

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CARLA MIGUEL DE OLIVEIRA

**EFEITO DA AMINOGUANIDINA E SUA ASSOCIAÇÃO COM
METFORMINA NO SISTEMA REDOX DE RATOS COM DIABETES
TIPO 2 E AS IMPLICAÇÕES NOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E
HISTOLÓGICOS**

Alfenas/MG

2021

CARLA MIGUEL DE OLIVEIRA

**EFEITO DA AMINO Guanidina E SUA ASSOCIAÇÃO COM
METFORMINA NO SISTEMA REDOX DE RATOS COM DIABETES
TIPO 2 E AS IMPLICAÇÕES NOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E
HISTOLÓGICOS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Rita Rodrigues.

Alfenas/MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Oliveira, Carla Miguel de
O48a Efeito da aminoguanidina e sua associação com metformina no sistema redox de ratos com diabetes tipo 2 e as implicações nos parâmetros bioquímicos e histológicos / Carla Miguel de Oliveira. – Alfenas, MG, 2021. 82 f.: il. –

Orientadora: Maria Rita Rodrigues.
Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Diabetes *Mellitus* Tipo 2. Aminoguanidina. 3. Metformina. 4. ERON.
5. NOX2. I. Rodrigues, Maria Rita. II. Título.

CDD- 615

CARLA MIGUEL DE OLIVEIRA**"EFEITO DA AMINOGUANIDINA E SUA ASSOCIAÇÃO COM METFORMINA NO SISTEMA REDOX DE RATOS COM DIABETES TIPO 2 E AS IMPLICAÇÕES NOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HISTOLÓGICOS"**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 06 de agosto de 2021.

Profa. Dra. Maria Rita Rodrigues
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Gérsika Bitencourt Santos Barros
Instituição: UNIFENAS

Dra. Rita Dulcivana Ferreira Soares
Instituição: Instituto Racine

Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Deila Rosely Carneiro
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Maria Rita Rodrigues, Professor do Magistério Superior**, em 11/08/2021, às 12:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gérsika Bitencourt Santos, Usuário Externo**, em 11/08/2021, às 16:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rita Dulcivana Ferreira Soares, Usuário Externo**, em 12/08/2021, às 09:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Deila Rosely Carneiro, Chefe do Departamento de Biologia Estrutural**, em 12/08/2021, às 10:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Borges de Araújo Paula, Professor do Magistério Superior**, em 12/08/2021, às 15:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0573401** e o código CRC **655D14DE**.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pelas oportunidades e por todas as pessoas que tenho em minha vida.

A minha orientadora, Maria Rita Rodrigues, pela oportunidade de atuar numa área que era desconhecida para mim. Com você aprendi como é possível ser profissional e ter um grande coração ao mesmo tempo. Obrigada pela confiança, pelo carinho e por auxiliar no meu crescimento profissional.

Aos meus amigos do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica e Experimental, Naiane, Julia Rosental, Denise, Bruno Damião e Julia Rossato, pela amizade e parceria. Em especial, Damaris e Eliana, que me auxiliaram no laboratório e foram companheiras de longos diálogos.

Aos alunos de iniciação científica, Karina e Eduardo, que foram grandes companheiros de trabalho e extremamente dedicados. Sou grata por toda contribuição e tenho certeza de que sem o apoio de vocês esta jornada teria sido bem mais difícil.

À banca examinadora por aceitar o convite e pelas valiosas contribuições que certamente serão dadas para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal de Alfenas.

Ao meu esposo, Bruno por estar junto comigo durante toda essa caminhada, por também acreditar nos meus sonhos, por lutar comigo e por todas as dificuldades que enfrentamos juntos.

Ao meu pai, que sempre dizia aos seus amigos que teria uma filha doutora, e que inclusive reforçava aos médicos nos últimos dias de sua vida que eu iria conseguir realizar esse sonho.

A minha mãe e meu irmão, que sempre tiveram muito orgulho de mim, me apoiaram independente de qual sonho eu tivesse, e que muitas vezes tinham mais fé em mim do que eu mesma. Desejo que eu continue sendo orgulho para vocês e que vocês recebam essa vitória como nossa.

A minha avó, a qual eu havia prometido que levaria a minha defesa de doutorado, mas Deus tinha planos diferentes para ela. Tenho certeza de que hoje ela está contente, pois fazia questão de estar presente em toda titulação que eu recebia desde minha infância.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG.

RESUMO

Em trabalho anterior, nosso grupo demonstrou que a aminoguanidina (AG), um conhecido inibidor de produtos finais de glicação avançada (AGEs), aumentou a atividade de NOX2 (Sistema NADPH oxidase fagocítico) em neutrófilos peritoneais de ratos, levando ao aumento da atividade fagocítica e candidida nestas células, entretanto este aumento foi menos pronunciado em ratos diabéticos. Neste trabalho, nosso objetivo foi investigar o papel da AG no balanço redox em modelo experimental de Diabetes Tipo 2 (DM2) e avaliar seu efeito nos parâmetros bioquímicos e histológicos desses animais. Devido à semelhança molecular da AG com a metformina (MET), largamente utilizada no tratamento do DM2, utilizamos aqui as duas guanidinas (AG e MET) e avaliamos o efeito de ambas, isoladamente e/ou associadas, na atividade de enzimas pró e antioxidantes (soro, rins e fígado) e nos parâmetros bioquímicos e histológicos. Para isso, o DM2 foi induzido em ratos machos Wistar através de dieta hipercalórica, seguido de injeção intraperitoneal (IP) de estreptozotocina (STZ) em baixa dosagem (35 mg/kg). Após a confirmação da hiperglicemia, os animais foram tratados com AG e/ou MET por 30 dias e os parâmetros citados acima, foram avaliados. Nossos resultados mostraram um aumento da atividade de NOX 2 no grupo tratado com AG e/ou MET independente do estado diabético, reforçando resultados prévios do grupo. Em relação à mieloperoxidase em neutrófilos, houve diminuição da atividade enzimática associada à hiperglicemia, e os diferentes tratamentos não exerceram efeito sobre sua atividade. Com relação à avaliação de marcadores de estresse oxidativo, pode-se notar que a AG e a MET demonstraram capacidade de modular o metabolismo oxidativo, uma vez que o tratamento com AG e MET foi capaz de restabelecer a atividade de SOD, CAT e GPX, e diminuir os níveis de peroxidação lipídica no soro, rins e fígado. Quanto ao perfil bioquímico, notou-se um melhor controle glicêmico nos animais do grupo diabético MET e no grupo tratado com gliclazida, demonstrando a eficácia do modelo de DM2 padronizado neste trabalho. No perfil lipídico, não houve alteração nos níveis de colesterol total e colesterol HDL pela hiperglicemia, entretanto, grupos tratados com AG e/ou MET apresentaram diminuição nos níveis de triglicerídeos. Pode-se notar também que houve um aumento de AST e ALT decorrentes do estado diabético, contudo nos grupos tratados com AG e MET, houve uma diminuição de AST e ALT, demonstrando a capacidade dos compostos na recuperação do dano hepático. A fosfatase alcalina se elevou pela hiperglicemia, entretanto, os tratamentos com AG e MET não afetaram este parâmetro bioquímico. Os marcadores séricos de função renal, ureia e creatinina, não foram afetados pelos tratamentos. Através das análises histológicas notou-se que AG e MET isoladas ou em associação apresentaram efeitos benéficos por minimizar os danos hepático e renal oriundos do DM2. Desta forma, concluímos que o tratamento com AG, MET e a associação destes compostos induziram uma melhora nos parâmetros hepáticos dos animais diabéticos, diminuição dos níveis de triglicerídeos, restituição da atividade de SOD, CAT e GPX, e foi capaz de promover uma melhora nos danos teciduais renal e hepático. Dado o exposto, pode-se notar que a associação da AG e MET atuou de forma benéfica nesse modelo experimental, sendo necessário mais estudos a fim de estabelecer se a associação das guanidinas pode trazer mais benefícios que a ação isolada da metformina, largamente utilizada no tratamento do DM2.

Palavras-chave: Diabetes *Mellitus* Tipo 2; Aminoguanidina; Metformina; ERON; NOX2.

ABSTRACT

In a previous study, our group demonstrated that aminoguanidine (AG), a known inhibitor of Advanced Glycation End Products (AGEs), increased NOX2 (phagocytic NADPH Oxidase System) activity in rat peritoneal neutrophils, leading to increased activity phagocytic and neutrophil candidal; however, this increase was less pronounced in diabetic rats. In this study, our aim was to investigate the role of AG in the redox balance in an experimental model of Type 2 Diabetes (DM2) and to evaluate its effect on the biochemical and histological parameters of these animals. Due to the molecular similarity of AG with metformin (MET), widely used in the treatment of DM2, we used here the two guanidines (AG and MET) and evaluated the effect of both, alone and/or associated, on the activity of pro and antioxidant enzymes and in biochemical and histological parameters. DM2 was induced in male Wistar rats through a hypercaloric diet, followed by intraperitoneal (IP) injection of streptozotocin (STZ) in low dosage (35 mg/kg). After confirmation of hyperglycemia, the animals were treated with AG and/or MET for 30 days and the parameters mentioned above were evaluated. Our results showed an increase in NOX 2 activity in the group treated with AG and/or MET regardless of the diabetic status, reinforcing previous results of our group. Regarding MPO, there was a decrease in enzymatic activity associated with hyperglycemia, and the different treatments had no effect on its activity. Related to the evaluation of oxidative stress markers, it can be noted that AG and MET demonstrated the ability to modulate oxidative metabolism, since the treatment with AG and MET was able to reestablish the activity of SOD, CAT and GPX, and decrease lipid peroxidation levels. In addition, in the biochemical profile, a better glycemic control was noted in the animals in the diabetic group MET and in the group treated with gliclazide, demonstrating the effectiveness of the DM2 model standardized in this study. In the lipid profile, there was no change in the levels of total cholesterol and HDL cholesterol due to hyperglycemia. However, groups treated with AG and/or MET showed a decrease in triglyceride levels. It can also be noted that there was an increase in AST and ALT resulting from the diabetic state. Nevertheless, in the groups treated with AG and MET, there was a decrease in AST and ALT, demonstrating the ability of the compounds to recover from liver damage. Alkaline phosphatase was increased by hyperglycemia, however, treatments with AG and MET did not affect this parameter. Serum markers of renal function, urea and creatinine, were not affected by the treatments. Through histological analysis it was noted that AG and MET alone or in association had beneficial effects by minimizing liver and kidney damage arising from DM2. Thus, we concluded that treatment with AG, MET and the association of these compounds induced an improvement in the liver parameters of diabetic animals, decreased triglyceride levels, restitution of SOD, CAT and GPX activity, and was able to promote an improvement in kidney and liver tissue damage. Given the above, it can be noted that the association of AG and MET acted beneficially in this experimental model, requiring further studies to establish whether the association of guanidines can bring more benefits than the isolated action of metformin, widely used in DM2 treatment.

Keywords: Type 2 Diabetes *Mellitus*; Aminoguanidine; Metformin; ROS; NOX2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ativação de NOX2	15
Figura 2 -	Vias de regulação do estresse oxidativo intracelular	17
Figura 3 -	Representação esquemática do tratamento dos animais	23
Figura 4 -	Representação esquemática dos experimentos	23
Figura 5 -	Imagem histológica do rim não diabético versus diabético	63
Figura 6 -	Imagem histológica do rim em animais não diabéticos	64
Figura 7 -	Imagem histológica do rim em animais diabéticos	66
Figura 8 -	Imagem histológica de fígado controle versus diabético	67
Figura 9 -	Imagem histológica de fígado	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Glicemia casual dos animais nos protocolos utilizados na padronização do DM2	32
Gráfico 2 -	Glicemia casual e comparativa de grupo controle (GC), dieta de cafeteria (GDC) e dieta hiperlipídica incrementada com banha de porco (GDH)	34
Gráfico 3 -	Massa corporal comparativa de grupo controle (GC), dieta de cafeteria (GDC) e dieta hiperlipídica incrementada com banha de porco (GDH)	35
Gráfico 4 -	Massa corporal durante o tratamento	36
Gráfico 5 -	Produção de ERO e ânions superóxido por neutrófilos peritoneais	38
Gráfico 6 -	Produção de HOCl por neutrófilos peritoneais	39
Gráfico 7 -	Produção de nitritos por neutrófilos peritoneais	40
Gráfico 8 -	Perfil glicêmico após 30 dias de tratamento	42
Gráfico 9 -	Resistência à insulina pelo índice de TyG	43
Gráfico 10 -	Alanina aminotransferase após 30 dias de tratamento	45
Gráfico 11 -	Aspartato aminotransferase após 30 dias de tratamento	46
Gráfico 12 -	Fosfatase alcalina após 30 dias de tratamento	47
Gráfico 13 -	triglicerídeos após 30 dias de tratamento	48
Gráfico 14 -	Colesterol Total após 30 dias de tratamento	49
Gráfico 15 -	Colesterol HDL após 30 dias de tratamento	50
Gráfico 16 -	Colesterol não-HDL após 30 dias de tratamento	50
Gráfico 17 -	Ureia após 30 dias de tratamento	52
Gráfico 18 -	Creatinina após 30 dias de tratamento	52
Gráfico 19 -	Superóxido dismutase em amostras de soro	54
Gráfico 20 -	Catalase em amostras de soro	54
Gráfico 21 -	Glutationa peroxidase em amostras de soro	55
Gráfico 22 -	Peroxidação lipídica em amostras de soro	55
Gráfico 23 -	Superóxido dismutase em amostras de fígado	57
Gráfico 24 -	Catalase em amostras de fígado	57
Gráfico 25 -	GPx em amostras de fígado	58
Gráfico 26 -	Peroxidação lipídica em amostras de fígado	58
Gráfico 27 -	Superóxido dismutase em amostras de rim	60
Gráfico 28 -	Catalase em amostras de rim	60

Gráfico 29 - Glutathiona peroxidase em amostras de rim	61
Gráfico 30 - Peroxidação lipídica em amostras de rim	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Metodologias utilizadas como referência para padronização do DM2	24
Tabela 2 -	Composição da dieta hiperlipídica com banha de porco	25
Tabela 3 -	Composição da dieta de cafeteria	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	aminoguanidina
AGEs	produtos finais de glicação avançada
ALT	alanina amino transferase
AST	aspartato aminotransferase
CAT	catalase
DAG	diacilgliceróis
DTNB	5,5'-ditiobis ácido 2-nitrobenzoico
ERO	espécies reativas de oxigênio
ERN	espécies reativas de nitrogênio
GPx	glutathione peroxidase
IRS-1	substrato receptor de insulina 1
MET	metformina
MPO	mieloperoxidase
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH oxidase	sistema enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NOX2	sistema NADPH oxidase fagocítico
NO	óxido nítrico
O ₂ ⁻	ânion superóxido
PKC	proteína quinase C
PMA	forbol-12-miristato-13-acetato
SOD	superóxido dismutase
STZ	estreptozotocina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	DIABETES <i>MELLITUS</i>	12
2.2	DIABETES <i>MELLITUS</i> E ESTRESSE OXIDATIVO	13
2.3	FAGÓCITOS E O BALANÇO OXIDATIVO (ERO X ENZIMAS ANTIOXIDANTES).....	13
2.4	AMINOGUANIDINA.....	17
2.5	METFORMINA	18
3	JUSTIFICATIVA	20
4	OBJETIVOS	21
4.1	OBJETIVO GERAL	21
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5	METODOLOGIA.....	22
5.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	22
5.2	INDUÇÃO DO DIABETES <i>MELLITUS</i>	24
5.3	DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA À INSULINA	25
5.4	TRATAMENTO COM AMINOGUANIDINA E METFORMINA EM RATOS WISTAR	26
5.5	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	26
5.6	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	26
5.7	RECRUTAMENTO DOS NEUTRÓFILOS, CONTAGEM DAS CÉLULAS E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	27
5.8	DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA POR FLUORIMETRIA	27
5.9	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE CATALASE	28
5.10	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE GLUTATIONA PEROXIDASE.....	28
5.11	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE	28
5.12	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE NOX2 EM NEUTRÓFILOS PERITONEAIS.....	29
5.13	ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (FORMAÇÃO DE HOCL).....	29
5.14	DOSAGEM DE NITRITOS.....	29
5.15	ANÁLISES HISTOLÓGICAS	29
5.16	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6.1	PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE INDUÇÃO DO DIABETES <i>MELLITUS</i> TIPO 2	31

6.2	ATIVIDADE DE NOX2.....	36
6.3	ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (FORMAÇÃO DE HOCL).....	38
6.4	DOSAGEM DE NITRITOS.....	39
6.5	AVALIAÇÃO DE GLICEMIA	41
6.6	DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA À INSULINA	42
6.7	AVALIAÇÃO DE MARCADORES HEPATOBILIARES	44
6.8	AVALIAÇÃO DE PERFIL LIPÍDICO	47
6.9	AVALIAÇÃO DE FUNÇÃO RENAL.....	51
6.10	BIOMARCADORES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO NO SORO	53
6.11	BIOMARCADORES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO.....	56
6.12	BIOMARCADORES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO NO RIM.....	59
6.13	ANÁLISES HISTOLÓGICAS	62
7	CONCLUSÃO.....	70
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO A.....	82

1 INTRODUÇÃO

Segundo estimativas mundiais, o número de portadores de diabetes *mellitus* (DM) em 2045 pode chegar a 700 milhões, tendo como fatores de risco para o desenvolvimento do DM, história familiar, envelhecimento, obesidade, sedentarismo, diagnóstico prévio de pré-diabetes ou diabetes *mellitus* gestacional e presença de componentes da síndrome metabólica, tais como hipertensão arterial e dislipidemia (IDF, 2019; SBD, 2019). O DM2 é uma síndrome heterogênea, observada em cerca de 90% do total de diabéticos. É um distúrbio que apesar dos pacientes produzirem insulina normalmente, suas células são incapazes de usar essa insulina secretada pelo pâncreas, e assim seus níveis permaneçam altos no sangue, sendo conhecido como resistência à insulina (VIANA; RODRIGUEZ, 2011).

Quanto ao tratamento do DM2, metformina (MET) é utilizada como tratamento de primeira linha para controlar a hiperglicemia (TAN *et al.*, 2016). Acredita-se que a metformina tem capacidade de atenuar a resistência à insulina hepática induzida por diabetes *mellitus* tipo 2 e melhorar a disfunção das células β (GARABADU; KRISHNAMURTHY, 2017). O aumento dos níveis de glicose no organismo causa complicações tais como nefropatia que tem impacto na qualidade de vida do paciente e nos índices de mortalidade. Além disso, vale ressaltar que complicações relacionadas ao diabetes levam ao custo anual estimado entre 4,6 e 13,7 bilhões de dólares (WAMBOLDT; KAPUSTIN, 2006).

Além da semelhança molecular da aminoguanidina (AG) com a MET, largamente utilizada no tratamento do Diabetes tipo 2, a AG vem se destacando em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa. Observou-se um aumento da atividade de NOX2 em neutrófilos de ratos tratados com AG, sendo que este aumento da atividade foi inicialmente atribuído à diminuição na formação dos AGEs, no entanto, experimentos adicionais, demonstraram que o mesmo ocorre em ratos não diabéticos (DE SOUZA FERREIRA *et al.*, 2016). Notando-se desta forma um papel imunomodulador da AG e a necessidade de mais estudos com relação ao aumento da atividade de NOX2 e suas implicações no sistema redox.

Diante da alta incidência do diabetes *mellitus* tipo 2 e das complicações a longo prazo associadas a esta patologia, estudos que visam ampliar a perspectiva de novos candidatos a fármacos que auxiliam no tratamento do DM2 são de grande importância. Adicionalmente, a AG tem sido apontada como neuroprotetor, podendo assim, sugerir sua ação combinada aos fármacos utilizados atualmente para auxiliar no tratamento das morbidades relacionadas ao diabetes (SIL *et al.*, 2016).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

No texto a seguir é apresentada uma revisão de literatura sobre os principais alvos desse estudo, que permitirá uma melhor compreensão deste trabalho.

