



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**O PAPEL DA METFORMINA NO CONTROLE DO ESTRESSE OXIDATIVO EM
MÚSCULO DE RATOS DIABÉTICOS**

Aluno: Danielle Diniz Vilela

Orientador: Foued Salmen Espindola

Co-Orientador: Renata Roland Teixeira

**UBERLÂNDIA – MG
2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**O PAPEL DA METFORMINA NO CONTROLE DO ESTRESSE OXIDATIVO EM
MÚSCULO DE RATOS DIABÉTICOS**

Aluno: Danielle Diniz Vilela

Orientador: Foued Salmen Espindola

Co-Orientador: Renata Roland Teixeira

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Bioquímica (Área
Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA - MG
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

V699p
2015

Vilela, Danielle Diniz, 1986-
O Papel da metformina no controle do estresse oxidativo em
músculo de ratos diabéticos / Danielle Diniz Vilela. - 2015.
43 p. : il.

Orientador: Foued Salmen Espindola.

Coorientador: Renata Roland Teixeira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Diabetes - Teses. 3. Antioxidantes - Teses.
4. Stress oxidativo - Teses. I. Espindola, Foued Salmen. II. Teixeira,
Renata Roland, 1983-. III. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**O PAPEL DA METFORMINA NO CONTROLE DO ESTRESSE OXIDATIVO EM
MÚSCULO DE RATOS DIABÉTICOS**

ALUNO: Danielle Diniz Vilela

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Foued Salmen Espindola (Orientador)

**Examinadores: Graziella Eliza Ronsein
Ana Barbara Teixeira Alves**

Data da Defesa: 30 /07 /2015

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas

(Foued Salmen Espindola)

Dedico esse trabalho aos meus pais Emilson Vilela e Denise Diniz Vilela que sempre estiveram ao meu lado comemorando cada conquista, me incentivando nas horas difíceis e principalmente me ensinando que o verdadeiro valor da vida é o conhecimento que adquirimos.

Agradecimentos

A Deus por todas as oportunidades que tive na vida, por ter me colocado em uma família unida e amorosa e por estar sempre cuidando do meu coração.

A minha mãe Denise por ser tão dedicada a nossa família e estar sempre disposta a ajudar. Mãe, você é meu porto seguro, meu exemplo de mulher.

Ao meu pai Emilson por deixar nosso lar sempre alegre com sua energia contagiante e seu sorriso no rosto. Pai os seus “bom dia com muita alegria” fazem muita diferença nos meus dias.

A minha irmã Ellen que é minha metade, minha gêmea sem ser, minha amiga de faculdade, amor maior na vida. Obrigada por me ensinar a ensinar, pelas broncas que me fizeram crescer e também pelos passes no hand e por me ensinar tudo sobre cálculo.

Ao meu futuro marido Alonso Neto, que é tão carinhoso e paciente comigo, que nunca me deixa desistir de nada, que me acalma e me faz acreditar no amor verdadeiro. Sem você eu não chegaria até aqui. Obrigada por ser um exemplo pra mim e por dividir sua família maravilhosa comigo.

A meu orientador prof. Dr. Foued Salmen Espindola pela oportunidade de enriquecer meu conhecimento e por abrir as portas do seu laboratório. Tenho muita admiração por todo seu trabalho e preocupação em fazer da pesquisa um bem para comunidade ao seu redor.

A minha co-orientadora e amiga Renata Roland Teixeira por todos os ensinamentos dentro e fora do laboratório. Você é um exemplo de profissional pra mim. Obrigada por toda a dedicação e todo o carinho nesses dois anos que passei no laboratório.

Ao meu amigo Leonardo Gomes Peixoto que me ensinou a nunca desistir de um experimento, que com toda paciência dedicou seu tempo nas nossas longas discussões sobre vias metabólicas. Posso dizer que sem a sua ajuda eu jamais chegaria até aqui.

A Helen Machado por ter me acompanhado desde meus primeiros dias no laboratório e por sempre reforçar a importância da ética dentro da pesquisa.

Aos meus amigos Nathalia, Douglas e Adriele que me ajudaram desde o início dos experimentos, que alegram meus dias dentro do laboratório e que são a prova de que um trabalho em equipe é sempre mais fácil.

Aos amigos Allisson e Mariana, uma dupla sempre disposta a ajudar no que for preciso com sorriso no rosto e muita dedicação.

Ao Robinson Sabino por estar sempre integrado as atividades do LABIBI, colaborando com técnicas e discussões.

Ao Eduardo realizou comigo todas as disciplinas do curso de mestrado, me ajudando nas discussões e aprendendo junto comigo.

Finalmente, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com esse trabalho e com minha formação.

Sumário

Apresentação	1
Capítulo 1 - Referencial teórico	4
1. Diabetes mellitus	4
2. Metformina	5
3. Estresse oxidativo versus diabetes	8
3.1 Sistema de defesa antioxidante.....	10
3.2 Biomarcadores do Estresse oxidativo	11
3.2.1 Superóxido dismutase	11
3.2.2 Catalase	11
3.2.3 Glutathione Peroxidase e Glutathione Redutase	12
3.2.4 Glutathione Reduzida.....	12
3.2.5 Glicose-6-fosfato-desidrogenase	12
3.2.6 Capacidade Antioxidante Total.....	13
3.2.7 Peroxidação Lipídica.....	13
4. Referência Bibliográfica	15
Capítulo 2.....	20
1 Introduction.....	23
2 Materials and methods	24
2.1 Animals	24
2.2 Diabetes Induction	24
2.3 Groups and treatment	24
2.4 Sample collection and Tissue Preparation.....	25
2.5 Oxidative Stress Markers Analysis.....	25
2.5.1 Lipid Peroxidation (TBARS)	25
2.5.2 Total antioxidant capacity (FRAP).....	25
2.5.3 Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity (G6PDH)	25
2.5.4 Glutathione Reductase Activity (GR).....	26
2.5.5 Glutathione Peroxidase Activity (GPx)	26
2.5.6 Reduced glutathione (GSH)	26
2.6 Western Blotting	26
2.7 Statistical Analysis	27
3 Results	27
4 Discussion	30
5 Conclusion.....	33
6 References	35

Lista de Figuras e Tabela

Figura 1: Mecanismo de ação da metformina para ativação de AMPK e diferentes atuações de AMPK na via de sinalização para translocação de GLUT-4 em músculo esquelético.	7
Figura 2: Via de sinalização para o processo inflamatório via NF- κ B, I κ B e JNK para aumento da resistência a insulina em musculatura esquelética.	8
Figura 3: Redução tetraivalente do oxigênio molecular (O ₂) na mitocôndria até a formação de água (H ₂ O). Várias espécies reativas de O ₂ são formadas no processo (Ferreira e Matsubara, 1997).	10
Figura 4: Mecanismo de proteção do sistema de defesa antioxidante e mecanismo de peroxidação lipídica em um quadro de estresse oxidativo causada por superprodução de EROs ou diminuição da atividade de enzimas antioxidantes.	11
Figura 5: Etapas da lipoperoxidação onde LH representa um ácido graxo poliinsaturado, L• um radical lipídico e LOO• um radical peroxila.	14
As figuras 1, 2 e 4 foram elaboradas e produzidas por Leonardo Gomes Peixoto, doutorando do Laboratório de bioquímica e Biologia Molecular.	

Capítulo 2

Figure 1: Analysis of biomarkers of oxidative stress in gastrocnemius muscle of diabetic and non-diabetic rats. FRAP (A), TBARS (B). Non-diabetic (ND), diabetic (D), diabetic treated with insulin (DI), diabetic treated with insulin and metformin (DIM) and diabetic treated with metformin (DM). * p < 0.05 compared with D.	28
Figure 2 : Glutathione antioxidant defense system in gastrocnemius muscle of diabetic and non-diabetic rats. GPX (A), GR (B) GSH (C) and G6P (D). Non-diabetic (ND), Diabetic (D) Diabetic treated with insulin (DI), Diabetic treated with insulin (DIM) and diabetic treated with metformin (DM). * p < 0.05 compared with D.	29
Figure 3: Catalase (A) and SOD (B) protein contained in gastrocnemius muscle of diabetic and non-diabetic rats. Diabetic (D), non-diabetic (ND), diabetic treated with insulin (DI), diabetic treated with insulin and metformin (DIM) and diabetic treated with Metformin (DM). At the top of each graph, a image of the western blot assay. Representatives bands of 3 rats/group (total n=6rats/group). * p < 0.05 compared with D.	30
Tabela 1: Blood glucose levels of diabetic and non-diabetic rats.	27

Apresentação

O Diabetes *mellitus* é considerado uma epidemia mundial e crescente, muito relacionada com estilo de vida sedentário e a má alimentação, cada vez mais comum nos dias de hoje. A prospecção da Organização Mundial da Saúde é que o número de pacientes com diabetes vai aumentar de forma alarmante. Por isso, torna-se importante, estudos e pesquisas em busca de terapias que possam auxiliar no tratamento dessa doença.

A metformina é um medicamento bastante prescrito para pacientes diabéticos tipo II no tratamento da resistência a insulina e hiperglicemia. Aqui, estudamos um novo benefício desse medicamento para pacientes diabéticos, relacionado ao estresse oxidativo, desenvolvido durante a diabetes e apontado como grande responsável pela progressão da doença. É cada vez mais comum estudar novos efeitos de uma droga já inserida no mercado com a vantagem desse medicamento já ter passado por todos os estágios clínicos necessários.

O primeiro capítulo dessa dissertação é uma revisão sobre os temas estudados, o qual é base para todo desenvolvimento do artigo científico apresentado no segundo capítulo. A partir desse estudo foi possível delinear um experimento capaz de avaliar a hipótese proposta. A metformina pode atuar no músculo inibindo o complexo I da cadeia transportadora de elétrons e ativando uma cascata de sinalização para translocação de GLUT4 para membrana celular. Nossa hipótese é que esta inibição pode diminuir as espécies ativas de oxigênio mitocondrial (EROs), minimizando os danos celulares causados pelo estresse oxidativo.

O capítulo 2 é escrito em formato de um artigo científico e apresenta resultados interessantes e promissores sobre o uso da Metformina. Foi avaliada a atividade e expressão de enzimas de estresse oxidativo, capacidade antioxidante total e peroxidação lipídica no músculo gastrocnêmio de ratos com diabetes *mellitus* induzido por estreptozotocina. Nossos resultados mostraram que os grupos tratados com metformina preveniram o aumento na atividade e expressão de SOD e catalase, bem como mantiveram a capacidade antioxidante total e atividade de G6PDH, quando comparado com o grupo não tratado. Estes resultados parecem estar relacionados com a inibição do complexo I e redução da produção de ROS, resultando em uma menor peroxidação lipídica. Portanto, este estudo sugere que a metformina pode estar

envolvida na regulação do estresse oxidativo nas células musculares diminuindo a peroxidação lipídica o que poderia melhorar a captação de glicose.

