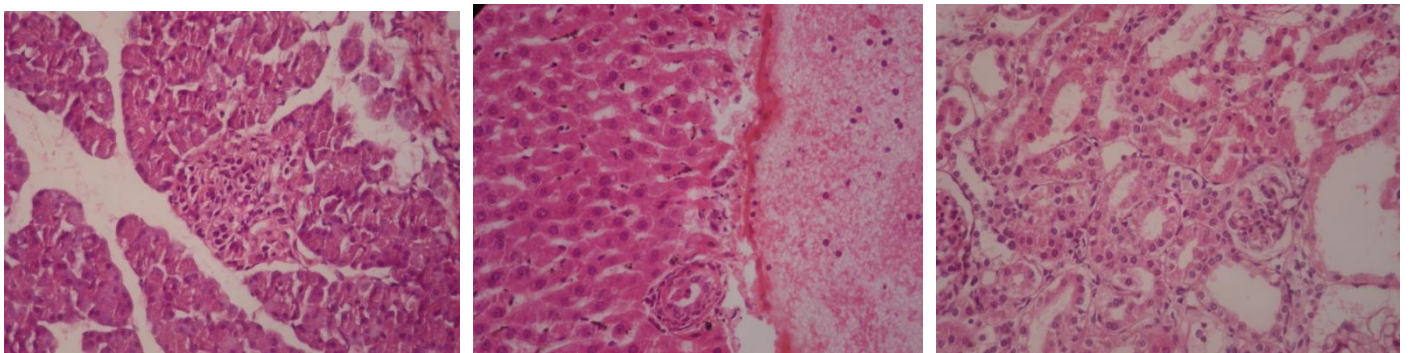


Figura 63. Grupo tratado com PTX5+MET5: pâncreas, fígado e rim, respectivamente (HE 400x). **PÂNCREAS** – amostra representada por pâncreas exócrino com células centro-acinares. Poucas ilhotas de Langerhans, denso infiltrado de células inflamatórias mononucleares e numerosos vasos ectásicos. **FÍGADO** – microsecções de fígado constituída por cordões de hepatócitos com moderada tumefação celular, dilatação do espaço porta e da veia centrolobular, hiperplasia das células de Kupffer focal, presença de muitos pigmentos escurecidos: hemossiderina? bilirrubina? **RIM** – microsecções de rim mostrando estrutura glomerular mantida, porém muitos com discreta hipocelularidade, intensa tumefação celular do epitélio tubular e presença de células inflamatórias mononucleares na região intersticial.

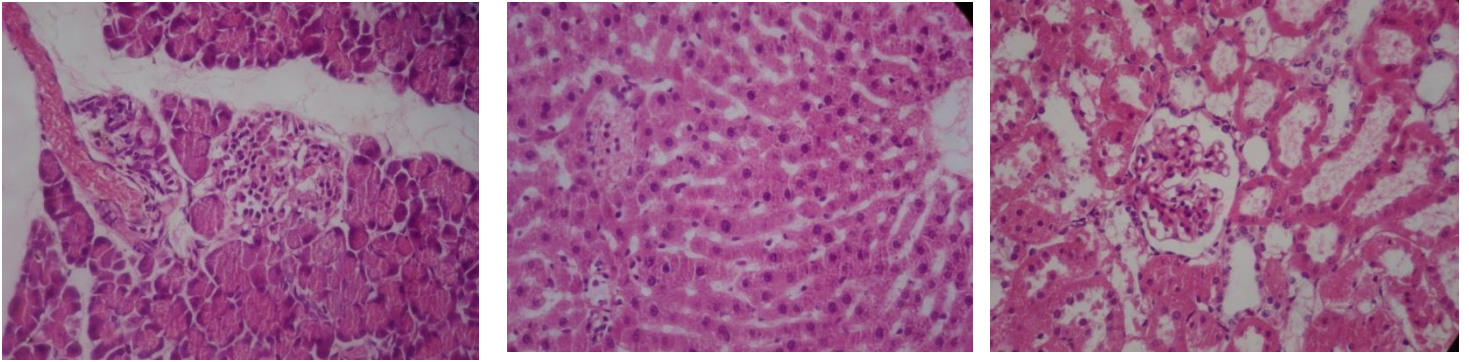


Figura 64. Grupo tratado com MET5: pâncreas, fígado e rim, respectivamente (HE 400x). **PÂNCREAS** – amostra representada por pâncreas exócrino com células centro-acinares. Raras ilhotas de Langerhans, desorganizadas, com denso infiltrado de células inflamatórias mononucleares e numerosos vasos ectásicos. **FÍGADO** – microssecções de fígado constituída por cordões de hepatócitos com moderada tumefação celular, dilatação da veia centrolobular, focos inflamatórios. **RIM** – microssecções de rim mostrando estrutura glomerular mantida, porém muitos com discreta hipocelularidade e presença de material eosinofílico preenchendo, parcialmente os túbulos proximais e distais.

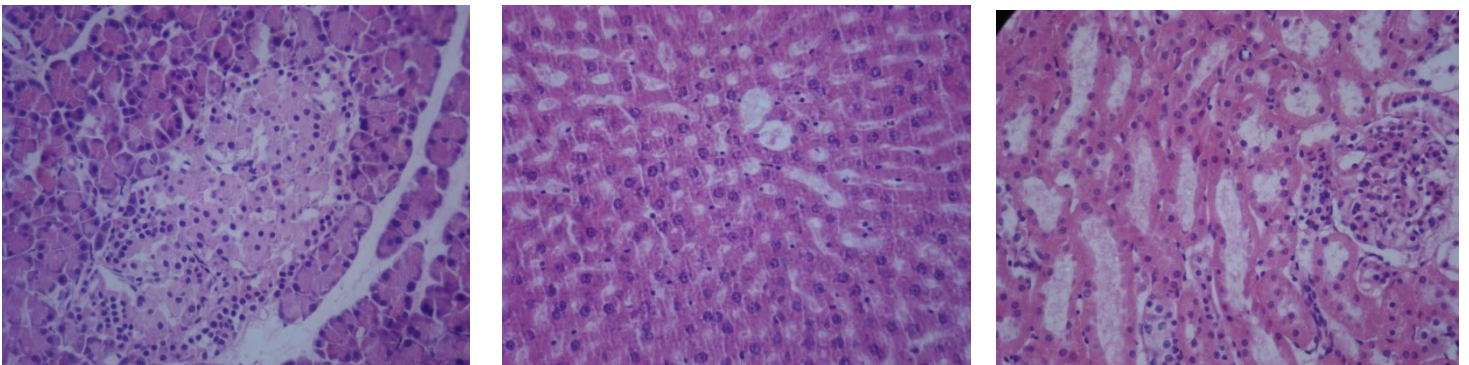


Figura 65. Grupo tratado com GLI2: pâncreas, fígado e rim, respectivamente (HE 400x). **PÂNCREAS** – amostra representada por pâncreas exócrino com células centro-acinares. Ilhotas de Langerhans, algumas células substituídas por material amorfo hialino, ducto interlobular em meio a tecido conjuntivo frouxo intersticial. Há denso acúmulo de células inflamatórias na periferia. **FÍGADO** – microssecções de fígado constituída por cordões de hepatócitos exibindo discreta tumefação celular, sinusoides, dilatados e células inflamatórias dispersas. **RIM** – microssecções de rim mostrando estrutura glomerular mantida, porém alguns com discreta hipocelularidade e discreta tumefação celular do epitélio tubular e congestão.

6.0 DISCUSSÃO

O desenvolvimento do conceito de que o DM2 é uma condição inflamatória é novo, mas com importante papel nas complicações da doença. O conceito de inflamação em relação às condições metabólicas como obesidade e resistência insulínica partiu de achados experimentais que demonstraram a expressão do TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, estava aumentada nos adipócitos de animais obesos, e que quando suprimida levava à diminuição da resistência insulínica nesses animais. Estabeleceu-se, assim, a primeira conexão entre o aumento de citocinas pró-inflamatórias e a resistência insulínica.

Estudos pioneiros conduzidos por HOTAMISLIGIL et al. demonstraram, em 1994, que o TNF- α modula a sinalização intracelular de insulina. Isso acontece porque ele inibe a fosforilação da tirosina dos IRS e fosforila a sua porção serina. Uma vez fosforilada a serina, os IRS se tornam substratos pobres para o receptor de insulina. Tal bloqueio impede que as interações protéicas funcionem adequadamente na translocação dos GLUTs para a membrana célula e afetem a captação da glicose para as células (PASCHOAL; NAVES; FONSECA, 2007).

As cascatas de sinalização reguladas pelo TNF- α são complexas e envolvem muitos pontos de ramificação (BAUD E KARIN, 2001). Uma das ramificações da via de sinalização do TNF- α envolve a ativação da quinase c-Jun N-terminal (Jnk) (AGUIRRE et al, 2000). A Jnk é uma quinase é estimulada por muitos agonistas durante uma inflamação. A Jnk fosforila inúmeras proteínas celulares, inclusive IRS-1 e IRS-2, Shc e Gab1 (AGUIRRE et al, 2000), o que fortalece os achados que dizem que uma inflamação subclínica antecede o DM.

Os primeiros estudos para o entendimento desta linha de raciocínio se deram pelo consenso que a obesidade, o principal fator de risco para o DM2, está associada com secreção de citocinas inflamatórias e proteínas, tais como TNF- α , IL-6, leptina e adinopectina, mediadores inflamatórios que poderiam prever o desenvolvimento de DM2. E posteriormente, vários estudos confirmaram a presença da inflamação como um preditor do desenvolvimento de DM2 (DANDONA, 2004).

O tratamento *in vivo* com citocinas ou endotoxinas reduz a capacidade da insulina de mediar a entrada de glicose nas células do tecido musculoesquelético, o que constitui forte evidência da participação dessas moléculas na resistência à insulina no músculo, associada à inflamação aguda sistêmica. Os mecanismos que levam a indução da resistência à insulina pelas citocinas têm sido alvo de intensa investigação nos últimos anos (DUCAN et al., 2005).

Indivíduos com diabetes apresentam altas concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias (PIRART, 1984; NAVARO; MORA-FERNÁNDEZ, 2006ab; ADAMIEC; OFICJALSKA-MLYNCZAK, 2007; GACKA et al, 2008; FESTA, 2000; GIUGLIANO et al, 1996; GUSTAVSSON et al, 2008, HATANAKA et al, 2006) e da proteína amilóide sérica A de fase aguda (KADOGLOU et al, 2007; HATANAKA et al, 2007). Estas citocinas/proteínas podem ser produzidas pelo tecido adiposo (COPPACK, 2001) e em parte podem ser originadas de leucócitos (HATANAKA et al, 2006), e também de células T. Estes indivíduos apresentam um estado inflamatório sub-clínico constante, fato que está diretamente correlacionado com a instalação e progressão das complicações crônicas da doença (ADAMIEC; MLYNCZAK, 2007; HATANAKA et al, 2006; HREIDARSSON, 1981; HATANAKA et al 2007; PIRART, 1984; NAVARO; FERNÁNDEZ, 2006; FERREIRA et al, 1998).

A pentoxifilina é um inibidor não-seletivo da fosfodiesterase, derivada de uma metilxantina, com ações antiinflamatórias vasculares e reológicas que podem neutralizar algumas das mudanças no diabetes que contribuem para amenizar os seus efeitos secundários como a neuropatia, a retinopatia e a nefropatia, complicações crônicas temidas no DM e determinadas por um estado da “*low grade inflammation*” (LEE et al., 2001; MORRIS, 2001; RODRIGUÉZ & GUERRERO, 2008).

Diversos estudos atribuem a pentoxifilina a capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (MACDONALD et al,1994; SLIWA et al, 1998; COOPER et al, 2004; ANTUNES et al, 2008) presentes no DM2 desde o início da doença.

Alguns estudos relatam que o efeito hipoglicemiante da insulina ou dos antidiabéticos orais pode ser potencializado (risco aumentado de hipoglicemia) com o uso concomitante da pentoxifilina, condição que colaborou para uma

investigação dos possíveis mecanismos envolvidos na sua ação hipoglicemiante, uma vez que na prática clínica pacientes portadores do DM 2 complicado com vasculopatia diabética fazem uso, com êxito, da PTX.

O uso da PTX estimulou a secreção de insulina em pâncreas perfundidos de ratos, ação atribuída a numerosos estudos que confirmam a participação do AMPc como mediador da secreção de insulina (RAPTIS et al., 1987). Estudos também apontaram que o aumento da concentração intracelular de AMPc inibe a síntese de TNF α *in vitro* (TARNENBAUN e HAMILTON, 1989; TAFFET et al., 1989).

Até hoje os mecanismos envolvidos na atividade antiinflamatória da pentoxifilina não foram totalmente esclarecidos e/ou correlacionados com o diabetes, faz-se necessário verificar o seu potencial hipoglicemiante/antiinflamatório comparando-o com a glibenclamida e com a metformina, drogas usadas no tratamento de pacientes diabéticos.

Um ponto relevante para a condução desse estudo é que algumas pesquisas têm indicado que algumas drogas antiinflamatórias podem apresentar potencial terapêutico importante para pacientes com DM2.

Pacientes com DM2 submetidos a um tratamento com doses elevadas de ácido acetilsalicílico (na ordem dos 7g/dia, durante duas semanas), apresentaram uma melhora tanto na glicemia em jejum como na pós-prandial, um efeito atribuído a um decréscimo nas taxas basais de produção de glicose hepática, um incremento da sensibilidade à insulina periférica e a uma redução do *clearance* da insulina. Contudo, tendo em vista a toxicidade potencial associada com doses elevadas deste fármaco, as pesquisas revelaram-se contra a sua prescrição para o tratamento do diabetes tipo (HUNDAL, 2002).

No presente estudo, quer seja nos modelos para estudo da ação hipoglicemiante das drogas ou nos modelos para estudo da atividade antiinflamatória, o diabetes experimental com aloxano foi o modelo de partida.

A ação diabetogênica do aloxano foi reportada por DUNN, SHEEHAN E MCLETHIE (1943 apud SZKUDELSKI, 2001) em seu estudo sobre os efeitos dessa substância em coelhos. Os autores concluíram nesse trabalho que o aloxano induz uma necrose específica das ilhotas pancreáticas. O aloxano é um dos agentes diabetogênicos mais estudados e comumente utilizados no meio científico para a indução de diabetes experimental, quer seja pelo seu

baixo custo, quer seja pela sua segurança no estabelecimento de diabetes permanente nas 24 (vinte e quatro) horas subsequentes (LERCO et al., 2003).

Estudos também apontaram que o aloxano não destrói todas as células β pancreáticas, mas faz apenas uma redução parcial destas (GOMES et al., 2008), o que simula um estado de DM2.