2.1 DIABETES *MELLITUS*

O diabetes *mellitus* (DM) trata-se de uma desordem metabólica de múltipla etiologia caracterizada por níveis elevados de glicose sanguínea que tem o estresse oxidativo como um ponto chave no desenvolvimento de suas complicações crônicas (ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016). Uma estimativa mundial calcula cerca de 700 milhões de portadores de DM em 2045 (IDF, 2019), sendo que o predomínio está associado à história familiar, envelhecimento, obesidade, sedentarismo, diagnóstico prévio de pré-diabetes ou diabetes *mellitus* gestacional (DMG) e presença de componentes da síndrome metabólica, tais como hipertensão arterial e dislipidemia (SBD, 2019).

A incapacidade do corpo em produzir ou utilizar a insulina, caracteriza dois tipos clássicos de diabetes, o diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) e o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) (IROBEKHIAN *et al.*, 2017). Na maioria dos casos, no DM1 o sistema imunológico ataca equivocadamente as células beta. Logo, pouca ou nenhuma insulina é produzida resultando num quadro de hiperglicemia. O DM1 está presente em 5% a 10% dos casos, aparece geralmente na infância ou adolescência, mas pode ser diagnosticado em adultos também. O DM2 é uma síndrome heterogênea, observada em cerca de 90% a 95% do total de diabéticos. O Tipo 2 aparece quando o organismo não consegue usar adequadamente a insulina que produz devido a resistência à insulina; ou não produz insulina suficiente para controlar a taxa glicêmica (SBD, 2019). Poliúria, polidipsia e polifagia, além de alterações visuais e feridas de difícil cicatrização nos estágios mais avançados da doença são comuns em pacientes diabéticos, tanto tipo 1 quanto tipo 2.

Os dados da literatura têm apontado a atividade da via dos polióis, a glicação não enzimática das proteínas com a produção de produtos finais da glicação avançada (AGEs), o estresse oxidativo e as alterações da proteína quinase C (PKC), como os principais mecanismos envolvidos na regulação do diabetes, podendo ocasionar disfunções endoteliais e aterogênese, que precedem as graves complicações crônicas induzidas pelo diabetes *mellitus* (IGHODARO, 2018).

2.2 DIABETES *MELLITUS* E ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção de espécies oxidantes e a capacidade antioxidante endógena e o seu papel como determinante principal do progresso das complicações crônicas no Diabetes *mellitus* (REIS *et al.*, 2008). Espécies oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), estão entre as principais responsáveis por desencadear o estresse oxidativo. Essas espécies são átomos, íons ou moléculas que possuem um elétron não pareado na órbita mais externa, tornando-as instáveis e altamente reativas (WATT *et al.*, 2012).

Embora a cadeia de transporte de elétrons seja o principal sítio de produção de ERO, outras diferentes fontes podem produzir esses oxidantes, como, por exemplo, as células fagocíticas durante a explosão respiratória. A NADPH oxidase (NOX) tipo fagocítica é a maior fonte de produção de ERO. A produção de ERO pela oxidase, em pequenas quantidades, pode funcionar na sinalização metabólica, porém em grandes quantidades, pode originar dano oxidativo. Li *et al.* (2011) relata que a redução na atividade da NOX e/ou a melhora na função mitocondrial pode prevenir o aparecimento de complicações cardiovasculares, que antecedem as alterações crônicas em pacientes portadores de DM.

O aumento da produção de ERO por múltiplas vias está relacionado com a desregulação do metabolismo de glicose. Níveis aumentados de glicose ativa isoformas PKC e PI3-k e NADPH oxidases na forma de PKC, Rac1 e p47^{phox}. No DM2 há também outros mecanismos que auxiliam na ativação de NOX, sendo estes, quinases reguladas por AMP e hiperinsulinemia. Também ocorre aumento de ERO através do acréscimo de fosforilação de p47^{phox} pelos produtos de glicação avançada (AGES), demonstrando um desequilíbrio na homeostase através de vários mecanismos que aumentam ERO (BRANDES; WEISSMANN; SCHRÖDER, 2014).

2.3 FAGÓCITOS E O BALANÇO OXIDATIVO (ERO X ENZIMAS ANTIOXIDANTES)

Os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) são as principais células fagocíticas do sistema imune (KLEBANOFF *et al.*, 2013). Vários agentes solúveis e particulados são capazes de ativar os fagócitos, podendo estar ou não revestidos por proteínas do hospedeiro, tais como imunoglobulinas e/ou complemento.

O arsenal microbicida dos neutrófilos é dividido em duas categorias onde o primeiro envolve o conteúdo dos grânulos dos neutrófilos (envolvendo principalmente a enzima

mieloperoxidase), enquanto o segundo envolve a ativação do complexo NOX 2 e produção de ERO (MAYER-SCHOLL; AVERHOFF; ZYCHLINSKY, 2004).

A ativação de neutrófilos e fagócitos mononucleares resulta na secreção do conteúdo de seus grânulos: peptídeos microbicidas (defensinas, proteína antimicrobiana catiônica) e enzimas /líticas (MPO, elastase, catepsina G). Este fenômeno é acompanhado pela geração de reativos intermediários do oxigênio – fenômeno este, denominado de “burst” oxidativo - que podem ser liberados para o interior dos fagolisossomos, formados após a fagocitose, onde contribuem para a morte dos microrganismos ingeridos, ou, em algumas circunstâncias, para o meio extracelular, causando danos aos tecidos (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

A quantificação do “burst” oxidativo pode ser obtida através da quimiluminescência na presença de luminol. A quimiluminescência nativa que acompanha a ativação de fagócitos é decorrente da ativação de oxidases e formação de produtos de oxigenação de substratos biológicos (RODRIGUES *et al.*, 2002). A luminescência dessa reação, apesar de não poder ser utilizada para discriminar o tipo de espécies oxidantes envolvidas, tem sido frequentemente usada para detecção do “pool” de espécies oxidantes em sistemas biológicos, bem como a atividade peroxidásica em homogenato celular (MYHRE *et al.*, 2003).

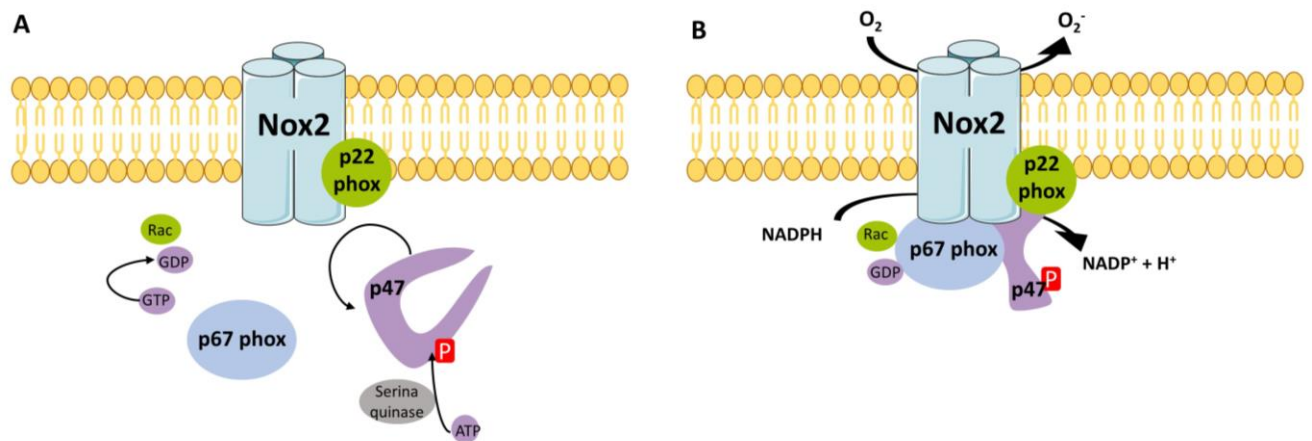
O sistema NADPH oxidase é encontrado em diversas células de origem mesodermal. Tem como substrato as coenzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADPH) ou nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADH) e catalisa a transferência de elétrons através da membrana celular. Possui sete isoformas identificadas em mamíferos que foram denominadas NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 (dual oxidase) e DUOX2, e todas possuem a mesma função de geração de ERO (espécies reativas de oxigênio), entretanto, os mecanismos de ativação, assim como as subunidades necessárias e sua distribuição intracelular variam entre as isoformas (BRANDES; WEISSMANN; SCHRÖDER, 2014; RODIÑO-JANEIRO *et al.*, 2013).

O sistema NADPH oxidase é considerado fonte primária e reguladora de ERO, sendo formado por componentes que se encontram dissociados na célula em repouso. Componentes citosólicos, tais como p40^{phox}, a p47^{phox} e a p67^{phox}, agrupadas em um sistema proteico citoplasmático de 240kDa e o citocromo b₅₅₈, composto pelas proteínas p22^{phox} e NOX2 (também conhecida como gp91^{phox}) localizadas nas membranas das vesículas secretórias e dos grânulos específicos citoplasmáticos. Também estão presentes proteínas de baixa massa molecular, ligantes de nucleotídeo guanina (GTPases): a Rac 1 e 2 e Rap1a (GUICHARD *et al.*, 2008). A NOX2 foi descrita inicialmente em neutrófilos e macrófagos, sendo muitas vezes referida como NADPH oxidase fagocítica.

Os neutrófilos desempenham um importante papel na resposta imune inata contra os agentes patogênicos, e possuem a capacidade de gerar ERO através de sistema NOX2 que está associado às membranas intracelulares como plasmáticas em estreita associação com p22^{phox} (BEDARD; KRAUSE, 2007).

Nos neutrófilos, a ativação de NOX2 leva a formação de ânions superóxido e a iniciação do “*burst*” oxidativo, tendo como finalidade a defesa contra a invasão por microrganismo (EL-BENNA *et al.*, 2009). Portanto, NOX2 é a isoforma de NADPH oxidase, mais estudada, sendo a sua ativação iniciada pela fosforilação do componente citosólico p47^{phox}, que quando ativada se liga à p22^{phox} e aproxima p67^{phox}. Uma vez na membrana, essas proteínas se associam ao citocromo b₅₅₈. A Rac1/2 liga-se simultaneamente ao trifosfato de guanosina (GTP) e migra para a membrana juntamente com o sistema citosólico (FIGURA 1A e B).

Figura 1 - Ativação de NOX2



Fonte: Adaptado de LADDHA; KULKARNI (2020)

Após ativação desse complexo, NOX2 realiza transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, formando o ânion superóxido $O_2^{\bullet-}$, o qual tem pouca atividade microbicida, entretanto, origina ERO mais potentes (BEDARD; KRAUSE, 2007; BRANDES; WEISSMANN; SCHRÖDER, 2014).

Por outro lado, essas substâncias são importantes para degradar o patógeno fagocitado, mas também podem reagir com moléculas do hospedeiro, levando ao desenvolvimento de diversas doenças, como as inflamatórias crônicas (artrite reumatoide, vasculite), cardiovasculares (aterosclerose, isquemia miocárdica), neurodegenerativas (esclerose múltipla, Doença de Parkinson, Alzheimer), lesão hepática e câncer (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Em contrapartida, o sistema de defesa antioxidante do organismo

compreende uma gama variada de substâncias que atuam em diferentes níveis. O sistema de defesa primário é constituído por substâncias que impedem a geração de espécies reativas ou as sequestram, impedindo sua interação com alvos celulares. Entre elas estão as enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, demonstradas em Figura 2.

Estas enzimas têm um importante papel na resistência oxidante de células inflamatórias. Sabe-se que neutrófilos possuem atividade de CAT mais alta que todos os fagócitos, o que pode explicar, entre outros, o possível mecanismo de resistência oxidante destas células e que diferenciação de monócitos a macrófagos *in vitro* é acompanhada pela diminuição da catalase e glutathione peroxidase (PIETARINEN-RUNTTI *et al.*, 2000).

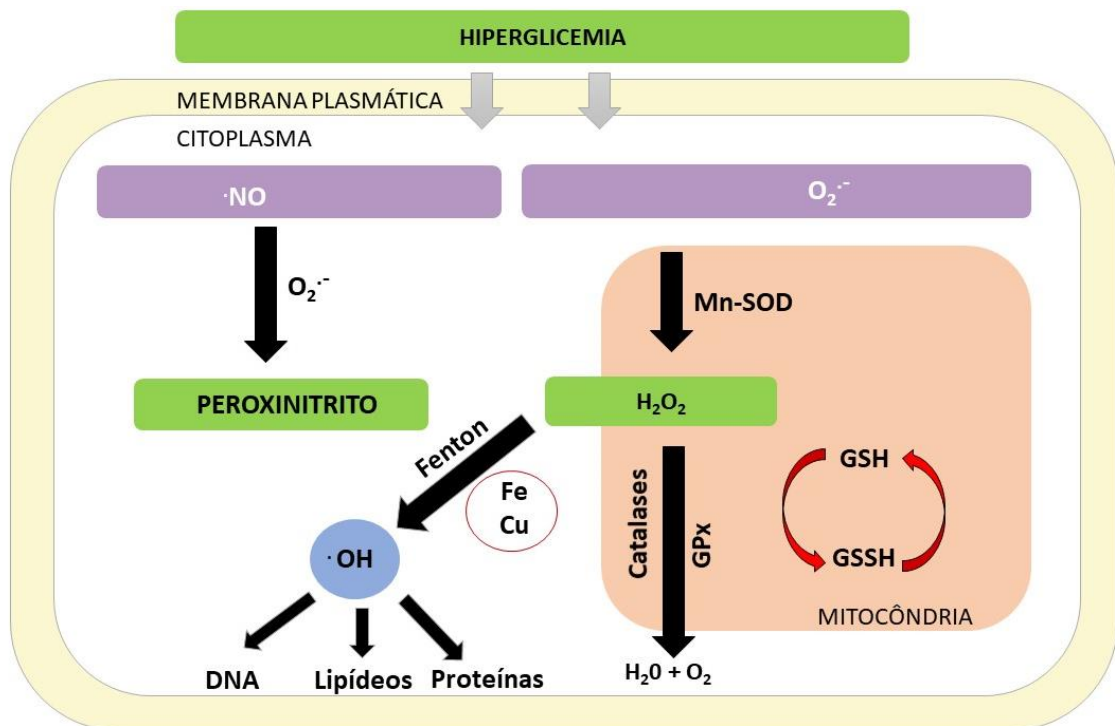
O balanço entre a produção de oxidantes e a defesa antioxidante pode ter um importante papel na função fagocítica e prevenção de danos oxidativos durante a fagocitose. O sistema da glutathione peroxidase é assim chamado porque envolve mais de um sistema enzimático, a saber: a glutathione redutase, glicose 6-fosfato desidrogenase e a glutathione peroxidase. Essas três enzimas funcionam em conjunto para metabolizar o peróxido de hidrogênio e outros peróxidos derivados da oxidação de macromoléculas (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

O sistema da glutathione peroxidase está quase sempre no mesmo local celular que a superóxido dismutase (SOD), sugerindo que esta é a principal enzima que transforma o H_2O_2 em H_2O e O_2 , produzido pela Cu-SOD ou Zn-SOD no citosol, seja pela Mn-SOD na mitocôndria (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010; HALLIWELL, 1994). A glutathione peroxidase é uma enzima que depende de selênio para exercer sua atividade.

A CAT é uma enzima que contém o grupo heme em seu sítio catalítico. Está presente nos peroxissomas das células dos mamíferos, e servem provavelmente, para destruir o peróxido de hidrogênio gerado pelas enzimas oxidativas localizadas dentro das organelas subcelulares (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

A CAT tem grande capacidade de metabolizar o H_2O_2 , e em termos de moléculas de H_2O_2 destruídas por minuto por molécula de enzima, ela é uma das mais ativas enzimas conhecidas. Porém, sua afinidade pelo H_2O_2 é baixa, sendo necessárias altas concentrações de H_2O_2 , para que ela possa trabalhar rapidamente. Por outro lado, a CAT transforma o H_2O_2 lentamente quando existem pequenas concentrações do mesmo (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010; HALLIWELL, 1994).

Figura 2 - Vias de regulação do estresse oxidativo intracelular



Fonte: Adaptado de BRANDES; WEISSMANN; SCHRÖDER (2014)

Portanto, em conjunto essas três enzimas funcionam para metabolizar o peróxido de hidrogênio e outros peróxidos derivados da oxidação de macromoléculas, sendo que a manutenção do metabolismo oxidativo por essas enzimas é essencial para a prevenção ou redução do risco de desenvolvimento de complicações crônicas induzidas pelo diabetes *mellitus* (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

2.4 AMINOGUANIDINA

A AG é um conhecido inibidor de AGEs que atua eliminando intermediários capazes de ocasionar a glicação de proteínas. A estrutura da AG contém hidrazina que é capaz de reagir com os compostos que levam a glicação, tais como glioxal, metilglioxal e 3-desoxiglicosona, e vem demonstrando sua capacidade de inibir a atividade de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (DI NASO *et al.*, 2010).

Em modelos animais, a administração de AG resultou na recuperação de neuroinflamação e prevenção parcial de neurodegeneração. Além de recuperação de marcadores inflamatórios séricos, a AG demonstra ser capaz de reduzir neurodegeneração,

alterações da memória e alterações das respostas sistêmicas induzidas por colchicina, inibindo a iNOS (SIL *et al.*, 2016). Trabalhos demonstram que AG aumenta os níveis de SOD, CAT e GSH, e diminui os níveis de NO e MDA em tecidos do túbulo seminífero de animais diabéticos. Podendo-se destacar que o tratamento com AG é eficaz em melhorar a defesa antioxidante neste tecido (ORMAN *et al.*, 2015).

Outros estudos exibem a capacidade de AG aumentar a resposta de NOX2 e a atividade microbicida de neutrófilos, independente do estado diabético, demonstrando o papel imunomodulador que desencadeia um aumento na resposta microbicida dos neutrófilos, principalmente relacionado à produção de espécies reativas de oxigênio pelo NOX2 (DE SOUZA FERREIRA *et al.*, 2016). Estudos demonstram que tratamento com aminoguanidina tem atuação relacionada com o estresse oxidativo, restaurando as alterações estruturais e bioquímicas em rins de ratos diabéticos. Provavelmente inibindo citocinas pró-inflamatórias, MDA e NO (VADLA; VELLAICHAMY, 2013).

2.5 METFORMINA

A metformina (dimetilguanidina) é o fármaco de primeira linha para controlar a hiperglicemia no diabetes *mellitus* tipo 2, sendo também utilizado para retardar o início do DM2, no tratamento do diabetes *mellitus* gestacional e em mulheres com ovário policístico (TAN *et al.*, 2016). Atua como um inibidor metabólico e altera o metabolismo energético celular. Ela é usada principalmente em pacientes com DM tipo 2, estudos clínicos e em modelos animais sugerem que a principal atuação é inibir gliconeogênese hepática. Sugerindo que MET interage com o complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, diminuindo os níveis de ATP celular e causando acúmulo de AMP. AMP se liga ao sítio P da adenilato ciclase e inibe a sua ação em resposta ao glucagon, interrompendo, a sinalização cAMP-PKA (VIOLLET *et al.*, 2012). Assim, a atividade das enzimas da via gliconeogênica são inibidas em favor da glicólise, sendo este um dos mecanismos de ação da MET no organismo (APOSTOLOVA *et al.*, 2020; VIOLLET *et al.*, 2012).

Estudos a respeito da influência de MET em disfunção endotelial induzida por glicose flutuante demonstra a capacidade de MET diminuir a geração de ERO e melhorar a disfunção endotelial, sendo que esse efeito pode ser mediado através da ativação do reacoplamento eNOS mediado por GTPCH1 e inibição da NOX 2 através de uma via dependente da proteína quinase ativada por AMP (AN *et al.*, 2016). Dados também sugerem que a MET pode atenuar a resistência à insulina hepática induzida por diabetes *mellitus* tipo 2 e melhorando a

disfunção das células β , através de alterações na via de sinalização PI3K/Akt/GLUT-4 (GARABADU; KRISHNAMURTHY, 2017).

Outros estudos demonstram a capacidade da metformina em melhorar a defesa antioxidante renal, aumentando os níveis de SOD, CAT e GSH, e diminuindo os níveis de MDA em animais diabéticos submetidos ao tratamento com MET (REN *et al.*, 2020).