Capítulo 1 - Referencial teórico

1. Diabetes mellitus

O diabetes *mellitus* (DM) é considerado uma das grandes epidemias mundiais do século XXI. Em 1985, estimava-se haver 30 milhões de adultos com DM no mundo; esse número cresceu para 173 milhões em 2002 e estima-se que em 2030 possa alcançar 300 milhões. (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2013-2014). A crescente incidência e prevalência são atribuídas ao crescimento e envelhecimento populacional, prevalência de obesidade e sedentarismo, maior urbanização, bem como maior sobrevida de pacientes com DM (Organization, 2002). No Brasil, no final da década de 1980, estimou-se a prevalência de DM na população adulta em 7,6% (Malerbi e Franco, 1992); dados isolados, mais recentes apontam para taxas ainda mais elevadas, como 13,5% em São Carlos-SP (Bosi *et al.*, 2009) e de 15% em Ribeirão Preto-SP (Moraes *et al.*, 2010).

Quando definida como qualquer menção na certidão de óbito, a mortalidade associada ao diabetes aumentou 8% de 2000 a 2007. Esse fato pode ser explicado pela prevalência crescente, mas também por melhores diagnósticos. No período de 1999-2001, 7,4% de todas as hospitalizações não relacionadas a gestações e 9,3% de todos os custos hospitalares puderam ser atribuídos ao diabetes. Além disso, um registro nacional de diabetes e hipertensão, SisHiperdia, iniciado em 2002 mostra que dos mais de 1,6 milhão de casos registrados de diabetes: 4,3% dos casos registrados tinham transtorno do pé diabético e 2,2% uma amputação prévia, 7,8% tinham doença renal, 7,8% haviam tido infarto do miocárdio e 8,0% haviam tido derrame. O pareamento entre esses dados e o Sistema de Informações de Mortalidade mostra que a mortalidade padronizada por idade e gênero foi 57% mais alta em indivíduos diabéticos do que na população em geral (Schmidt *et al.*, 2011).

O DM pode ser caracterizado por elevados níveis de glicose no sangue, devido a deficiência na ação e/ou secreção de insulina (Ashcroft e Rorsman, 2012), tendo como consequência, distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. Outros sintomas como poliúria, polidipsia e perda ponderal não explicada podem ser característicos da doença (Craig *et al.*, 2014). Na sua forma mais grave, caracterizada por cetoacidose a DM pode levar ao coma e, na ausência de tratamento, a morte.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (Alberti e Zimmet, 1998) e a Associação Americana de Diabetes (ADA) (Rayburn, 1997), a classificação atual do

DM inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional. Ainda há duas categorias, referidas como pré-diabetes, que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída. Essas categorias não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento de DM e doenças cardiovasculares (DCVs).

No DM1 há destruição de células beta pancreáticas, mediada por autoimunidade com consequente deficiência de insulina. Em alguns casos não há evidências de processo autoimune, sendo, portanto, referidos como forma idiopática de DM1. O DM2 é a forma mais comum, presente em 90% a 95% dos casos. A maioria dos pacientes com essa forma de DM apresenta sobrepeso ou obesidade, e raramente se desenvolve cetoacidose. Geralmente, o DM2 é diagnosticado após os 40 anos, mas pode ocorrer em qualquer idade. Os pacientes não dependem de insulina exógena para sobreviver, porém podem necessitar de tratamento com insulina para controle da homeostase glicêmica. Outros tipos específicos de DM são formas menos comuns cujos defeitos (defeitos genéticos na função das células beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino e outras condições) ou processos causadores podem ser identificados. O DM gestacional é caracterizado por qualquer intolerância à glicose, de magnitude variável, com início ou diagnóstico durante a gestação (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2013-2014).

A prevalência de doenças crônicas não transmissíveis aumenta de forma alarmante e, por isso, pesquisas em busca de intervenções farmacológicas no tratamento do DM se tornam essenciais.

2. Metformina

A biguanida metformina tem sido amplamente utilizada no tratamento da DM para controle da glicemia e melhora da sensibilidade à insulina (Salpeter *et al.*, 2008). O composto ativo denominado galegina é derivado da guanidina, foi descoberto em 1920, em extratos de plantas *Galega officinalis* utilizada, na época, para tratamento de poliúria no DM. A guanidina por si só, é tóxica para ser usada como medicamento, mas o desenvolvimento de derivados gerou em 1957 na Europa, a primeira publicação sobre a metformina (Ungar, Freedman e Shapiro, 1957). A ação anti-hiperglicemiante da metformina ocorre principalmente devido à inibição da gliconeogênese hepática. No músculo esquelético, atua melhorando a sensibilidade a

insulina (Gunton *et al.*, 2003) e aumentando a absorção de glicose (Fischer *et al.*, 1995).

O músculo esquelético é a fonte primária de captação de glicose, principalmente durante o estado pós-prandial, desempenhando um papel central na homeostase glicêmica (DeFronzo e Tripathy, 2009). A resistência à insulina no músculo esquelético é um fator importante para o desenvolvimento do DM. Assim, a ação da metformina nesse tecido torna-se um importante alvo de manutenção glicêmica. É bem descrito na literatura que a metformina atua como agonista da AMPK (Vincent *et al.*, 2014; Meng *et al.*, 2015). AMPK é um sensor de energia e tem papel central em um sistema integrado de sinalização metabólica para restaurar o balanço energético celular podendo ativar vias catabólicas ou desativar vias anabólicas. No músculo, a ativação de AMPK através da ação da metformina, pode ativar a via de sinalização para translocação de GLUT4 até a membrana plasmática e com isso, aumentar a captação de glicose (ver figura 1).

A ativação de AMPK pela metformina acontece de maneira indireta. É bem descrito que o bloqueio do complexo I da cadeia transportadora de elétrons é o principal mecanismo de ação da metformina (El-Mir *et al.*, 2000; Owen, Doran e Halestrap, 2000; Demaille *et al.*, 2002; DeFronzo e Abdul-Ghani, 2011). Esse bloqueio resulta em uma menor produção de ATP e um aumento nos níveis de AMP que, então, ativa AMPK. Alguns trabalhos descrevem diferentes atuações de AMPK na via de sinalização para translocação de transportadores de glicose (GLUT4) (figura 1): fosforilando o substrato do receptor de insulina (IRS-1) e aumentando a sensibilidade ao hormônio (Jakobsen *et al.*, 2001) ou, aumentando a translocação de GLUT4 independente de insulina, fosforilando fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (Steinberg e Kemp, 2009) e Akt substrato de 160 kDa (AS-160) (Sakamoto e Holman, 2008). Essas ativações geram um interesse significativo para a utilidade terapêutica da AMPK no controle da resistência à insulina (Merrill *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 1998; Bergeron *et al.*, 1999).

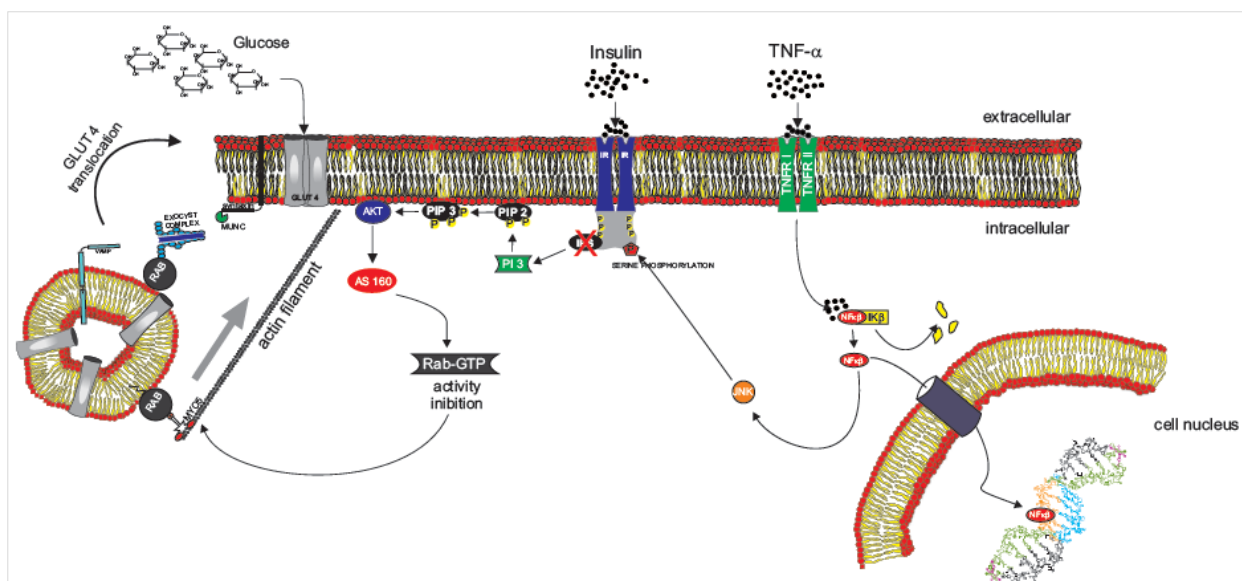


Figura 2: Via de sinalização para o processo inflamatório via NF- κ B, I κ B e JNK para aumento da resistência a insulina em musculatura esquelética.

Tanto a diminuição de JNK quanto a inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons já foram relacionados com uma menor produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Turrens e Boveris, 1980; Kushnareva, Murphy e Andreyev, 2002; Ge *et al.*, 2008). O aumento da produção de EROs está associado com o desenvolvimento e progressão das complicações do diabetes (Baynes, 1991; Martim, Sanders e Watkins, 2003). No músculo, o estresse oxidativo pode aumentar a peroxidação lipídica em membranas celulares, o que contribui para o desenvolvimento de resistência à insulina (Pillon *et al.*, 2012; Kopprasch *et al.*, 2015). Apesar disso, nenhum estudo foi realizado a fim de analisar os marcadores do estresse oxidativo em músculo de ratos tratados com metformina.

Considerando-se que a resistência periférica à insulina é uma característica não só para indivíduos com DM2, mas um achado clinicamente relevante também em indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) (Yki-Jarvinen, Helve e Koivisto, 1987; Rossetti, Giaccari e DeFronzo, 1990), a investigação do uso de metformina relacionadas com marcadores de estresse oxidativo no músculo esquelético abriria novos benefícios para o tratamento de pacientes diabéticos.

3. Estresse oxidativo versus diabetes

A evidência crescente em estudos experimentais e clínicos sugere que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese da DM. Os

radicais livres são formados desproporcionalmente no DM por oxidação de glicose, não enzimática, glicação de proteínas, e a subsequente oxidação e degradação de proteínas glicosiladas. Os níveis de radicais livres anormalmente elevados e a diminuição simultânea de mecanismos de defesa antioxidante podem levar a danos de organelas celulares e enzimas, aumento da peroxidação lipídica, e desenvolvimento de resistência à insulina. Estas consequências do estresse oxidativo podem promover o desenvolvimento de complicações do DM.

As alterações nos biomarcadores de estresse oxidativo, incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione-redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx), os níveis de glutathione (GSH), vitaminas, peroxidação de lipídios, a concentração de nitrito, proteínas glicosiladas (não enzimática) e hiperglicemia, trazem consequências graves para os pacientes com DM. Estudos in vivo dos efeitos de drogas convencionais ou alternativas sobre esses marcadores devem ser explorados em um esforço para expandir as opções de tratamento e ainda elucidar mecanismos pelos quais o estresse oxidativo acelera o desenvolvimento da DM.

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O (Cohen, 1989). Acredita-se que cerca de 5% do oxigênio consumido, não é transformado em água, podendo formar espécies reativas de oxigênio (EROs).