Neste estudo foram usados como controles dois fármacos hipoglicemiantes que agem por diferentes mecanismos de ação. Um secretagogo de insulina da classe das sulfoniluréias, a glibenclamida, que causa hipoglicemia principalmente por estimular a liberação de insulina das células pancreáticas. Dois mecanismos têm sido propostos para a glibenclamida: redução dos níveis de glucagon no soro e fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP (DAVIS, 2006). O outro hipoglicemiante utilizado foi a metformina, uma biguanida que melhora o controle glicêmico, aumentando principalmente a sensibilidade hepática (por meio da supressão da glicogenólise e inibição da gluconeogenese no fígado) e que, em menor extensão, melhora a sensibilidade do músculo à insulina (maior captação periférica de glicose e armazenamento no músculo) e que também colabora na redução do colesterol, dos triglicérides e do peso corporal (WIERNSPERGER e BAILEY, 1999).

O acompanhamento do diabetes, no presente trabalho, foi realizado em curto prazo (uma e duas semanas) com o objetivo de ver as ações mais agudas do DM e prever as ações curativas das drogas em estudo. E em longo prazo (um a três meses) como forma de acompanhar os efeitos secundários do diabetes, conseqüentes da glicação de proteínas, na presença e na ausência do tratamento com PTX.

A manutenção da vitalidade de um grupo de animais com diabetes experimental é extremamente difícil no decorrer dos experimentos, uma vez que os animais se debilitam e o controle sobre as mortes é mínimo, tendo em vista essa situação, o número de indivíduos por grupo geralmente se torna reduzido, o que leva a repetições constantes do experimento.

Mesmo com um monitoramento constante da indução do diabetes experimental, uma das interrogações iniciais desse trabalho foi se o diabetes experimental, induzido por aloxano em ratos, conseguiria manter o estado diabético dos ratos não tratados por longo tempo e também verificar o controle

glicêmico da PTX em condições que simulam as complicações crônicas do DM. Tais indagações foram totalmente respondidas pelas respostas obtidas nos muitos experimentos, onde, mesmo diante de uma única aplicação de aloxano, os ratos não tratados mantiveram seus níveis glicêmicos elevados, comprovados pela avaliação bioquímica semanal e também pela visualização dos sinais típicos do diabetes (polidipsia, poliúria e perda de peso) não documentados neste estudo.

Segundo alguns autores o diabetes induzido por aloxano pode ser permanente, como observado no estudo em que a diabetes persistiu por 2 a 8 meses em coelhos, ratos, cachorros e carneiros (DUFF & STARR, 1944; HOUSSAY *et al.*, 1946; CURTIS *et al.*, 1947; ZHAO *et al.*, 1987).

6.1 Estudos Pilotos

Na primeira parte deste estudo, para validar a determinação das doses de pentoxifilina e dos hipoglicemiantes orais em relação aos parâmetros bioquímicos, foram realizados estudos pilotos. Os animais com diabetes induzido por aloxano foram tratados com a pentoxifilina nas doses de 50 e 100 mg/Kg por uma semana e tiveram redução da glicemia e triglicerídeos comparativamente aos ratos tratados com glibenclamida na dose 5 mg/Kg e com a metformina 50 mg/Kg.

Em relação ao colesterol total (CT), os animais com diabetes induzido por aloxano, não tratados, não apresentaram alterações significativas quando comparados com o controle normal, esse achado vai de encontro a LINO (2008) que diz não haver alterações nos níveis de colesterol dos animais com diabetes induzido por aloxano. Da mesma forma a pentoxifilina, assim como a glibenclamida não modificaram os níveis plasmáticos de colesterol total destes ratos.

Outro aspecto importante desses primeiros estudos foram os resultados encontrados sobre as transaminases hepáticas que não foram alteradas nem pela pentoxifilina, nem pelos hipoglicemiantes orais clássicos, nem pela própria ação do diabetes experimental.

Embora muitos estudiosos relatem pouco ou nenhuma anormalidade do fígado em diabetes induzido por aloxano, um similar consumo de aloxano

ocorre no fígado. Entretanto, este e outros tecidos são mais resistentes a espécies de oxigênio reativas em comparação com as células beta pancreáticas, protegendo contra a toxicidade do aloxano (TIEDGE *et al.*, 1997).

6.2 Definição das doses para o estudo de potencialização (associação das drogas)

Com o objetivo de identificar o possível mecanismo de ação hipoglicemiante da pentoxifilina foram definidas doses de baixo efeito terapêutico da pentoxifilina, da glibenclamida e da metformina (5, 2 e 5 mg/Kg respectivamente) que seguiriam para os estudos de potencialização (associação das drogas). A PTX5, a GLI2 e a MET5, em curto prazo, reduziram os níveis de glicemia e de triglicerídeos na ordem de 28% e 25% respectivamente, resultados inferiores ao encontrados para PTX 50 mg/Kg (54 e 59% respectivamente).

6.3 Estudos de Potencialização (associação das drogas)

Os experimentos associando PTX5+GLI2 e PTX5+MET5 foram realizados nos períodos de uma semana a três meses. Os animais com diabetes induzido por aloxano e tratados com a associação de PTX5+GLI2 tiveram reduções significativas nos níveis plasmáticos de glicose e triglicerídeos, levando-os a parâmetros bioquímicos normais, em apenas duas semanas de tratamento. Já a administração da associação de PTX5+MET5, em nenhum dos tempos estudados, levou os ratos a níveis normais de glicemia e triglicerídeos e manteve nos animais os principais sinais típicos do diabetes.

As drogas isoladas ou em associações não modificaram os níveis plasmáticos de colesterol total destes ratos. Da mesma forma, as transaminases hepáticas também não sofreram alterações, na presença ou na ausência das drogas, em nenhum dos períodos estudados.

Os resultados indicam um importante sinergismo entre a PTX e a GLI, indicando que a ação hipoglicemiante da pentoxifilina pode apresentar um mecanismo semelhante a glibenclamida.

6.4 Investigação do Mecanismo de Ação via bloqueio de canais de K⁺ ATP dependentes em ratos diabéticos e não diabéticos

A glibenclamida, como já citado, uma sulfonilureia, estimula a secreção de insulina pelo bloqueio dos canais de K⁺-ATP dependentes nas membranas das células β -pancreáticas, causando despolarização e influxo de Ca²⁺, ao passo que o Diazóxido inibe a secreção de insulina prolongando o tempo de abertura dos canais de K⁺-ATP dependentes. O DZD também possui uma capacidade modesta de inibir a utilização periférica da glicose pelo músculo e estimular a gliconeogênese hepática (DAVIS, 2006).

No presente trabalho avaliou-se a capacidade da PTX em prevenir a hiperglicemia induzida pelo DZD em ratos diabéticos e em ratos não diabéticos.

Os resultados mostraram que, em animais diabéticos, a PTX e a GLI mostraram um perfil semelhante em não evitar os níveis aumentados de glicose induzidos pelo DZD. Situação que atribuída à insensibilidade K⁺-ATP dependentes a estas drogas, decorrente da somação de estímulos hiperglicêmicos, do aloxano e posteriormente do DZD.

Nos animais não-diabéticos, enquanto a GLI bloqueou o aumento dos níveis de glicose após DZD, isto não foi observado nos animais tratados com a PTX. Estes resultados sugerem que outros fatores, além do bloqueio de canais de K⁺-ATP dependentes, podem estar envolvidos. Foi mostrado que o relaxamento vascular dos vasos de resistência induzido pela PTX foi diminuído após incubação com tetraetilamônio, um bloqueador do canal de K⁺ não seletivo, o que sugere que PTX age em canais de K⁺ não seletivos (HANSEN, 1994). Todavia, a ligação da PTX ao bloqueio de canais de K⁺-ATP dependentes não deve ser descartado até que doses maiores de PTX sejam testadas.

6.5 Atividade hipoglicemiante da PTX e da GLI através de dois métodos de rastreio da glicação: hemoglobina glicada e Frutosamina

Outra condição investigada nesta pesquisa foi se a avaliação do estado glicêmico dos ratos diabéticos, a médio e longo prazo, tratados ou não,

espelhava as concentrações de reais de glicose plasmática através de dois métodos de rastreio da glicação, hemoglobina glicada e frutossamina.

O controle glicêmico é extremamente importante, pois um estado de constante hiperglicemia acarreta grandes complicações, promovendo o desenvolvimento de lesões orgânicas extensas e irreversíveis, afetando os olhos, os rins, os nervos, os vasos grandes e pequenos, assim como a coagulação sanguínea.

Em seres humanos, a hemoglobina glicada e a frutossamina são ferramentas importantes para monitorar o tratamento do diabetes mellitus, pois fornecem informações precisas dos níveis glicêmicos médios a curto e longo prazo (MARCA et al., 2000a).

A hemoglobina glicada, também denominada A1c, refere-se a um conjunto de substâncias formada pelas reações entre a hemoglobina A (HbA) e alguns açúcares. Este processo de glicação de proteínas envolve uma ligação não enzimática e permanente de açúcares redutores com a glicose (BRY et al., 2001). A fração A1c é a mais importante e mais estudada. Dependendo do método de análise laboratorial, a fração A1c corresponde a cerca de 3% a 6% da HbA total em pacientes humanos saudáveis e não diabéticos, alcançando até 20% ou mais em diabéticos mal controlados. Os valores de referência devem ser bem estabelecidos, por que quando os valores encontrados em um paciente diabético estão acima do limite superior de referência, está indicada a revisão do esquema terapêutico em vigor (KILPATRICK, 2008).

Níveis de HbA1c acima de 7% estão associados a um risco progressivamente maior de complicações crônicas. Por isso, o conceito atual de tratamento do diabetes por objetivos define 7% como o limite superior acima do qual está indicada a revisão do esquema terapêutico em vigor (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1999; MALERBI & FRANCO, 1992).

Além da hemoglobina glicada, outras proteínas que estão livres no plasma também podem se ligar a glicose originando outras proteínas glicadas, como a frutossamina. Segundo NATHAN et al., (2008), o processo de glicação de proteínas não se restringe apenas a ligação da glicose com a hemoglobina, formando a hemoglobina glicada. Ao contrário, esse processo estende-se, praticamente, a muitas proteínas do organismo, contribuindo para a geração

dos chamados produtos finais da glicação avançada (“Advanced Glycation end products” = AGEs).

Uma vez que o exame da hemoglobina glicada relata uma retrospectiva sobre dois a quatro meses precedentes, neste estudo, os valores de A1C quando confrontados com os valores da glicemia foram fidedignos e mostram que a pentoxifilina na dose 50 mg/Kg e sua associação PTX5+GLI2 conseguiram ser eficazes no tratamento a longo prazo, mantendo níveis de HbA1c inferiores a 7%.

A GLI 2mg/kg mesmo mostrando uma redução importante dos níveis glicêmicos dos ratos, apresentou hemoglobina glicada de 8,10%, contrariando um dos conceitos de tratamento que define 7% como o limite superior do valor aceitável, sendo que a Sociedade Brasileira de Diabetes estabeleceu uma meta ainda mais rígida de A1C (< 6,5%), indicando que aparentemente houve falha no tratamento e/ou o resultado da glicemia não indica o real estado glicêmico do grupo tratado.

A grande vantagem da HbA1c está no fato de não sofrer grandes flutuações, como na dosagem da glicose plasmática, bem como estar diretamente relacionada ao risco de complicações em pacientes com DM tipos 1 e 2 (DCCT RESEARCH GROUP, 1993).

O resultado encontrado acima talvez seja justificado pelos estudos que dizem que a dosagem da glicose no sangue não constitui parâmetro eficiente para avaliação do controle da glicemia durante um intervalo de tempo prolongado (DCCT RESEARCH GROUP, 1993). Nesse sentido, a dosagem da hemoglobina glicada (HbA1c) tem papel fundamental no monitoramento do controle glicêmico em pacientes diabéticos, pois fornece informações acerca do índice retrospectivo da glicose plasmática (BRY *et al*, 2001; DCCT RESEARCH GROUP, 1993, PETERSON *et al.*, 1998; SACKS *et al.*, 2002; UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP, 1998).

Os resultados da determinação da frutossamina, diagnóstico a médio prazo, mostraram que após cinco semanas de tratamento, os ratos tratados com PTX na dose de 50 mg/kg e com a associação (PTX5+GLI2) alcançaram valores de frutossamina inferiores aos valores definidos como normais para humanos. As determinações dos valores de frutossamina para ratos e camundongos não estão claramente definidas, a maioria dos estudos se

concentrou em gatos, em cães e no homem, JENSEN (1992) e ELLIOT et al. (1999) e extrapolou a metodologia utilizada em humanos para a medicina veterinária. Alguns autores estabeleceram os seguintes valores de referência da frutossamina para cães: 279,70-322,30 $\mu\text{mol/L}$ para machos e 225,0-375,0 $\mu\text{mol/L}$ para fêmeas.

Os resultados de A1C e de frutossamina obtidos para os ratos tratados com a PTX indicam que esta droga pode inibir o desenvolvimento de lesões micro e macrovasculares advindas do DM, confirmando dados da literatura que mostraram que a pentoxifilina foi eficaz no tratamento da nefropatia diabética e de outras patologias de base inflamatória (LEYVA-JIMÉNEZ et al., 2009) e na minimização da progressão da retinopatia diabética (LOPES DE JESUS et al., 2008).

6.6 Avaliação da atividade antiinflamatória na presença do Diabetes induzido por Aloxano em modelo de inflamação aguda: Edema de Pata

Para estudar a inflamação subclínica do diabetes, citada por vários autores, foi induzido em ratos diabéticos o edema de pata por carragenina. Este modelo serviu para duas etapas importantes desse estudo; para a avaliação da ação antiedematosa das drogas e também para a dosagem de mediadores inflamatórios envolvidos.

Muitas das manifestações ocorridas em processos inflamatórios agudos e crônicos são investigadas por meio do uso de modelos experimentais, onde se avaliam as alterações que ocorrem durante a inflamação aguda ou crônica, assim como se identificam drogas potencialmente úteis como antiinflamatórios.

Nesses modelos diversos estímulos inflamatórios são usados, um desses estímulos é a carragenina, um polissacarídeo sulfatado obtido a partir de algumas espécies de algas vermelhas da ordem Gigartinales. Essa substância pode ser usada para indução de edema, assim como para indução de sensibilização dos nociceptores para estímulos mecânicos ou térmicos (WINTER et al., 1962; KAYSER & GUILBALD, 1987; OSBORNE & CODERRE, 1999). Essas alterações resultam da ação de diversos mediadores

inflamatórios que apresentam diferentes cursos temporais de produção após a injeção da carragenina (VINEGAR et al., 1987).