A metformina tem alguns efeitos colaterais, sendo mais comuns sintomas gastrointestinais, náuseas e vômitos. E, outros efeitos menos incidentes como acidose láctica e disfunção hepática. Este medicamento vem sendo bastante estudado por pesquisadores, visto a possibilidade de atuar em diferentes doenças, tais como câncer, doenças cardiovasculares e neurológica. Além disso, o mecanismo da metformina continua sendo pesquisado e diferentes vias vem sendo esclarecidas (WANG *et al.*, 2017).

3 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos tem aumentado o interesse nos estudos de espécies oxidantes e seu papel no desenvolvimento das complicações crônicas do Diabetes *mellitus*. Sabe-se que a NOX2 é a principal responsável pela formação de ânion superóxido em células fagocíticas e que apesar da sua pouca atividade microbicida, pode originar espécies oxidantes ainda mais potentes. Esta produção de espécies oxidantes em pequenas quantidades pode modular a sinalização metabólica e, em grandes quantidades, pode gerar dano oxidativo com lesões moleculares às estruturas celulares, com consequente alteração funcional e prejuízo das funções vitais de diversos tecidos e órgãos.

Em estudo anterior relatamos um aumento de atividade de NOX2, em neutrófilos de ratos tratados com a AG. O aumento da atividade de NOX2 neste sistema, foi atribuído inicialmente, à diminuição na formação dos AGEs, entretanto experimentos adicionais, demonstraram que o mesmo ocorre em ratos não diabéticos. Desta forma, o grupo trabalhou com modelo de neutrófilos humanos tratados *in vitro* com AG, onde foi visto um aumento da capacidade de fagocitose e atividade candidida destas células pelo tratamento (DE SOUZA FERREIRA *et al.*, 2016).

Diante destes resultados, sugerimos um papel imunomodulador para a AG, que pode ser um efeito isolado ainda não descrito na literatura ou um efeito das guanidinas em geral. Devido à semelhança molecular da AG com a MET e à sua comprovada eficácia clínica no tratamento do DM2, torna-se relevante avaliar o efeito de AG e MET neste modelo experimental, uma vez que estudos que forneçam dados que possam contribuir com futuras propostas de fármacos no tratamento do DM2 são necessários.

4 OBJETIVOS

Para estudar os efeitos da aminoguanidina, usada de forma isolada e em associação com a metformina, os objetivos deste trabalho foram divididos em objetivo geral e objetivos específicos.

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da AG e MET no sistema redox em neutrófilos de ratos *Wistar* em modelo experimental de DM2. Adicionalmente, analisar os efeitos de ambos compostos nos parâmetros bioquímicos e histologicamente em ratos *Wistar*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar um modelo de indução do DM2.
- Analisar os efeitos da AG e/ou MET sobre a modulação da atividade de NOX2, MPO e iNOS em neutrófilos peritoneais.
- Analisar os efeitos da AG e/ou MET sobre os marcadores de estresse oxidativo: peroxidação lipídica, atividade da glutatona peroxidase (GPx), atividade da superóxido dismutase (SOD) e atividade da catalase (CAT) no soro, rins e fígado.
- Analisar o efeito da AG e/ou MET no perfil glicêmico e na resistência à insulina dos animais.
- Analisar os efeitos da AG e/ou MET nos marcadores bioquímicos de funções renal e hepática, e perfil lipídico dos animais.
- Analisar os efeitos da AG e/ou MET histologicamente nos rins e fígado.

5 METODOLOGIA

O modelo experimental utilizado, o delineamento experimental, a coleta de materiais, testes e técnicas utilizadas neste trabalho estão descritas a seguir.

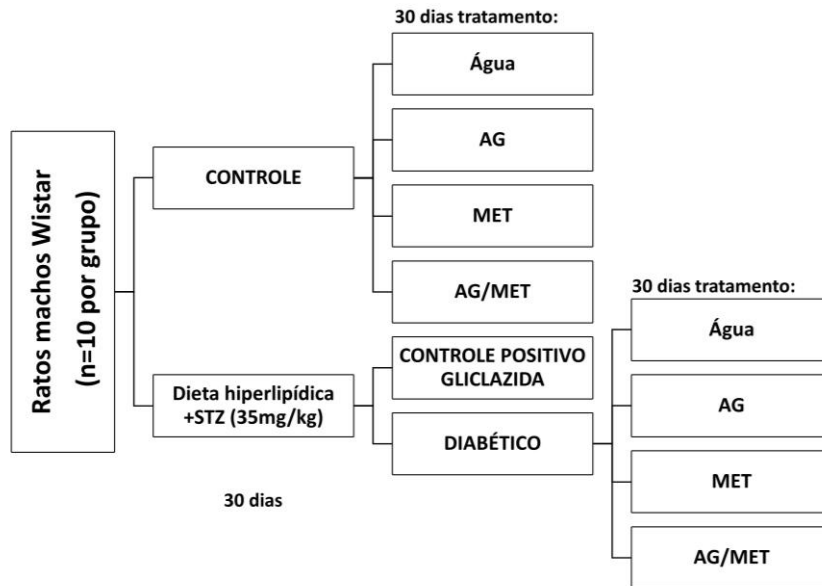
5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados ratos machos *Wistar*, com peso de 230 ± 50 g, obtidos no Biotério da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram mantidos em caixas de polietileno, receberam água e ração comercial *ad libitum*. Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e aprovação pelo comitê de ética em pesquisas animais da Universidade Federal de Alfenas registrada com o nº 33/2017 (Anexo A). Os animais foram divididos em oito grupos experimentais aleatórios contendo aproximadamente 10 animais por grupo para tratamento durante 30 dias. Realizamos tratamento de um grupo diabético com gliclazida como controle positivo para redução da glicemia, conforme Figura 3.

Os grupos foram utilizados conforme descrito a seguir:

- a) Controle: animais não diabéticos tratados com água.
- b) AG: animais não diabéticos tratados com aminoguanidina.
- c) MET: animais não diabéticos tratados com MET.
- d) AG/MET: animais não diabéticos tratados com AG e MET.
- e) Diabético: animais diabéticos tratados com água.
- f) Diabético AG: animais diabéticos tratados com AG.
- g) Diabético MET: animais diabéticos tratados com MET.
- h) Diabético MET/AG: animais diabéticos tratados com MET e AG.
- i) Diabético Gliclazida: animais diabéticos tratados com gliclazida.

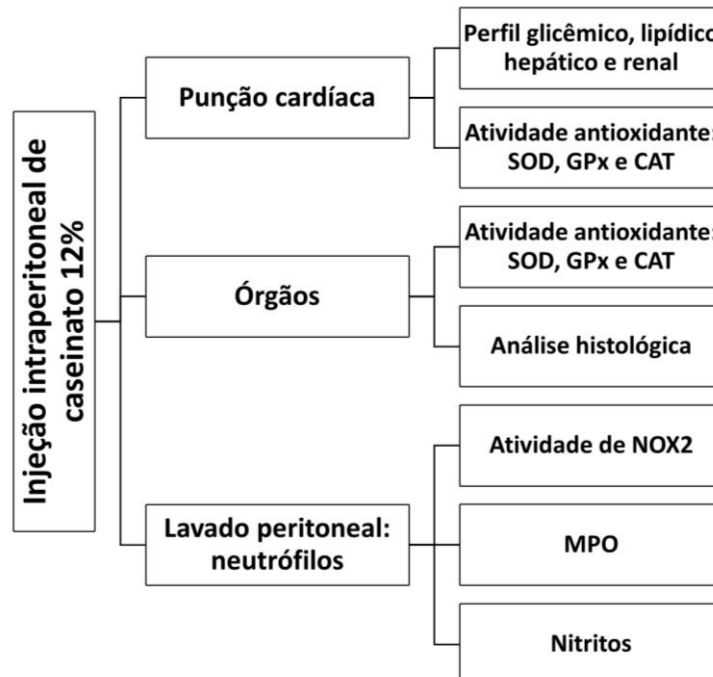
Figura 3 - Representação esquemática do tratamento dos animais



Fonte: Do autor

Após o tratamento dos animais pelo período de 30 dias, realizamos experimentos para avaliação do perfil bioquímico, hepático, histológico e atividade das enzimas, sendo organizado conforme Figura 4.

Figura 4 - Representação esquemática dos experimentos



Fonte: Do autor

5.2 INDUÇÃO DO DIABETES *MELLITUS*

Diferentes metodologias foram testadas a fim de selecionar a melhor metodologia para obtenção do diabetes *mellitus* tipo 2, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Metodologias utilizadas para padronização do DM2

PROTÓCOLOS	FONTE
Ratos <i>Wistar</i> com idade de 6 semanas tratados com solução de frutose a 10% por 4 semanas, associado a injeção i.p. da solução STZ (40mg/kg), sendo o grupo denominado GFS10 .	(MOHAMMED; KOORBANALLY; ISLAM, 2015)
Ratos <i>Wistar</i> com idade de 6 semanas receberam solução de frutose a 10% por seis semanas, sendo denominado grupo GF10 .	(ORLANDI, 2016)
Ratos <i>Wistar</i> com idade de 3 semanas receberam solução de frutose a 30% por três semanas, e com posterior injeção i.p. de STZ (40mg/Kg), sendo o grupo denominado GFS30 .	(WILSON; ISLAM, 2012)
Ratos <i>Wistar</i> com idade de 7 semanas receberam solução de frutose a 30% por três semanas, e com posterior injeção i.p. de STZ, sendo o grupo denominado GFS30-2 .	(WILSON; ISLAM, 2012)
Dieta hiperlipídica incrementada com banha de porco por quatro semanas e associada à injeção de estreptozotocina (35mg/kg) na terceira semana, sendo o grupo denominado GDH .	(CORREIA-SANTOS <i>et al.</i> , 2012)
Dieta de cafeteria por quatro semanas e associada à injeção de estreptozotocina (35mg/kg) na terceira semana, sendo o grupo denominado GDC .	(COSTA, 2014)

Fonte: Do autor

Foram utilizadas: 1. dieta hiperlipídica associada à injeção de estreptozotocina, segundo Correia-Santos *et al.*, (2012) e 2. dieta de cafeteria também associada injeção de

estreptozotocina, segundo Costa (2014). Essas dietas apresentam composição conforme descrita na Tabela 2 e Tabela 3, respectivamente.

Tabela 2 - Composição da dieta hiperlipídica com banha de porco

Componentes	Quantidade (g)
Ração comercial	800
Banha de porco	200

Fonte: Adaptado de Correia-Santos *et al.*, (2012)

Tabela 3 - Composição da dieta de cafeteria

Componentes	Quantidade (g)
Ração comercial	142,85
Biscoito doce	142,85
Batata palha	142,85
Chocolate ao leite	142,85
Bacon (moído)	142,85
Patê de sardinha	285,70

Fonte: COSTA (2014)

A injeção intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina (STZ) foi realizada em baixa dosagem, sendo dissolvida em veículo (solução de citrato de sódio 0,01M, pH = 4,5). Após o período de indução ao DM, animais com glicemia >200 mg/dL foram considerados diabéticos.

5.3 DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA À INSULINA

A determinação de resistência à insulina foi avaliada pelo índice TyG (triacilglicerídeos/glicose), sendo calculado pela fórmula abaixo (GUERRERO-ROMERO *et al.*, 2010):

$$\text{TyG} = \text{Ln} [\text{triacilglicerídeos de jejum (mg.dL}^{-1}) \times \text{glicose de jejum (mg.dL}^{-1}) / 2].$$

5.4 TRATAMENTO COM AMINOGUANIDINA E METFORMINA EM RATOS WISTAR

Para investigar a relação entre a aminoguanidina e o aumento de ERO, foi administrado por gavagem durante 30 dias, AG (200mg/kg) aos grupos de ratos diabéticos e não-diabéticos (controle) (STOPPA *et al.*, 2006). A metformina (200 mg/kg) também foi administrada nos animais por gavagem durante 30 dias (REN *et al.*, 2020).

5.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

No trigésimo primeiro dia os animais foram anestesiados com tiopental de sódio (120mg/kg) e o sangue foi colhido por punção cardíaca no ventrículo direito e distribuído em diferentes tubos de coleta de sangue e soro. O rim, o fígado foram coletados após a coleta do sangue e foram estocados em tampão fosfato salino 10mM, pH 7,4, 0,1 M, fenil-metilfluoridosulfóxido (PMSF) 50 µg/mL, benzamidina 100 µM e leupeptina 50µM à 10°C negativos até o momento das análises. Para análise histológica, os órgãos retirados foram colocados em paraformaldeído 4% tampão fosfato e deixados em temperatura ambiente até serem processados e incluídos em parafina.

- Obtenção de soro: as amostras de sangue foram colhidas em tubos siliconizados sem aditivo para obtenção de soro. Após centrifugação a 1500g por 10 minutos, o soro foi separado e utilizado para a determinação dos parâmetros bioquímicos.

- Preparo do homogeneizado dos órgãos: os órgãos foram homogeneizados a 4°C em tampão fosfato-salino pH 7,4, 0,1 M, fenil-metilfluoridosulfóxido (PMSF) 50 µg/mL, benzamidina 100 µM e leupeptina 50µM equivalente a 4 vezes o peso fresco de cada tecido. O homogeneizado foi centrifugado a 3000g, por 10 min a 4°C, sendo utilizado o sobrenadante para a determinação da peroxidação lipídica, SOD, CAT e GPx (JONES, L. H.; ABDALLA; FREITAS, 1995).

5.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

As concentrações de glicose, colesterol total e triglicerídeos foram determinadas no soro por método enzimático colorimétrico seguindo a metodologia de Trinder. O colesterol HDL foi determinado por sistema quantitativo direto através de surfactante seletivo. Os níveis

séricos de creatinina foram determinados pelo método de Jaffé modificado. Os níveis de ureia, AST e ALT foram determinados por método cinético. Os níveis de fosfatase alcalina foram determinados por método colorimétrico pela metodologia de Bowers e Mc Comb modificado (BURTIS; ASHWOOD; TIETZ, 1999). Todos os parâmetros bioquímicos foram realizados através de kits comerciais em equipamento automatizado da marca Labtest modelo LABMAX PLENNO.

5.7 RECRUTAMENTO DOS NEUTRÓFILOS, CONTAGEM DAS CÉLULAS E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

O recrutamento dos neutrófilos foi realizado pela administração intraperitoneal prévia de 2 mL de caseinato de sódio 12% (diluído em salina 0,9%). Após um período de 4 horas (pico de migração de neutrófilos para o peritônio) os animais foram sacrificados e os neutrófilos foram obtidos por lavagem peritoneal com PBS estéril. As células foram contadas na Câmara de Neubauer e mantidas em gelo durante a realização dos ensaios. Para a contagem das células, foram utilizadas 19 partes de líquido de Turk (ácido acético 3% e azul de metileno 1%) e 1 parte da suspensão celular (diluição 1/20). A viabilidade celular foi avaliada com Azul de Tripán 0.1% (ROSENFELD, 1947).

5.8 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA POR FLUORIMETRIA

A peroxidação lipídica foi avaliada no soro e nos órgãos através da determinação de dialdeído malônico por fluorimetria. Para cada 150µL de amostra ou de padrão foi adicionado 750µL de ácido fosfórico 1,22M, 1350µL de água e 750µL de TBA 0,67% em ácido acético 50%. Após homogeneização por 30 segundos, as amostras foram incubadas em banho-maria a 95°C, durante 60 minutos. Em seguida, foram resfriadas em banho de gelo. Foram adicionados 1800µL de metanol e 1000µL de NaOH 1M para cada alíquota de 200µL de amostra ou de padrão e analisadas em fluorímetro a 532 nm de excitação e 553 nm de emissão (SINNHUBER; YU, 1977).

5.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE CATALASE

A atividade da enzima CAT foi determinada no soro e nos órgãos segundo Aebi (1984), que acompanha a decomposição de H_2O_2 por minuto a 240 nm. Alíquotas das amostras foram incubadas em PBS pH 7,4. A reação foi iniciada com a adição de H_2O_2 10 mM, sendo a absorbância monitorada durante um minuto. A cinética de decomposição de H_2O_2 foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do mesmo a 240 nm ($43,6 M^{-1} cm^{-1}$). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína, onde U corresponde à atividade da enzima que promove a hidrólise de 1 μ mol de H_2O_2 por minuto.

5.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE GLUTATIONA PEROXIDASE

Foi determinada no soro e nos órgãos pelo método de Sinet *et al.* (1975) através do monitoramento da absorbância à 300 nm, à 37°C, de uma mistura contendo: glutationa reduzida 6 mM, tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, NADPH 1 mM, glutationa redutase 1 UI e alíquotas do plasma ou das frações obtidas do homogeneizado de alíquotas de fígado ratos na concentração final de 1 mg de proteína/mL. Após 3 minutos de incubação, a reação foi iniciada pela adição de t-butil-hidroperóxido (0,07 g/mL). A cinética de oxidação do NADPH foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar para o mesmo, a 340 nm. A atividade enzimática foi calculada em função da concentração de proteína na amostra.

5.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE

Foi determinada no soro e nos órgãos segundo Oyanagui (1984). Alíquotas do plasma foram incubadas com hidroxilamina 0,01 M, hipoxantina 1mM e xantina oxidase 0,0515 U/ml a 37°C, durante 30 minutos, na ausência de luz. Após a incubação foram adicionados ácido sulfanílico, α -naftilenodiamino e ácido acético glacial que ficaram incubados, a temperatura ambiente, por 20 minutos. A absorbância foi determinada em 550 nm. A atividade da enzima foi calculada, considerando-se que 1 unidade da enzima é capaz de produzir uma inibição de 50% na reação. Os resultados foram expressos em relação à concentração de proteína na amostra.

5.12 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE NOX2 EM NEUTRÓFILOS PERITONEAIS

A produção de espécies reativas de oxigênio direta e indiretamente produzidas pelo sistema NOX2 foi avaliada por quimioluminescência, acompanhada em luminômetro *Geomax*® 20/20 num volume final de 0,3 mL. A reação foi iniciada com PMA (12- miristato 13-acetato de forbol) (16 ng/ensaio). O luminol e a lucigenina foram utilizados como substrato na concentração de 1 mM. Todas as reações foram realizadas em PBS, pH 7,4 e acompanhadas por 30 minutos (GOMEZ *et al.* 1994; JONES, HANCOCK, 1994). Foram feitas reações controle (sem células, sem luminol, sem lucigenina, sem PMA, e com SOD). Todas as reações foram acompanhadas separadamente durante 30 minutos no luminômetro e os resultados expressos em RLU/minuto.

5.13 ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (FORMAÇÃO DE HOCL)

A formação de HOCl reflete a atividade de MPO e foi acompanhada por espectrofotometria baseada na formação de taurina-cloramina resultante da reação de ácido hipocloroso com taurina. A concentração de taurina-cloramina foi estimada pela oxidação do ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) a 5,5'-ditiobis ácido 2- nitrobenzoico (DTNB) medindo o decréscimo da absorbância de TNB a 412 nm (KETTLE; WINTERBOURN, 1994).

5.14 DOSAGEM DE NITRITOS

O lavado peritoneal foi coletado para estimativa da produção de NO pelo método de Griess, (DING; NATHAN; STUEHR, 1988). De acordo, 50 µl da amostra foi incubada com 50 µl do reagente de Griess (sulfanilamida 1%, dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,1%, ácido fosfórico 2,5%) por 5 min em temperatura ambiente. A concentração de nitritos foi determinada por leitura da densidade óptica a 550 nm em referência ao padrão da solução de NaNO₂. As dosagens foram realizadas em triplicata.

5.15 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

A amostra de tecido obtido do rim direito e quadrante superior direito do fígado foram lavados em soro fisiológico e imediatamente fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato por 24 horas e depois mantidos em álcool 70 em temperatura ambiente até serem

processados e incluídos em parafina. Posteriormente, o material foi desidratado em série crescente de concentrações de álcool (70, 80, 90, 95, 100%) e diafanizado (álcool-xilol 1:1, xilol) para inclusão em parafina histológica.

Foram obtidos cortes de 7 μ m de espessura em micrótomo Leica®. Os cortes foram aderidos em lâminas de vidro e posteriormente corados pelo método Hematoxilina-Eosina. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico acoplado a sistema de captura de imagens Digital Sight, NIS-Element BR®. Este experimento foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Tomaz H. Araújo no Laboratório de Biologia Estrutural (ICB- UNIFAL-MG).

5.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade. Foi utilizado o teste de variância ANOVA. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativamente diferentes.