As EROs são compostos muito instáveis quimicamente capazes de transformar moléculas orgânicas com as quais colidem, como, lipídeos, proteínas e DNA. As EROs mais relevantes são o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($OH\cdot$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion hipoclorito (OCl^-) e o oxigênio “singleto” (Halliwell e Gutteridge, 1990).

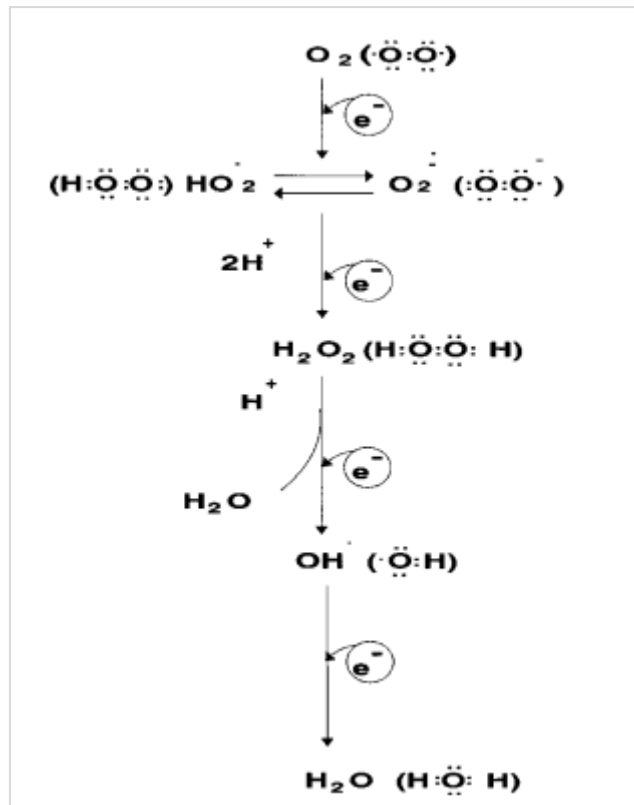


Figura 3: Redução tetravalente do oxigênio molecular (O₂) na mitocôndria até a formação de água (H₂O). Várias espécies reativas de O₂ são formadas no processo (Ferreira e Matsubara, 1997).

3.1 Sistema de defesa antioxidante

Como a produção de EROs é um evento fisiológico, nosso metabolismo se dispõe de defesas antioxidantes enzimáticas (GPx, CAT, SOD, glutathione redutase) e não enzimáticas (GSH, ácido ascórbico, alfa-tocoferol, entre outras), que atuam contra a ação tóxica dessas espécies e são responsáveis pelo equilíbrio entre a produção e a eliminação das mesmas (figura 5) (Halliwell, Clement e Long, 2000). No DM, ocorre um aumento da produção de EROs suficiente para ultrapassar a capacidade antioxidante ou agir de forma a diminuir as defesas antioxidantes do organismo; a esse fenômeno chamamos de estresse oxidativo (EO) (Bondy e LeBel, 1993; Cadenas e Davies, 2000). Nesse sentido, as enzimas antioxidantes tem função de neutralizar as EROs. Essas enzimas podem ser utilizadas como biomarcadores uma vez que alterações na sua atividade pode ser resultado da resposta antioxidante (Sies, 1993).

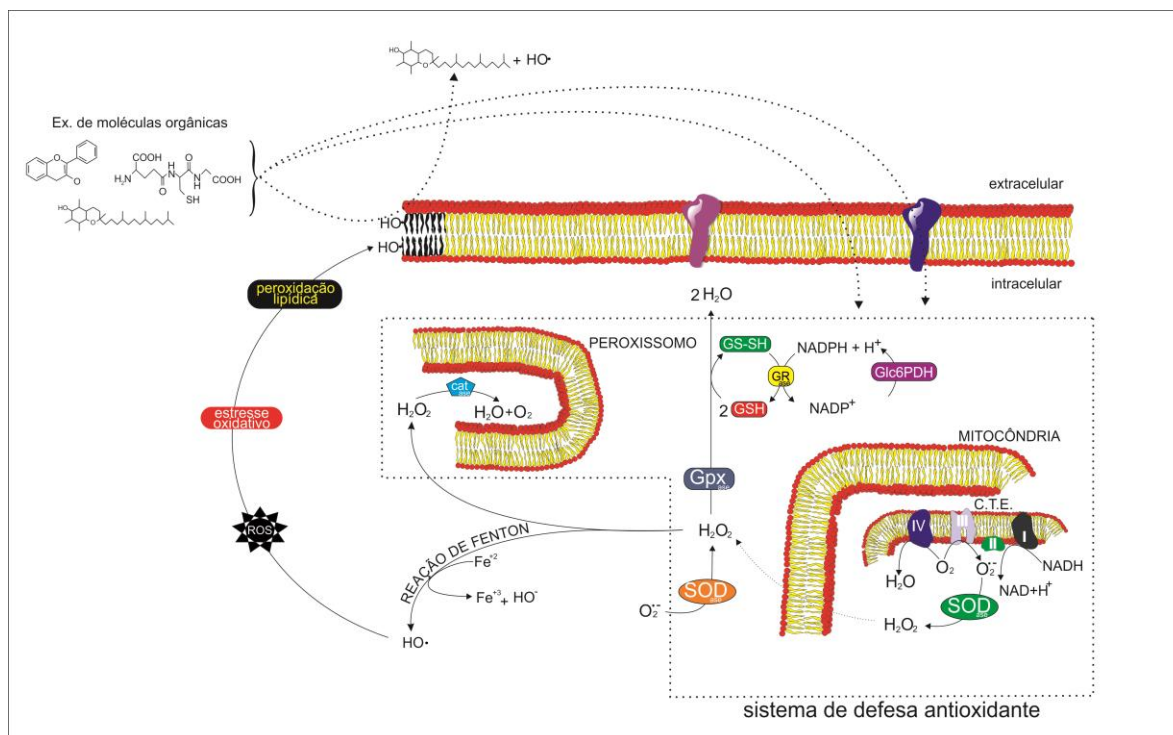


Figura 4: Mecanismo de proteção do sistema de defesa antioxidante e mecanismo de peroxidação lipídica em um quadro de estresse oxidativo causada por superprodução de EROs ou diminuição da atividade de enzimas antioxidantes.

3.2 Biomarcadores do Estresse oxidativo

3.2.1 Superóxido dismutase

A SOD está na linha de frente das enzimas antioxidantes, ela catalisa a reação de conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2) na presença de H^+ (Del Maestro, 1980). Existem isoformas da SOD dentro da célula: CuZn-SOD é encontrada no citoplasma e no núcleo e Mn-SOD está presente na mitocôndria, mas pode ser libertada no espaço extracelular (Reiter *et al.*, 2000).

3.2.2 Catalase

A catalase está localizada nos peroxissomos e catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 . O tipo mais comum de catalase é um tetrâmero de 240 kDa, ou seja, possui quatro cadeias polipeptídicas na sua estrutura quaternária, com cerca de 60 kDa de massa. Cada cadeia polipeptídica liga um grupo hemo, semelhante ao que existe

na hemoglobina, possuindo então cada hemo um íon de ferro. É este centro metálico que reage com o peróxido de hidrogênio. A atividade da enzima catalase é consistentemente encontrada elevada no coração (Kaul *et al.*, 1995; Kaul *et al.*, 1996; Rauscher, Sanders e Watkins, 2000; Ozansoy *et al.*, 2001; Rauscher, Sanders e Watkins, 2001) e aorta (Ozansoy *et al.*, 2001), bem como cérebro (Aragno *et al.*, 1999) de ratos diabéticos.

3.2.3 Glutationa Peroxidase e Glutationa Redutase

Tanto a glutathione peroxidase (GPx) quanto a redutase (GR) são enzimas encontradas no citoplasma, mitocôndria e núcleo. A GPx cataliza a redução do peróxido de hidrogênio em água através da GR sendo a doadora de hidrogênio, a qual converte glutathione reduzida (GSH) em oxidada (GSSG). A reciclagem de GSH a partir de GSSG ocorre utilizando a coenzima NADPH gerado pela glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH) (Martim, Sanders e Watkins, 2003).

3.2.4 Glutationa Reduzida

A glutathione reduzida (GSH, L-γ-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) pode ser considerada um dos principais tampões redox intracelular. Possui capacidade redutora, devido ao seu grupamento –SH, presente em cisteína, protegendo a célula contra lesão causada pelo EO. (Martim, Sanders e Watkins, 2003).

Pode ser oxidada para forma GSSG, forma dimerizada da GSH. A importância deste par é tal que a razão GSH/GSSG é normalmente utilizada para estimar o estado redox dos sistemas biológicos.

3.2.5 Glicose-6-fosfato-desidrogenase

A glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH) catalisa o primeiro passo na via das pentoses fosfato produzindo NADPH. Como já discutido anteriormente, essa coenzima é essencial para proteger as células de danos oxidativos, como por exemplo, quando H_2O_2 é convertida em H_2O pela GPx oxidando GSH em GSSG. Para reciclar GSH, a enzima GR utiliza NADPH para reduzir GSSH em GSH, transferindo os elétrons de NADPH. Por isso, a via das pentoses fosfato é uma via importante para manutenção de

um ambiente redutor (uma relação alta entre NADPH e NADP⁺ e entre as formas reduzida e oxidada da glutatona) (Rani e Mythili, 2014).

3.2.6 Capacidade Antioxidante Total

A capacidade antioxidante total, em resumo, está relacionada com a capacidade do metabolismo em proteger os sistemas biológicos dos efeitos deletérios resultantes dos processos ou reações envolvendo EROs.

O balanço redox em líquidos biológicos, organelas, células ou tecidos é determinado pela presença de pares redox responsáveis pelo fluxo de elétrons. Esses sofrem frequentes interconversões entre o estado reduzido e o oxidado. Alguns desses pares redox são interligados ("redox cycling"), outros constituem sistemas redox independentes. O balanço redox, na célula, relaciona-se à soma dos produtos do potencial de redução e da capacidade redutora de uma série de pares redox, acoplados, presentes (Vasconcelos *et al.*, 2007).

Os diversos testes propostos na literatura variam quanto ao tipo de radicais gerados, ao indicador de oxidação escolhido e ao método usado para sua detecção e quantificação. São chamados ensaios de capturação ("trap assays"). Em todos esses ensaios, um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência, perda ou ganho de sinais de ESR ("Electron Spin Resonance" ou Ressonância do Spin Eletrônico) ou outra mudança mensurável. A presença de antioxidantes altera esses sinais, o que permite sua análise quantitativa (Halliwell e Gutteridge, 1990).

3.2.7 Peroxidação Lipídica

A peroxidação líídica é uma reação em cadeia que se inicia com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado da membrana celular pelo radical hidroxila(OH•) ou pelo radical alcóxila (LO•), resultando na formação de um radical lipídico (L•). Na primeira etapa de propagação o L• reage rapidamente com o O₂, resultando na formação do radical peróxila LOO• que por sua vez sequestra outro hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o L•. A reação só termina quando os radicais L• e LOO• propagam-se até destruírem a si só (figura 5). A

peroxidação lipídica pode ser catalisada por íons ferro, por conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais altamente reativos (alcoxila e peroxila) que por sua vez iniciam nova cadeia de reações, denominada (Genet, Kale e Baquer, 2002). A membrana é um dos componentes celulares mais atingidos por radicais devido a presença de ácidos graxos poliinsaturados que sofrem uma oxidação em cadeia.