Os modelos experimentais de inflamação aguda e crônica permitiram a identificação de múltiplos mediadores e células que têm papel importante para indução de vários sinais e sintomas associados. O componente celular da resposta inflamatória envolve células do próprio tecido, como fibroblastos, macrófagos e mastócitos, e células que são atraídas por quimiotaxia, como neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas. Os mediadores inflamatórios podem estar armazenados em grânulos citoplasmáticos (histamina, 5-hidroxitriptamina), ser sintetizados após estimulação celular (eicosanóides, citocinas e óxido nítrico – NO•) ou estar presentes no plasma, na forma de precursores, e ser formados ao atingir o sítio inflamatório (fatores do complemento e bradicinina) (COLLINS, 1999).

O edema induzido por carragenina é um fenômeno temporal e multimediado, que envolve a participação de uma diversidade de mediadores inflamatórios. Na primeira fase (1-2 h), aminas biogênicas como histamina e serotonina são responsáveis pelo desenvolvimento dos eventos vasculares e, na segunda fase (3-6 h) atuam citocinas como IL-1 e TNF- α , prostaglandinas e óxido nítrico que participam da amplificação da reação inflamatória (Di ROSA, 1971). Com base na natureza bifásica do edema induzido por carragenina e no efeito inibitório da fase tardia, tem sido relatado que a segunda fase deste edema é sensível a drogas antiinflamatórias utilizadas na prática clínica.

Foi possível perceber neste estudo que o edema de pata no rato não diabético (rato normal) apresentou um pico máximo 4 horas após a indução e que as patas voltaram ao volume basal em 48 horas.

Entretanto, o perfil da inflamação no rato diabético tem um padrão diferenciado no rato normal, uma vez que, o pico do edema foi deslocado de 4 para 24 horas e os ratos mantiveram edemas superiores aos dos ratos normais em todos os tempos estudados. Somado a isto, os edemas permaneceram por cerca de 30 dias, enquanto as patas com edemas dos ratos normais voltaram ao normal em 48 horas, conforme já citado.

Mesmo diante da exacerbação do edema no grupo diabético nas 24 horas após o estímulo com carragenina, os ratos tratados com a PTX, nas

doses de 50 e 100 mg/Kg, quando comparados aos ratos não tratados, tiveram redução dos seus edemas em 56,21% e 53,55% respectivamente.

As considerações acima são inovadoras no sentido de evidenciar uma amplificação do processo inflamatório no rato diabético quando comparado ao rato normal, mas ainda não permitem apontar o mecanismo exato através do qual a pentoxifilina exerce sua atividade antiedematogênica neste modelo.

Contextualiza-se para este resultado que as citocinas pró-inflamatórias ligadas a inflamação crônica e subclínica envolvidas no DM exacerbaram e prolongaram a resposta inflamatória envolvida no modelo de edema de pata induzido por carragenina, tal condição é evidenciada em pacientes diabéticos quando acometidos por processos inflamatórios ou infecciosos.

Pacientes diabéticos apresentam altos índices de mortalidades e morbidades, não somente devido ao aparecimento de lesões crônicas, mas também devido ao fato de serem mais susceptíveis a infecções. Existe forte correlação entre susceptibilidade a infecções e o controle glicêmico, portanto a falta de controle glicêmico com presença da cetoacidose está intimamente associada com a baixa resistência a infecções devidas em parte à deficiência nas funções de leucócitos (SUDHIR et al., 1983; TENNENBERG et al., 1999).

O aumento na produção de citocinas nos diabéticos é responsável pela inapropriada ativação do estado inflamatório e pode contribuir para aumentar a suscetibilidade de microrganismos invasivos (HATANAKA, et al, 2006).

Segundo HATANAKA et al (2007), neutrófilos e monócitos de pacientes diabéticos tem produção aumentada de citocinas pró-inflamatória: IL-8, TNF- α e IL-1 β podendo essas afetar o processo inflamatório. As funções de neutrófilos também são alteradas em diabéticos (MARHOFFER et al, 1994), resultando em uma série de alterações como, por exemplo, dificuldade no processo de cicatrização de feridas (BRUNNER; BLAKUTNY, 2004), o que os tornam mais susceptível ao desenvolvimento de úlceras, podendo resultar em amputação de membros (JEFFCOATE; HARDING, 2003).

6.7 Dosagens de Citocinas (TNF- α e IL-6) e Nitrito no homogenato das patas dos animais diabéticos com edema produzido por carragenina

6.7.1 Dosagens de TNF- α e IL-6

Dentre as várias vias celulares e moleculares que constituem a inflamação, algumas têm recebido grande atenção por sua relevância no estabelecimento da resposta inflamatória. Uma destas vias é iniciada pela estimulação de células endoteliais por citocinas pró-inflamatórias tais como Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), a interleucina-1 β (IL-1) e a interleucina-6. A exposição a estas citocinas pró-inflamatórias resulta na ativação da cascata que leva a produção dos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B e à indução dos genes que são controlados por eles, tais como genes para citocinas (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6), quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas indutíveis que produzirão mais mediadores inflamatórios (iNOS e COX-2)(WINYARD, 2003; CUNHA e cols., 2005).

Para elucidar a participação dessas citocinas no DM foi utilizado o homogenato das patas dos ratos diabéticos para o doseamento das citocinas TNF- α e IL-6. O grupo diabético tratado com a pentoxifilina na dose 50 mg/kg apresentou uma redução de 20 vezes o valor de IL-6 e reduziu pela metade o valor de TNF- α quando comparado ao controle diabético, confirmando os inúmeros estudos que mostram que a pentoxifilina é um potente inibidor de TNF- α , IL-1(b), IL-6 e outras citocinas pró-inflamatórias (NEUNER et al. 1994; NOEL et al. 2000; POLLICE et al. 2001; VENTURA et al. 2001). Neste ensaio a GLI5 também causou uma redução importante nos níveis de IL-6.

Para confirmar essa resposta foi realizado também o doseamento dessas citocinas no plasma dos animais diabéticos sem estímulo inflamatório adicional (ratos com diabetes induzido por aloxano e sem edema de pata). Os níveis de IL-6 apenas foram reduzidos pela glibenclamida quando comparados com o controle diabético. Entretanto é possível perceber que o erro da amostragem pode ter mascarado uma possível redução dos níveis de IL-6 nos ratos tratados por PTX. Por falha da metodologia (baixa sensibilidade do KIT) não foi realizado o doseamento do TNF α .

Mas o principal interesse nessa linha de investigação se deu em função de que algumas doenças metabólicas como o DM2 apresentam um componente inflamatório evidente. No início da DM2, a reação inflamatória resulta em um aumento da citocina TNF- α (fator de necrose tumoral) e das

interleucinas 1 β (IL1 β) e 6 (IL6) que apresentam uma inter-relação com as proteínas de fase aguda (ROMANO et al., 2001). Com a evolução da doença, a persistência dessas proteínas em níveis acima do normal representa um estado de inflamação crônica leve, que poderia ser um dos fatores responsáveis pela aterosclerose acelerada desta população (SCHALKWIJK et al., 1999; HAYAISHI-OKANO *et al.*, 2002).

A inflamação crônica contribui para o desenvolvimento de doenças crônicas do diabetes tipo II (PICKUP; CROOK, 1998) e é também considerada a chave para o desenvolvimento da resistência a insulina por aumentar os níveis de TNF- α , conhecido por inibir parcialmente a ação da insulina (DANDONA et al., 2004).

A alta produção de citocinas pró-inflamatórias em pacientes diabéticos tem sido responsável pela caracterização do estado inflamatório e a predominância desse estado inflamatório está correlacionada com o desenvolvimento das complicações crônicas do diabetes.

A doença renal diabética (DRD) está associada com aumento da morbidade e mortalidade, principalmente em relação às complicações cardiovasculares. A relevância da inflamação na patogênese da DRD foi investigada nos últimos anos, e tem sido mostrado que os marcadores inflamatórios são maiores em pessoas com DRD em comparação com a população em geral.

Alguns estudos indicam que a inflamação mediada por citocinas proinflamatórias participa da progressão da nefropatia diabética e que o tratamento com a pentoxifilina produziu uma regressão e prevenção na progressão na lesão renal do paciente diabético (LEYVA-JIMÉNEZ et al., 2009).

Por suas ações hemorreológicas, antiinflamatórias e imunomoduladoras, a pentoxifilina melhora o fluxo sanguíneo e a disfunção renal e seu uso em período curto resultou em diminuição de proteinúria e microalbuminúria em diabéticos, com resposta comparada ao captopril em indivíduos não-hipertensos e diabéticos (RODRIGUÉZ-MORAN & GUERRERO MORENO, 2008; DAN SHAN et al., 2012).

6.7.2 Dosagens de Nitrito

Na determinação de nitrito em patas de animais diabéticos, tratados ou não, foram encontradas algumas discrepâncias importantes, embora a PTX na dose 100 mg/Kg tenha reduzido, de forma significativa, a liberação de nitrito tecidual em 25,09%, os resultados para PTX 50 mg/Kg foram elevados, o que pode ser atribuído ao pequeno tamanho da amostra.

Entretanto, na determinação sérica de nitrito nos ratos diabéticos, obteve-se uma importante redução dose-efeito da pentoxifilina. A ação da PTX sobre os níveis de nitrito evidencia sua ação como inibidora do estresse oxidativo.

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar as anormalidades estruturais e funcionais associadas à exposição prolongada dos tecidos vasculares à hiperglicemia. O aumento da atividade da via dos polióis, a glicação não-enzimática das proteínas com a produção dos produtos finais da glicação avançada (AGEs – do inglês, *Advanced Glycated End-Products*), o estresse oxidativo com o aumento dos radicais livres e as alterações da proteína kinase C, são mencionados na literatura como os principais mecanismos envolvidos nas disfunções endoteliais e na aterogênese, que precedem as graves complicações vasculares presentes no paciente diabético (SCHALKWIJK, 2005).

As células β pancreáticas expostas à hiperglicemia também produzem EROs (espécies reativas de oxigênio). Devido ao fato de células β serem sensíveis ao estresse oxidativo, o excesso de EROs pode causar disfunção dessas células (SAKURAI & OGISO, 1994), o que parece ocasionar depleção de glutathiona pancreática (GSH), que é vista em ratos diabéticos induzidos por aloxano (MOUSTAFA, 1998). A depleção dessas pode alterar o status redox das células pancreáticas podendo prejudicar a síntese de insulina e/ou disfunção severa das células pancreáticas além de conduzir a complicações diabéticas (ALTOMARE et al., 1997).

As moléculas reativas desempenham papéis fundamentais como segundos mensageiros intracelulares. Contudo, quando as suas concentrações excedem a capacidade de eliminação, através da rede antioxidante endógena, verifica-se um estado de estresse oxidativo. A literatura científica declara

atualmente que a formação de radicais livres (normalmente dependentes do oxigênio e do nitrogênio), é um fator importante no início e no desenvolvimento da diabetes e suas complicações.

Investigações realizadas nos últimos anos sugerem que o estresse oxidativo funciona como um elo entre um estado hiperglicêmico e as características patofisiológicas típicas associadas ao início e à progressão das complicações mais tardias do DM2 (LOPES et al, 2008).

Desta forma, o uso de antioxidantes pode ser relevante no que concerne à prevenção da ativação destas vias de sinalização. Além disso, a identificação da base molecular para a proteção conferida por uma variedade de antioxidantes, contra o dano oxidativo, poderá levar à descoberta de alvos farmacológicos para novas terapias, permitindo a prevenção, reversão ou atraso do início desta patologia (LOPES et al, 2008).

Alguns estudos indicam o tratamento do DM com antioxidantes (AGARDH *et al.*, 2002; KOCIC *et al.*, 2002). Resultados mostraram que ratos com diabetes induzido por aloxano, quando tratados com zinco, foram protegidos contra o dano oxidativo, melhorando o transporte de glicose e mantendo o potencial redox através da restauração dos níveis de glutathione (MOUSTAFA, 2003).

Outros autores têm descrito que o efeito benéfico da pentoxifilina no espermatozóide humano pode ser mediado pela neutralização das reações formadoras de radicais de oxigênio reativo (YOVICH et al., 1990 e 1993).

Terapias usando a pentoxifilina causaram um significativo aumento dos níveis hepáticos de glutathione peroxidase (GSH-Px) nos animais diabéticos tratados, quando comparados com os não tratados com a pentoxifilina. A glutathione peroxidase é conhecida por sua condição protetora sobre tecidos danificados por radicais livres. A atividade aumentada de GSH-Px pode estar ligada a uma resposta compensatória decorrente do estresse oxidativo, ocasionada pela produção de peróxido de hidrogênio endógeno nos tecidos de ratos diabéticos.

Pacientes com DM1 e DM2 apresentam além de estresse oxidativo aumentado, alterações do fator de crescimento epidérmico, a PTX é um redutor do fator de crescimento epidérmico, decorrente da inibição de

fosfodiesterases e da peroxidação lipídica (PL), reduzindo assim a lesão celular resultante da ação de radicais livres (RADFAR, 2005).

6.8 Avaliação do peso e da mortalidade dos ratos diabéticos

O estudo também objetivou avaliar a mortalidade e os parâmetros clínicos dos animais diabéticos, tratados ou não. Os animais que compuseram o grupo diabético evoluíram com parâmetros clínicos compatíveis com o diabetes, tais como polifagia, polidipsia e poliúria.

Na primeira semana ocorreu uma redução de peso em praticamente todos os grupos sendo mais acentuada no grupo diabético induzido não tratado, neste período percebeu-se também uma maior mortalidade dos grupos, ocorrida após as 24 horas da indução do diabetes com aloxano, seguindo a partir daí com mortes eventuais. Fato que atribuído a brusca hipoglicemia inicial decorrente da liberação maciça de insulina das células beta destruídas e a posterior hiperglicemia severa pela ausência da insulina.

Após três meses de tratamento obteve-se o seguinte quadro de perdas e ganhos ponderais; os grupos tratados com PTX50 e PTX5+GLI2 com ganhos importantes de peso e ao contrário grupos não tratados, MET5 e PTX5+MET5 com perdas significativas de peso, não existindo diferenças estatísticas entre estes dois grupos.

Não existem relatos científicos de ganho de peso com o uso da pentoxifilina, todavia é conhecido que o ganho de peso é um importante efeito colateral da glibenclâmida, e que mesmo numa condição de subdose, quando associada a pentoxifilina, mostrou um importante ganho ponderal e resultados glicêmicos normais ou próximos da normalidade, ações provenientes do sinergismo já citado nesta pesquisa. Enquanto a associação da metformina com a pentoxifilina foi acompanhada de significativa redução do peso corporal e altos níveis glicêmicos.