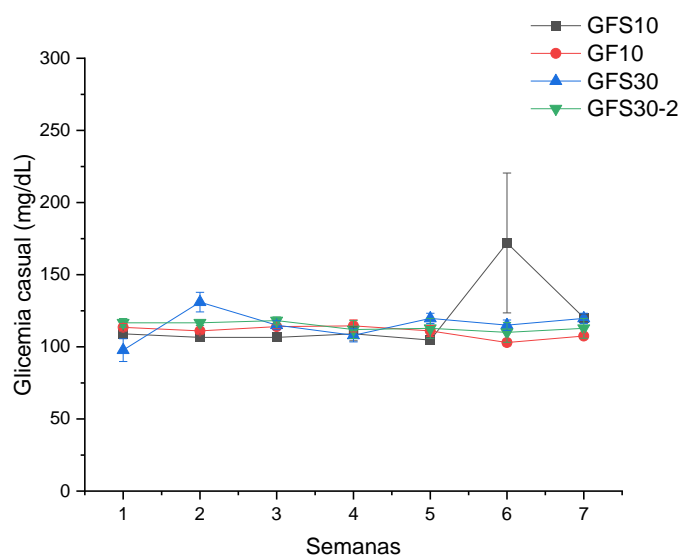
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora tenha ocorrido muitos avanços terapêuticos nos últimos anos, o diabetes continua sendo um importante problema de saúde pública mundial, já que torna o portador mais suscetível a complicações como cegueira, nefropatia, amputações de membros, doenças cardiovasculares e outras. Sendo assim, o presente trabalho visa contribuir com dados que ajudem na ampliação do conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos da doença e suas complicações, além da busca por tratamentos capazes de contribuir com a diminuição dos danos e sintomas no organismo do portador. Para esse fim, foi proposto um modelo experimental de DM2, onde foram testados inicialmente alguns protocolos de indução.

6.1 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS TIPO 2

Foram utilizados diferentes protocolos a fim de selecionar o mais adequado para a instalação do Diabetes Tipo 2 nos animais, conforme descrito na Tabela 1. Inicialmente, foram utilizadas metodologias que envolviam a solução de frutose para indução do DM2. Dessa maneira, para a comprovação da instalação do diabetes, a glicemia dos animais nos diferentes protocolos foi monitorada ao longo das semanas, conforme o Gráfico 1:

Gráfico 1 - Glicemia casual dos animais nos protocolos utilizados na padronização do DM2



Fonte: Do autor

Legenda: Avaliação da glicemia casual nos grupos GFS10 (animais que receberam frutose 10% associado a injeção de STZ, e com n=4); GF10 (animais que receberam apenas solução de frutose 10%, e com n=4); GFS30 (animais com idade de 3 semanas que receberam solução de frutose a 30% por três semanas, associado a injeção i.p. de STZ (40mg/Kg), e com n=4); GFS30-2 (animais com idade de 7 semanas que receberam solução de frutose a 30% por três semanas, associado a injeção i.p. de STZ (40mg/Kg), e com n=5). Valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes (ANOVA – tukey).

Não houve alteração nos níveis de glicemia nos grupos **GFS10** e **GF10**, exceto pelo aumento da glicemia de um animal na semana seis (GRÁFICO 1). Tais protocolos não foram eficazes em ocasionar um quadro de hiperglicemia, e isso pode estar associado ao fato de ratos *Wistar* serem menos afetados do que ratos *Sprague-Dawley* quanto aos efeitos da frutose ingerida em solução. Além disso, a ingestão da frutose através da dieta vem sendo relatada como mais efetiva na indução da síndrome metabólica quanto comparada a ingestão de frutose em solução aquosa (DE MOURA *et al.*, 2009).

O grupo **GFS30**, foi tratado com 30% de frutose em ratos *Wistar* com 3 semanas de idade, e com posterior injeção i.p. de STZ, uma vez que trabalhos demonstram que maiores concentrações de frutose induzem ao DM2 de forma mais acentuada (WILSON; ISLAM, 2012). No entanto, não houve alteração nos níveis de glicemia, podendo ser justificado pelo fato de que trabalhos demonstram que ratos *Wistar* jovens (28 dias) e sob ingestão de frutose

não apresentam alteração significativa na glicemia e outros parâmetros bioquímicos relacionados à síndrome metabólica quando comparado com animais de 90 dias, demonstrando que animais adultos poderiam apresentar melhores respostas frente à ingestão de frutose em solução (DE MOURA *et al.*, 2009).

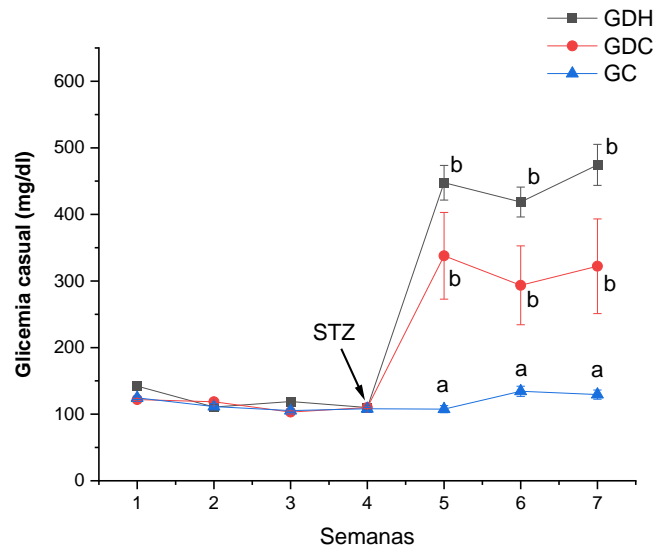
Em uma próxima alteração no protocolo, foram utilizados animais de sete semanas de idade sob a ingestão de solução de frutose a 30% por três semanas, e com posterior injeção i.p. de STZ, denominado GFS30-2, uma vez que Wilson e Islam (2012) demonstraram que pode ocorrer a indução ao DM de forma mais acentuada com a ingestão da solução de frutose a 30%. No entanto, não foi possível obter um quadro de hiperglicemia através desta metodologia.

Após o insucesso na padronização do modelo de DM2 utilizando solução de frutose em diferentes concentrações, optou-se pela indução do diabetes com dois protocolos distintos através da dieta. Foram utilizadas: 1. dieta hiperlipídica incrementada com banha de porco associada à injeção de estreptozotocina, segundo Correia-Santos *et al.*, (2012) e 2. dieta de cafeteria também associada injeção de estreptozotocina, segundo Costa (2014).

Trabalhou-se com o grupo controle (GC) e o grupo de indução ao diabetes mellitus tipo 2 (GDH), que foi mantido em dieta hiperlipídica por três semanas, recebeu a injeção de estreptozotocina (35mg/kg) e foi mantido por mais uma semana na dieta hiperlipídica, sendo realizado o controle glicêmico conforme Gráfico 2.

Em paralelo, optou-se por trabalhar com protocolo de indução do diabetes utilizando dieta de cafeteria, conforme Pinto Júnior e Seraphim (2012). A dieta foi mantida por 4 semanas e associada com injeção intraperitoneal de estreptozotocina (35 mg/kg) na terceira semana no intuito de ter um protocolo que induza o diabetes no período de quatro semanas e não quatorze semanas como relatado por Pinto Júnior e Seraphim (2012). Nesse protocolo, animais com sete semanas de idade receberam a dieta de cafeteria, sendo denominado GDC, que foi mantido com a dieta por três semanas, receberam a injeção de estreptozotocina (35 mg/kg) e foram mantidos por mais uma semana sob a dieta. Assim, foi realizado o controle glicêmico conforme Gráfico 2.

Gráfico 2 - Glicemia casual e comparativa de grupo controle (GC), dieta de cafeteria (GDC) e dieta hiperlipídica incrementada com banha de porco (GDH)

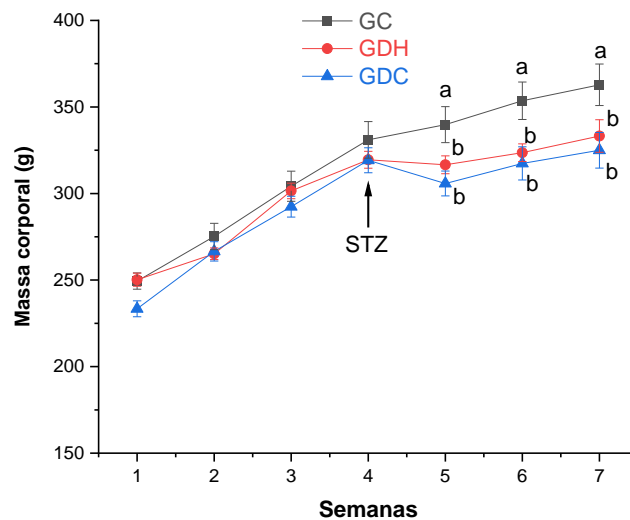


Fonte: Do autor

Legenda: Glicemia casual do grupo controle (GC), dieta de cafeteria (GDC) e dieta hiperlipídica incrementada com banha de porco (GDH). Valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes (ANOVA – tukey).

Através dos valores de glicemia, pode-se notar que ambos os protocolos foram efetivos na indução da hiperglicemia. No entanto, no grupo que foi administrado dieta de cafeteria (GDC), 40% dos animais não apresentaram o quadro de hiperglicemia. Já no grupo que permaneceu na dieta hiperlipídica, todos os animais apresentaram o quadro de hiperglicemia. Diante dos resultados, a metodologia de escolha foi a dieta hiperlipídica (incorporada com banha de porco), devido a sua eficácia na indução ao diabetes e manutenção do estado de hiperglicemia nas semanas subsequentes. Além disso, monitorou-se a influência do tratamento na massa corporal dos animais, conforme Gráfico 3.

Gráfico 3 - Massa corporal comparativa de grupo controle (GC), dieta de cafeteria (GDC) e dieta hiperlipídica incrementada com banha de porco (GDH)



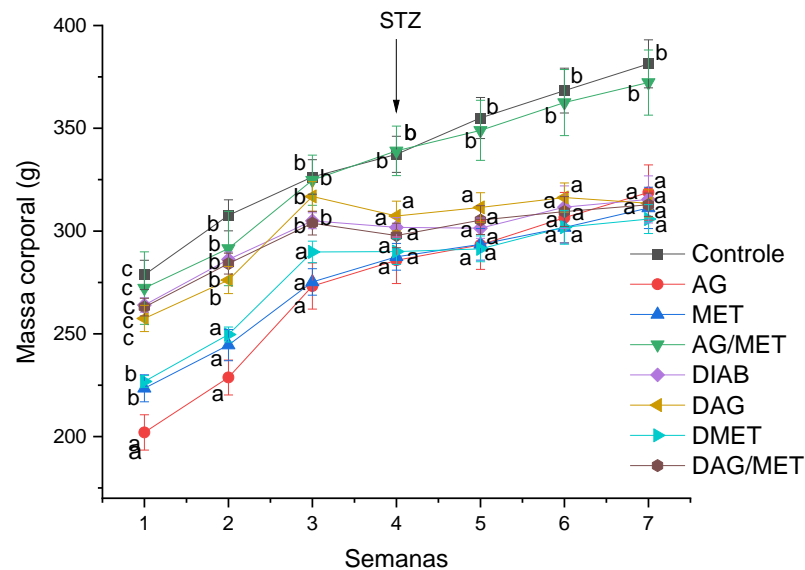
Fonte: Do autor

Legenda: Massa corporal do grupo controle (GC), dieta de cafeteria (GDC) e dieta hiperlipídica incrementada com banha de porco (GDH). Valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes (ANOVA – tukey).

Diante dos dados de monitoramento de massa corporal dos animais, pode-se notar que após a administração de estreptozotocina ocorreu diminuição e dificuldade na evolução de massa corporal, e tais dados corroboram com o que vem sendo relatado na literatura por Bhandari *et al.* (2013) e Correia-Santos *et al.* (2012).

A partir dos dados obtidos, pode-se selecionar a dieta hiperlipídica para indução dos animais ao DM2, conforme Correia-Santos *et al.* (2012), uma vez que essa dieta levou todos os animais ao quadro de hiperglicemia e apresenta menor custo na sua produção. Assim, deu-se sequência ao trabalho realizando os diferentes tratamentos aos grupos experimentais. No Gráfico 4, observa-se a massa corporal ao longo das semanas, e através desses dados não se observa diferença na massa corporal em decorrências dos diferentes tratamentos realizados ao longo das semanas.

Gráfico 4 - Massa corporal durante o tratamento



Fonte: Do autor

Legenda:

Os resultados representam a média \pm erro. CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. DAG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: animais com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

6.2 ATIVIDADE DE NOX2

Os neutrófilos são fagócitos importantes na defesa contra microrganismos invasores e após estimulação são capazes de produzir ERO que resulta em ativação da NOX 2. Esse processo, conhecido como “burst oxidativo” leva inicialmente a produção do ânion superóxido, e a partir deste há produção de espécies com maior atividade antimicrobiana (KAWAHARA; QUINN; LAMBETH, 2007).

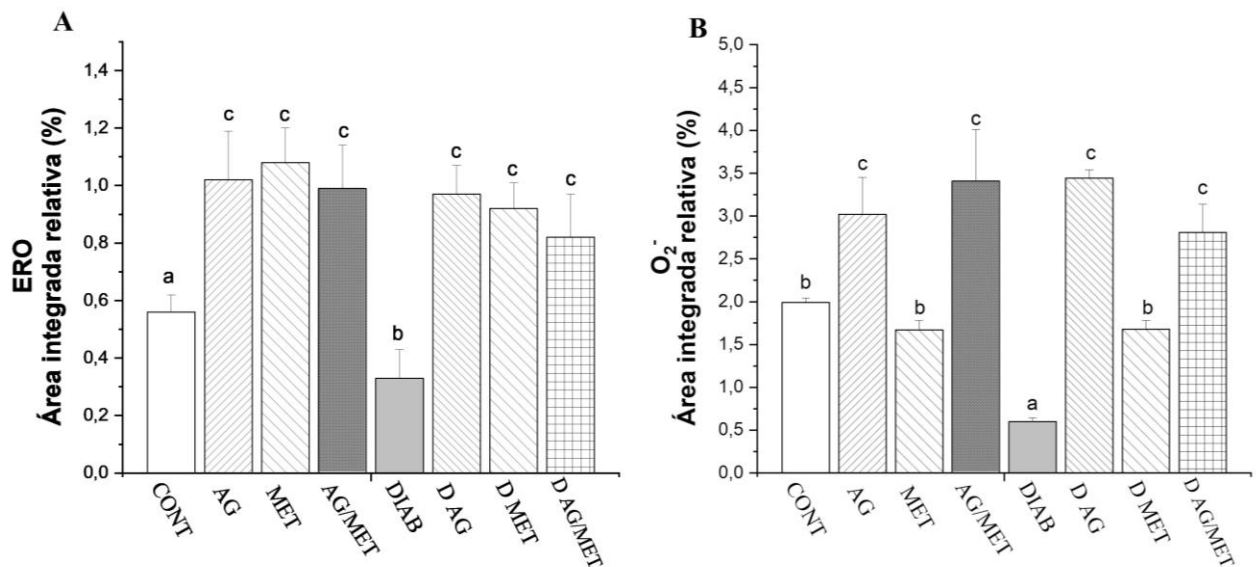
Dentre as técnicas conhecidas para mensurar as ERO, pode-se destacar a quimiluminescência amplificada por luminol e lucigenina, sendo que o luminol é mais utilizado e depende da peroxidase intracelular (KAWAHARA; QUINN; LAMBETH, 2007). Assim, após ativação dos neutrófilos, as ERO geradas podem converter moléculas como o luminol a derivados intermediários instáveis e excitados, e ao retornar ao seu estado fundamental são capazes de emitir luz na forma de fótons.

O luminol é uma espécie química capaz de ser oxidada pelas ERO geradas e atua como sonda para amplificar a quimiluminescência celular proporcional à produção total de

ERO. A lucigenina, por sua vez, é oxidada preferencialmente pelo ânion superóxido, e atua como sonda para a quantificação deste radical e avaliação da atividade de NOX2 (ASSIS, 2018). Assim, foi possível avaliar o metabolismo oxidativo na produção total de ERO pelo luminol, e a produção principalmente de O_2^- através da lucigenina.

Sendo assim, realizou-se o monitoramento da produção de espécies oxidantes pelos neutrófilos peritoneais, por quimiluminescência dependente de luminol e lucigenina, na presença e na ausência de PMA. Podendo-se notar no Gráfico 5 que a atividade de NOX 2 foi menor no grupo diabético e que houve aumento na atividade de NOX 2 (produção de ERO) nos grupos tratados por AG e/ou MET independente do estado diabético. Além disso, houve um aumento principalmente nos níveis de ânion superóxido nos grupos tratados com aminoguanidina e tais dados corroboram com De Souza Ferreira *et al.* (2016), que demonstrou a capacidade de AG em aumentar a atividade de NOX2. Além disso, foi demonstrado também que neutrófilos tratados com MET mantém a produção de ERO (DE SOUZA FERREIRA, 2016, p.66). Outros trabalhos relatam que a MET apresenta capacidade de inibir a atividade de NOX 2 e danos no DNA (AMREIN *et al.*, 2012; AN *et al.*, 2016; ARAS *et al.*, 2010).

Gráfico 5 - Produção de ERO e ânions superóxido por neutrófilos peritoneais



Fonte: Do autor

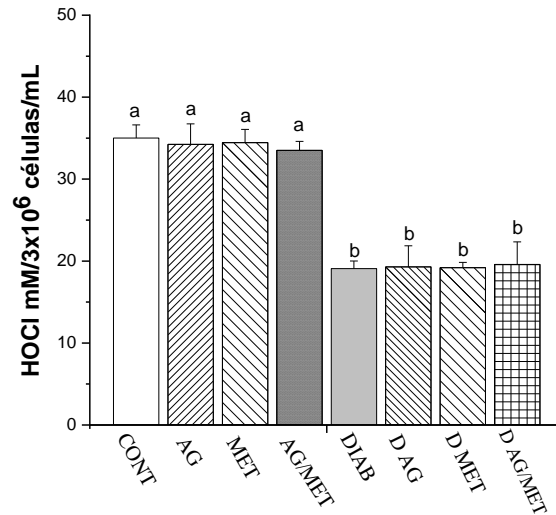
Legenda: Os resultados representam a média \pm erro padrão estimadas através da área integrada de emissão de luz. CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: animais com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

6.3 ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (FORMAÇÃO DE HOCL)

A Mieloperoxidase está presente em neutrófilos e monócitos, é armazenada em grânulos azurófilos e é secretada no meio extracelular após ativação de fagócitos, sendo que essa ativação ocorre pelo “burst oxidativo” formado pela NOX 2 (STOCKER; KEANEY, 2004).

De acordo com o Gráfico 6, pode-se observar que houve diminuição da atividade de MPO no grupos diabéticos, conforme vem sendo relatado na literatura (DE SOUZA FERREIRA *et al.*, 2012). Além disso, nota-se que o tratamento com aminoguanidina não altera atividade de mieloperoxidase, e esses dados corroboram com trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, no qual demonstrou que a aminoguanidina não influencia a atividade de MPO tanto em neutrófilos de ratos controle como em diabéticos (DE SOUZA FERREIRA *et al.*, 2016).