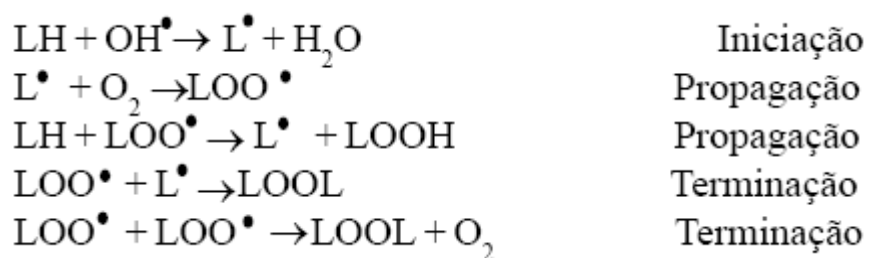


Figura 5: Etapas da lipoperoxidação onde LH representa um ácido graxo polinsaturado, L• um radical lipídico e LOO• um radical peroxila.

As consequências da peroxidação lipídica em membranas podem ser a perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como enzimas hidrolíticas dos lisossomas e formação de produtos citotóxicos como malondialdeído (MDA) podendo levar a morte celular. Vale lembrar que nem sempre os processos de peroxidação lipídica são prejudiciais, pois seus produtos são essenciais na formação de prostaglandinas em resposta inflamatória (Russell *et al.*, 2003).

A indução de diabetes com estreptozotocina (STZ) ou aloxana em ratos resulta em um aumento do ácido tiobarbiturico (TBARS) numa evidência indireta de que a produção de radicais livres se intensifica nessa patologia. (Martim, Sanders e Watkins, 2003). A peroxidação lipídica pode levar a resistência à insulina no músculo, contribuindo assim para o desenvolvimento do DM (Pillon *et al.*, 2012; Kopprasch *et al.*, 2015).

4. Referência Bibliográfica

Alberti, K. G.; Zimmet, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabet Med**, v. 15, n. 7, p. 539-53, Jul 1998.

Aragno, M. et al. Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 26, n. 11-12, p. 1467-74, Jun 1999.

Ashcroft, F. M.; Rorsman, P. Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1160-1171, 2012.

Bailey, C. J.; Day, C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. **Diabetes Care**, v. 12, n. 8, p. 553-64, Sep 1989.

Baynes, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, n. 4, p. 405-12, Apr 1991.

Bergeron, R. et al. Effect of AMPK activation on muscle glucose metabolism in conscious rats. **Am J Physiol**, v. 276, n. 5 Pt 1, p. E938-44, May 1999.

Bondy, S. C.; LeBel, C. P. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. **Free Radic Biol Med**, v. 14, n. 6, p. 633-42, Jun 1993.

Bosi, P. L. et al. Prevalência de diabetes melito e tolerância à glicose diminuída na população urbana de 30 a 79 anos da cidade de São Carlos, São Paulo. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 6, p. 726-32, 2009.

Cadenas, E.; Davies, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radic Biol Med**, v. 29, n. 3-4, p. 222-30, Aug 2000.

Cohen, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this the time for clinical trials? **Ann Intern Med**, v. 111, n. 11, p. 918-31, Dec 1 1989.

Craig, M. E. et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. **Pediatr Diabetes**, v. 15 Suppl 20, p. 4-17, Sep 2014.

DeFronzo, R. A.; Abdul-Ghani, M. A. Preservation of beta-cell function: the key to diabetes prevention. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 8, p. 2354-66, Aug 2011.

DeFronzo, R. A.; Tripathy, D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 32 Suppl 2, p. S157-63, Nov 2009.

Del Maestro, R. F. An approach to free radicals in medicine and biology. **Acta Physiol Scand Suppl**, v. 492, p. 153-68, 1980.

Detaille, D. et al. Obligatory role of membrane events in the regulatory effect of metformin on the respiratory chain function. **Biochemical pharmacology**, v. 63, n. 7, p. 1259-1272, 2002.

El-Mir, M. Y. et al. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. **J Biol Chem**, v. 275, n. 1, p. 223-8, Jan 7 2000.

Ferreira, A.; Matsubara, L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

Fischer, Y. et al. Action of metformin on glucose transport and glucose transporter GLUT1 and GLUT4 in heart muscle cells from healthy and diabetic rats. **Endocrinology**, v. 136, n. 2, p. 412-20, Feb 1995.

Ge, X. et al. Chronic insulin treatment causes insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes through oxidative stress. **Free Radic Res**, v. 42, n. 6, p. 582-91, Jun 2008.

Gunton, J. E. et al. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 3, p. 1323-32, Mar 2003.

Halliwell, B.; Clement, M. V.; Long, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Lett**, v. 486, n. 1, p. 10-3, Dec 1 2000.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 1-85, 1990.

Hancer, N. J. et al. Insulin and metabolic stress stimulate multisite serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and inhibit tyrosine phosphorylation. **J Biol Chem**, v. 289, n. 18, p. 12467-84, May 2 2014.

Hayashi, T. et al. Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. **Diabetes**, v. 47, n. 8, p. 1369-73, Aug 1998.

Jakobsen, S. N. et al. 5'-AMP-activated protein kinase phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in mouse C2C12 myotubes in response to 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside. **J Biol Chem**, v. 276, n. 50, p. 46912-6, Dec 14 2001.

Kaul, N. et al. Probucol treatment reverses antioxidant and functional deficit in diabetic cardiomyopathy. **Mol Cell Biochem**, v. 160-161, p. 283-8, Jul-Aug 1996.

Kaul, N. et al.. Probucol improves antioxidant activity and modulates development of diabetic cardiomyopathy. **Nutrition**, v. 11, n. 5 Suppl, p. 551-4, Sep-Oct 1995.

Kopprasch, S. et al. Association of systemic oxidative stress and insulin resistance/sensitivity indices - the PREDIAS study. **Clin Endocrinol (Oxf)**, May 4 2015.

Kushnareva, Y.; Murphy, A. N.; Andreyev, A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. In: (Ed.). **Biochem J**. England, v.368, 2002. p.545-53.

Malerbi, D. A.; Franco, L. J. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. **Diabetes Care**, v. 15, n. 11, p. 1509-16, 1992.

Martim, A. C.; Sanders, R. A.; Watkins, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 17, n. 1, p. 24-38, 2003.

Meng, S. et al. Metformin activates AMP-activated protein kinase by promoting formation of the alphabetagamma heterotrimeric complex. **J Biol Chem**, v. 290, n. 6, p. 3793-802, Feb 6 2015.

Merrill, G. F. et al. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. **Am J Physiol**, v. 273, n. 6 Pt 1, p. E1107-12, Dec 1997.

Moraes, S. A. d. et al. Prevalência de diabetes mellitus e identificação de fatores associados em adultos residentes em área urbana de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 2006: Projeto OBEDIARP. **Cad Saúde Pública**, v. 26, n. 5, p. 929-41, 2010.

Organization, W. H. **The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life**. World Health Organization, 2002.

Owen, M. R.; Doran, E.; Halestrap, A. P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. **Biochem J**, v. 348 Pt 3, p. 607-14, Jun 15 2000.

Ozansoy, G. et al. Short-term gemfibrozil treatment reverses lipid profile and peroxidation but does not alter blood glucose and tissue antioxidant enzymes in chronically diabetic rats. **Mol Cell Biochem**, v. 216, n. 1-2, p. 59-63, Jan 2001.

Pickup, J. C. Diabetes: insulin pump therapy for type 2 diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol**, v. 10, n. 11, p. 647-9, Nov 2014.

Pillon, N. J. et al. The lipid peroxidation by-product 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) induces insulin resistance in skeletal muscle through both carbonyl and oxidative stress. In: (Ed.). **Endocrinology**. United States, v.153, p.2099-111, 2012.

Plomgaard, P. et al. Tumor necrosis factor- α induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. **Diabetes**, v. 54, n. 10, p. 2939-45, Oct 2005.

Rani, A. J.; Mythili, S. V. Study on total antioxidant status in relation to oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. **J Clin Diagn Res**, v. 8, n. 3, p. 108-10, Mar 2014.

Rauscher, F. M.; Sanders, R. A.; Watkins, J. B., 3rd. Effects of piperine on antioxidant pathways in tissues from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 14, n. 6, p. 329-34, 2000.

Rauscher, F. M, Sanders, R. A, Watkins, J. B 3rd. Effects of coenzyme Q10 treatment on antioxidant pathways in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 15, n. 1, p. 41-6, 2001.

Rayburn, W. F. Diagnosis and classification of diabetes mellitus: highlights from the American Diabetes Association. **J Reprod Med**, v. 42, n. 9, p. 585-6, Sep 1997.

Reiter, R. J. et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. **J Biomed Sci**, v. 7, n. 6, p. 444-58, Nov-Dec 2000.

Rossetti, L.; Giaccari, A.; DeFronzo, R. A. Glucose toxicity. **Diabetes Care**, v. 13, n. 6, p. 610-30, Jun 1990.

Sakamoto, K.; Holman, G. D. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, n. 1, p. E29-37, Jul 2008.

Salpeter, S. R. et al. Meta-analysis: metformin treatment in persons at risk for diabetes mellitus. In: (Ed.). **Am J Med**. United States, v.121, 2008. p.149-157 e2.

Schmidt, M. et al. **Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: carga e desafios atuais**. The Lancet Saúde no Brasil 2011.

Sies, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur J Biochem**, v. 215, n. 2, p. 213-9, Jul 15 1993.

Steinberg, G. R.; Kemp, B. E. AMPK in Health and Disease. **Physiol Rev**, v. 89, n. 3, p. 1025-78, Jul 2009.

Steinberg, G. R. et al. Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. **Cell Metab**, v. 4, n. 6, p. 465-74, Dec 2006.

Turrens, J. F.; Boveris, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochem J**, v. 191, n. 2, p. 421-7, Nov 1 1980.

Ungar, G.; Freedman, L.; Shapiro, S. L. Pharmacological studies of a new oral hypoglycemic drug. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 95, n. 1, p. 190-2, May 1957.

Vasconcelos, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

Vincent, E. E. et al. Differential effects of AMPK agonists on cell growth and metabolism. **Oncogene**, Sep 22 2014.

Vozarova, B. et al. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 6, p. 1889-95, Jun 2002.

Yki-Jarvinen, H.; Helve, E.; Koivisto, V. A. Hyperglycemia decreases glucose uptake in type I diabetes. **Diabetes**, v. 36, n. 8, p. 892-6, Aug 1987.