Ao término do experimento, quando os animais foram sacrificados, foi possível visualizar nitidamente uma importante perda de massa muscular dos animais diabéticos não-tratados (grupo placebo), dos animais tratados com MET5 e PTX5+MET5 quando comparados aos animais tratados com PTX50 e

PTX5+GLI2. Pode-se também observar um menor crescimento dos animais diabéticos não-tratados em relação aos grupos tratados com GLI e PTX.

6.9 Avaliação Histopatológica do pâncreas, fígado e rins

A análise histopatológica das amostras de fígado, de rins e de pâncreas revelou uma tendência a normalização destes órgãos após tratamentos por três meses com PTX5+GLI2, enquanto que os animais não tratados ou aqueles tratados com PTX5+MET2 apresentaram danos acentuados nesse órgãos.

No pâncreas dos ratos diabéticos não tratados foram observadas poucas ilhotas de Langerhans, em meio a escasso tecido conjuntivo frouxo intersticial, tal fato corrobora com alguns autores que dizem que no pâncreas ocorre a destruição seletiva e parcial das células beta com redução no tamanho e número das ilhotas pancreáticas (BAILEY *et al.*, 1944; SCHOSSLER *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2008).

Os eventos deletérios nas ilhotas de Langherans no pâncreas, associados à instalação natural do DM1 são: redução no número e no tamanho das ilhotas, infiltração leucocitária nas ilhotas, degranulação das células beta, refletindo a depleção da insulina armazenada nas células já lesadas. No DM2, pode haver uma redução sutil na massa de células da ilhota, substituição amilóide (composto de fibrilas de amilina derivadas das células beta) das ilhotas, deposição de substância amorfa rosada, que surge nos capilares e ao redor deles, bem como entre as células. Nos estágios avançados as ilhotas podem estar praticamente obliteradas e, além disso, pode haver fibrose, quase sempre observada nos casos de longa duração do DM2 (COTRAN *et al.*, 2000).

Nos rins dos ratos diabéticos não tratados foram identificadas microsecções mostrando uma estrutura glomerular mantida, porém alguns com moderada hipocelularidade, vacuolização isomérica do epitélio tubular, células inflamatórias no espaço intertubular e congestão vascular.

A notável toxicidade de aloxano para as células β das ilhotas de Langerhans é acompanhada por dano nos túbulos renais o qual pode ser devido à sensibilidade desse tecido para o aumento da concentração da droga durante a excreção. As lesões são comparadas ao veneno mercurial

(HOUSSAY *et al.*, 1946), sendo que nos primeiros quatro dias após administração de aloxano, as lesões renais ficam mais evidentes. Se a morte por uremia não ocorrer, as lesões são reversíveis, um fato pelo qual os rins diferem das ilhotas de Langerhans (HOUSSAY *et al.*, 1946).

Nos fígados dos ratos diabéticos não tratados ocorreu uma dilatação da veia centrolobular e do espaço porta; hemorragia sinusoidal e presença de pigmentos de hemossiderina que podem ser decorrentes de uma hemorragia.

Esses achados indicam que o diabetes experimental provoca modificações deletérias, a longo prazo, nestes órgãos, que incidem negativamente na sobrevivência dos animais. Tais condições podem estar ligadas ao processo inflamatório e ao estresse oxidativo correlacionados a esta patologia.

Nos pâncreas dos animais tratados com a PTX 50 mg/Kg e GLI 2 mg/Kg observa-se a presença de muitas ilhotas de Langerhans, mas com algumas células substituídas por material amorfo hialino, que pode se tratar de uma substituição das células β pancreáticas que foram destruídas pela ação do aloxano.

Já nos animais tratados PTX5+GLI2 as ilhotas de Langerhans aparecem com aspecto normal, processo certamente decorrente da recuperação ou renovação das células beta pancreáticas. A renovação das células beta no pâncreas tem sido largamente estudada. Vários produtos naturais e sintéticos promovem regeneração das células beta pancreáticas após a administração do aloxano (GHOSH; SURYAWANSHI, 2001). As células do fígado, entre outras alterações, mostraram discreto aumento dos hepatócitos, todavia sem comprometimento de suas funções. Nos rins a estrutura glomerular foi mantida, porém com discreta hipocelularidade, condições provenientes da instalação do diabetes nas primeiras 48 horas.

Um estudo recente mostrou que a pentoxifilina melhorou a regeneração do fígado após ressecção de 70% do parênquima hepático, ação atribuída a redução sérica das citocinas TNF- α e IL-6 (MARTINO *et al.*, 2010).

Os ratos tratados com MET5 ou com a associação PTX5+MET5 apresentaram raras ilhotas de Langerhans, sendo as mesmas desorganizadas e com denso infiltrado de células inflamatórias mononucleares.

Tais achados confirmam que a pentoxifilina foi capaz de proteger o pâncreas, o fígado e os rins da citotoxicidade produzida pelo aloxano e também minimizar os danos ocasionados pela hiperglicemia ocasionada por este modelo experimental. Os ratos tratados com a associação PTX5+GLI2 apresentaram ilhotas em condições equiparadas com os ratos normais, tal condição nos permite falar que esta associação conseguiu reverter os danos causados pelo diabetes experimental, o que pode ser uma ação protetora dessa xantina sobre processos como; estresse oxidativo, inflamatória, resistência insulínica e glicação de proteínas.

Sugere-se assim, que os efeitos hipoglicemiante e hipo-trigliceridêmico da PTX, aqui demonstrados, podem está correlacionado com sua ação sobre o estresse oxidativo e sobre a *low grade inflammation*, o que torna a PTX um importante alvo terapêutico para o manejo do *diabetes mellitus* na clínica, estudos ainda favorecidos pelo fato da PTX já ser uma droga há longo tempo utilizada para o tratamento de doenças vasculares, de grande segurança e com poucos efeitos colaterais.

7.0 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Pentoxifilina (PTX) apresentou efeito hipoglicemiante e hipotrigliceridêmico, em animais com diabetes induzido por aloxano, nas doses 5, 25, 50 e 100 mg/Kg.

A administração oral da associação PTX5 + GLI2 causou reduções significativas nos níveis plasmáticos de glicose e triglicerídeos em curto e longo prazo, evidenciando que o mecanismo de ação da PTX pode ser explicado via canais de K⁺ ATP- dependentes.

A administração oral da associação de PTX5 + MET5 ocasionou uma redução da hiperglicemia apenas a longo prazo, todavia menos significativa quando comparada com a associação PTX5+GLI2, indicando não partilharem o mesmo mecanismo de ação.

A PTX, na dose de 50 mg/Kg, não bloqueou a hiperglicemia induzida pelo diazóxido, sugerindo que outros fatores, além do bloqueio de canais de K⁺-ATP dependentes, podem estar envolvidos.

A redução nos valores de hemoglobina glicada (A1C) e de frutossamina mostraram que o tratamento com PTX50 e com a associação PTX5+GLI2 melhorou o controle glicêmico dos animais em estudo.

A PTX mostrou um marcante efeito antiinflamatório melhorando o estado geral dos ratos em experimentação:

- Reduziu, de forma significativa, nas doses de 50 e 100 mg/Kg, a formação do edema de pata nos ratos diabéticos em todos os tempos avaliados.

- Os níveis de TNF- α e IL-6 aumentaram de modo significativo após a indução do edema de pata nos ratos diabéticos quando comparados com os ratos normais com edema, entretanto nos ratos diabéticos tratados com PTX os

níveis teciduais destas citocinas mostraram-se significativamente mais baixos, o que fala a favor de uma evidente ação antiinflamatória da PTX.

A PTX exerce um efeito protetor generalizado diminuindo a mortalidade dos animais que foram tratados com aloxano.

A PTX mostrou um importante efeito antioxidante reduzindo, de forma significativa, as liberações de nitrito tecidual e sérica, além das reduções, já citadas, de hemoglobina glicada e frutossamina, atuando favoravelmente nas enzimas antioxidantes e reduzindo a formação de radicais livres.

O tratamento prolongado com PTX foi eficaz em manter o padrão normal do pâncreas nos grupos diabéticos tratados com PTX50 e com PTX5+GLI2, enquanto os estudos histológicos mostraram que o pâncreas dos ratos diabéticos não tratados ou tratados com associação PTX5+MET5 apresentaram poucas ilhotas de Langerhans, presença de tecido conjuntivo intersticial frouxo e presença de vasos sanguíneos dilatados e ectásicos. Indicando uma ação protetora da PTX contra a citotoxicidade induzida pelo aloxano.

Os efeitos hipoglicemiante e hipo-trigliceridêmico da PTX, aqui demonstrados, podem está correlacionado com sua ação sobre o estresse oxidativo e sobre a *low grade inflammation*, o que torna a PTX um importante alvo terapêutico para o manejo do *diabetes mellitus* na clínica.

Mostrou-se ainda que a PTX aumenta a relação IL-10/TNF-alfa (Visser et al., 2009) o que poderia ser um mecanismo de proteção para o desenvolvimento do diabetes e explicar em parte os resultados encontrados.

Contudo, a realização de ensaios clínicos bem desenhados e em larga escala não poderão ser descartados para a extrapolação dos dados experimentais para a clínica (*Translational Medicine*) de modo seguro e eficaz.

REFERÊNCIAS

ABE, M.; MATSUMOTO, K. Glycated Hemoglobin or Glycated Albumin for Assessment of Glycemic Control in Hemodialysis Patients With Diabetes? **Nat ClinPractNephrol.**, v.4, p.482-483, 2008.

ADAMIEC, J.; OFICJALSKA-MLYNCZAK, J. Contribution of selected cellular adhesion molecules and proinflammatory cytokines in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. **PrzeplLek.**, 64:389-92, 2007.

AGARDH, C.D. *et al.* Effects of inhibition of glycation and oxidative stress on the development of diabetic nephropathy in rats. **J Diabetes Complications.**, v.16, n. 6, p.395-400, 2002.

AGUIRRE, V.; UCHIDA, T.; YENUSH, L. *et al.* The c-Jun NH2-terminal kinasepromotes insulin resistance during association with insulin receptorsubstrate-1 and phosphorylation of Ser307. **J Biol Chem.**, 275(12):9047–9054, 2000.

ALTOMARE, E. *et al.* Oxidative protein damage in human diabetic eye. Evidence of a retinal participation. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 27, n. 2, p.141-147, 1997.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008. Fructosamine Test. Disponível em: http://professional.diabetes.org/Disease_Backgrounder.spx?TYP=6&MID=262. Acesso em: 21 de novembro de 2010.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Screening for type 2 diabetes. **Diabetes Care.**, v. 26, p. S21-S24, 2003.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care for diabetes. **Diabetes Care.**, v.17, p.1514-1522, 2007.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Position Statement. Standards of Medical Care for Patients with Diabetes *mellitus*. **Diabetes Care.**, v. 22, p. S32-S41, 1999.

ANGELKORT, B.; MAURIN, N.; BOATENG, K. Influence of pentoxifylline on erythrocyte deformability in peripheral occlusive arterial disease. **Curr Med Res Opin.**, v.6, n.4, p.255-258, 1979.

ANTUNES, A.S.; TEIXEIRA, M.C.B.; JÚNIOR, A.G. Efeitos da pentoxifilina na anemia resistente à eritropoetina em pacientes sob hemodiálise. **Rev. bras. hematol. Hemoter.**, v.30; n.4; p.303-308, 2008.

ARNER, P.; LITHELL, H.H.; WAHRENBERG, H.; BRONNEGARD, M. Body composition and obesity. **Journal of Lipid Research**, v.32, p. 423-429, 1991.

BAIOG, Z.; KIEPAC, R.; ROSIC, S.; JUKIC-LESINA, T. Alloxan induced cataract in a rat. **Coll Antropol.** 25:43-6, 2001.

BARON S. H. Salicylates as hypoglycemic agents. **Diabetes Care.**, 5(1):64–71, 1982.

BARZILAY, J.; FREEDLAND, E. Inflammation and its association with glucose disorders and cardiovascular disease. **Treat Endocrinol.**, v.2; n.2; p.85-94, 2003.

BASTA, G.; SCHIMIDT, A.M.; DE CATERINA, R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. **Cardiovasc Res.**, v.63, n.4, p. 582-592, 2004.

BASTARD, J.P, BASTARD, J.P.; MAACHI, M.; LAGATHU, C.; KIM, M.J.; CARON, M.; VIDAL, H.; CAPEAU, J.; FEVE, B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation and insulin resistance. **Eur. Cytokine Netw.**, v.17; n.1, p.4-12, 2006.

BAUD, V.; KARIN M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. **Trends Cell Biol.**, 11(9):372–377, 2001.

BEARDSALL, K.; YUEN, K.; WILLIAMS R., DUNGER, D. Applied physiology of glucose control. **Current Paediatrics.**v. 13, p. 543-548, 2003.

BELL Jr., R.H.; HYE, R.J. Animal models of diabetes *mellitus*-physiology and pathology. **J. Surg. Res.**, v. 35, p.433-460, 1983.

BELLOMO, G., *et al.* Auto antibodies against oxidatively modified low density lipoproteins in NIDDM. **Diabetes.**, v. 44; p. 60-66, 1991.

BELLOMO, G.; MAGGI, E.; POLLI, M.; AGOSTA, F.; G, BOLLATI, P.; FINARDI, G. Auto antibodies against oxidatively modified low density lipoproteins in NIDDM. **Diabetes**, v. 44, p.60-6, 1994.

BERG, A.H.; COMBS, T.P.; SCHERER, P.E. ACRP30/adiponectin: An adipokine regulating glucose and lipid metabolism. **Trends Endocrinology Metabolism.**, v. 13; p. 84-89, 2002.

BERNARD, C.; BARNIER, P.; MERVAL, R.; ESPOSITO, B.; TEDGUI, A.. Pentoxifylline selectivity inhibits tumor necrosis factor synthesis in the arterial wall. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 25, suppl. 2, p.: S30 – S33, 1995.

BESSLER, H.; GILGAL, R.; DJALDETTI, M.; ZAHAVI, I. Effect of pentoxifylline on the phagocytic activity, cAMP levels, and superoxide anion production by monocytes and polymorphonuclear cells. **J Leukocyte Biol.**, 40:747-54, 1986.

BIESSELS, G.J.; GISPEN, W.H. The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models? **Neurobiology Aging.**, v. 26, p. 36-41, 2005.

BOLDT, J.; BROSCH, C.; LEHMANN, A.; HAISCH, G.; LANG, J.; ISGRO, F. Prophylactic use of pentoxifylline on inflammation in elderly cardiac surgery patients. **Ann Thorac Surg.**, v.71,n.5, p.1524-9, 2001.

BOLDT, J.; BROSCH, C.; PIPER, S. N.; SUTTNER, S.; LEHMANN, A.; WERLING, C. Influence of prophylactic use of pentoxifylline on postoperative organ function in elderly cardiac surgery patients. **Crit Care Med.**, v.29, n.5, p.952-8, 2001.