Gráfico 6 - Produção de HOCl por neutrófilos peritoneais



Fon

te: Do autor

Legenda: Avaliação da produção de HOCl por neutrófilos peritoneais (3×10^6 células/mL). Os resultados representam a média \pm erro padrão. Grupos: CONT: animais não diabéticos (n=3). AG: aminoguanidina (n=3). MET: metformina (n=4). AG/MET: aminoguanidina e metformina (n=5). DIAB: diabéticos (n=4). D AG: diabéticos com aminoguanidina (n=5). D MET: diabéticos com metformina (n=4). D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina (n=5). Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

6.4 DOSAGEM DE NITRITOS

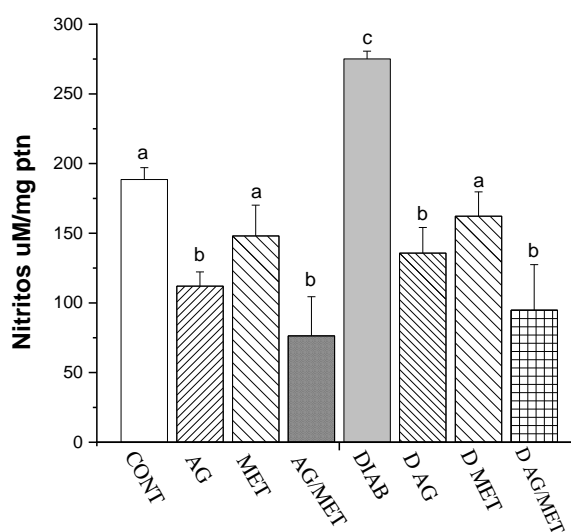
O íon nitrito pode atuar como microbicida em determinadas situações, sendo gerado por macrófagos ativados e tem seus níveis aumentados em locais de infecção. Estudos sugerem que NO_2^- gerado através do catabolismo – pode ser precursor de ERN em células e tecidos. Também há estudos que sugerem a possibilidade de nitritos serem o substrato da Cicloxigenase 2, podendo ter sua importância em processos inflamatórios. Além disso, sabe-se que a restauração nos níveis de nitritos tem sido associada a melhora no quadro de diabetes tipo 2 (CAPE; HURST, 2009).

Autores demonstram aumento nos níveis de NO em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em comparação com pacientes não portadores de diabetes, apesar de alguns autores relatarem o oposto (WANG, H. *et al.*, 2007). Outros autores também demonstram aumento nos níveis de NO em paciente com DM2, e que animais com hiperglicemia também

apresentam este aumento, podendo-se sugerir que maiores níveis de glicemia estão relacionados aos maiores níveis de NO e maior expressão de iNOS (ADELA *et al.*, 2015).

Conforme observado no Gráfico 7, pode-se notar que houve aumento na produção de NO no grupo diabético, e que os tratamentos com AG e/ou MET restabeleceu os níveis de acordo com os grupos controles que receberam o mesmo tratamento. Autores demonstram que a aminoguanidina reduz nitritos, e tais dados corroboram com este trabalho (CORBETT *et al.*, 1992). Outros autores também demonstram a capacidade de AG em bloquear o aumento dos níveis de NO quando associado a compostos capazes de gerar maior produção de nitritos (DA SILVA CHAVES *et al.*, 2020). Trabalhos demonstram que a MET possui capacidade de reduzir nitritos e tais informações corroboram com os dados observados no **Gráfico 6** (SHIROOIE *et al.*, 2020). Assim, pode-se notar que AG e/ou MET são eficazes em diminuir os níveis de nitritos que estava maior em grupos diabéticos não tratados, demonstrando sua capacidade em restabelecer tais níveis.

Gráfico 7 - Produção de nitritos por neutrófilos peritoneais



Fonte: Do autor

Legenda: Avaliação da produção de nitritos por neutrófilos peritoneais. Grupos: CONT: animais não diabéticos (n=3). AG: aminoguanidina (n=3). MET: metformina (n=4). AG/MET: aminoguanidina e metformina (n=4). DIAB: diabéticos (n=3). D AG: diabéticos com aminoguanidina (n=4). D MET: diabéticos com metformina (n=4). D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina (n=4). Os resultados representam a média \pm erro padrão. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

6.5 AVALIAÇÃO DE GLICEMIA

Foram avaliados os efeitos de diferentes tratamentos com AG e/ou MET no perfil glicêmico de ratos *Wistar* tratados por 30 dias. Aqui, foi utilizado a gliclazida para evidenciar a instalação do modelo de DM2, através da diminuição da glicemia após sua administração, uma vez que este fármaco atua estimulando as células beta do pâncreas a liberar insulina. Assim, a gliclazida se liga no receptor de sulfonilureia das células beta (SUR1), ocasionando bloqueio em canais de potássio, o que resulta em efluxo de potássio com despolarização de células beta. Posteriormente, ocorre abertura de canais de cálcio e consequente ativação de calmodulina que leva à liberação de grânulos contendo insulina (HOICH; NG, 1986).

De acordo com a dieta hiperlipídica escolhida para a indução dos animais ao DM2, conforme Correia-Santos *et al.* (2012), pode-se observar que o protocolo de indução ao diabetes foi efetivo. Os resultados apresentados no Gráfico 8, demonstram que os animais do grupo diabético tiveram uma média glicêmica maior do que os animais do grupo controle. Por outro lado, animais diabéticos tratados com MET e associação de AG e MET apresentaram níveis glicêmicos menores quando comparados com o grupo apenas diabético. Segundo Santomauro *et al.* (2008), a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) é um ponto crucial para a redução da glicemia e atua como sensibilizador do balanço energético celular, sendo ativada pelo aumento da razão AMP/ATP.

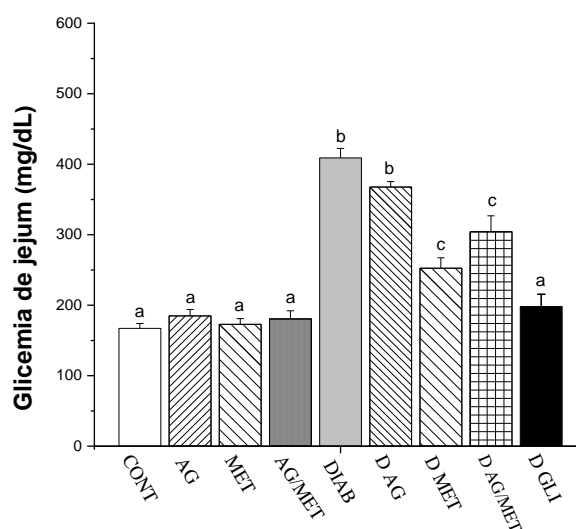
Ao ser ativada, a AMPK atuará principalmente nas vias relacionadas ao metabolismo da glicose e dos lipídios, sobre expressão gênica e sobre síntese proteica (ZHOU *et al.*, 2001). Nestas vias, a AMPK irá inibir o anabolismo (síntese de ácidos graxos e colesterol) e estimular o catabolismo energético celular como, por exemplo, a oxidação da glicose (SANTOMAURO JUNIOR *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2001). De tal maneira, duas situações podem estimular a AMPK: 1- exercício físico, muito recomendado para pacientes portadores de DM2 associado a dieta; 2 - ativação por estímulo da MET (SANTOMAURO JUNIOR *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2001). Como visto em nossos resultados, a redução da glicemia no grupo diabético MET e no grupo tratado com gliclazida, demonstra que o protocolo de indução do DM2 foi efetivo para as condições experimentais propostas.

Entretanto, no grupo diabético tratado com a aminoguanidina não houve redução glicêmica, e tais dados corroboram com De Souza Ferreira *et al.*, (2016), onde é demonstrado que tratamentos de até 50 dias com aminoguanidina não alteram níveis glicêmicos. Apesar de não observamos uma redução neste grupo, devemos lembrar que a grande preocupação do

DM são os efeitos crônicos de um descontrole glicêmico e estas complicações crônicas estão associadas diretamente ao processo de glicação proteica (AGEs) e dano oxidativo.

Segundo Abate *et al.* (2015), os AGEs possuem a capacidade de modificar as propriedades químicas e funcionais de diversas estruturas biológicas devido à geração de radicais livres, formação de ligações cruzadas com proteínas ou de interações com receptores celulares.

Gráfico 8 - Perfil glicêmico após 30 dias de tratamento



Fonte: Do autor

Legenda: Determinação da glicemia realizada no soro. Os resultados representam a média de 8 a 10 análises por grupo. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

6.6 DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA À INSULINA

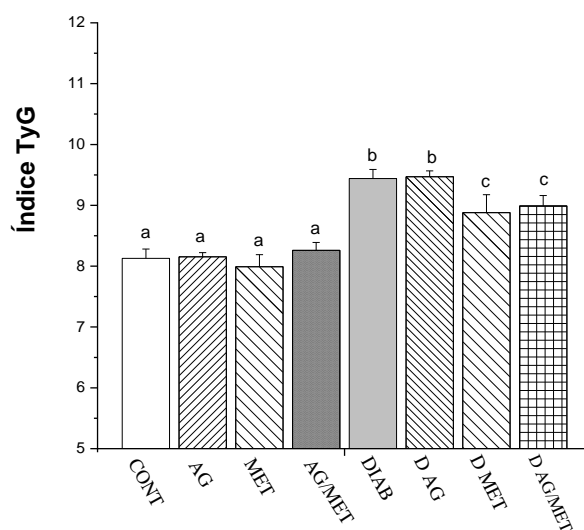
Trabalhos têm demonstrado que a resistência à insulina está associada aos maiores níveis de lipídeos. Assim, vem sendo relatado que devido ao aumento de lipídios, tais como diacilgliceróis (DAG) ocorre um defeito na sinalização que diminui o estímulo da insulina para captação da glicose através de GLUT4. O mecanismo sugerido é que DAG ativam as isoformas de serina/ treonina de proteína quinase C (PKC), o que leva a diminuição fosforilação da tirosina do substrato receptor de insulina 1 (IRS-1) e, como resultado diminui a ativação da PI3-quinase e captação de glicose. Através dessas evidências vem sendo

justificado o fato de o aumento no nível de lipídeos estar relacionado com a resistência insulínica no DM2 (SAMUEL; PETERSEN; SHULMAN, 2010).

Diante do exposto, a metodologia TyG foi elaborada e vem sendo utilizada para demonstrar a resistência à insulina através de cálculo com os níveis de triacilglicerídeos e glicose. Autores demonstram que possui alta sensibilidade e especificidade para avaliar a resistência à insulina, e pode ser correlacionado com HOMA IR (GUERRERO-ROMERO *et al.*, 2010).

De acordo com o Gráfico 9, pode-se observar que os valores do índice TyG nos diferentes grupos diabéticos são maiores que os grupos controles, demonstrando assim que há uma maior resistência à insulina, o que era algo esperado em um protocolo de DM2. Além disso, trabalhos demonstram a capacidade da metformina em reduzir a resistência à insulina (GUO; LIU; LI, 2021), e tais dados corroboram com o Gráfico 9, no qual podemos observar redução na resistência insulínica nos grupos diabéticos tratados com metformina e a associação de aminoguanidina e metformina.

Gráfico 9 - Resistência à insulina pelo índice de TyG



Fonte: Do autor

Legenda: Determinação do índice de TyG. Os resultados representam a média de 8 a 10 análises por grupo. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

6.7 AVALIAÇÃO DE MARCADORES HEPATOBILIARES

A aspartato aminotransferase (AST) e a Alanina amino transferase (ALT) são marcadores utilizados para avaliar a função hepática. De acordo com Burtis e Bruns (2016), a AST é encontrada principalmente no coração, no fígado, no músculo esquelético e no rim. Por outro lado, a ALT é encontrada predominantemente no fígado e no rim. Em situações que se caracteriza uma doença hepática é comum observar o aumento das enzimas AST e ALT. O perfil de aumento de cada uma das enzimas irá caracterizar uma doença hepática crônica ou aguda.

Enquanto a ALT é encontrada principalmente no citoplasma dos hepatócitos, a AST por sua vez, encontra-se 80% nas mitocôndrias (TELLI; FRIGERI; MELLO, 2016). Sendo assim, um aumento predominante de ALT caracteriza um quadro de lesão hepática aguda e um aumento predominante de AST caracteriza um quadro de lesão hepática crônica. A lesão hepática poderá ser um resultado de vários transtornos tais como, a hipóxia, o acúmulo de lipídeos hepáticos, as doenças bacterianas e virais, as inflamações, as neoplasias hepáticas, endo e exotoxinas, bem como medicamentos (BATISTA, 2016).

Estudos recentes têm demonstrado uma associação entre os valores anormais dos marcadores hepáticos AST e ALT no diabetes *mellitus* tipo 2 (SHAHWAN *et al.*, 2019). Esta relação ocorre principalmente devido ao metabolismo de Acetil-CoA, que é um metabólito intermediário da integração metabólica de lipídeos, de carboidratos e proteínas. Um aumento em qualquer uma das três vertentes aumentará cumulativamente as demais vertentes (DA SILVA *et al.*, 2006). Além do aumento na disponibilidade hepática de Acetil-CoA em portadores de diabetes *mellitus*, há relatos de que um aumento de marcadores inflamatórios é comum nesta situação.

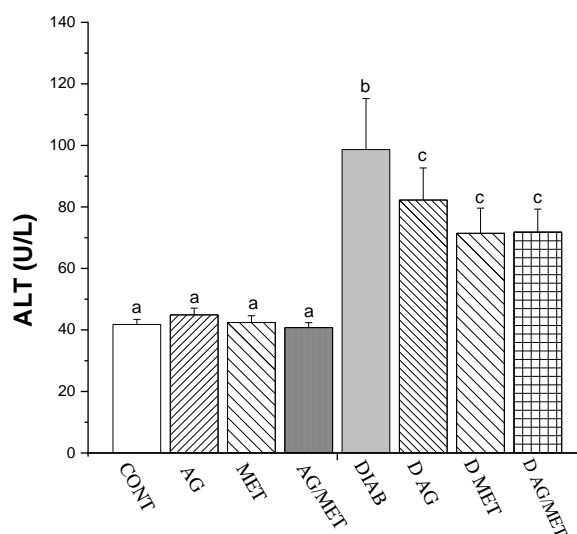
Jonscher *et al.* (2017) e Devasani e Majumdar (2019), deixam claro que controlar os níveis inflamatórios em longo prazo previne a doença hepática e suas consequências metabólicas. Sabemos que em situações de longo descontrolo glicêmico, um aumento no dano oxidativo e inflamatório, associado a um aumento de glicose hepática, são situações comuns em portadores de DM que podem levar até mesmo a um quadro de dislipidemia.

Analisando os Gráficos 10 e 11, pode-se notar que não há diferença estatística entre os animais não diabéticos submetidos aos diferentes tratamentos, o que sugere que os compostos não possuem efeito hepatotóxico. Entretanto, observamos um aumento dos níveis séricos de ALT e AST no grupo de animais diabéticos quando comparados com os animais não

diabéticos, demonstrando que o DM levou a um quadro hepatotóxico, que pode ser devido à processos inflamatórios e aumento do aporte de lipídeos nestes grupos, o que pode ser observado ao analisarmos os valores de triglicérides no grupo de animais diabéticos (GRÁFICO 13) (CHEN *et al.*, 2020). Já nos grupos diabéticos sob o tratamento com a AG e MET, ambos foram capazes de prevenir o aumento de AST e ALT no soro dos animais diabéticos.

Analisando o Gráfico 10, observou-se uma redução nos níveis de ALT no grupo diabético tratados com AG, MET e AG/MET. No Gráfico 11, a redução de AST no grupo diabético tratados com AG, MET e AG/MET foi ainda mais efetivo, uma vez que os valores se igualaram ao do grupo controle. Os resultados dos parâmetros hepatobiliares demonstram que a AG e a MET na dose utilizadas neste trabalho, não são hepatotóxico, e podem ser efetivos na diminuição de complicações hepáticas associadas ao DM.

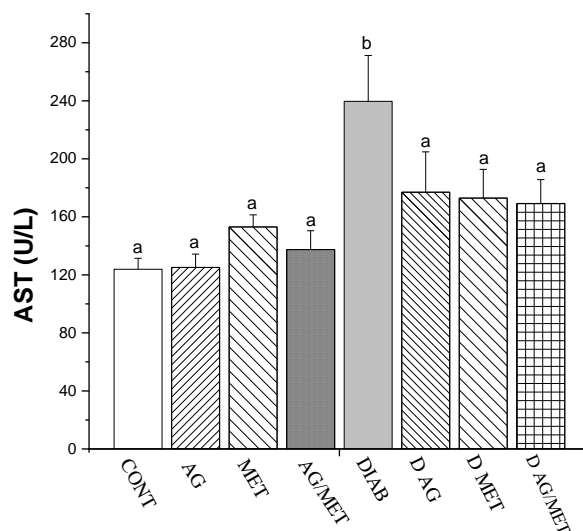
Gráfico 10 Alanina aminotransferase após 30 dias de tratamento



Fonte: Do autor

Legenda: Determinação da ALT em soro. Os resultados representam a média de 8 a 10 análises por grupo. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

Gráfico 11 - Alanina aminotransferase após 30 dias de tratamento



Fonte: Do autor

Legenda: Determinação da AST em soro. Os resultados representam a média de 8 a 10 análises por grupo. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

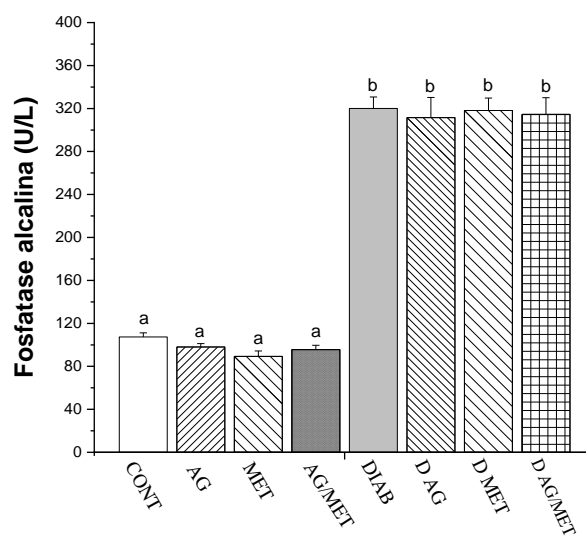
Alguns autores relatam que o uso da metformina em DM2, além de provocar transtornos gastrointestinais inespecíficos, apresenta alguns casos isolados de hepatotoxicidade (GÓMEZ *et al.*, 2008). Em uma visão contraditória, Chae *et al.*, (2019) demonstra que a metformina pode levar a melhora do quadro hepático, diminuindo o nível de esteatose.

Observou-se que ainda há contradições quanto a um possível efeito da própria MET a nível hepático apesar da sua comprovada eficácia clínica no tratamento do DM 2. Com os resultados observados em nosso estudo, pode-se sugerir que há um efeito hepático benéfico da MET e AG no DM 2 e que após as análises histológicas, poderemos confirmar esta hipótese levantada de acordo com os resultados.

A fosfatase alcalina sérica foi identificada em 1926 por Martland e Robison (BORBA, 1982). Demonstrando na época sua presença em tecidos como o hepático, intestinal, ósseo, placentário e renal. Autores relataram casos de portadores de diabetes *mellitus* gestacional com elevados níveis de fosfatase alcalina da isoforma placentária (WOJCICKA-BENTYN *et al.*, 2004). Posteriormente, em estudo publicado em janeiro de 2020, associa um aumento da fosfatase alcalina sérica à síndrome metabólica (KIM *et al.*, 2020).

Observando o Gráfico 12, nota-se que os grupos de animais diabéticos apresentaram níveis estatisticamente maiores de fosfatase alcalina quando comparados com os animais dos grupos controles, que podem estar relacionados com a síndrome metabólica e que os tratamentos, no período de 30 dias, não são capazes de diminuir esses danos.

Gráfico 12 - Fosfatase alcalina após 30 dias de tratamento



Fonte: Do autor

Legenda: Determinação da fosfatase alcalina em soro. Os resultados representam a média de 8 a 10 análises por grupo. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$)

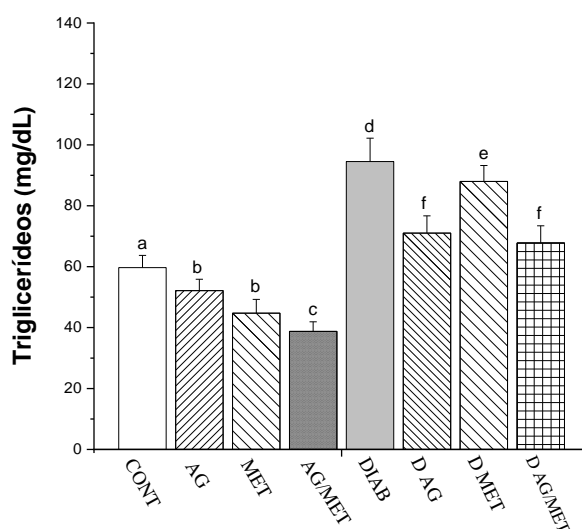
6.8 AVALIAÇÃO DE PERFIL LIPÍDICO

Analisando os resultados do perfil lipídico nos diferentes grupos, podemos observar que os níveis séricos de colesterol total, colesterol HDL e colesterol não HDL não apresentaram diferença estatística (GRÁFICOS 14, 15 e 16). Entretanto, os animais do grupo diabético apresentaram níveis de triglicerídeos (GRÁFICO 13) estatisticamente maiores quando comparados com os animais dos grupos controle. Observa-se ainda que os animais tratados com a aminoguanidina e metformina apresentaram uma melhora nos níveis de triglicerídeos quando comparados com os animais do grupo diabético.