Capítulo 2

Artigo científico submetido à revista “Free Radical Biology & Medicine”

O PAPEL DA METFORMINA NO CONTROLE DO ESTRESSE OXIDATIVO EM MÚSCULO DE RATOS DIABÉTICOS

Resumo

Introdução e Objetivos: A metformina pode atuar no músculo inibindo o complexo I da cadeia de transporte de elétrons, ativando uma cascata de sinalização para translocação de GLUT-4 para membrana. Nossa hipótese é que esta inibição pode diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio mitocondrial (ROS), minimizando os danos celulares causados pelo estresse oxidativo. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade e expressão de enzimas do estresse oxidativo, capacidade antioxidante total e peroxidação lipídica no músculo gastrocnêmio de ratos com diabetes *mellitus* induzida e tratados com insulina e/ou metformina. **Materiais e Métodos:** O DM foi induzido em ratos Wistar divididos em quatro grupos: não tratados, tratados com insulina, insulina e metformina, e metformina. O músculo gastrocnêmio foi coletado e homogeneizado para avaliar os seguintes parâmetros: superóxido dismutase (SOD) e catalase (atividade e expressão), glutathione-peroxidase, glutathione redutase e glicose-6-fosfato desidrogenase (atividade), glutathione reduzida, peroxidação lipídica e capacidade antioxidante. **Resultados e conclusões:** Os grupos tratados com metformina mostraram prevenção no aumento da atividade e expressão de SOD e catalase, bem como mantiveram a capacidade antioxidante total e atividade de G6PDH, quando comparado com o grupo não tratado. Esses resultados parecem estar relacionados com uma menor peroxidação lipídica. Portanto, este estudo sugere que a metformina pode estar envolvida na regulação do estresse oxidativo nas células musculares diminuindo a peroxidação lipídica que poderia melhorar a captação de glicose.

Palavras chave: Espécies reativas de oxigênio, Antioxidantes, Hipoglicemiante.

METFORMIN ROLE IN CONTROL OF OXIDATIVE STRESS IN MUSCLE OF DIABETIC RATS

Abstract

Introduction and Objectives: Metformin can act in muscle inhibiting the complex I of the electron transport chain and activating a signaling cascade for glut-4 translocation to the membrane cell. Our hypothesis is that this inhibition can decrease mitochondrial reactive oxygen species (ROS), minimizing cell damage caused by oxidative stress. Thus, the aim of this study was to evaluate the activity and expression of oxidative stress enzymes, total antioxidant status and lipid peroxidation in gastrocnemius muscle of rat with induced diabetic Mellitus and treated with metformin. **Materials and Methods:** The DM was induced in Wistar rats divided into four groups: untreated, treated with insulin, insulin plus metformin, and metformin. A non-diabetic group was used as control. The gastrocnemius muscle was collected and homogenized to evaluate the following parameters: superoxide dismutase (SOD) and catalase (activity and immunoblotting), glutathione peroxidase, glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase (activity), reduced glutathione, lipid peroxidation and total antioxidant capacity were measured. **Results and conclusions:** he group treated with metformin showed prevention in increased activity and expression of SOD and catalase, and kept the total antioxidant capacity and G6PDH activity when compared to the untreated group. These results seem to be related to lower lipid peroxidation. Therefore, this study suggest that metformin may is involved in the regulation of the oxidative stress in muscle cells decreasing lipid peroxidation which could improve glucose uptake.

Key words: Reactive oxygen species, antioxidants, hipolglycemic.

METFORMIN ROLE IN CONTROL OF OXIDATIVE STRESS IN MUSCLE OF DIABETIC RATS

Danielle Diniz Vilela^A , Leonardo Gomes Peixoto^A, Renata Roland Teixeira^A, Nathalia Belele Baptista^A, Douglas Carvalho Caixeta^A, Adriele Vieira de Souza ^A, Robinson Sabino da Silva^B , Foued Salmen Espindola^A

A. Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, MG, Brazil.

B. Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, MG Brazil.

Danielle Diniz Vilela
danielledvilela@gmail.com

Leonardo Gomes Peixoto
lgpeixoto@yahoo.com.br

Renata Roland Teixeira
rolandteixeira@yahoo.com

Nathalia Belele Baptista
nath.belele@gmail.com

Douglas Carvalho Caixeta
caixeta_douglas@yahoo.com.br

Robinson Sabino da Silva
robinsonsabino@gmail.com

*Foued Salmen Espindola (Corresponding Author) PhD.

Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia
Uberlândia, MG, Brasil
foued@ufu.br
Rua Acre, S/N, Bloco 2E sala 237, 38400-902 - Uberlândia - MG- Brazil

1 Introduction

Metformin, a biguanide derivate, is widely used to treat patients with Type 2 *Diabetes mellitus* (DM2)(Nathan *et al.*, 2009). This drug decreases plasma glucose levels and improves insulin sensitivity (Salpeter *et al.*, 2008). The hypoglycemic action of metformin is a result of inhibition of gluconeogenesis which decreases the release of glucose from the liver (Shaw *et al.*, 2005). Moreover, in skeletal muscle, metformin improves glucose uptake (McIntyre *et al.*, 1991).

Metformin is known to inhibit mitochondrial complex I *in vitro* (Owen, Doran e Halestrap, 2000; Brunmair *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2008). Although a mechanism of this interaction remains unclear, there is evidence of an interaction between metformin and copper ions, altering the membrane potential. The accumulation of positive charge in the mitochondrial matrix elicited a decrease in ATP (Logie *et al.*, 2012).

Metformin has been shown to activate 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) by stimulating phosphorylation (Thr172) of the catalytic α subunit in skeletal muscle and liver (Zhou *et al.*, 2001; Hawley *et al.*, 2002). In skeletal muscle AMPK induces an intracellular signaling cascade in response to cellular energy change (Hardie, 2003; Hardie, Hawley e Scott, 2006), affecting glucose uptake by the increase of GLUT4 translocation to the cell membrane (Lee, Wei e Loeken, 2014). Some studies have considered that the treatment of DM2 patients with metformin seems contraindicated, since muscle mitochondrial dysfunction has been associated with the pathogenesis of this disease (Morino, Petersen e Shulman, 2006; Szendroedi, Phielix e Roden, 2012). However, our hypothesis is that the decrease in oxidative capacity in muscle reduce cell damage caused by oxidative stress in *Diabetes mellitus*, since the complex I blocking can lead to a decrease production of reactive oxygen species (ROS), due to reduced transport of electrons from NADH plus H^+ (Turrens e Boveris, 1980; Kushnareva, Murphy e Andreyev, 2002).

The increase of oxidative stress is associated with the development and progression of diabetes complications (Baynes, 1991; Maritim, Sanders e Watkins, 2003). In muscle, the oxidative stress can increase lipid peroxidation in cell membranes, contributing to the development of insulin resistance (Pillon *et al.*, 2012; Kopprasch *et al.*, 2015). Considering that peripheral insulin resistance is characteristic not only for

subjects with DM2, but a clinically relevant finding also in subjects with type 1 *Diabetes Mellitus* (DM1) (Yki-Jarvinen, Helve e Koivisto, 1987; Rossetti, Giaccari e DeFronzo, 1990), the investigation of metformin related to oxidative stress markers in skeletal muscle would clear new benefits to the treatment of diabetic patients. Thus, the aim of this study is to evaluate the activity and expression of markers of oxidative stress, total antioxidant capacity and lipid peroxidation in the gastrocnemius muscle of diabetic rats treated with metformin and / or insulin.

2 Materials and methods

2.1 Animals

Male Wistar rats (about 7 weeks and weighing 200-270 g) were kept in standard conditions (22 ± 1 ° C, humidity 60% $\pm$ 5 and 12 hours light / 12 hours dark) with *ad libitum* food and water. The procedures for handling and use of animals followed the resolutions proposed by the Brazilian Society of Laboratory Animal Science and by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Uberlandia, Brazil (CEUA / UFU 107/14).

2.2 Diabetes Induction

The rats were subjected to 24-h starvation and given intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 45 mg / kg body weight, dissolved in 0.01M sodium citrate buffer, pH 4.5) to diabetes induction. Control group animals received the same volume of citrate buffer. Blood glucose was determined by puncture with lancet of the tail and measured using test strips (Accu-Chek Performa) 10 days after STZ injection. Rats with fasting glucose level > 250 mg / dl were considered diabetic.

2.3 Groups and treatment

Diabetic animals were divided randomly into 4 groups (n = 6 / group): untreated diabetics (D) diabetic treated with insulin (DI), diabetic treated with insulin and metformin (DIM) and diabetic treated with metformin (DM). In the non-diabetic (ND) group, animals received both placebo preparations alone. After diabetes characterization, the DI and DIM rats were submitted to a 7 day treatment with insulin (Novolin N Human Insulin -NPH) at a dose of 3 units per day (1U at 08:00 hours and 2U at 17:00 hours; subcutaneously). The metformin (metformin hydrochloride, Merck) was

diluted with filtered water and the animals received (500 mg / kg body weight) by oral gavage during 7 days. The non-diabetic group received filtered water by oral gavage. After glycemia evaluation in the seventh day of treatment and animals were euthanized by sodium thiopental overdose (80 mg / kg body weight, iv).

2.4 Sample collection and Tissue Preparation

The gastrocnemius muscles were quickly removed and washed chilled normal saline (NaCl 0.9%) and immersed in liquid nitrogen. For oxidative stress markers and western blotting analyses, muscle tissue was homogenized in phosphate buffer (1:10 w/v, pH 7.4). The homogenates were centrifuged at 15,000 xg for 10 min at 4C, and total protein concentration in the supernatant samples was measured following the Bradford assay (Bradford, 1976).

2.5 Oxidative Stress Markers Analysis

2.5.1 Lipid Peroxidation (TBARS)

Lipid peroxidation was measured in the gastrocnemius muscle by reaction of malondialdehyde (MDA) with thiobarbituric acid (0.67% TBA), forming a colored compound, read fluorometer at 514 nm excitation and 553 nm emission. A MDA standard curve allowed the quantification of that compound in the samples by linear regression (Yagi, 1998).

2.5.2 Total antioxidant capacity (FRAP)

Antioxidants present in the samples reduced Fe^{+3} (ferric chloride solution 20 mM) of Fe^{+2} , which is chelated by 2,4,6-tri (2pyridil) -s-triazine (TPTZ 10mM), forming the complex Fe^{+2} -TPTZ of intense blue color, read in spectrophotometer at 593 nm.

2.5.3 Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity (G6PDH)

The activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase was monitored by the production of NADPH with a consequent increase in absorbance at 340nm. The reading was performed in a microplate, where the sample was incubated with Tris-HCl buffer (100mM, pH 7.5), magnesium chloride (MgCl_2 2 M), NADP + (0.5 mM) and glucose 6-phosphate (1mM). The kinetic reading was taken for 10 minutes (Leong e Clark, 1984).

2.5.4 Glutathione Reductase Activity (GR)

The GR assay to quantitate the enzyme activity registered the decrease in the concentration of NADPH in the sample reacting with GR buffer (200 mM sodium phosphate pH 7.5, 6.3mM EDTA) and NADPH. The kinetic reading was performed at 340 nm for 10 minutes (Carleberg e Mannervik, 1985).

2.5.5 Glutathione Peroxidase Activity (GPx)

To measure the activity of glutathione peroxidase, the homogenate was incubated with GPx buffer (100 mM potassium phosphate with 1 mM EDTA pH 7.7), 40 mM sodium azide, GSH (diluted in 5% metaphosphoric acid), GR (GPx diluted in buffer) NADPH (diluted with sodium bicarbonate 5%) and tert-butyl. The decay of NADPH concentration was recorded in 10 minute time in a spectrophotometer at 340 nm (Wendel, 1980).