BONORA, E. *et al.* Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. **Diabetes Care.**, v.23, n.1, p.57-63, 2000.

BONORA, E.; KIECHL, E.; WILLEIT, J.; OBERHOLLENZER, F.; EGGER, G.; TARGHER, G.; ALBERICHE, M.; BONADONNA, R.; C.; MUGGEO, M. Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders: the Bruneck study. **Diabetes.**, v.47, n.10, p.1643-9, 1998.

BOQUIST, L. The endocrine pancreas in early alloxan diabetes. Including study of the alloxan inhibitory effect of feeding and some hexoses. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, Copenhagen.**, v. 85, n. 2, p. 219-29, 1977.

BOULOUMIÉ, A.; SENGENÈS, C.; PORTOLAN, G.; GALITZKY, J.; LAFONTAN, M. Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. **Diabetes.**, v.50, p. 2080-6, 2001.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature.**, v.414, p.813-820, 2001.

BRUNNER G, BLAKUTNY R. Extracellular regulation of TGF- β activity in wound repair: growth factor latency as a sensor mechanism for injury. **Throm Haemost.**, 92:253-261, 2004.

BRY, L.; CHEN, P. C.; SACKS, D. B. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assay for glycohemoglobin. **ClinChem.**, v. 47, p. 153-163, 2001.

BULLÓ, M.; CASAS-AGUSTENCH, P.; AMIGÓ-CORREIG, P.; ARANCETA, J.; SALAS-SALVADÓ, J.. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. **Public Health Nutr.**, v. 10; p. 1164-1172, 2007.

CABALLERO, A.E. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. **Obesity Res.**, v.11; p. 1278-1289, 2003.

CARVALHO, M.N.; COLAÇO, L.A.; FORTES, B.Z. Citocinas, disfunção endotelial e resistência a insulina. **Arq Brás endocrinol Metab.**, v. 50; p. 304-312, 2006.

CERIELLO, A. Post prandial hyperglycemia and cardiovascular complications of diabetes. **JournAnnuDiabetol Hotel Dieu.**, v.54, n.1, p.75-8, 2006.

CHARRIÈRE, G.; COUSIN, B.; ARNAUD, E.; ANDRÉ, M.; BACOU, F.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. **J.Biol. Chem.**, v. 278, p.9850-5, 2003.

CNOP, M.; WELSH, N.; JONAS, J.C.; JORNS, A.; LENZEN, S. Mechanism of: Pancreatic -Cell Death in Type 1 and Type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 54, p. 97-107, 2005.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: Robbins pathologic basis of cardiomyopathy. **Lancet.**, v.351, n.9109, Apr 11, p.1091-3, 1998.

COOPER, A.; MIKHAIL, A.; LETHBRIDGE, M.W.; KEMENY, D.M.; MACDOUGALL, I.C. Pentoxifylline improves hemoglobin levels in patients with erythropoietin-resistant anemia in renal failure. **J Am Soc Nephrol**, v.15; n.7, p.1877-1882, 2004.

COPPACK, S.W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. **Proc Nutr Soc.**, 60:349–356, 2001.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. ROBBINS: **Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1400p.

COUSIN, B.; MUNOZ, O.; ANDRE, M.; FONTANILLES, A.M.; DANI, C.; COUSIN, J.L.; LAHARRAGUE, P.; CASTEILLA, L.; PÉNICAUD, L. A role for preadipocytes as macrophage-like cells. **FASEB J.**, v.13, p.305-312, 1999.

CURTIS, G.W; ROBBINS, S.L.; GLICKMAN, I. Studies on glycogen nephrosis in alloxan-treated diabetic rats. **The J. of Exper. Med.**, v. 85, p. 373-379, 1974.

D'HELLENCOURT, C. L.; DIAW, L.; CORNILLET, P.; GUENOUNOU, M. Differential regulation of TNF alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, TNF beta, and IL-10 by pentoxifylline. **Int J Immunopharmacol.**, v.18, n.12, Dec, p.739-48, 1996.

DAILYMED Current Medication Information.PENTOXIFYLLINE tablet, extended release.Disponível em:<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=18907>. Acessado no dia 06 de abril de 2011.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends Immunol.**, v. 25; p. 4-7, 2004.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; CHAUDHURI, A.; MOHANTY, P.; GARG, R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. **Circulation.**, 111(11):1448-54, 2005.

DATASUS, 2009.Disponível em:
http://tabnet.datasus.gov.br/tabdata/cadernos/CE/CE_Juazeiro_do_Norte_Geral.xls.Acessado no dia 22 de Abril de 2011.

DATASUS, 2012. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?ibge/cnv/popbr.def> > Acessado no dia 17 de Fevereiro de 2012.

DAVIS, S.N. Insulina, Agentes hipoglicemiantes orais e a Farmacologia do pâncreas endócrino. In: **GOODMAN e GILMAN**. As bases Farmacológicas da Terapêutica. 1º ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006, 1848 p.

DCCT RESEARCHGROUP. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **New Eng.J.Med.**, v. 329, p. 977-86, 1993.

DE PROST, D.; OLLIVIER, V.; HAKIM, J. Pentoxifylline inhibition of procoagulant activity generated by activated mononuclear phagocytes. **Mol Pharmacol.**, v.38, n.4, Oct, p.562-6, 1990.

DUFF, G.L; STARR, H. Experimental alloxan diabetes in hooded rats. Proc. Soc. Exper. **Boil. and Med.**, v. 57, p.280-282, 1944.

DUFFY, E. Alloxan diabetes in the rabbit. **J Path and Bact.**, v. 57, n. 2, p. 199-212, 1945.

EIZIRIK, D. L.; SANDLER, S.; PALMER, J. P. Repair of pancreatic β -cells: a relevant phenomenon in early IDDM? **Diabete.**, v.42, p.1383-1391, 1993.

ELLIOT D. A.; NELSON RW, REUCH CE, et al: Comparison of serum fructosamine and blood glycosylated hemoglobin concentrations for assessment of glycem control in cats and dogs with diabetes mellitus. **JAVMA** **214 (12):** 1794-1798, 1999.

ENGERMAN, R., FINKESLSTEIN, D., AGUIRRA, G. et al. Ocular complications. **Diabetes.**, v.31, p.82-88, 1982.

ENOKSSON, S.; DEGERMAN, E.; HAGSTRÖM-TOFT, E.; LARGE, V.; ARNER, P. Various phosphodiesterase subtypes mediate the in vivo antilipolytic effect of insulin on adipose tissue and skeletal muscle in man. **Diabetologia.**, v. 41; p. 560-568, 1998.

FAROOQI, I.S., et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. **J Clin Invest.**, v. 110; p. 1093 –1103, 2002.

FERNANDES, G., et al. Immune response in the mutant diabetic C57BL/Ks-dt+ mouse. Discrepancies between *in vitro* and in vivo immunological assays. **J. Clin. Invest.**, v. 61; p. 243-250, 1978.

FERREIRA, S.R.; CESARINI, P.R.; VIVOLO, M.A.; ZANELLA, M.T. Abnormal nocturnal blood pressure fall in normotensive adolescents with insulin-dependent diabetes is ameliorated following glycem improvement. **Braz J Med Biol Res.**, 31:523-528, 1998.

FESTA, A.; D'AGOSTINO, J.R.; WILLIAMS, K.; KARTER, A.J.; MAYER-DAVIS, E.J.; TRACY, R.P.; HAFFNER, S.M. The relation of body fat mass and distribution to marker of chronic inflammation. **Int J Obes.** 25:1407-15, 2000.

FORD ES. Body mass index, diabetes, and C-reactive protein among US adults. **Diabetes Care.**, v.22, n.12, p.1971-7, 1999.

FRAMPTON, J.E.; BROGDEN, R.N. Pentoxifylline (oxpentifylline). A review of its therapeutic efficacy in the management of peripheral vascular and cerebrovascular disorders. **Drugs Aging.**, v.7, n.6, p.480-503, 1995.

FROHLICH et al. Association between C-Reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study. **Diabetes Care.**, v. 23, p.1835-9, 2000.

FUKUHARA, A.; MATSUDA M.; NISHIZAWA, M.; SEGAWA, K.; TANAKA, M.; KISHIMOTO, K, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. **Science.**, 307(5708):426-30, 2005.

GANNON, M. Molecular genetic analysis of diabetes in mice. **Trends in Genetics.**, v.17, n.10, Oct., p.S23-S28, 2001.

GAVELLA, M., LIPOVAC, V., & MAROTTI, T. Effect of pentoxifylline on superoxide anion production by sperm. **International Journal of Andrology**, 14, 320-327, 1991.

GERICH J, E. Determinación del índice de resistencia insulínica mediante HOMA em una población de la Región Metropolitana de Chile. **Endocrinology.**, v. 19, p. 477-490, 1998.

GHOSH, S. AND SURYAWANSHI, S.A. Effect of Vincarosea extracts in treatment of alloxan diabetes in male albino rats. **Ind. J. Exp. Biol.**, 39: 748-759, 2001.

GIUGLIANO, D.; CERIELLO, A.; PAOLISSO, G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. **Diabetes Care.**, 19:257-67, 1996.

GOLDIN, A.; BECKMAN, J.A.; SCHMIDT, A.M.; CREAGER, M. A. Advanced glycation end products. Sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation.**, v.114, n. 6, p.597-605, 2006.

GOMES, R. J. *et al.* Efeitos do treinamento de natação em aspectos metabólicos e morfológicos de ratos diabéticos. **Motriz.**, v. 14, n. 3, p. 320-328, 2008.

GREENBERG, A.S.; MCDANIEL, M.L. Identifying the links between obesity, insulin resistance and beta-cell function: potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Eur J Clin Invest.**, v. 32, n. 3, p.24-34, 2002.

GRIBBLE, F.M.; REIMANN, F. Differential selectivity of insulin secretagogues. Mechanisms, clinical implications, and drug interactions. **Journal of Diabetes and Its Complications.**, v.15, p. 11-15, 2003.

GRUPO INTERDISCIPLINAR DE PADRONIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA – A1C: atualização sobre hemoglobina glicada (a1c) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. **Posicionamento Oficial**, 3ª edição, 2009.

GUSTAVSSON, C.; AGARDH, C.D.; HAGERT, P.; AGARDH, E. Inflammatory markers in nondiabetic and diabetic rat retinas exposed to ischemia followed by reperfusion. **Retina.**, 4:645-52, 2008.

GUYTON, A. C. **Fisiologia humana**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

HALL, J. E. Insulina, glucagon e diabetes *mellitus*. In: _____. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. Cap 78.

HATANAKA, E.; MONTEAGUDO, P.T.; MARROCOS, M.S.M.; CAMPA, A. Interaction between serum amyloid A and leukocytes-A possible role in the progression of vascular complications in diabetes. **Immunol Lett.**, 108:160–166, 2007.

HATANAKA, E.; MONTEAGUDO, P.T.; MARROCOS, M.S.M.; CAMPA, A. Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes. Journal compilation. **Clin Ex Immunol.**, 146:443–447, 2006.

HAYAISHI-OKANO, R.; YAMASAKI, Y.; KATAKAMI, N.; OHTOSHI, K.; GOROGAWA, S.; KURODA, A.; MATSUHISA, M.; KOSUGI, K.; NISHIKAWA, N.; KAJIMOTO, Y.; HORI, M. Elevated C-reactive protein associates with early-stage carotidatherosclerosis in young subjects with type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v.25, n.8, p.1432-8, 2002.

HEIKKILA, R.E.; WINSTON, G. C.; BARDEN, H. **Biochem Pharmacol.**, v. 25, p. 1085-1092, 1976.

HENDERSON, B.; POOLE, S.; WILSON, M. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. **Microbiol Ver.**, 60:316-341, 1996.

HENQUIN, J.C. Pathways in β -cell stimulus-secretion coupling as targets for therapeutic insulin secretagogues. **Diabetes.**, v. 53, p. 48-58, 2004.

HOTAMISLIGIL, G.S.; MURRAY, D.L.; CHOY, L.N., et al. Tumor necrosis factor α inhibits signaling from the insulin receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1994; v.91, p.4854-4858.

HOTAMISLIGIL, G.S.; PERALDI, P.; BUDAVARI, A.; ELLIS, R.; WHITE, M.F.; SPIEGELMAN, B.M. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine

kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. **Science.**, 271(5249): p. 665-8, 1996.

HOTAMISLIGIL, G.S.; SPIEGELMAN, B.M. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes. **Diabetes.**, v. 43, n.11, p.1271-8, 2004.

HOUSSAY, B.A.; BRIGNONE, R.F.; MAZOCCO, P. Alloxan and diabetes **Rev. Soc. Argent. Biol.**, v. 22, p.195-231, 1946.

HOWARD, G.; O'LEARY, D.H.; ZACCARO, D.; HAFFNER, S.; REWERS, M.; HAMMAN, R. et al. Insulin sensitivity and atherosclerosis: the insulin resistance atherosclerosis study (IRAS) investigators. **Circulation.**, v. 93, n.10, p.1809-1817, 1996.

HSUEH, W.A.; QUIÑONES, M.J. Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. **Am J Cardiol.**, v. 92; p. 10J-17J, 2003.

HUNDAL, R.S.; PETERSEN, K.F.; MAYERSON, A.B et al: Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. **J Clin Invest**, 109:1321-6, 2002.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes Atlas, 3^a Edition, 2007. Disponível em [http://www.diabetesatlas.org/sites/default/files/IDFDiabetesAtlas-2007\(3rdedition\).pdf](http://www.diabetesatlas.org/sites/default/files/IDFDiabetesAtlas-2007(3rdedition).pdf). Acessado no dia 06 de Abril de 2011.

JAWORSKI, J., et al. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. **J. Neurosci**, Vol. 25, 2005.

JEFFCOATE, W.J.; HARDING, K.G. Diabetic foot ulcers. **Lancet.**, v. 361, p. 1545 -1551, 2003.

JENSEN A.L.; AAES, H. Reference interval and critical difference for canine serum fructosamine concentration. *Veterinary Research Communications*, 16, 317-325, 1992.

JONASSON, O., JONES, C.W., BAUMAN, C. et al. The pathophysiology of experimental insulin - deficient diabetes in the monkey: implications for pancreatic transplantation. **Ann. Surg.**, v.201, p.27-39, 1985.

KADOGLOU NP, ILIADIS F, ANGELOPOULOU N, PERREA D, AMPATZIDIS G, LIAPIS CD, ALEVIZOS M. The anti-inflammatory effects of exercise training in patients with type 2 diabetes mellitus. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.**, 14:837-43, 2007.

KAHN, B.B.; FLIER, J.S. Obesity and insulin resistance. **J Clin Invest.**, v.106, n.4, p.473-81, 2000.