Como pode ser observado, a dieta hipercalórica administrada no período de indução do diabetes não altera os níveis de colesterol total e HDL, uma vez que após a confirmação do

DM, a dieta no período de tratamento (30 dias) é a mesma para os dois grupos (diabéticos e não-diabéticos). Sendo assim, a dislipidemia observada nos animais diabéticos pode ser atribuída à hiperglicemia apresentada por eles. A hipertrigliceridemia decorrente do DM tipo 2 é caracterizada como uma dislipidemia secundária a doenças tais como o Diabetes *mellitus* tipo 2, a insuficiência renal crônica e até mesmo ao estilo de vida (SBD, 2018).

Gráfico 13 - Triglicerídeos após 30 dias de tratamento



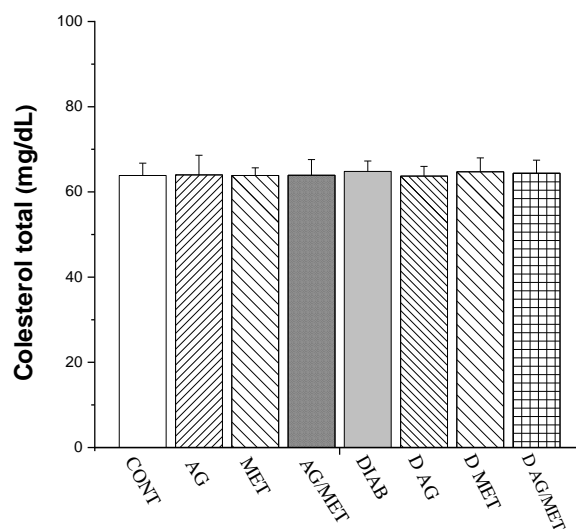
Fonte: Do autor

Legenda: Determinação de triglicerídeos em soro. Os resultados representam a média de 8 a 10 análises por grupo. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

Segundo Panagiotopoulos *et al.* (1998), após tratamento de 12 semanas não foi possível notar diminuição nos níveis de colesterol total e HDL com o tratamento de aminoguanidina, o que vem ao encontro com os dados obtidos, conforme Gráficos 13 e 14. Outros autores demonstram que a metformina contribuiu na redução de colesterol total e HDL, quando animais tratados com dieta hiperlipídica recebem o tratamento de metformina pelo período de 11 semanas (CHAE *et al.*, 2019). Aqui, podemos observar uma diminuição nos níveis de triglicerídeos nos animais tratados com AG e/ou MET. Segundo Yamauchi *et al.* (1997), a aminoguanidina possui capacidade de diminuir os níveis de triglicerídeos em tratamento de 36 semanas em ratos diabéticos. Outros autores relatam a diminuição de triglicerídeos em pacientes que receberam a aminoguanidina por 28 dias na dose de

1200mg/dia, provavelmente por alguma alteração cinética através do qual este inibidor de AGEs possa contribuir (BUCALA *et al.*, 1994).

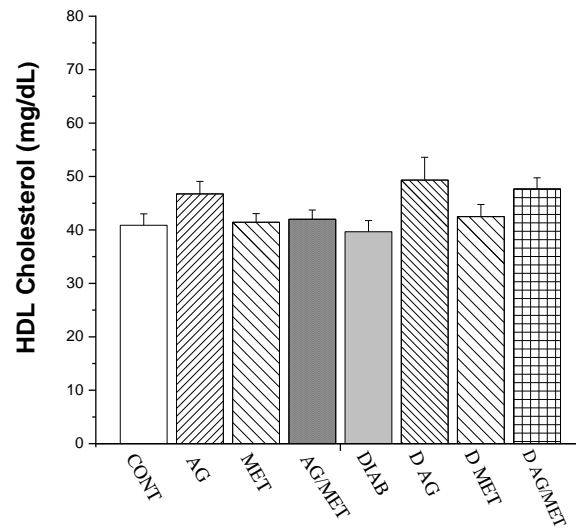
Gráfico 14 - Colesterol Total após 30 dias de tratamento



Fonte: Do autor

Legenda: Determinação de colesterol total em soro. Os resultados representam a média de 8 a 10 análises por grupo. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

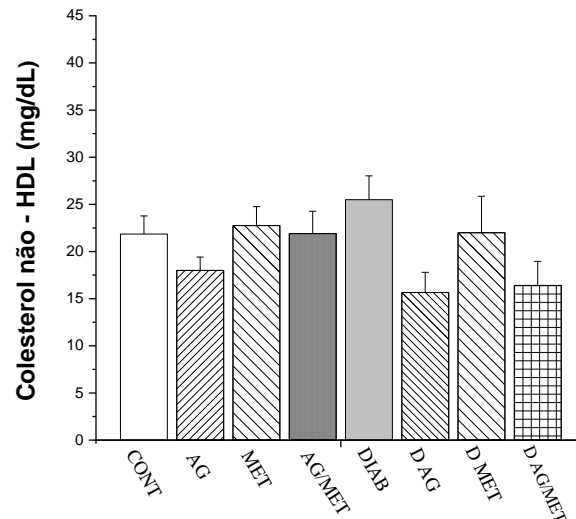
Gráfico 15 - Colesterol HDL após 30 dias de tratamento



Fonte: Do autor

Legenda: Determinação de colesterol HDL em soro. Os resultados representam a média de 8 a 10 análises por grupo. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

Gráfico 16 - Colesterol não-HDL após 30 dias de tratamento



Fonte: Do autor

Legenda: Determinação de colesterol não-HDL em soro. Os resultados representam a média de 8 a 10 análises por grupo. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão. ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

6.9 AVALIAÇÃO DE FUNÇÃO RENAL

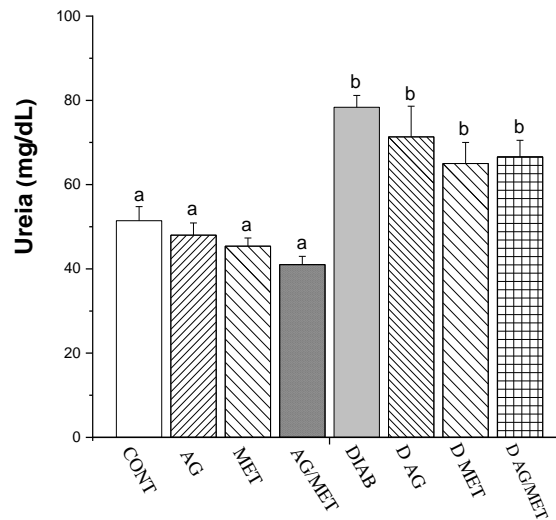
A ureia é o principal metabólito nitrogenado derivado da degradação de proteínas pelo organismo, sendo excretada em sua maior parte pelos rins (SODRÉ; COSTA; LIMA, 2007). Por ser um marcador mais sensível a alterações primárias das condições renais, apresenta grande importância em casos que envolvam esta condição. Porém, não é tão específica para avaliação da função renal como a creatinina, visto que pode ser influenciada pelo grau de hidratação do paciente e o conteúdo proteico da dieta do indivíduo (BURTIS; ASHWOOD, 2008).

Considerando que a glicação de proteínas tem sido apontada como um dos principais mecanismos responsáveis pelas lesões glomerulares observadas na nefropatia diabética (VADLA; VELLAICHAMY, 2013), foram avaliados os níveis de ureia e de creatinina no soro dos animais pertencentes aos diferentes grupos estudados (GRÁFICOS 17 e 18).

Observamos um aumento significativo nos níveis de ureia nos animais dos grupos diabéticos quando comparados com os animais dos grupos não diabéticos. Apesar de não observarmos um aumento significativo nos níveis de creatinina do grupo diabético, não podemos descartar uma possível lesão renal nos animais diabéticos. Deve-se lembrar que marcadores tais como ureia e creatinina se elevam apenas em estágio avançado da lesão renal crônica com diminuição da ordem de 50 – 60% da Taxa de Filtração glomerular (SHEMESH *et al.*, 1985).

Sendo assim, valores não alterados de creatinina não exclui a presença de lesão renal, uma vez que se apresenta alterada nos estágios 3 e 4 de lesão renal. Desta forma, é extremamente importante avaliar a morfologia do tecido renal a fim de verificar a presença ou não da lesão renal e se houve melhora morfológica das unidades funcionais do rim tendo a formação dos AGEs como um dos principais responsáveis pela nefropatia diabética. Zabad; Amin; El-shishtawy (2019) demonstraram recentemente que reduzir a concentração sérica de AGEs melhora a arquitetura do tecido renal. Espera-se com as análises histológicas do tecido renal obter resultados que nos ajudem a esclarecer os possíveis efeitos dos diferentes tratamentos da AG na patologia do Diabetes *mellitus* tipo 2.

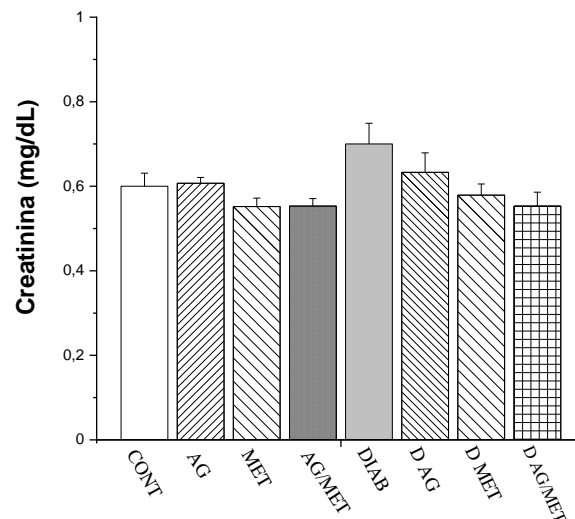
Gráfico 17 - Ureia após 30 dias de tratamento



Fonte: Do autor

Legenda: Determinação de ureia em soro. Os resultados representam a média de 8 a 10 análises por grupo. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

Gráfico 18 - Creatinina após 30 dias de tratamento



Fonte: Do autor

Legenda: Determinação de creatinina em soro. Os resultados representam a média de 8 a 10 análises por grupo. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

6.10 BIOMARCADORES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO NO SORO

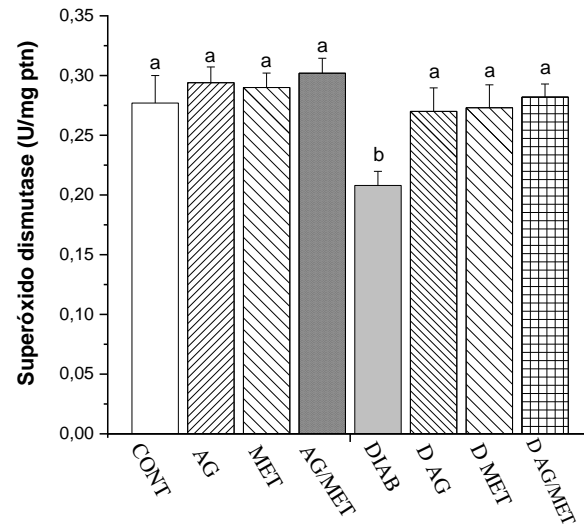
O balanço entre a produção de oxidantes e a defesa antioxidante desempenham um papel importante na prevenção de danos oxidativos. A glutatona, a glutatona peroxidase (GPx), a superóxido dismutase (SOD) e catalase são as principais enzimas que atuam no mecanismo de defesa antioxidante para tentar contrabalancear com o excesso de espécies oxidantes produzidas (ROBSON; KUNDUR; SINGH, 2018).

Analisando os Gráficos 19, 20 e 21, podemos observar que houve diminuição da produção de superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase no grupo DM2, conforme vem sendo relatado na literatura (NOROUZIRAD *et al.*, 2019). Segundo Adeshara *et al.* (2020), metformina melhora a defesa antioxidante, aumentando os níveis de enzimas, tais como catalase e GPx, podendo ser que estes dados estejam correlacionados com o melhor controle glicêmico.

Podemos observar que após o tratamento com AG e/ou MET, houve aumento na produção das enzimas SOD, catalase, e GPx, retornando aos mesmos níveis dos grupos controles. Segundo Vadla e Vellaichamy (2013), demonstram a capacidade da aminoguanidina administrada em animais induzidos ao diabetes com estreptozotocina de restabelecer a produção das três enzimas antioxidantes em questão.

Além disso, podemos notar no Gráfico 22 que houve aumento de peroxidação lipídica no grupo diabético e diminuição nos seus níveis em grupos tratados com AG e/ou metformina, refletindo na atividade antioxidante destes compostos, o que vem ao encontro dos resultados obtidos a respeito da aminoguanidina por Stoppa *et al.* (2006). Outros autores, demonstram a capacidade da metformina diminuir o níveis de peroxidação lipídica em pacientes tratados por três meses (ADESHARA *et al.*, 2020).

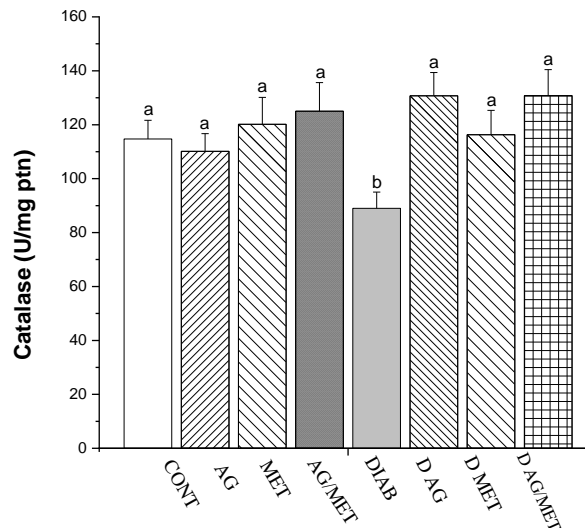
Gráfico 19 - Superóxido dismutase em amostras de soro



Fonte: Do autor

Legenda Determinação da atividade de superóxido dismutase em soro. Os resultados representam a média de 8 a 10 análises por grupo. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

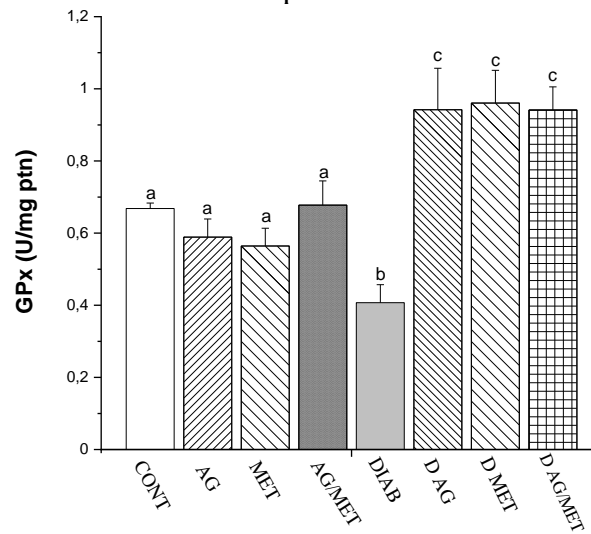
Gráfico 20 - Catalase em amostras de soro



Fonte: Do autor

Legenda: Determinação da atividade de catalase em soro. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão, com 8 a 10 análises por grupo. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

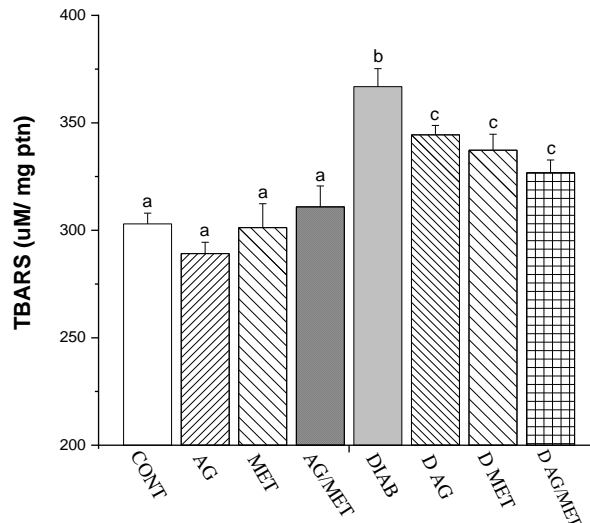
Gráfico 21 - Glutationa peroxidase em amostras de soro



Fonte: Do autor

Legenda: Determinação da atividade de glutatona peroxidase em soro. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão, com 8 a 10 análises por grupo. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

Gráfico 22 - Peroxidação lipídica em amostras de soro



Fonte: Do autor

Legenda: Determinação de peroxidação lipídica em soro. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D AG/MET: diabéticos com aminoguanidina e metformina. Os resultados representam a média \pm erro padrão, com média de 5 análises por grupo. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

6.11 BIOMARCADORES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO

A hiperglicemia pode causar aumento de ERO, mudanças nos níveis do transportador de glicose e metabolismo de glicose, podendo levar ao acúmulo de proteínas oxidadas, e diminuição da função mitocondrial de hepatócitos (DEY; SWAMINATHAN, 2010).

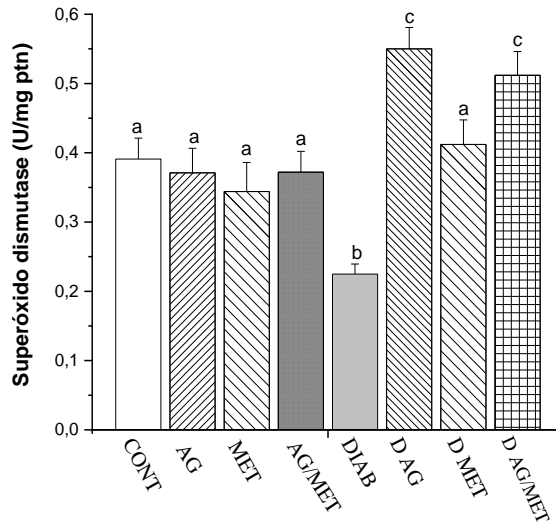
Analisando os Gráficos 23, 24 e 25, podemos observar que houve diminuição da produção das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase no grupo DM2, conforme vem sendo relatado na literatura (NOROUZIRAD *et al.*, 2019).

De acordo com Mokashi *et al.* (2017), também foi possível observar a diminuição dos níveis de catalase no grupo com DM2 e aumento nos níveis de catalase no grupos tratados com metformina, conforme Gráfico 24. Segundo Kurup e Mini (2016), através do tratamento com metformina é possível notar melhora em todo quadro hepático relacionado a ação das enzimas antioxidantes no fígado em animais com DM2, uma vez que seu trabalho demonstra aumento nos níveis de SOD, catalase e GPx, e redução nos níveis de peroxidação lipídica, o que vem ao encontro dos dados obtidos, conforme Gráficos 23, 24, 25 e 26. Tal melhora na atividade antioxidante está relacionada com a diminuição do descontrole glicêmico, contribuindo assim, para uma melhor homeostasia do organismo.

Além disso, com relação a aminoguanidina, podemos observar que houve um maior aumento nos níveis de SOD nos grupos tratados com AG, e que provavelmente os maiores níveis de SOD no grupo tratado com AG/MET está principalmente relacionado com a aminoguanidina. Também houve melhora em todo quadro hepático com relação as enzimas antioxidantes, uma vez que grupos tratados com AG e/ou MET apresentaram aumento nos níveis de SOD, catalase, GPx em comparação com o grupo diabético, e diminuição nos níveis de peroxidação lipídica.

Alguns autores relatam que a aminoguanidina produz um efeito hepatoprotetor, uma vez que após administração concomitante de aminoguanidina e metotrexato (hepatotóxico), pode-se observar aumento nos níveis das enzimas antioxidantes (SOD, catalase e GPx) e diminuição da peroxidação lipídica, em comparação ao grupo de animais que recebeu apenas o composto hepatotóxico, demonstrando assim, sua capacidade de proteção (HAFEZ *et al.*, 2015).