2.5.6 Reduced glutathione (GSH)

The proteins contained in the sample were initially precipitated metaphosphoric acid (MPA) in the ratio 1: 1 (homogenate MPA) with agitation. The samples were centrifuged at 7000xg for 10 minutes and the supernatant was used for the measurements. A standard curve of GSH (starting from short 1mM stock solution) was made to quantify GSH in the sample from a linear regression. GSH reacts with ortho-phthalaldehyde (OPT 1mg / ml methanol) in sodium phosphate monobasic buffer (0.1M) containing EDTA (0.005M). The reading was held in fluorometer with excitation 350nm and emission 420 (Browne e Armstrong, 1998).

2.6 Western Blotting

Aliquots of supernatant sample were solubilized in electrophoresis sample buffer containing and additional 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 25% glycerol. Twenty micrograms of protein was electrophoresed, transferred to nitrocellulose membrane in Tris-glycine buffer (Towbin, Staehelin e Gordon, 1992). The membranes were blocked with 5% dried milk in PBS-T (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) and then incubed with catalase and SOD primary antibodies (0.1 µg/mL). The samples were incubated with a peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (diluted 1:5000). Antibodies bound to the membranes were visualized by chemiluminescence. The

intensity of the protein bands was analyzed by ImageQuantTL software and results were expressed by densitometry.

2.7 Statistical Analysis

All values were presented as mean $\pm$ SEM. Blood glucose analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's Multiple Comparison as post-test. And the analysis of oxidative stress biomarkers was performed by ANOVA followed by Tukey Multiple Comparison as post-test. All analyzes were performed in GraphPad Prism program (GraphPad Prism version 4.00 for Windows; GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3 Results

Table 1. Blood glucose levels of diabetic and non-diabetic rats.

Groups	Initial Glycemia	Final Glycemia
D	429.66 $\pm$ 102.14	502.71 $\pm$ 61.16
ND	64.10 $\pm$ 10.75*	92.00 $\pm$ 11.45*
DI	388.16 $\pm$ 35.67	286.50 $\pm$ 116.51*
DIM	446.33 $\pm$ 52.12	174.80 $\pm$ 85.46*
DM	486.00 $\pm$ 109.90	504.42 $\pm$ 52.26

Diabetic (D), non-diabetic (ND), diabetic treated with insulin (DI), diabetic treated with Insulin and Metformin (DIM) and diabetic treated with Metformin (DM). * $p < 0.05$ compared with D. Initial glycemia: 10 days after diabetes induction or placebo injection. Final Glycemia: 7 days after treatment (insulin, metformin, placebo).

As expected, high plasma glucose levels ($p < 0.05$) were observed in diabetic rats (D) as compared to nondiabetic rats (ND; Table1). Animals treated with insulin (DI) and treated with Insulin plus Metformin (DIM) showed a decrease ($p < 0.05$) in blood glucose compared to untreated animals (D). Although this decrease did not reach blood glucose levels of non-diabetic rats (ND), we found that adding metformin to insulin treatment proved to be more efficient because it was able to reduce blood glucose levels by up to 61%, while the rats treated only with insulin reduced blood glucose in just 26%. Furthermore, despite the diabetic rats treated with metformin (DM) did not

showed a decrease in blood glucose, when monitoring the glycemia throughout the day (data not shown) it was verified a decrease until 6 hours after metformin administration.

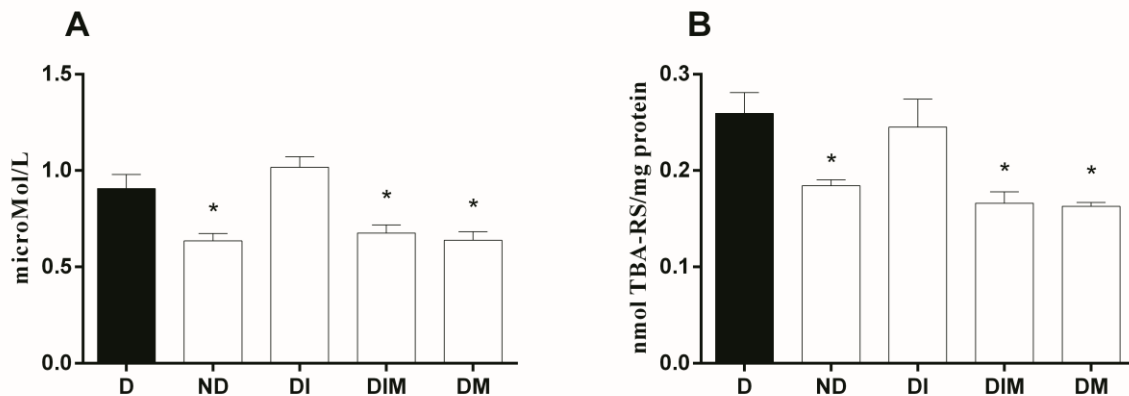


Figure 1: Analysis of biomarkers of oxidative stress in gastrocnemius muscle of diabetic and non-diabetic rats. FRAP (A), TBARS (B). Non-diabetic (ND), diabetic (D), diabetic treated with insulin (DI), diabetic treated with insulin and metformin (DIM) and metformin (DIM) and diabetic treated with metformin (DM). * $p < 0.05$ compared with D.

The diabetic rats had increased ($p < 0.05$) total antioxidant capacity and lipid peroxidation in relation to non-diabetic rats. The diabetic animals treated with metformin (DIM and DM) presented a decrease ($p < 0.05$) of these parameters compared to the untreated diabetic group (Figure 01). The animals treated with insulin (DI) showed no difference in total antioxidant capacity and lipid peroxidation compared to group D (Figure 1, B).

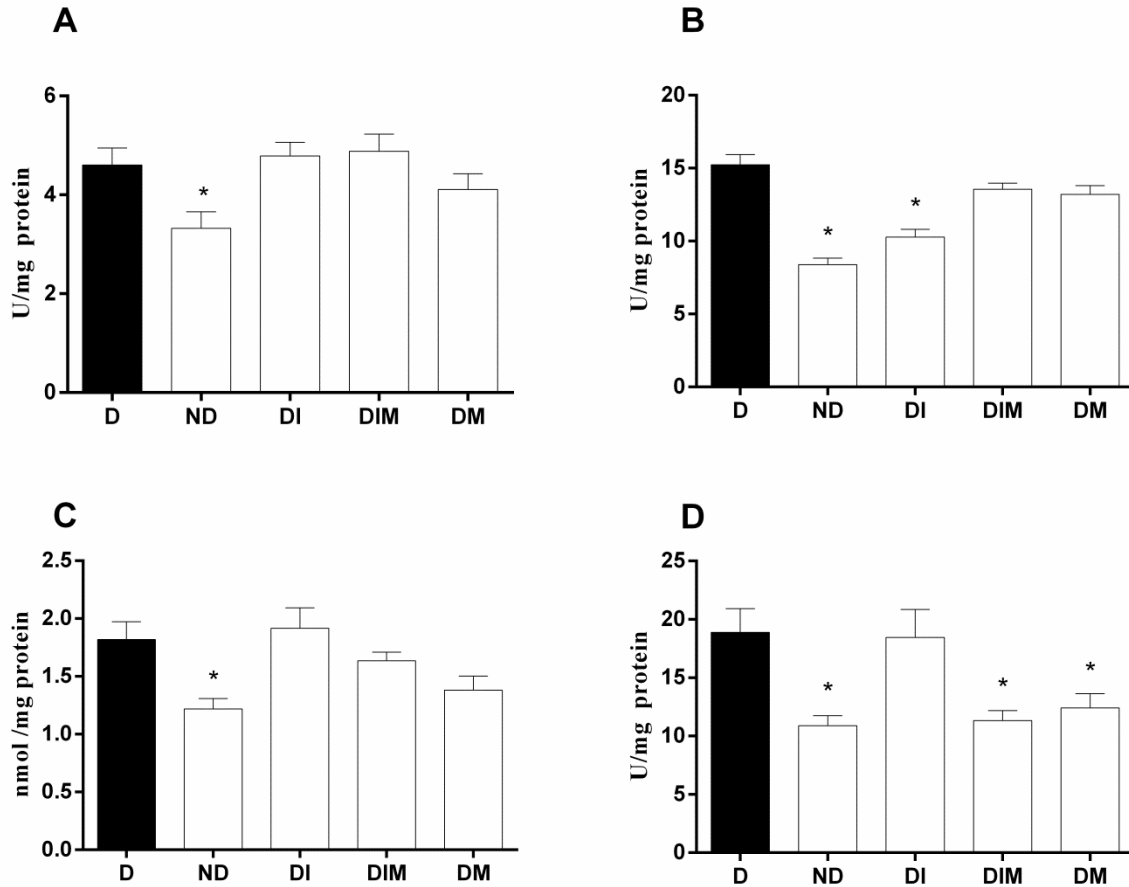


Figure 2: Glutathione antioxidant defense system in gastrocnemius muscle of diabetic rats and not diabetic. GPX (A), GR (B) GSH (C) and G6P (D). Non-diabetic (ND), Diabetic (D) Diabetic treated with insulin (DI), Diabetic treated with insulin and metformin diabetic (DM). * $p < 0.05$ compared with D.

Evaluating the antioxidant defense system of glutathione, an increased activity ($p < 0.05$) of GPx, GR and G6PD enzymes and concentration of GSH was observed in gastrocnemius muscle of D than ND rats (Figure 2A-2D). The GR activity in gastrocnemius muscle was lower ($p < 0.05$) in DI compared to D rats (Figure 2B). In both groups treated with metformin (DIM and DM) a decrease ($p < 0.05$) in the activity of G6PD was verified in relation to D group (Figure 2D).

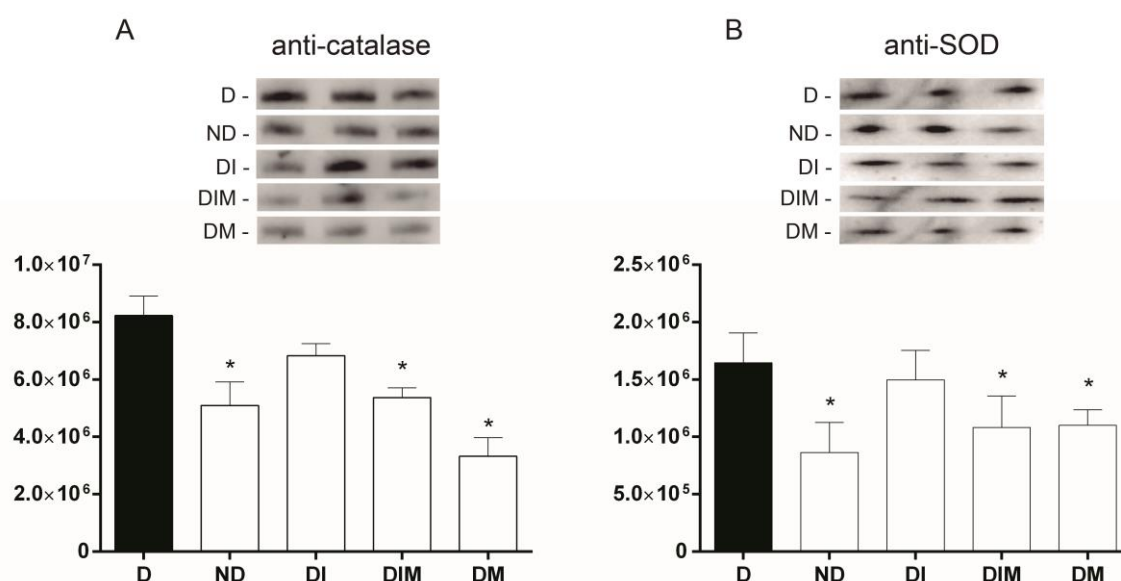


Figure 3: Catalase (A) and SOD (B) protein contained gastrocnemius muscle of diabetic and non-diabetic rats. Diabetic (D), not diabetic (ND), diabetic treated with insulin (DI), diabetic treated with insulin and metformin (DIM) and diabetic treated with Metformin (DM). At the top of each graph, a representative image of the western blot assay. Bands representatives of 3rats/group (total n=6rats/group). * $p < 0.05$ compared with D.