KAMPHUIS, J.; SMITS, P.; THIEN, T. Vascular effects of pentoxifylline in humans. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v.24, n.4, Oct, p.648-654, 1994.

KAYSER, V.; GUILBAUD, G. Local and remote modifications of nociceptive sensitivity during carrageenin-induced inflammation in the rat. **Pain.**, v. 28, n. 1, p. 99-107, 1987.

KILPATRICK, E.S. Haemoglobin A1C in the diagnosis and monitoring of diabetes *mellitus*. **Clinical Pathology.**, v. 61, p. 977 – 982, 2008.

KISLINGER, T., *et al.* N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. **J Biol Chem.**, v. 274; p. 31740–31749, 1999.

KISSEBAH, A.H.; SONNENBERG, G.E.; MYKLEBUST, J.; GOLDSTEIN, M.; BROMAN, K.; JAMES, R.G.; MARKS, J.A.; KRAKOWER, G.R.; JACOB, H.J.; WEBER, J., *et al.* Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. **Proc Natl Acad Sci.**, 97,14478–14483, 2000.

KLIBER, A.; SZKUDELSKI, T.; CHICHOLOWSKA, J. Alloxan stimulation and Subsequent inhibition of insulin release from insitu perfused rat pancreas. **J Physiol Pharmacol.**, v. 47, p. 321-328, 1996.

KOCIC, G.; DJORDJEVIC, V.; VLAHOVIC, P.; KOCIC, R.; PAVLOVIC, D. AND JEVTOVIC, T. Antioxidants modulate adenosine metabolism in rat mesangial cells cultured under high glucose conditions. **Ren. Fail.** 24(6): 691-701, 2002.

KREMSNER, P.G., *et al.* Pentoxifylline prevents murine cerebral malaria. **J Infect Dis.**, v.164, n.3, Sep, p.605-608, 1991.

KRUGER, A. *et al.* Short term oral pentoxifylline use increases choroidal blood flow in patients with age related macular degeneration. **Arch Ophthalmol.**, v. 116, n.1 p. 27 – 30, 1998.

KUANCY, YANG, D.D.; SAMANTA, ROY, D.R. *et al.* The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. **Neuron.**, 22(4):667–676, 1999.

LAPOLLA, A. *et al.* Enzymatic digestion and mass spectrometry in the study of advanced glycation and products/peptides. **J Am Mass Spectrom.**, v.15, p.496-509, 2004.

LE FLEM, G.; DUPRADEAU, F.; PUJOL, J.; MONTI, J.; BOGDANOWICZ, P. Synthesis, and functional properties of a modified human insulin A-chain: implication in a 'mini-insulin' structure determination. **Bioorganic and Medicinal Chemistry.**, v.10, p. 2111-2117, 2002.

LEAHY, J.L.; BUMBALO, L.M.; CHEN, C. Diazoxide causes recovery of beta-cell glucose responsiveness in 90% pancreatectomized diabetic rats. **Diabetes**, v.43, n.2, p.173-179, 1994.

LEE, J.; HENG, D.; CHIA, K.S.; CHEW, S.K.; TAN, B.Y.; HUGHES, K. Risk factors and incident coronary heart disease in Chinese, Malay and Asian Indian

males: the Singapore Cardiovascular Cohort Study. **Int J Epidemiol.**, v.30, n.5, p.983-988, 2001.

LEHRKE, MICHAEL; REILLY, MUREDACH P.; MILLINGTON, SEGAN C.; IQBAL, NAYYAR; RADER, DANIEL J.; LAZAR, MITCHELL A. An Inflammatory Cascade Leading to Hyperresistinemia in Humans. **Plos Med.**, v. 1; n. 2; p. e45, 2004.

LEHTO, S.; RÖNNEMAA, T.; HAFFNER, S.M.; PYÖRÄLÄ, K.; KALLIO, V.; LAAKSO, M. Dyslipidemia and hyperglycemia predict coronary heart disease events in middle – aged patients with NIDDM. **Diabetes.**, v. 46; p. 1354 – 1359, 1997.

LEI FENG, M.D.; MATSUMOTO, B.S.; ALLAN, M.D.; ANN SCHMIDT, M.D.; DAVID, M.; STERN, M.D.; JOHN PILE-SPPELLMAN, M.D. Chronic Vascular Inflammation in Patients With Type 2 Diabetes. **Diabetes Care.**, v.28, p.379-384, 2005.

LEI FENG, M.D.; MATSUMOTO, B.S.; ALLAN, M.D.; ANN SCHMIDT, M.D.; DAVID, M.; STERN, M.D.; JOHN PILE-SPPELLMAN, M.D. Chronic Vascular Inflammation in Patients With Type 2 Diabetes. **Diabetes Care.**, v.28, p.379-384, 2005.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia.**, Berlin, v. 51, p. 216–226, 2008.

LENZEN, S.; MIRZAIE-PETRI, M. Inhibition of glucokinase and hexokinase from pancreatic B-cells and liver by alloxan, alloxantin, dialuric acid, and t-butylhydroperoxide. **Biomed Res.**, 12, 297-307, 1991.

LENZEN, S.; MUNDAY, R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. **Biochemical Pharmacology.**, 42(7):1385-1391, 1991.

LERCO, M.M.; SPADELLA, C.T.; MACHADO, J.L.M.; SCHELLINI, S.A.; PADOVANI, C.R. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirurgica Brasileira.**, São Paulo, v.18, n.2, p.132-142, 2003.

LEVI, M.; TEN.; CATE, H. Disseminated intravascular coagulation. **N Engl J Med.**, v.16, n. 341(25), p.1937-8, 1999.

LEYVA-JIMENEZ, R.; RODRIGUEZ-OROZCO, A.R.; ORTEGA-PIERRES, L.E.; RAMIREZ-ENRIQUEZ, J.; GOMEZ-GARCIA, A.; ALVAREZ-AGUILAR, C. Efecto de la pentoxifilina sobre la evolucion de la nefropatia diabética. **Med Clin (Barc).**, v. 132, n. 20, p. 772–778, 2009.

LINO, C.S. Efeitos antidiabético, antioxidante, analgésico e antiinflamatório da fração solúvel em metanol e tiramina isolados de *Cissus Verticillata*. 2008. 190 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2008.

LOPES DE JESUS, C.C.; ATALLAH, A.N.; VALENTE, O.; MOÇA TREVISANI, V.F. Pentoxifilina para la retinopatía diabética (Revisión Cochrane traducida). En: La Biblioteca **Cochrane Plus**, 2008 Número 4. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de The Cochrane Library, 2008 Issue 3. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).

LOPES, *et al*, Stress oxidativo e seus efeitos na insulino-resistência e disfunção das células β -pancreáticas Relação com as Complicações da Diabetes *Mellitus* Tipo 2. **Acta Med Port.**, v. 21, n. 3, p. 293-302, 2008.

LOW, P.A.; NICKANDER, K.K.; TRITSCHLER, H.J. The roles of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy. **Diabetes.**, v.46, p.385-425, 1997.

MACDONALD, M.J.; SHAHIDI, N.T.; ALLEN, D.B.; LUSTIG, R.H.; MITCHELL, T.L.; CORNWE, L.L.S.T. Pentoxifylline in the treatment of children with new-onset type I diabetes mellitus. **JAMA**, v.271, n.1, p.27-28, 1994.

MAKOWSKI, L.; BOORD, J.B.; MAEDA, K.; BABAEV, V.R.; UYSAL, K.T.; MORGAN, M.A.; PARKER, R.A.; SUTTLES, J.; FAZIO, S.; HOTAMISLIGIL, G.S.; LINTON, M.F. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein a P2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. **Nat Med June.**, 7(6):699-705, 2001.

MAKOWSKI, L.; HOTAMISLIGIL, G.S. Fatty acid binding proteins-the evolutionary crossroads of inflammatory and metabolic responses. **J Nutr.**, v.134, n.9, p.2464S-2468S, 2004.

MALERBI, D.; FRANCO, L. Multicenter study of the prevalence of diabetes *mellitus* and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 Yr. **Diabetes Care**, 1992; v. 15, p.1509-16.

MANDELL, G.L. ARDS, neutrophils, and pentoxifylline. **Am Rev Respir Dis.**, v.138, n.5, Nov, p.1103-1105, 1988.

MARCA, M.C.; LOSTE, A.; RAMOS, J.J. Effect of acute hyperglycaemia on the serum fructosamine and blood glycated haemoglobin concentrations in canine samples. **Vet. Res. Commun.**, v. 24, p. 11-16, 2000.

MARHOFFER, W., *et al*. Monitoring of polymorphonuclear leukocyte functions in diabetes *mellitus*: a comparative study of conventional radiometric function tests and low-light imaging systems. **J Biolumin Chemilumin.**, v. 9, p. 165-170, 1994.

MARTINS, J.D; NERY, C.G.C.; PIANETTI, G.A.; VIANA-JÚNIOR, N.S.; VIANNASOARES, C.D. Glibenclamide determination by derivative ultraviolet spectrophotometry for test or dissolution profile assessment in tablets. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.**43: 63-70. 2007.

MCCORMICK, B.B.; SYDOR, A.; AKBARI, A.; FERGUSON, D.; DOUCETTE, S.; KNOLL, G.. The effect of pentoxifylline on proteinuria in diabetic kidney disease: a meta-analysis. **Am J Kidney Dis.**, v. 52, p.: 454 – 463, 2008.

MCKENZIE, K.K. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. **Fed Proc.**, v. 46, n. 1, p. 118-126, 1987.

MCLAUGHLIN, T.L.; REAVEN, G.M. Beyond type 2 diabetes: the need for a clinically useful way to identify insulin resistance. **Am J Med.**, v.114, n.6, p.501-502, 2003.

MCMILLAN, D.E. Increased Levels Of Acute-Phase Serum Proteins In Diabetes. **Metabolism.**, v.38, n.11, p.1042-6, 1989.

MELLO, K.F., *et al.* Immunomodulatory effects of oral antidiabetic drugs in lymphocyte cultures from patients with type 2 diabetes. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 47, n. 1, p. 43-48, 2011.

MELO, D.A.S. Comparação e análise da expressão do fator de ativação nuclear Kappa B (NFkB) e da eletrogastrografia em ratos normais e diabéticos. Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Departamento de Fisiologia, Porto Alegre, 2001.

MENDEZ, J. D.; RAMOS, H. G. Animals models in diabetes research. **Archives of Medical Research.**, v. (25) 4, p. 376-375, 1994.

MILLER, C. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha levels in adipose tissue of lean and obese cats. **J. Nutr.**, v.12, p.2751S:2752S, 1998.

MOORE, M.C.; CHERRINGTON, A.D.; WASSERMAN, D. H. Regulation of hepatic and peripheral glucose disposal. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.**, v. 17, p. 343-364, 2003.

MORDES, J. P.; ROSSINI, A. A. Animal models of diabetes. **Am. J. Med.**, v. 70, p. 353-360, 1981.

MORO, E.; GALLINA, P.; PAIS, M.; CAZZOLATO, G.; ALESSANDRINI, P.; BITTOLO-BOM, G. Hypertriglyceridemia is associated with increased insulin resistance in subjects with normal glucose tolerance: evaluation in large cohort of subjects assessed with the 1999 World Health Organization criteria for classification of diabetes. **Metabolism.**, v.52, n.5, p.616-9, 2003.

MORRIS, A.D. The reality of type 2 diabetes treatment today. **Int J Clin Pract Suppl.**, v.121, p.32-35, 2001.

MOUSTAFA, S.A. Effect of glutathione depletion on carbohydrate metabolism in the rat. **Res. Commun. Pathol. Toxicol.** v. 3, p. 55-64, 1998.

MOUSTAFA, S.A. Toxic effects of alloxan in the rat. Mechanism and protection with zinc. **The Egyptian Journal of Hospital Medicine.**, v. 10, p. 1-13, 2003.

MÜLLER R & LEHRACH F - Haemorrhological and cerebrovascular disease: multifunctional approach with pentoxifylline. **Current Med Res Opin.**, 7:253-63, 1981.

NATHAN, D.M. et al. Translating the A1C Assay Into Estimated Average Glucose Values. **Diabetes Care.**, v.31, p.1-16, 2008.

NAVARRO, J.F.; MORA-FERNÁNDEZ, C. The role of TNF- α in diabetic nephropathy: Pathogenic and therapeutic implications. **Cytok Growth Factor Rev.**, 17:441–450, 2006b.

NEEPER, M.; SCHMIDT, A.M.; BRETT, J.; YAN, S.D.; WANG, F.; PAN, Y.C.; ELLISTON, K.; STERN, D.; SHAW, A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. **J BiolChem**, v.267, p.14998–15004, 1992.

NESTO, R.W. Correlation Between Cardiovascular Disease and Diabetes *Mellitus*: Current Concepts. **Am. J. Med.**, v. 116; p. 115-225, 2004.

NESTO, R.W.; BELL, D.; BONOW, R.O.; FONSECA, V.; GRUNDY, S.M.; HORTON, E.S.; WINTER, M.L.; PORTE, D.; SEMENKOVICH, C.; SMITH, S.; YOUNG, L.H.; KAHN, R. Thiazolidine use, fluid retention and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. **Diabetes Care.** 27:256–263, 2004

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; MCCARTHY, S.; BETTERIDGE, D.J.; WOLFF, S.P. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. **Diabetes.**, v.44, p.1054-8, 1995.

OSBORNE, M.G. & CODERRE, T.J. Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 126, n.8, p.1840-1846, 1999.

PACKER, L.; RÖSEN, P.; TRITSCHLER, H.J.; KING, G.L.; AZZI, A. Antioxidants in diabetes management.? ed.New York: Marcel Dekker, 2000.

PANZRAM, G. Mortality and survival in Type 2 (non-insulindependent) diabetes *mellitus*. **Diabetologia.**, v. 30; p. 123-131, 1987.

PARK, B.H., RHO, H.W.; PARK, J.W.; CHO, C.G.; KIM, J.S.; CHUNG, H.T.; KIM, H.R. Protective mechanism of glucose against alloxan-induced pancreatic beta-cell damage. **Biochemical and Biophysical Research Communications.**, v. 210, p. 1 – 6, 1995.

PASCHOAL, Valéria; NAVES, Andreia; FONSECA, Ana Beatriz B.L. **Nutrição Clínica Funcional: dos princípios à prática clínica.** São Paulo: Valéria Paschoal Ltda., 2007.

PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. **Clin Diabetes**, v.21, n.4, p.186-7, 2003.

PERFETTI, R.; AHMAD, A. Novel sulfonylurea and non-sulfonylurea drugs to promote the secretion of insulin. **Trends In End and Metabolism.**, v.11, p.218-223, 2000.