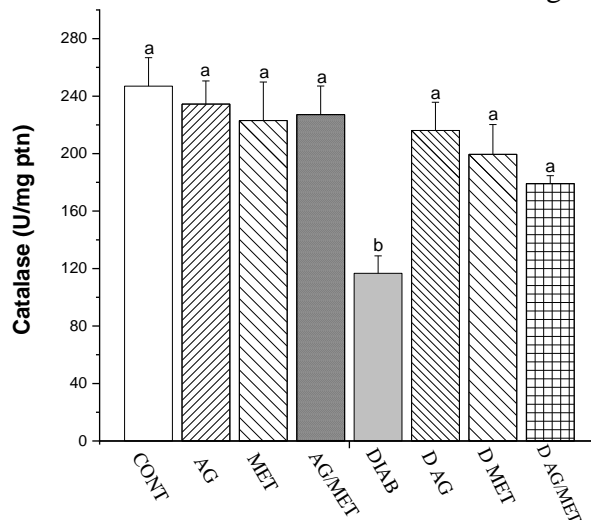
Gráfico 23 - Superóxido dismutase em amostras de fígado



Fonte: Do autor

Legenda: Determinação da atividade de superóxido dismutase no fígado. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão, com 8 a 10 análises por grupo. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

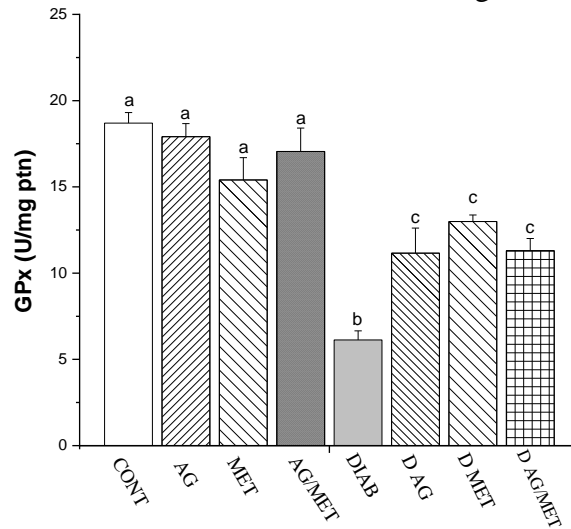
Gráfico 24 - Catalase em amostras de fígado



Fonte: Do autor

Legenda: Determinação da atividade de catalase no fígado. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão, com 8 a 10 análises por grupo. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

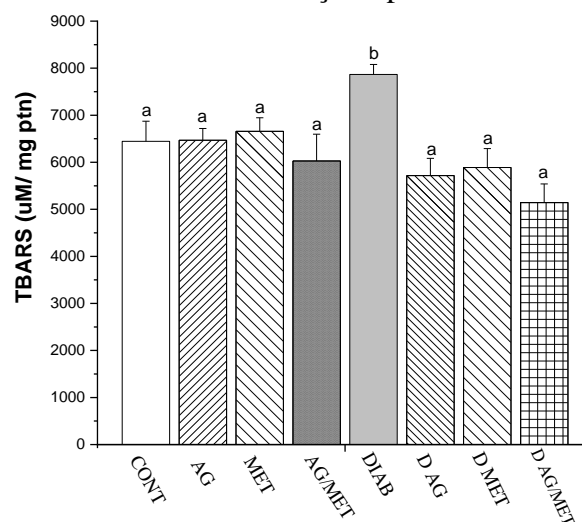
Gráfico 25 - GPx em amostras de fígado



Fonte: Do autor

Legenda: Determinação da atividade de glutathiona peroxidase no fígado. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão, com 8 a 10 análises por grupo. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

Gráfico 26 - Peroxidação lipídica em amostras de fígado



Fonte: Do autor

Legenda: Determinação da peroxidação lipídica no fígado. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão, com 8 a 10 análises por grupo. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

6.12 BIOMARCADORES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO NO RIM

As inúmeras alterações relacionadas ao DM2 causam um desbalanço na homeostasia, ocasionando uma hemodinâmica renal anormal, e podendo ter hiperfiltração e hiperfusão glomerular. Assim, esse estresse na mecânica capilar leva a lesão das células endoteliais. Além disso, pode ocorrer aumento de AGEs e ERO, gerando futuramente um quadro de nefropatia (ALICIC; TUTTLE, 2014).

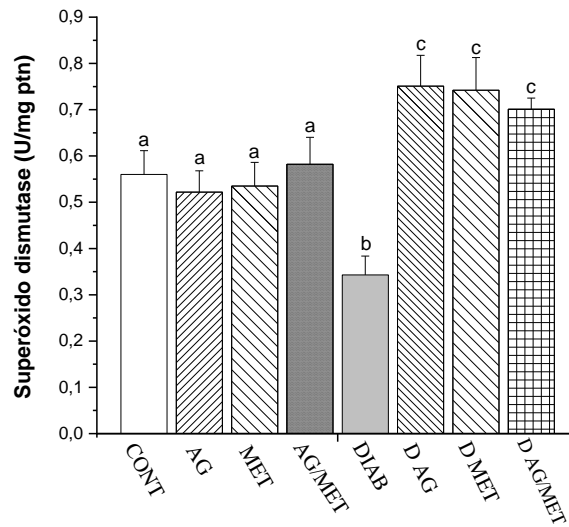
De acordo os Gráficos 27, 28 e 29, foi possível observar diminuição das enzimas antioxidantes (SOD, catalase e GPx) no DM2 em amostras de homogeneizado de rim, sendo que os grupos tratados com AG e/ou MET obtiveram restabelecimento no nível das enzimas. No caso da GPx, pode-se notar que o aumento no grupo tratado com AG foi ainda maior, o que nos faz pensar que a elevação dos níveis da glutathiona peroxidase no grupo tratado concomitantemente por AG e MET, foi principalmente devido a contribuição da aminoguanidina.

Pode-se notar que o tratamento com metformina atua de forma significativa na melhora do quadro renal, uma vez que os animais diabéticos tratados com este medicamento apresentam aumento nos níveis de SOD e GPx, conforme vem sendo relatado na literatura por Akila *et al.* (2018). Além disso, também ocorre aumento nos níveis de catalase, o que tem sido relatado por Mokashi *et al.*, (2017).

Alguns autores relatam que a aminoguanidina possuiu um efeito nefroprotetor, visto que a aminoguanidina aumenta os níveis das enzimas antioxidantes (SOD, catalase e GPx) em ratos que tiveram insuficiência renal aguda induzida por gentamicina, ressaltando assim, o seu efeito antioxidante e protetor para os rins (POLAT *et al.*, 2006). Outros autores também demonstram esse efeito protetor, uma vez que após administração concomitante de aminoguanidina e metotrexato (nefrotóxico), pode-se observar aumento nos níveis das enzimas antioxidantes (SOD, catalase e GPx) e diminuição da peroxidação lipídica, em comparação ao grupo de animais que recebeu apenas o composto nefrotóxico (HAFEZ *et al.*, 2015).

Dessa maneira, pode-se notar a contribuição de forma significativa da aminoguanidina no quadro renal, sendo utilizada isoladamente ou associada a metformina. Demonstrando a sua capacidade na defesa antioxidante tanto pelos nossos estudos quanto pelo que vem sendo exposto na literatura.

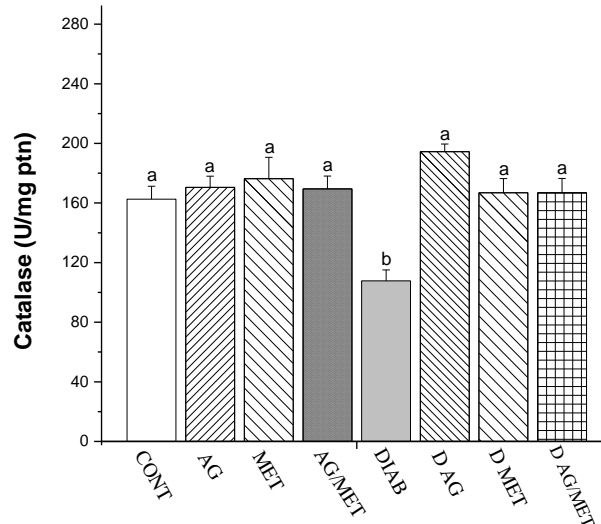
Gráfico 27 - Superóxido dismutase em amostras de rim



Fonte: Do autor

Legenda: Determinação da atividade de superóxido dismutase no rim. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão, com 8 a 10 análises por grupo. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

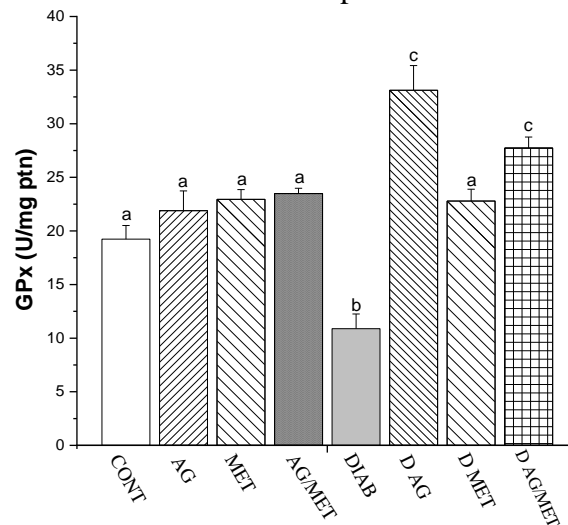
Gráfico 28 - Catalase em amostras de rim



Fonte: Do autor

Legenda: Determinação da atividade de catalase no rim. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão, com 8 a 10 análises por grupo. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

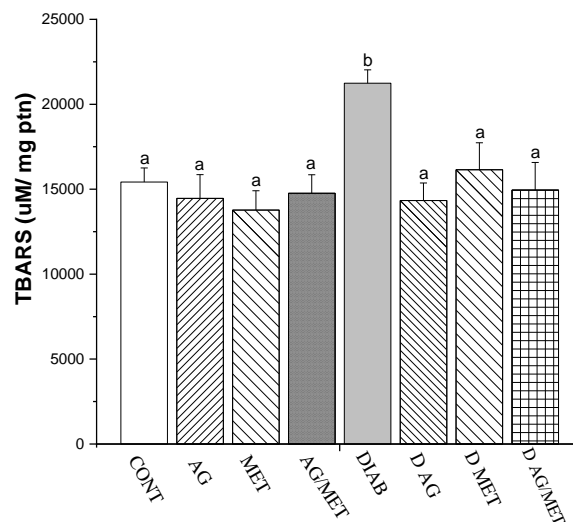
Gráfico 29 - Glutathiona peroxidase em amostras de rim



Fonte: Do autor

Legenda: Determinação da atividade de glutathiona peroxidase no rim. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão, com 8 a 10 análises por grupo. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

Gráfico 30 - Peroxidação lipídica em amostras de rim



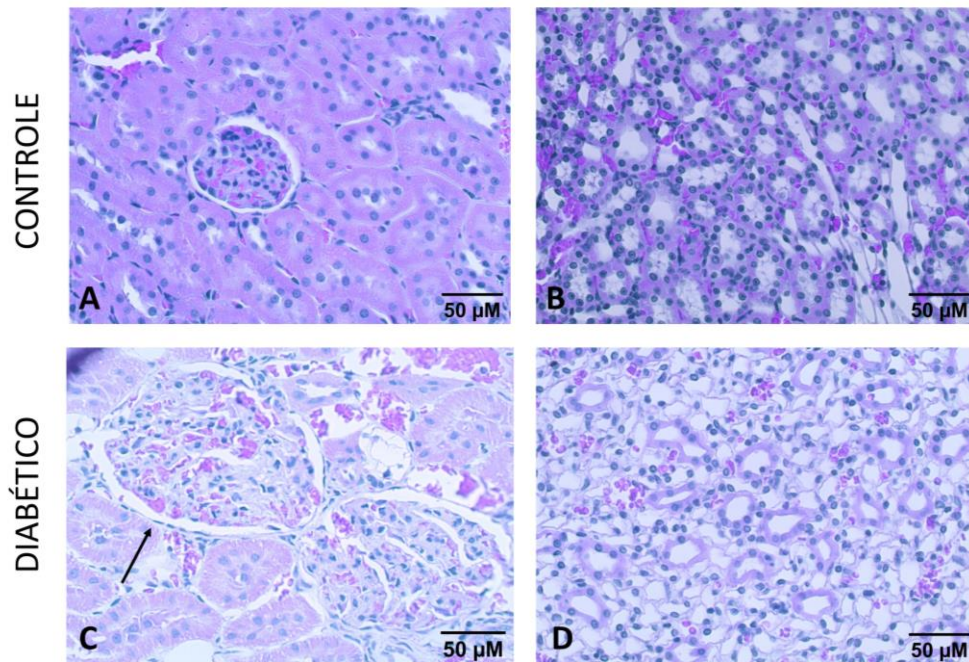
Fonte: Do autor

Legenda: Determinação da peroxidação lipídica no rim. Grupos: CONT: animais não diabéticos. AG: aminoguanidina. MET: metformina. AG/MET: aminoguanidina e metformina. DIAB: diabéticos. D AG: diabéticos com aminoguanidina. D MET: diabéticos com metformina. D MET/AG: diabéticos com metformina e aminoguanidina. Os resultados representam a média \pm erro padrão, com 8 a 10 análises por grupo. Determinado por ANOVA - tukey e as letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$).

6.13 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

De acordo com a análise histológica na Figura 5, pode-se observar a estrutura renal de animais não diabéticos (FIGURAS 5A e B). Na Figura 5C pode-se notar o espaço capsular glomerular aumentado e em 5D observa-se o dano glomerular com arranjo desorganizado em animais diabéticos, conforme já foi relatado em animais diabéticos por De Souza Ferreira (2016), e Vadla e Vellaichamy (2013).

Figura 5 – Imagem histológica do rim de animais não diabético versus diabético

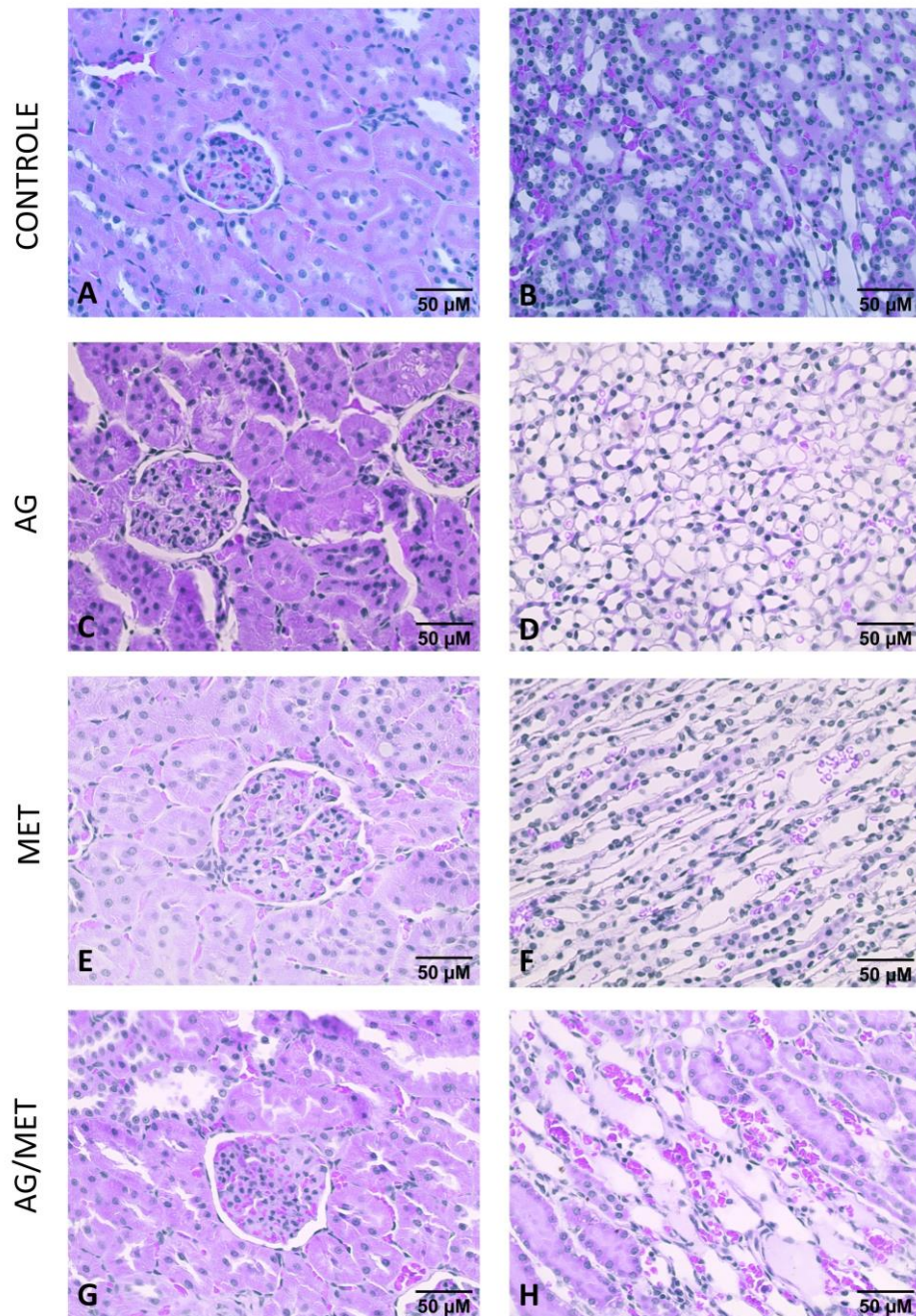


Fonte: Do autor

Legenda: Fotomicrografia do tecido renal em aumento de 40x. A e B: rim de animais não diabéticos na zona cortical. C e D: rim de animais diabéticos na zona cortical (n=3 por grupo).

Na Figura 6, pode-se observar que animais não diabéticos tratados com AG e/ou MET não apresentaram alteração histológica, demonstrando que o tratamento não ocasionou danos no tecido renal dos animais não diabéticos e tratados com AG e/ou MET.