Western blotting was performed to assess the expression of catalase and SOD in the treatment of diabetic rats (Figure 3 A and 3B). Catalase and SOD expression were increased ($p < 0.05$) in D than ND rats. The densitometric analysis also showed that catalase and SOD decrease ($p < 0.05$) in rats treated with metformin compared to diabetic group. On the other hand, in the group treated with insulin (DI) no change in the expression of these enzymes was verified compared to diabetic rats (Figure 3 A and 3B).

4 Discussion

The present study demonstrated how treatment with metformin may influence indirectly the antioxidant defense system in diabetic rats. This results appears to be associated with the mechanism of action of this drug that blocks the mitochondrial complex I (Brunmair *et al.*, 2004; Piwkowska *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2014) leading to decreased production of ROS (Ouslimani *et al.*, 2005) and decrease mitochondrial

oxidative capacity (Wessels *et al.*, 2014). Here, we show that metformin may prevent muscle cell damage decreasing lipid peroxidation and altering activity and expression of enzymes involved in the oxidative stress.

The ROS increase generated by hyperglycemia (Yano *et al.*, 2004) leads to an increased activity of SOD that was observed in diabetic group (Manea *et al.*, 2004; Akhileshwar, Patel e Katyare, 2007). Moreover, oxidative stress generated by diabetes active signaling pathway JNK/FOXO (Kawamori *et al.*, 2006) and the phosphorylation of the transcription factor FOXO by JNK. FOXO phosphorylated translocate to the nucleus, upregulating the expression of MnSOD and catalase gene (Kawamori *et al.*, 2006; Erol, 2007). Diabetic animals treated with metformin had lower expression of these enzymes. This suggests that metformin may regulate indirectly the expression of these enzymes by decrease ROS production and oxidative stress. Moreover, the blocks the complex I can decrease superoxide anion production in mitochondria (Detaile *et al.*, 2002; Miller e Birnbaum, 2010), decreasing the activity of SOD and Catalase and consequently the expression of enzymes.

The increased of the ROS can also stimulate peroxidase-glutathione glutathione reductase system in different tissues (Maritim, Sanders e Watkins, 2003). Thus, the activities of GPx, GR and G6PD enzymes and the concentration of GSH increased in untreated diabetics rats, suggesting an imbalance of the oxidant status. The animals treated with insulin showed the same behavior in relation to these markers, excepted to the reduced GR enzyme activity in this group. The fact of insulin increase the glucose uptake could explain the reduction in GR activity, since this enzyme is negatively modulated by glucose.

Furthermore, we showed no change in GR activity after metformin treatment, even if the intracellular glucose was increased. Probably, this may be related to the ability of metformin to block complex I leading to the accumulation in the mitochondrial

matrix NADH. There is evidence that in this condition, NADH is oxidized to NAD by nicotinamide nucleotide transhydrogenase enzyme, also present in the inner mitochondrial membrane. This enzyme transfers these electrons from NADH to NADP^+ , reducing it to NADPH (Albracht, Meijer e Rydstrom, 2011; Krengel e Tornroth-Horsefield, 2015). The accumulation of this coenzyme, substrate for GR, can explain the absence of change in the activity of this enzyme in the metformin-treated groups compared to untreated diabetics group. Further, it is known that NADPH acts as a negative allosteric modulator of the G6PDH enzyme, decreasing its activity as observed in treatment with metformin. Despite treatment with metformin have altered the expression of SOD and catalalase and have shown evidence of NADP^+ accumulation in mitochondria by decreasing G6PDH, we did not find differences in GPX enzyme activity and the concentration of GSH in diabetic animals treated with metformin compared to the untreated group.

In our study, the diabetic rats untreated and treated with insulin increased the total antioxidant capacity in the muscle. Some studies showed that the total antioxidant capacity is decreased in diabetic rats (Machha *et al.*, 2007; Nakhaee *et al.*, 2009) in experiments that evaluated the animals for 4 to 6 weeks (2-ours, 4- Nakhaee *et al.*, 2009, 6 Machha *et al.*, 2007; weeks respectively). The data presented in our study where animals remained diabetic for two weeks, there was an initial compensatory increase in antioxidant capacity, induced as a response to an overproduction of free radicals, as described in a previous study (Savu *et al.*, 2012). On the other hand, as shown here, metformin prevented an increase in total antioxidant capacity both in animals treated with the drug alone or its combination with insulin. This may have occurred by metformin action in controlling the ROS production in skeletal muscle of animals.

There was a high level of lipid peroxidation in the muscle of untreated diabetic animals in the present study, as shown in other studies (Gul *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2011; Dey *et al.*, 2015). Whereas a greater amount of reactive oxygen species is directly related to the increase of lipid peroxidation (Sundaram *et al.*, 1996; Büyükköçak *et al.*, 2000), this increase observed in the present study could be associated with an increased insulin resistance and an ability to reduced glucose absorption (Russell *et al.*, 2003).

Instead, and as a result of the drug action, muscles of animals treated with metformin showed a decrease in lipid peroxidation. Interestingly, when combined, the treatment of metformin associated at insulin, there was a better glycemic control (61% reduction in blood glucose). On the other hand, treatment with insulin alone did not prevent an increase in lipid peroxidation of the muscle cell and promote less glycemic control (26% reduction in blood glucose). These results suggest that concomitant insulin and metformin therapy was more effective in reducing blood glucose levels than insulin administration only. It is well described that metformin reduces insulin resistance, and increases the uptake of glucose in muscle via activation of both AMPK and GLUT4 translocation (Owen, Doran e Halestrap, 2000; Viollet *et al.*, 2009). Besides, metformin inactivated proinflammatory mediators produced by systemic inflammation resulting from diabetes (Vozarova *et al.*, 2002; Pickup, 2004; 2014a). Beside this, we show an indirect action of metformin in antioxidant defense system resulting in the prevention of lipid peroxidation and oxidative damage in muscle cells from diabetic animals, which may have contributed to the decrease of blood glucose.

5 Conclusion

According to the results of oxidative stress, metformin treatment of diabetic rats, can indirectly regulate the antioxidant system. Thus, metformin showed a role in

maintaining the antioxidant capacity, preventing lipid peroxidation in skeletal muscle and avoiding the oxidative damage. Furthermore, combination therapy with metformin and insulin effectively reduced blood glucose when compared with the use of insulin therapy alone. Therefore, the use of metformin different dosage and long-term safety should be investigated in association with insulin treatment of diabetes.

6 References

Akhileshwar, V.; Patel, S. P.; Katyare, S. S. Diabetic cardiomyopathy and reactive oxygen species (ROS) related parameters in male and female rats: A comparative study. In: (Ed.). **Indian J Clin Biochem**. India, v.22, 2007. p.84-90.

Alberti, K. G.; Zimmet, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabet Med**, v. 15, n. 7, p. 539-53, Jul 1998.

Albracht, S. P.; Meijer, A. J.; Rydstrom, J. Mammalian NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) and nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) together regulate the mitochondrial production of H₂O₂--implications for their role in disease, especially cancer. **J Bioenerg Biomembr**, v. 43, n. 5, p. 541-64, Oct 2011.

Ashcroft, F. M.; Rorsman, P. Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1160-1171, 2012.

Baynes, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, n. 4, p. 405-12, Apr 1991.

Bergeron, R. et al. Effect of AMPK activation on muscle glucose metabolism in conscious rats. **Am J Physiol**, v. 276, n. 5 Pt 1, p. E938-44, May 1999.

Bondy, S. C.; LeBel, C. P. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. **Free Radic Biol Med**, v. 14, n. 6, p. 633-42, Jun 1993.

Bosi, P. L. et al. Prevalência de diabetes melito e tolerância à glicose diminuída na população urbana de 30 a 79 anos da cidade de São Carlos, São Paulo. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 6, p. 726-32, 2009.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: (Ed.). **Anal Biochem**. United States, v.72, 1976. p.248-54.

Brunmair, B. et al. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? **Diabetes**, v. 53, n. 4, p. 1052-9, Apr 2004.

Büyükoçak, S. et al. Erythrocyte oxidant/antioxidant status of diabetic patients. **Journal of endocrinological investigation**, v. 23, n. 4, p. 228-230, 2000.

Cadenas, E.; Davies, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radic Biol Med**, v. 29, n. 3-4, p. 222-30, Aug 2000.

Carvalho, C. et al. Metformin promotes isolated rat liver mitochondria impairment. **Mol Cell Biochem**, v. 308, n. 1-2, p. 75-83, Jan 2008.

Chen, G. Q. et al. [Effects of oxidative stress on MuRF1 expression in skeletal muscle of diabetic rats]. **Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 42, n. 3, p. 349-52, May 2011.

Cohen, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this the time for clinical trials? **Ann Intern Med**, v. 111, n. 11, p. 918-31, Dec 1 1989.

Craig, M. E. et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. **Pediatr Diabetes**, v. 15 Suppl 20, p. 4-17, Sep 2014.

DeFronzo, R. A.; Abdul-Ghani, M. A. Preservation of beta-cell function: the key to diabetes prevention. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 8, p. 2354-66, Aug 2011.

DeFronzo, R. A.; Tripathy, D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 32 Suppl 2, p. S157-63, Nov 2009.

Del Maestro, R. F. An approach to free radicals in medicine and biology. **Acta Physiol Scand Suppl**, v. 492, p. 153-68, 1980.

Detaille, D. et al. Obligatory role of membrane events in the regulatory effect of metformin on the respiratory chain function. **Biochemical pharmacology**, v. 63, n. 7, p. 1259-1272, 2002.

Dey, P. et al. Assessment of anti-diabetic activity of an ethnopharmacological plant *Nerium oleander* through alloxan induced diabetes in mice. **J Ethnopharmacol**, v. 161, p. 128-37, Feb 23 2015.

El-Mir, M. Y. et al. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. **J Biol Chem**, v. 275, n. 1, p. 223-8, Jan 7 2000.

Erol, A. Insulin resistance is an evolutionarily conserved physiological mechanism at the cellular level for protection against increased oxidative stress. **Bioessays**, v. 29, n. 8, p. 811-8, Aug 2007.

Fischer, Y. et al. Action of metformin on glucose transport and glucose transporter GLUT1 and GLUT4 in heart muscle cells from healthy and diabetic rats. **Endocrinology**, v. 136, n. 2, p. 412-20, Feb 1995.