PETERSON, K. P., *et al.* What is hemoglobin A1bc? An analysis of glycosylated hemoglobins by electrospray ionization mass spectrometry. **ClinChem.**, v.44, p.1951-1958, 1998.

PICKUP, J.C. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Diabetes Care.**, v.27, p.813-823, 2004.

PICKUP, J.C.; CROOK, M.A. Is type II diabetes *mellitus* a disease of the innate immune system? **Diabetologia.**, v. 41, p.1241–1248, 1998.

PICKUP, J.C.; MATTOCK, M.B.; CHUSNEY, G.D.; BURT, D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. **Diabetologia.**, v.40, p.1286-92, 1997.

PIRART J. Glycemic control and prevention of complications. **Minerva Endocrinol.**, 9:55-58, 1984.

POITOUT, V.; ROBERTSON, R.P. Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes – a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. **Endocrinology.**, v. 143, p. 339-342, 2002.

PRADHAN, A.D.; MANSON, J.E.; RIFAI, N.; BURING, J.E.; RIDKER, P.M. C-reactive protein, interleukin 6 and risk of developing type 2 diabetes mellitus. **J Am Med Assoc**, v. 286, p.327–334, 2001.

PROIETTO, J. Mechanisms of Insulin Resistance Caused By Nutrient Toxicity. **Hepato Res**, v.33, n.2, p.87-91, 2005.

RAMANI, M.; KHECHAI, F.; OLLIVIER, V.; TERNISIEN, C.; BRIDEY, F.; HAKIM, J.; DE PROST, D. Interleukin-10 and pentoxifylline inhibit C-reactive protein-induced tissue factor gene expression in peripheral human blood monocytes. **FEBS Lett**, v.356, n.1, Dec 12, p.86-8, 1994.

RAPTIS *et al.*, “24-H Blood Glucose Pattern in Type I and Type II Diabetics After Oral Treatment with Pentoxifylline as Assessed by Artificial Endocrine Pancreas, **Acta Diabetologica latina** 24:181-192, 1987.

REITMAN, S.; FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. **Amer. J. Clin. Pathol.**, v. 28; p. 56-63; 1957.

RENKE, M.; TYLICKI, L.; RUTKOWSKI, P.; KNAP, N.; ZIETKIEWICZ, M.; NEUWELT, A.; ALEKSANDROWICZ. Effect of pentoxifylline on proteinuria, markers of tubular injury and oxidative stress in non-diabetic patients with chronic kidney disease -placebo controlled, randomized, cross-over study. **Biochimica Polonica.**, v.57, n.1, p.119–123, 2010.

RIECKMANN, P.; WEBER, F.; GUNTHER, A.; MARTIN, S.; BITSCH, A.; BROOCKS, A.; KITZE, B.; WEBER, T.; BORNER, T.; POSER, S. Pentoxifylline, a phosphodiesterase inhibitor, induces immune deviation in patients with multiple sclerosis. **J Neuroimmunol.**, v.64, n.2, Feb, p.193-200, 1996.

RINCON, M.; WHITMARSH, A.; YANG, D.D. et al. The JNK pathway regulates their in vivo deletion of immature CD4(+)CD8(+) thymocytes. **J Exp Med.**, 188(10):1817–1830, 1998.

RODEN, M.; BERNROIDER, E. Hepatic glucose metabolism in humans: its role in health and disease. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, 17(3): 365-383, 2003.

RODRIGUÉZ-MORAN, M.; GUERRERO MORENO, F. Efficacy of pentoxifylline in the management of microalbuminuria in patients with diabetes. **Curr Diabetes Rev**, v.4, n.1, p.55-62, 2008.

ROHRER, L.; HERSBERGER, M.; VON ECKARDSTEIN, A. High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease. **Curr Opin Lipidol.**, v.15, n.3, p.269-78, 2004.

ROMANO, M.; POMILIO, M.; VIGNERI, S.; FALCO, A.; CHIESA, P.L.; CHIARELLI, F.; DAVI, G. Endothelial perturbation in children and adolescents with type 1 diabetes: association with markers of the inflammatory reaction. **Diabetes Care**, v.24, n.9, p.1674-8, 2001.

SACKS, D. B. et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. **Clin Chem.**, v. 48, p. 436-72, 2002

SACKS, D.B. Carbohydrates. In: Burtis, C.A.; Ashwood, E.R.; Brunz, D.E. 4th ed. Tietz. **Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.**, St. Louis, Elsevier Saunders. p.837-901, 2006.

SAKURAI, K.; OGISO, T. Effect of ferritin on DNA strand breaks in the reaction system of alloxan plus NADPH-cytochrome P450 reductase: ferritin's role in the diabetogenic action of alloxan. **Biol Pharm Bull.** 18:262-266, 1995.

SAMLASKA, C. P.; WINFIELD, E. A. Pentoxifylline. **J Am Acad Dermatol**, v.30, n.4, Apr, p.603-21, 1994.

SCHALKWIJK, C.G., et al. High expression levels of innate immunity genes like b-defensin-2, in psoriatic epidermis (right) compared to normal epidermis (left). deJongh et al 2005, **J Invest Dermatol** 125: 1163, 2005.

SCHALKWIJK, C.G.; LIGTVOET, N.; TWAALFHOVEN, H.; JAGER, A.; BLAAUWGEERS, H.G.; SCHLINGEMANN, R.O.; TARNOW, L.; PARVING, H.H.; STEHOUWER, C.D.; VAN HINSBERGH, V.W. Amadori albumin in type 1 diabetic patients: correlation with markers of endothelial function, association with diabetic nephropathy, and localization in retinal capillaries. **Diabetes**, v.48, n.12, p.2446-53, 1999.

SCHALKWIJK, et al. High expression levels of innate immunity genes like b-defensin-2, in psoriatic epidermis (right) compared to normal epidermis (left). de Jongh et al 2005, **J Invest Dermatol**, 2005; v. 125, p. 1163.

SCHELLINIS, A. retinopatia diabética experimental. estudo estrutural, ultraestrutural e morfométrico da retina de ratos normais, diabéticos e diabéticos tratados. **Tese de Doutorado** - Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Botucatu, 1992.

SCHMETTERER, L., *et al.* The effect of inhalation of different mixtures of O₂ and CO₂ on ocular fundus pulsations. **Expe Eye Res.**, v. 63, p.: 351 -355, 1996.

SCHMIDT, A.M., *et al.* RAGE: a novel cellular receptor for advanced glycation end products. **Diabetes**, Vol.45, 1996.

SCHMIDT, M.I.; SAAD, M.F.; DUNCAN, B.B. Subclinical inflammation and obesity, diabetes and related disorders. **DrugDiscovToday**. In press 2005.

SCHOSSLER, D. R. C.; MAZZANTI, C. M.; LUZ, S.C. A.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; SILVEIRA, A. F.; CECIM, M. Alterações histológicas e imunoistoquímicas em pâncreas de ratos normais e diabéticos tratados com *Syzygiumcumini*. **Ciência Rural**, v.34, n.6, p.1821-1825, 2004.

SHAN, D., *et al.* Revisão Sistemática, **Cochrane Database Syst Ver.**, v. 15, n. 2, p. CD006800, 2012.

SING, A.; BARDEN, A.M.T.; BEILIN, L. Advanced glycation end products: a review. **Diabetologia**,v.44, p.129-46, 2001.

SKUDICKY, D.; BERGEMANN, A.; SLIWA, K.; CANDY, G.; SARELI, P. Beneficial effects of pentoxifylline in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy treated with angiotensin-convertingenzyme inhibitors and carvedilol: results of a randomized study. **Circulation**, v.103, n.8, Feb27, p.1083-8, 2001.

SKYLER, J.S. Diabetes mellitus: pathogenesis and treatment strategies. **J Med Chem**, v.47, p.4113-7, 2004.

SLIWA, K., *et al.* Randomised investigation of effects of pentoxifylline on left -ventricular performance in idiopathic dilated cardiomyopathy. **Lancet.**, v. 351; n. 9109; p. 1091- 1093, 1998.

SLIWA, K.; WOODIWISS, A.; CANDY, G.; BADENHORST, D.; LIBHABER, C.; NORTON, G.; SKUDICKY, D.;SARELI, P. Effects of pentoxifylline on cytokine profiles and left ventricular performance inpatients with decompensated congestive heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. **Am J Cardiol**, v.90, n.10, Nov 15, p.1118-22, 2002.

SLIWA, K.; WOODIWISS, A.; KONE, V. N.; CANDY, G.; BADENHORST, D.; NORTON, G.; ZAMBAKIDES, C.;PETERS, F.; ESSOP, R. Therapy of ischemic cardiomyopathy with the immune modulating agent pentoxifylline: results of a randomized study. **Circulation**, v.109, n.6, Feb 17, p.750-5, 2004.

SLIWA, K.; WOODIWISS, A.; LIBHABER, E.; ZHANJE, F.; LIBHABER, C.; MOTARA, R.; ESSOP, R. Creactive protein predicts response to pentoxifylline

in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. **Eur J Heart Fail**, v.6, n.6, Oct, p.731-4, 2004.

SMITH, S.C.; ANDERSON, J.L.; CANNON, R.O.; FADL, Y.Y.; KOENIG, W.; LIBBY, P. et al. CDC/AHA Workshop on markers of inflammation and cardiovascular disease. **Circulation**, v.110, p.e550-e3, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Algoritmo para o tratamento do *diabetes* tipo 2. Atualização 2011. Posicionamento oficial SBD n 3, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Consenso Brasileiro sobre Diabetes 2002. Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2. Rio de Janeiro: **Diagraphic** Editora, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Tratamento e acompanhamento do Diabetes *mellitus* – **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 2006b.

SONKIN, P.L.; KELLY, L.W.; SINCLAIR, S.H.; HATCHELL, D.L. Pentoxifylline modulates deformability, F-actin content, and superoxide anion production of polymorphonuclear leukocytes from diabetic cats. **Experimental Eye Research**, 55(6):831-8, 1992.

SORO-PAAVONEN, A.; FORBES, J.M. Novel therapeutics for diabetic micro- and macrovascular complications. **Curr Med Chem**, v.13, n.15, p.1777-88, 2006.

STEEB, G.D.; WILSON, M.A.; GARRISON, R.N. Pentoxifylline preserves small-intestine micro-vascular blood flow during bacteremia. **Surgery**, v.112, p. 756-763, 1992.

STEPPAN, C.M.; LAZAR, M.A. Resistin and obesity-associated insulin resistance. **Trends Endocrinol Metab**. 13(1): 18-23, 2002.

STEPPAN, C.M.; LAZAR, M.A. The current biology of resistin. **J Intern Med**. 255(4):439-47, 2004

SUDHIR, V.; WALLIN, J.D.; EILEN, S.D. Chemiluminescence and superoxide anion production by leukocytes from diabetic patients. **J Clin endocrinol Metab**.57:402-409, 1983.

SURESH, R., et al. Pentoxifylline functions as an adjuvant in vivo to enhance T cell immune responses by inhibiting activation-induced death. **J Immunol**, v.169, n.8, Oct 15, p.4262-72, 2002.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res**, v.50; n.6; p.537-546, 2001.

TAHA, C.; KLIP, A. The insulin signaling pathway. **Journal of Membrane Biology**. v. 169, p.1-12, 1999.

TANNENBAUM, C.S.; HAMILTON, T.A. Lipopolysaccharide-induced gene expression in murine peritoneal macrophages is selectively suppressed by agents that elevate intracellular cAMP. **J Immunol.**, 142(4):1274–1280, 1989.

TENNENBERG, S.D.; FINKENAUER, R.; DWIVEDI, A. Absence of lipopolysaccharide-induced inhibition of neutrophil apoptosis in patients with diabetes. **Arch Surg.** 134:1229-1234, 1999.

TIEDGE, M.; LORTZ, S.; DRINKGERN, J.; LENZEN, S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. **Diabetes.** 46(11):1733-42, 1997.

TIRELI, G.A., *et al.* The effect of pentoxifylline on intestinal anastomotic healing after ischemia. **Pediatr Surg Int.**, v. 19; suppl. 1–2, p.: 88–90, 2003.

TONTONOZ, P. *et al.* PPAR gamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. **Cell**, v.93, p.241–252, 1998.

TRINDER, P. "Determination of blood glucose using an oxidase peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen". **J. Clin. Path.**, 22 (2): 158–161, 1969.

TRINDER, P. Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor. **Ann Clin Biochem**, v. 6,p. 24-25, 1969.

TRIVELLI, L.A.; RANNEY, H.M.; LAL, H.T. Haemoglobin components in patients with diabetes mellitus. **N Engl J Med.**, 284,353-357,1971.

UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. **Lancet**, v.352, p.837-53, 1998.

ULRICH, P.; CERAMI, A. Protein Glucation, Diabetes, and Aging. **Recent Progress in Hormone Research**, v.56, p.1-22, 2001.

VERICEL, E.; JANUEL, C.; CARRERAS, M.; MOULIN, P. Diabetes Patients without Vascular Complications Display Enhanced Basal Platelet Activation and Decreased Antioxidant Status. **Diabetes**, v. 53, p.1046-1051, 2004.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L.; JOHNSTON, P.R.; VENABLE, A.L.; MCKENZIE, K.K. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. **Fed Proc.**, Washington, v. 46, n. 1, p. 118-126, jan. 1987.

VISSER, L.; BLOUT, E.R. The use of p-nitrophenyl N-tert-butyloxycarbonyl-L-alaninate as substrate for elastase. **Biochim Biophys Acta.**, v.268, n.1, p.257-60, 1972.

VISSER, M.; BOUTER, L. M.; MCQUILLAN, G. M., WENER, M.H.; HARRIS, T. B. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. **JAMA.** 282:2131-5, 1999.

VLISSARA, H.; BUCALA, R.; STRICKER, L. Pathogenic effects of AGEs, biochemical, biologic and clinical implications for diabetes and aging. **Lab Invest.**, v.70, p.138-151, 1994.

WATANBE, D.; NAKARA, H.; AKAGI, K.; ISHII, T.; MIZUGUCHI, H.; NAGASHIMA, Y.; OKANIWA, A. Oral glucose tolerance test and determination of serum fructosamine level in beagle dogs. **Journal Toxicol Science.**, 29:33-36, 2007.

WATERS JW. Biochemical and clinical changes in the rabbit lens during alloxan diabetes. **Biochem J.** 46(5):575-78, 1950.

WEIR, G.C.; BONNER-WEIR, S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. **Diabetes.** 53 Suppl 3:S16-S2, 2004.

WEISBERG, S.P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J. Clin. Invest.**, v.112, p.1796-1808, 2003.

WEST, K.M., ERDREICH, L.J., STOBBER, J.A. A detailed study of risk factors for retinopathy and nephropathy in diabetes. **Diabetes**, New York, v.29, p.501-507, 1980.

WHO (World Health Organization) *Diabetes Mellitus*. Fact sheets, nº 312, 2006. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>. Setembro 2006. Acesso em: 29 julho de 2008.

WHO (World Health Organization). *Diabetes Mellitus*. Disponível em: http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/print.html. Acessado em setembro de 2006.

WIERNSPERGER, M. E.; BAILEY, J. C.. The antihyperglycaemic effect of metformin. **Drugs.**, Stanford – USA, v.58, n.1, p.31-39, 1999.

WILD, S., et al. Global prevalence of diabetes. **Diabetes Care.**, v. 27, p. 1047-1053, 2004.

WILLIAMSON, J.R.; CHANG, K.; FRANGOS, M.; HASAN, K.S.; IDO, Y.; KAWAMURA, T.; NYENGAARD, J.R.; VAN-DEN ENDEN, M.; KILO, C.; TILTON, R.G. Hyperglycaemic pseudohypoxia and diabetic complications. **Diabetes.**, v.42, p.801-8, 1993.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med., Malden**, v. 111, p. 544-547, dez. 1962.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition, Diagnosis and Classification of *Diabetes Mellitus* and its Complications. **Department of Noncommunicable Disease Surveillance, Geneva** 1999. Disponível em: http://www.staff.ncl.ac.uk/philip.home/who_dmg.pdf > Acessado no dia 18 de maio de 2011.

XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J. Clin. Invest**, v.112, p.1821-1830, 2003.

YASUDA, H., HARANO, Y., KOSUGI, T. et al. Development of early lesions of microangiopathy in chronically diabetic monkeys. **Diabetes.**, v.33, p.415-420, 1984.

YOVICH, J. M., EDIRISINGHE, W. R., CUMMINS, J. M., & YOVICH, J. L. (1990). Influence of pentoxifylline in severe male factor infertility. **Fertility and Sterility**, 53, 715–722, 1990.

YOVICH, J.M. Pentoxifylline: action and applications in assisted reproduction. **Human Reproduction.**, v. 8, p. 1786-1791, 1993.

YUASA, T.; OHNO, S.; KEHRL, J.H.; KYRIAKIS, J.M. Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase upstream of MKK6 and p38. **J Biol Chem.**, 273(35):22681–22692, 1998.

ZHAO, L.; LI, Z.; KULLIN, M.; BORG, L.A.H.; KARLSSON, F.A. Alterations in net glucose uptake and in pancreatic B-cell GLUT-2 transport induced by diazoxide and secretory stimuli. **J. Endocrinol.**, v.185, p. 295-299, 2005.

ZHAO, Z.H.; WATSCHINGER, B.; BROWN, C.D.; BEYER, M.M.; FRIEDMAN, E.A. Variations of susceptibility to alloxan induced diabetes in the rabbit. **Horm Metab Res.** 19(11):534-7, 1987.

APENDICE A

DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA (TRINDER modificado, 1969).

Preparo da amostra: A amostra de sangue foi obtida após jejum de no mínimo 8 horas e imediatamente centrifugada para separação do soro.

Procedimento: para cada animal foi separado três tubos de ensaio e procedido como a seguir:

1. Branco: Adicionado 1,0mL do reagente “1” (Contendo tampão 50mmol/L, pH 7,5; fenol \geq 1 mmol/L; glicose oxidase \geq 11000 U/L; peroxidase \geq 700 U/L; 4-aminoantipirina 290 μ mol/L; azida sódica 7,5 mmol/L; estabilizadores e surfactantes).
2. Teste: Adicionado 0,01mL da amostra e 1,0mL do reagente “1”.
3. Padrão: Adicionado 0,01mL do padrão (contendo glicose 100 mg/dL e biocida não tóxico) e 1,0mL do reagente “1”.

Misturamos vigorosamente e incubamos em banho maria a 37°C durante 15 minutos. O nível da água foi superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Determinamos as absorvâncias do teste e padrão em 505 nm, acertando o zero com o branco.

$$\text{Cálculo: Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 100$$

DETERMINAÇÃO DO TRIGLICERÍDEO (TRINDER modificado, 1969).

Preparo da amostra: Usamos soro com EDTA, pois quando a amostra é colhida em heparina pode-se obter resultado falsamente baixo. A heparina promove a ativação da lipoproteína lípase, fazendo com que a concentração dos triglicerídeos se reduza gradativamente em amostras contendo heparina.

Procedimento: para cada animal foi separado três tubos de ensaio e procedido como a seguir:

1. Branco: Adicionado 1,0mL do reagente “1” (Contendo tampão 50mmol/L, pH 7,0; íons magnésio 4mmol/L; 4-clorofenol 2,70mmol/L; 4-aminoantipirina 300 μ mol/L; ATP 1,8 mmol/L; lipoproteína lípase \geq 1400 U/L; glicerolquinase 1000 \geq U/L; glicerolfosfato oxidase \geq 1500 U/L; peroxidase \geq 900 U/L e azida sódica 0,095%).
2. Teste: Adicionado 0,01mL da amostra e 1,0mL do reagente “1”.
3. Padrão: Adicionado 0,01mL do padrão (contendo triglicérides 200mg/dL e azida sódica 0,045%) e 1,0mL do reagente “1”.

Misturamos e colocamos em banho maria a 37°C durante 10 minutos. O nível da água foi superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Determinamos as absorbâncias do teste e padrão em 505 nm, acertando o zero com o branco.

$$\text{Cálculo: Triglicérides (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$$

DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL TOTAL (TRINDER modificado, 1969)

Preparo da amostra: Usamos soro e não utilizamos amostras fortemente hemolisadas. O uso de anticoagulantes como citrato, oxalato EDTA pode-se obter resultado falsamente baixo.

Procedimento: para cada animal foi separado três tubos de ensaio e procedido como a seguir:

1. Branco: Adicionado 1,0 mL do reagente "1" (Contendo tampão 50mmol/L, pH 7,0; fenol 24 mmol/L; colato de sódio 500 μ mol/L; azida sódica 15 mmol/L; 4-aminoantipirina 500 μ mol/L; colesterol esterase \geq 250 U/L; colesterol oxidase \geq 250 U/L; peroxidase \geq 1000 U/L).
2. Teste: Adicionado 0,01mL da amostra e 1,0mL do reagente "1".
3. Padrão: Adicionado 0,01mL do padrão (contendo azida sódica 15 mmol/L) e 1,0mL do reagente "1".

Misturamos e colocamos em banho maria a 37°C durante 10 minutos. O nível da água foi superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Determinamos as absorvâncias do teste e padrão em 500 nm, acertando o zero com o branco.

$$\text{Cálculo: Colesterol (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$$

DETERMINAÇÃO DAS TRANSAMINASES HEPÁTICAS, AST/ALT

(REITMAN & FRANKEL modificado, 1957).

Preparo da amostra: Usamos soro colhido com EDTA. O soro foi isento de hemólise, pois a concentração das aminotransferases é consideravelmente maior nos eritrócitos.

Preparo da solução de hidróxido de sódio 0,4M: Transferimos todo o líquido de hidróxido de sódio (40 mL), solução concentrada 10M, para um balão volumétrico de 1000 mL. Acertamos o volume com água destilada isenta de gás carbônico (recém-fervida). Guardamos a solução em frasco plástico.

Procedimento: para cada animal foi separado dois tubos de ensaio e procedido como a seguir:

1. AST: Adicionado 0,5 mL do substrato AST (contendo 0,2M de L-aspartato, 0,002M Alfa cetoglutarato, tampão de fosfatos 0,1M pH 7,4) colocado em banho maria a 37°C durante 2 minutos. Adicionado 200µL, homogeneizado e incubado a 37°C, durante 30 minutos. Adicionado 0,5 mL de reagente de cor (solução 0,001M de 2,4 dinitrofenilhidrazina), homogeneizado e deixado em repouso, à temperatura ambiente (20-30°C), durante 20 minutos. Adicionado 5mL hidróxido de sódio 0,4M misturado e deixado repousar durante 2 minutos, à temperatura de 20-30°C. Lida as absorbâncias em espectrofotômetro em 505nm, acertando o zero com água destilada. Utilizando a curva de calibração, procuramos os valores em unidades AST.
2. ALT: Adicionado 0,5 mL do substrato ALT (contendo 0,2M de L-alanina, 0,002M Alfa cetoglutarato, tampão de fosfatos 0,1M pH 7,4) colocado em banho maria a 37°C durante 2 minutos. Adicionado 100µL, homogeneizado e incubado a 37°C, durante 30 minutos. Adicionado 0,5 mL de reagente de cor (solução 0,001M de 2,4 dinitrofenilhidrazina), homogeneizado e deixado em repouso, à

temperatura ambiente (20-30°C), durante 20 minutos. Adicionado 5mL hidróxido de sódio 0,4M misturado e deixado em repouso durante 2 minutos, à temperatura de 20-30°C. Lida as absorbâncias em espectrofotômetro em 505nm, acertando o zero com água destilada. Utilizando a curva de calibração, procuramos os valores em unidades ALT.

Preparo da curva de calibração: Utilizamos 5 tubos de ensaio e procedemos como a seguir:

Tubo nº	1	2	3	4	5
	mL	mL	mL	mL	mL
Padrão	----	0,05	0,1	0,15	0,2
TGP substrato	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3
TGO substrato	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3
Água destilada ou deionizada	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Reagente de cor (nº 2)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Misturamos e deixamos na temperatura ambiente durante 20 minutos. Decorridos os 20 minutos, acrescentamos a cada tubo 5mL de hidróxido de sódio 0,4M e misturamos por inversão. Deixamos repousar por 2 minutos e lermos os tubos de 1 a 5 contra um branco constituído de água destilada, ajustando a absorbância em espectrofotômetro em 505nm.

Traçado da curva de calibração: Traçamos a Curva de Calibração correlacionando as leituras obtidas com os valores em Unidades/mL, expressos na tabela abaixo, utilizando papel linear (para absorbâncias).

Tubo nº	1	2	3	4	5
ALT (Unidades F.R./mL)	Zero	28	57	97	150
AST (Unidades F.R./mL)	Zero	24	61	114	190

Expressão dos resultados em Unidades do Sistema Internacional (U.I):

Transaminases (U.I/L) = transaminases unidades F.R./ mL x 0,482

DETERMINAÇÃO DAHEMOGLOBINA GLICADA

(TRIVELLI modificado, 1971).

Preparo da amostra: Usamos sangue total colhido com EDTA, quando a amostra é colhida em heparina pode-se obter resultado falsamente elevado. Amostras lipêmicas ou ictéricas interferem na dosagem, fornecendo resultados falsamente elevados, em função disso, o procedimento a seguir descrito foi aplicado somente quando a amostra estivesse turva, lipêmica ou ictérica.

1. Pipetamos e em um tubo 1,0mL da amostra bem homogeneizada. Marcamos o nível de 1,0mL no tubo.
2. Centrifugamos a 2000 rpm por 5 minutos. Retiramos o plasma sem ressuspenderas hemácias.
3. Adicionamos 3,0 mL de NaCl 150mmol/L (0,85%). Centrifugamos e removemos o sobrenadante sem ressuspender as hemácias.
4. Ressuspendemos as hemácias com 3,0mL de NaCl 150mmol/L (0,85%). Centrifugamos. Acertamos o volume para a marca de 1,0mL, retirando o excesso de sobrenadante.
5. Homogeneizamos bem e utilizamos para preparar o hemolisado.

Preparo do hemolisado: em um tubo 12 x 75 adicionamos 0,4mL de Hemolisante (contendo ácido bórico 600mmol/L e azida sódica 14,6mmol/L) e 0,1mL da amostra. Agitamos fortemente por 20 segundos e esperamos 5 minutos. Se a hemólise foi incompleta (o líquido no tubo se mostrar turvo), centrifugamos e usamos sobrenadante.

Antes de iniciar a cromatografia asseguramos que o hemolisado, o tampão (contendo tampão fosfato 36mmol/L, pH 6,7 e biocida não tóxico) e as colunas estavam a mesma temperatura do ambiente.

Preparo da coluna: Retiramos a tampa superior da coluna (contendo resina de troca iônica equilibrada em tampão fosfato pH 6,7), introduzimos o bastão fazendomovimentos giratórios descendentes e ascendentes para

ressuspender a resina. Removemos imediatamente a tampa inferior, colocamos a coluna em um tubo de ensaio (alto o suficiente para que a ponta da coluna não tocasse o líquido no tubo) e esperamos que todo o líquido penetrasse na resina. A partir daí, a coluna estava pronta para uso e a cromatografia foi iniciada imediatamente.

Cromatografia: Adicionamos 0,05mL do hemolisado sobre a resina, de modo que não houvesse ressuspensão da mesma, evitando a formação de bolhas de ar. Esperamos que todo o hemolisado penetrasse na resina.

Transferimos a coluna para um tubo de ensaio limpo e seco (alto o suficiente para que a ponta da coluna não tocasse o líquido no tubo), marcando com o número “1” e adicionamos lentamente, com a ponta da pipeta tocando a parede da coluna, 3,5mL de tampão. A eluição da Hemoglobina glicada (Hb - G) se completa quando todo o tampão penetra na resina.

Desprezamos a coluna.

Colorimetria: homogeneizamos o conteúdo do tubo número “1” (Hb - G) e usamos para a colorimetria sem qualquer tratamento adicional.

Para um tubo limpo e seco, marcamos com o número “2” (Hb - Total), pipetamos 7,0mL de água deionizada, adicionamos 0,02mL do hemolisado e misturamos.

Determinamos as absorvâncias dos tubos número “1” (Hb - G) e número “2” (Hb - Total) em 415nm acertando o zero com água destilada.

$$\text{Cálculo: Hb - G (\%)} = \frac{\text{Absorvância do tubo "1" (Hb - G)}}{\text{Absorvância do tubo "2" (Hb - Total)} \times 5} \times 100$$

DETERMINAÇÃO DA FRUTOSAMINA

A nova metodologia para a determinação da frutosamina tem como princípio a ligação da glicose aos grupamentos das proteínas formando uma base de Schiff (aldimina), que após um rearranjo molecular transforma-se em uma cetoamina estável denominada genericamente frutosamina. Em pH alcalino, a frutosamina é convertida à forma enólica, que reduz o nitroazul de tetrazólio (NBT) a uma cor azul púrpura. Nesta prova, outros agentes redutores podem estar presentes na amostra causando interferência no ensaio. No novo reagente enzimático colorimétrico para a determinação de frutosamina foi incorporada a uricase, um agente clarificador à base de detergente com o objetivo de minimizar os interferentes presentes na amostra. A mensuração da diferença de absorvância em espectrofotômetro, após incubação por 10 a 15 minutos é proporcional a concentração de frutosamina na amostra (WATANABE et al., 2007).