Ge, X. et al. Chronic insulin treatment causes insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes through oxidative stress. **Free Radic Res**, v. 42, n. 6, p. 582-91, Jun 2008.

Genet, S.; Kale, R. K.; Baquer, N. Z. Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). **Mol Cell Biochem**, v. 236, n. 1-2, p. 7-12, Jul 2002.

Gul, M. et al. Effects of endurance training on tissue glutathione homeostasis and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. In: (Ed.). **Scand J Med Sci Sports**. Denmark, v.12, 2002. p.163-70.

Gunton, J. E. et al. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 3, p. 1323-32, Mar 2003.

Halliwell, B.; Clement, M. V.; Long, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Lett**, v. 486, n. 1, p. 10-3, Dec 1 2000.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 1-85, 1990.

Hancer, N. J. et al. Insulin and metabolic stress stimulate multisite serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and inhibit tyrosine phosphorylation. **J Biol Chem**, v. 289, n. 18, p. 12467-84, May 2 2014.

Hardie, D. G. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. In: (Ed.). **Endocrinology**. United States, v.144, 2003. p.5179-83.

Hardie, D. G.; Hawley, S. A.; Scott, J. W. AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. **J Physiol**, v. 574, n. Pt 1, p. 7-15, Jul 2006.

Hawley, S. A. et al. The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. **Diabetes**, v. 51, n. 8, p. 2420-5, Aug 2002.

Hayashi, T. et al. Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. **Diabetes**, v. 47, n. 8, p. 1369-73, Aug 1998.

Jakobsen, S. N. et al. 5'-AMP-activated protein kinase phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in mouse C2C12 myotubes in response to 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside. **J Biol Chem**, v. 276, n. 50, p. 46912-6, Dec 14 2001.

Kaul, N. et al. Probucol treatment reverses antioxidant and functional deficit in diabetic cardiomyopathy. **Mol Cell Biochem**, v. 160-161, p. 283-8, Jul-Aug 1996.

Kaul, N. et al. Probucol improves antioxidant activity and modulates development of diabetic cardiomyopathy. **Nutrition**, v. 11, n. 5 Suppl, p. 551-4, Sep-Oct 1995.

Kawamori, D. et al. The forkhead transcription factor Foxo1 bridges the JNK pathway and the transcription factor PDX-1 through its intracellular translocation. In: (Ed.). **J Biol Chem**. United States, v.281, 2006. p.1091-8.

Kopprasch, S. et al. Association of systemic oxidative stress and insulin resistance/sensitivity indices - the PREDIAS study. **Clin Endocrinol (Oxf)**, May 4 2015.

Krengel, U.; Tornroth-Horsefield, S. Biochemistry. Coping with oxidative stress. In: (Ed.). **Science**. United States, v.347, 2015. p.125-6.

Kushnareva, Y.; Murphy, A. N.; Andreyev, A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. In: (Ed.). **Biochem J**. England, v.368, 2002. p.545-53.

Lee, H. Y.; Wei, D.; Loeken, M. R. Lack of metformin effect on mouse embryo AMPK activity: implications for metformin treatment during pregnancy. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 30, n. 1, p. 23-30, Jan 2014.

Leong, S. F.; Clark, J. B. Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. **Biochem J**, v. 218, n. 1, p. 131-8, Feb 15 1984.

Logie, L. et al. Cellular responses to the metal-binding properties of metformin. In: (Ed.). **Diabetes**. United States, v.61, 2012. p.1423-33.

Machha, A. et al. Quercetin, a flavonoid antioxidant, modulates endothelium-derived nitric oxide bioavailability in diabetic rat aortas. **Nitric Oxide**, v. 16, n. 4, p. 442-447, 2007.

Malerbi, D. A.; Franco, L. J. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. **Diabetes Care**, v. 15, n. 11, p. 1509-16, 1992.

Manea, A. et al. Changes in oxidative balance in rat pericytes exposed to diabetic conditions. In: (Ed.). **J Cell Mol Med**. Romania, v.8, 2004. p.117-26.

Maritim, A. C.; Sanders, R. A.; Watkins, J. B., 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 17, n. 1, p. 24-38, 2003.

Martim, A. C.; Sanders, R. A.; Watkins, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 17, n. 1, p. 24-38, 2003.

McIntyre, H. D. et al. Metformin increases insulin sensitivity and basal glucose clearance in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus. **Aust N Z J Med**, v. 21, n. 5, p. 714-9, Oct 1991.

Meng, S. et al. Metformin activates AMP-activated protein kinase by promoting formation of the alphabetagamma heterotrimeric complex. **J Biol Chem**, v. 290, n. 6, p. 3793-802, Feb 6 2015.

Merrill, G. F. et al. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. **Am J Physiol**, v. 273, n. 6 Pt 1, p. E1107-12, Dec 1997.

Miller, R. A.; Birnbaum, M. J. An energetic tale of AMPK-independent effects of metformin. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 7, p. 2267, 2010.

Moraes, S. A. d. et al. Prevalência de diabetes mellitus e identificação de fatores associados em adultos residentes em área urbana de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 2006: Projeto OBEDIARP. **Cad Saúde Pública**, v. 26, n. 5, p. 929-41, 2010.

Morino, K.; Petersen, K. F.; Shulman, G. I. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. In: (Ed.). **Diabetes**. United States, v.55 Suppl 2, 2006. p.S9-S15.

Nakhaee, A. et al. Attenuation of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats by Eucalyptus globulus. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 419-425, 2009.

Nathan, D. M. et al. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n. 1, p. 193-203, Jan 2009.

Organization, W. H. **The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life**. World Health Organization, 2002.

Ouslimani, N. et al. Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. In: (Ed.). **Metabolism**. United States, v.54, 2005. p.829-34.

Owen, M. R.; Doran, E.; Halestrap, A. P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. **Biochem J**, v. 348 Pt 3, p. 607-14, Jun 15 2000.

Ozansoy, G. et al. Short-term gemfibrozil treatment reverses lipid profile and peroxidation but does not alter blood glucose and tissue antioxidant enzymes in chronically diabetic rats. **Mol Cell Biochem**, v. 216, n. 1-2, p. 59-63, Jan 2001.

Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 3, p. 813-23, Mar 2004.

Pickup, J. C. Diabetes: Insulin pump therapy for type 2 diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol**, Aug 2014a.

Pickup, J. C. Diabetes: insulin pump therapy for type 2 diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol**, v. 10, n. 11, p. 647-9, Nov 2014b.

Pillon, N. J. et al. The lipid peroxidation by-product 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) induces insulin resistance in skeletal muscle through both carbonyl and oxidative stress. In: (Ed.). **Endocrinology**. United States, v.153, 2012. p.2099-111.

Piwkowska, A. et al. Metformin induces suppression of NAD(P)H oxidase activity in podocytes. In: (Ed.). **Biochem Biophys Res Commun**. United States: 2010 Elsevier Inc, v.393, p.268-73, 2010.

Plomgaard, P. et al. Tumor necrosis factor-alpha induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. **Diabetes**, v. 54, n. 10, p. 2939-45, Oct 2005.

Rani, A. J.; Mythili, S. V. Study on total antioxidant status in relation to oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. **J Clin Diagn Res**, v. 8, n. 3, p. 108-10, Mar 2014.

Effects of piperine on antioxidant pathways in tissues from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 14, n. 6, p. 329-34, 2000.

Rauscher, F. M.; Sanders, R. A.; Watkins, J. B., 3rd. Effects of coenzyme Q10 treatment on antioxidant pathways in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 15, n. 1, p. 41-6, 2001.

Rayburn, W. F. Diagnosis and classification of diabetes mellitus: highlights from the American Diabetes Association. **J Reprod Med**, v. 42, n. 9, p. 585-6, Sep 1997.

Reiter, R. J. et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. **J Biomed Sci**, v. 7, n. 6, p. 444-58, Nov-Dec 2000.

Rossetti, L.; Giaccari, A.; DeFronzo, R. A. Glucose toxicity. **Diabetes Care**, v. 13, n. 6, p. 610-30, Jun 1990.

Russell, A. P. et al. Lipid peroxidation in skeletal muscle of obese as compared to endurance-trained humans: a case of good vs. bad lipids? In: (Ed.). **FEBS Lett.** Netherlands, v.551, p.104-6, 2003.

Sakamoto, K.; Holman, G. D. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, n. 1, p. E29-37, Jul 2008.

Salpeter, S. R. et al. Meta-analysis: metformin treatment in persons at risk for diabetes mellitus. In: (Ed.). **Am J Med**. United States, v.121, p.149-157 e2, 2008.

Savu, O. et al. Increase in total antioxidant capacity of plasma despite high levels of oxidative stress in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. **J Int Med Res**, v. 40, n. 2, p. 709-16, 2012.

Schmidt, M. et al. **Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: carga e desafios atuais**. The Lancet Saúde no Brasil 2011.

Shaw, R. J. et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. In: (Ed.). **Science**. United States, v.310, 2005. p.1642-6.

Sies, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur J Biochem**, v. 215, n. 2, p. 213-9, Jul 15 1993.

Steinberg, G. R.; Kemp, B. E. AMPK in Health and Disease. **Physiol Rev**, v. 89, n. 3, p. 1025-78, Jul 2009.

Steinberg, G. R. et al. Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. **Cell Metab**, v. 4, n. 6, p. 465-74, Dec 2006.

Sun, Y. et al. Myosin Va mediates Rab8A-regulated GLUT4 vesicle exocytosis in insulin-stimulated muscle cells. **Mol Biol Cell**, v. 25, n. 7, p. 1159-70, Apr 2014.

Sundaram, R. K. et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. **Clinical science (London, England: 1979)**, v. 90, n. 4, p. 255-60, 1996.

Szendroedi, J.; Phielix, E.; Roden, M. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. In: (Ed.). **Nat Rev Endocrinol**. England, v.8, 2012. p.92-103.

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. **Biotechnology**, v. 24, p. 145-9, 1992.

Turrens, J. F.; Boveris, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochem J**, v. 191, n. 2, p. 421-7, Nov 1 1980.

Vasconcelos, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

Vincent, E. E. et al. Differential effects of AMPK agonists on cell growth and metabolism. **Oncogene**, Sep 22 2014.

Viollet, B. et al. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 196, n. 1, p. 81-98, May 2009.

Vozarova, B. et al. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 6, p. 1889-95, Jun 2002.

Wessels, B. et al. Metformin impairs mitochondrial function in skeletal muscle of both lean and diabetic rats in a dose-dependent manner. In: (Ed.). **PLoS One**. United States, v.9, 2014.

Yano, M. et al. Short-term exposure of high glucose concentration induces generation of reactive oxygen species in endothelial cells: implication for the oxidative stress associated with postprandial hyperglycemia. **Redox Rep**, v. 9, n. 2, p. 111-6, 2004.

Yki-Jarvinen, H.; Helve, E.; Koivisto, V. A. Hyperglycemia decreases glucose uptake in type I diabetes. **Diabetes**, v. 36, n. 8, p. 892-6, Aug 1987.

Zhou, G. et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action.
J Clin Invest, v. 108, n. 8, p. 1167-74, Oct 2001.