Figura 6 – Imagem histológica do rim em animais não diabéticos



Fonte: Do autor

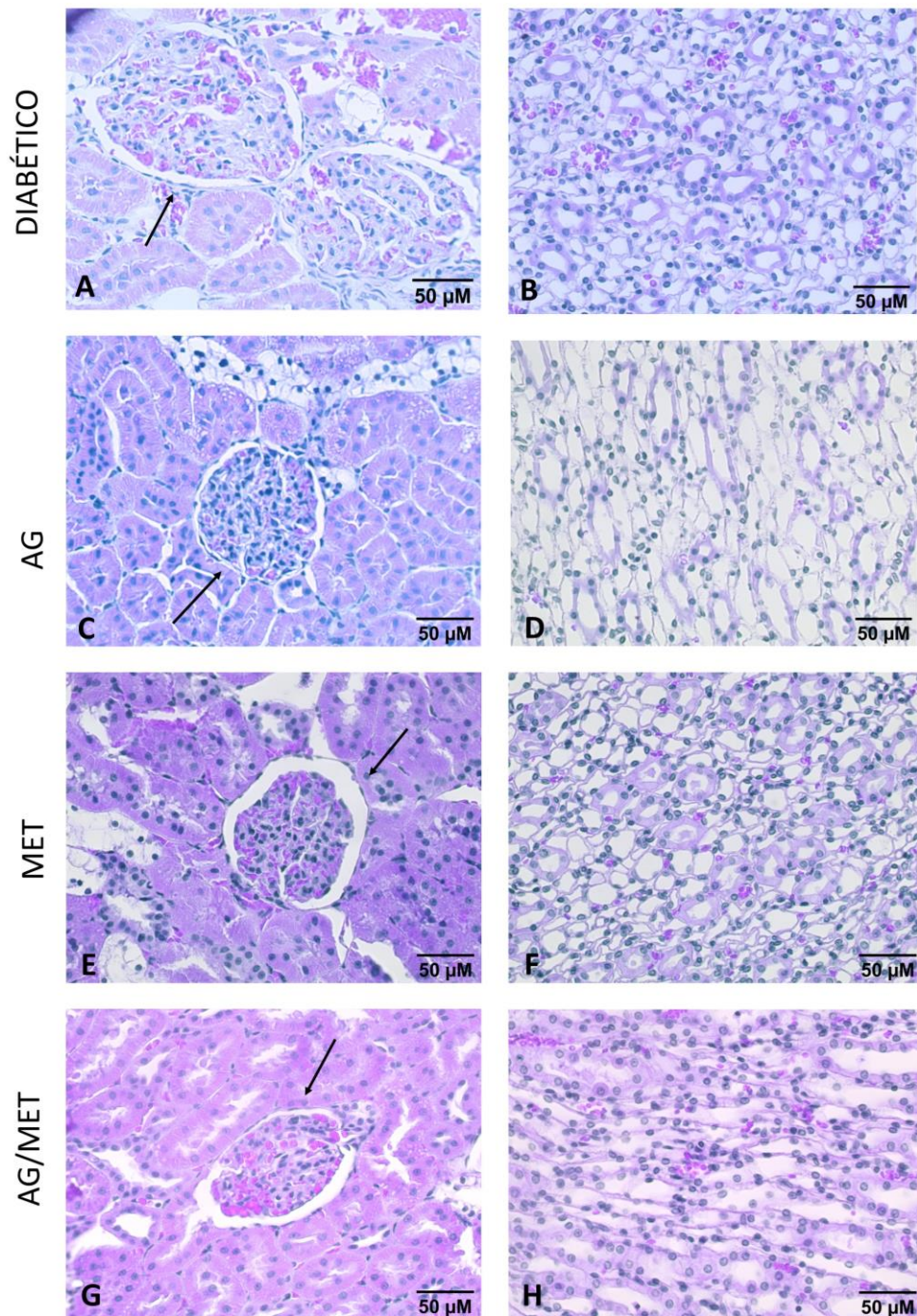
Legenda: Fotomicrografia do tecido renal em aumento de 40x. A, C, E e G: rim de animais não diabéticos na zona cortical, sendo respectivamente animais não tratados, tratados com aminoguanidina, metformina e aminoguanidina/ metformina. B, D, F e H: rim de animais diabéticos na zona cortical, sendo respectivamente animais não tratados, tratados com aminoguanidina, metformina e aminoguanidina/ metformina (n=3 por grupo)

Na Figura 7, pode-se observar em A e B alterações características do diabetes, tais como espaço capsular glomerular aumentado e zona cortical com o arranjo desorganizado, respectivamente. Quando os animais diabéticos recebem o tratamento com AG, pode-se observar menores danos causados pelo diabetes (FIGURA 7C e D), demonstrando que a AG tem capacidade de proteger os glomérulos da hipertrofia glomerular comparado aos animais diabéticos, conforme vem sendo relatado na literatura (DE SOUZA FERREIRA, *et al.*, 2016; VADLA; VELLAICHAMY, 2013). Outros autores também demonstram a capacidade da AG em evitar lesões renais, uma vez a AG pode atuar inibindo iNOs, apresentando melhora na função renal com melhora na taxa de filtração e fluxo renal (AL DREES; SALAH KHALIL; SOLIMAN, 2017). Além disso, tais dados corroboram com nossos resultados, uma vez que AG foi capaz de melhorar a defesa antioxidante com aumento nos níveis de SOD, catalase e GPx em animais diabéticos e tratados com aminoguanidina.

O tratamento com MET demonstra que o tecido renal apresenta menor lesão do que em animais diabéticos não tratados com ausência de foco inflamatório, mas o espaço capsular está aumentado (FIGURA 7E), e zona cortical apresenta arranjo preservado (FIGURA 7F), tais dados corroboram com a literatura (KHADRE *et al.*, 2011; REN *et al.*, 2020). Segundo Ren *et al.*, (2020), a metformina atua protegendo os rins dos danos provenientes do diabetes regulando a via AMPK/ SIT1-Fox01, e também através da regulação do estresse oxidativo e autofagia.

O tratamento concomitante de AG e MET demonstra zona cortical com diminuição do espaço capsular glomerular e aspecto semelhante ao tecido renal de animais não diabéticos, e zona medular com o arranjo preservado, respectivamente Figuras 7G e 7H. Demonstrando assim, que o tratamento com AG e MET promoveu uma melhora no aspecto do tecido renal e que o tratamento concomitante de AG e MET foi o que mais se aproximou do aspecto de tecido renal de animais não diabéticos.

Figura 7 – Imagem histológica do rim em animais diabéticos

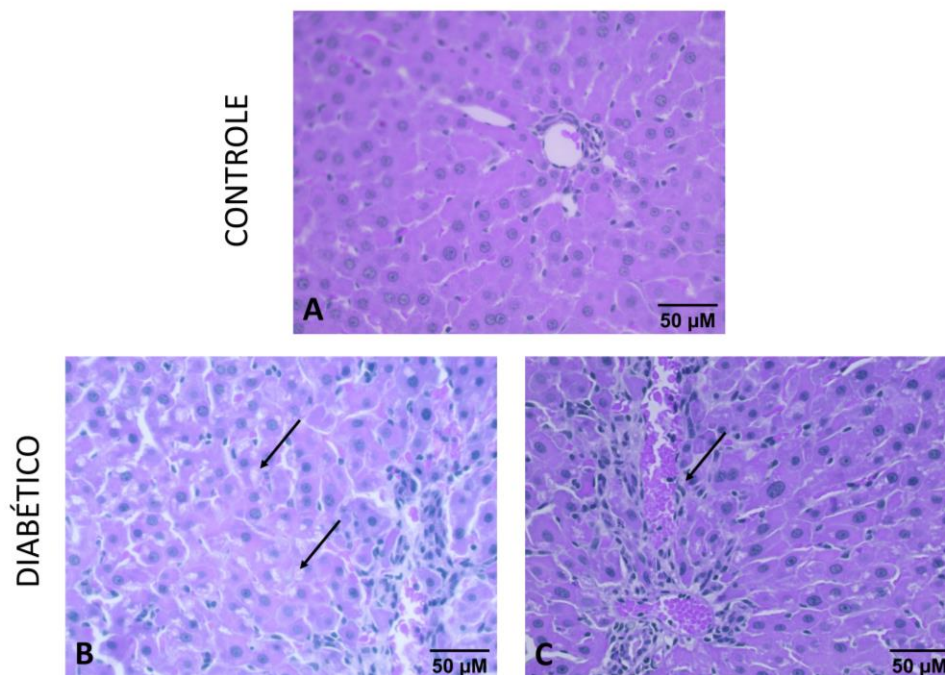


Fonte: Do autor

Legenda: Fotomicrografia do tecido renal em aumento de 40x. A, C, E e G: rim de animais diabéticos na zona cortical, sendo respectivamente animais diabéticos não tratados, tratados com aminoguanidina, metformina e aminoguanidina/ metformina. B, D, F e H: rim de animais diabéticos na zona cortical, sendo respectivamente animais diabéticos não tratados, tratados com aminoguanidina, metformina e aminoguanidina/ metformina (n=3 por grupo).

Com relação ao tecido hepático, pode-se notar na Figuras 8B e C que nos animais diabéticos não tratados há congestão, infiltrado inflamatório, perda da arquitetura hepática, e vacuolização, conforme já foi relatado na literatura (ELATTAR *et al.*, 2017; TISS *et al.*, 2020).

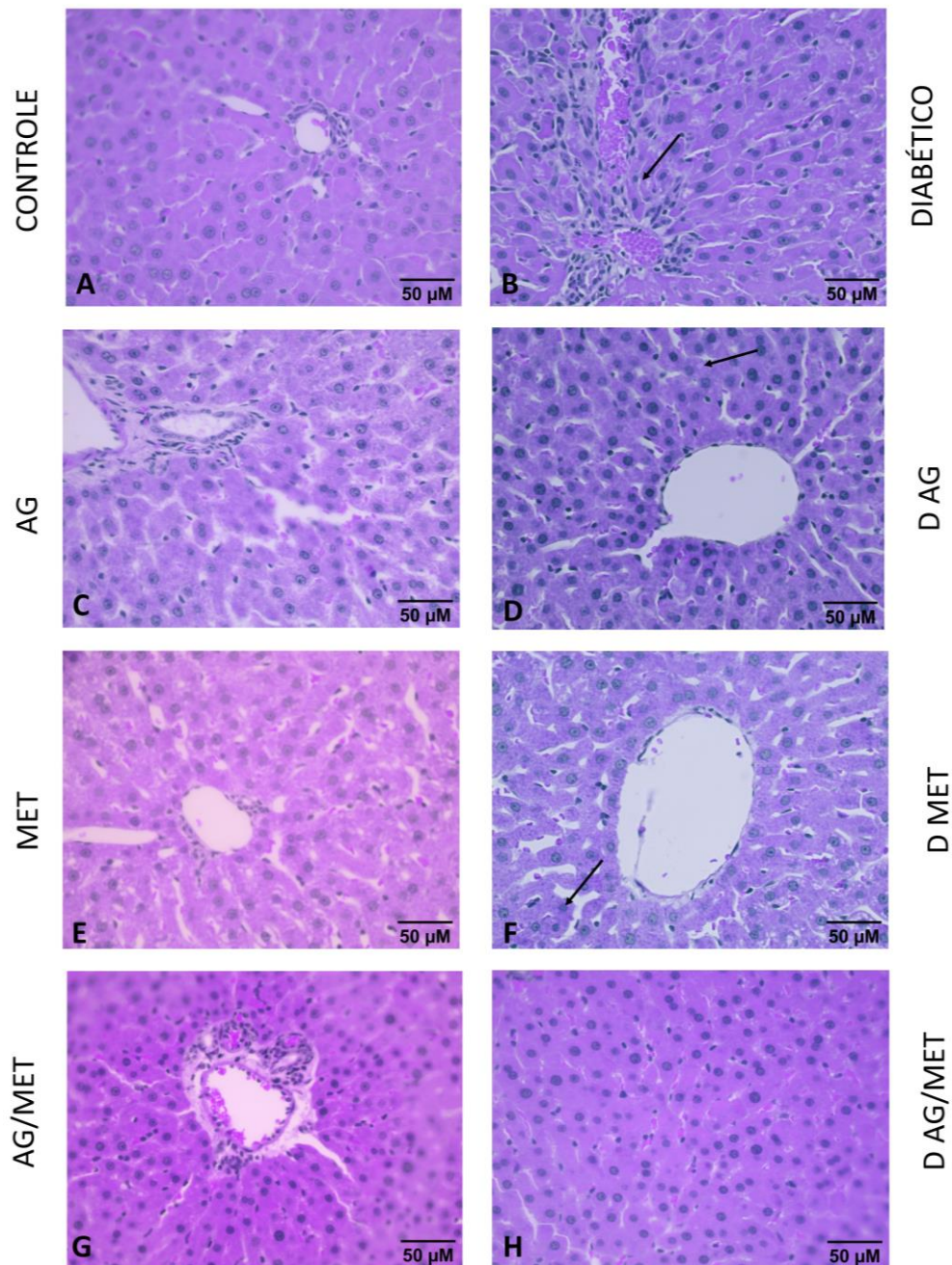
Figura 8 – Imagem histológica de fígado de animais não diabéticos e diabéticos



Fonte: Do autor

Legenda: Fotomicrografia do tecido hepático em aumento de 40x. A: fígado de animais não diabéticos. B e C: fígado de animais diabéticos, demonstrando a presença de vacúolos e congestão hepática, respectivamente (n=3 por grupo).

Figura 9 – Imagem histológica de fígado de animais não diabéticos e diabéticos



Fonte: Do autor

Legenda: Fotomicrografia do tecido hepático em aumento de 40x. A, C, E e G: fígado de animais não diabéticos, sendo respectivamente animais diabéticos não tratados, tratados com aminoguanidina, metformina e aminoguanidina/ metformina. B, D, F e H: fígado de animais diabéticos, sendo respectivamente animais diabéticos não tratados, tratados com aminoguanidina, metformina e aminoguanidina/ metformina (n=3 por grupo).

Na Figuras 9 A, C, E e G, pode-se observar que animais não diabéticos tratados com AG e/ou MET não apresentaram alteração histológica, demonstrando que o tratamento não gera dano hepático nos animais. Na Figura 9 B pode-se observar alterações características da instalação do DM2, tais como a congestão hepática.

Quando animais diabéticos são submetidos ao tratamento com AG (FIGURA 9D), pode-se notar menor vacuolização, ausência de congestão e cordões hepáticos bem organizados (E NICO *et al.*, 2013). Segundo Taslidere *et al.* (2014), a AG é capaz de reduzir os danos hepáticos causados pelo diabetes induzido por estreptozotocina, uma vez que AG apresenta um efeito protetor diminuindo a apoptose, sendo que sua ação pode estar relacionada com a atividade antioxidante e inibição de NO.

Nos animais diabéticos tratados com metformina (FIGURA 9F), nota-se a arquitetura relativamente normal do tecido hepático com poucos hepatócitos vacuolizados e núcleos picnóticos (ELATTAR *et al.*, 2017). Segundo ELATTAR *et al.*, (2017), a metformina demonstra efeito protetor no fígado, uma vez que melhora o nível de enzimas hepáticas e diminui a apoptose, podendo ser que tal efeito esteja associado a modulação de NFkB.

Nos animais tratados concomitante com a AG e MET (FIGURA 9H), o tecido apresenta aspecto semelhante ao de animais não diabéticos, observando-se menor vacuolização, poucos núcleos picnóticos e cordões bem arranjados, demonstrando assim, que a associação dos compostos levou a uma melhora no tecido hepático.

7 CONCLUSÃO

Foi possível estabelecer um modelo de diabetes *mellitus* tipo 2 através de dieta hiperlipídica (incrementada com banha de porco) e associada com estreptozotocina, obtendo-se um quadro de hiperglicemia associado com resistência à insulina.

Em relação às enzimas pró-oxidantes, houve aumento da atividade de NOX 2 nos grupos tratados com AG e/ou MET independente do estado diabético. Com relação à MPO, a hiperglicemia levou à diminuição da atividade, e os diferentes tratamentos não exerceram efeito. Houve aumento nos níveis de nitritos no grupo diabético comparado ao grupo controle e o tratamento com a AG isolada ou associada à MET foi capaz de diminuir esses níveis de nitrito, tanto nos grupos controles quanto nos grupos diabéticos.

Com relação à atividade antioxidante, foi possível observar diminuição na atividade de SOD, catalase e GPx no grupo DM2, e nos grupos tratados com AG e/ou MET houve restabelecimento da atividade das enzimas. Da mesma forma, os níveis de peroxidação lipídica aumentaram no grupo DM2 e isso foi parcialmente revertido pelo tratamento com os compostos. Esses dados sugerem um efeito benéfico das guanidinas no balanço redox de animais diabéticos.

Quanto ao perfil bioquímico, notou-se um melhor controle glicêmico nos animais do grupo diabético tratado com metformina e no grupo tratado com gliclazida, demonstrando a eficácia do modelo de DM2 padronizado neste trabalho. A AG isoladamente não teve efeito sobre a glicemia e resistência à insulina dos animais. Observou-se que houve diminuição nos níveis de triglicerídeos nos animais tratados com AG e/ou MET. Pode-se notar ainda que os níveis de AST e ALT diminuíram nos grupos tratados com AG e MET, demonstrando a capacidade dos compostos na melhoria do quadro hepático dos animais diabéticos.

Através das análises histológicas foi possível observar os danos teciduais renais e hepáticos causados pelo quadro diabético, e foi possível notar que o tratamento com a AG e MET foram capazes de minimizar estes danos.

Tendo em vista os resultados apresentados, sugere-se uma possível ação benéfica da associação da AG e MET nas complicações associadas ao modelo experimental. Assim, este trabalho abre novas perspectivas e mostra a necessidade de melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nos efeitos observados e nos potenciais benefícios que a associação das guanidinas pode trazer em relação ao uso isolado da metformina.

REFERÊNCIAS

- ABATE, G. *et al.* Advanced Glycation End Products (Ages) in Food: Focusing on Mediterranean Pasta. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, Barcelona, v. 05, n. 06, p. 1–8, 2015.
- ADELA, R. *et al.* Hyperglycaemia enhances nitric oxide production in diabetes: A study from South Indian patients. **Plos One**, California, v. 10, n. 4, p. 1–17, 2015.
- ADESHARA, K. A. *et al.* Action of metformin therapy against advanced glycation, oxidative stress and inflammation in type 2 diabetes patients: 3 months follow-up study. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, India, v. 14, n. 5, p. 1449–1458, 2020.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzimology**, Pensilvânia, v. 105, n. 121–126, p.121-126, 1984.
- AKILA, G. *et al.* Comparative study of antihypertensive and antioxidant effects of clove and metformin on renal dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. **PharmaNutrition**, Padova, v. 6, n. 1, p. 37–44, 2018.
- AL DREES, Abdulmajeed; SALAH KHALIL, Mahmoud; SOLIMAN, Mona. Histological and immunohistochemical basis of the effect of aminoguanidine on renal changes associated with hemorrhagic shock in a rat model. **Acta Histochemica et Cytochemica**, Tóquio, v. 50, n. 1, p. 11–19, 2017.
- ALICIC, R. Z.; TUTTLE, K. R. Novel therapies for diabetic kidney disease. **Advances in Chronic Kidney Disease**, Canada, v. 21, n. 2, p. 121–133, 2014.
- ALGIRE, C. *et al.* Metformin Reduces Endogenous Reactive Oxygen Species and Associated DNA Damage. **Cancer Prevention Research**, Filadelfia, v. 5, n.4, p. 536–544, 2012.
- AN, H. *et al.* Journal of Diabetes and Its Complications Metformin attenuates fluctuating glucose-induced endothelial dysfunction through enhancing GTPCH1-mediated eNOS recoupling and inhibiting NADPH oxidase. **Journal of Diabetes and Its Complications**, Louisiana, v. 30, n. 6, p. 1017–1024, 2016.
- APOSTOLOVA, N. *et al.* Mechanisms of action of metformin in type 2 diabetes: Effects on mitochondria and leukocyte-endothelium interactions. **Redox Biology**, Germany, v. 34, n.1, p. 1-12, 2020.

ARAS, B. *et al.* Protective effect of pyrrolidine dithiocarbamate on kidney tissue in streptozotocin-induced diabetic rats. **Türk Üroloji Dergisi/Turkish Journal of Urology**, İstanbul, v. 36, n. 2, p. 167–175, 2010.

ASMAT, Ullah; ABAD, Khan; ISMAIL, Khan. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Riyadh, v. 24, n. 5, p. 547–553, 2016.

ASSIS, Renata Pires. **Prospecção de amplificadores para o sistema quimiluminescente mieloperoxidase/luminol/H₂O₂ e avaliação neutrofílica de animais diabéticos**. 2018. 48 f. Relatório Científico de Pós-Doutorado - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2018.

BATISTA, Chester. **Indicadores De Lesão E Função Hepática**. 2016. 10f. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RGS, 2016.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological reviews**, Boulevard, v. 87, n. 1, p. 245–313, 2007.

BHANDARI, U. *et al.* Antidiabetic effects of Embelia ribes extract in high fat diet and low dose streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. **Frontiers in Life Science**, Strasbourg, v. 7, n. 3–4, p. 186–196, 2013.

BORBA, M. O. P. Estudo da fosfatase alcalina sérica e formas isodinâmicas na esquistossomose mansônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 15, n. 1, p. 1–14, 1982.

BRANDES, R. P.; WEISSMANN, N.; SCHRÖDER, K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. **Free Radical Biology and Medicine**, California v. 76, n.1, p. 208–226, 2014.

BUCALA, R. *et al.* Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 20, p. 9441–9445, 1994.

CAPE, J. L.; HURST, J. K. The role of nitrite ion in phagocyte function-perspectives and puzzles. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Texas, v. 484, n. 2, p. 190–196, 2009.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, New York, v. 51, n. 1, p. 15–25, 2013.

CHAE, H. S. *et al.* Ginseng berry extract enhances metformin efficacy against obesity and hepatic steatosis in mice fed high-fat diet through increase of metformin uptake in liver. **Journal of Functional Foods**, Wageningen, v. 62, n. 1, p. 1756-4646, 2019.

CHEN, L. W. *et al.* A community-based study on the application of fatty liver index in screening subjects with nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of the Formosan Medical Association**, Taipei, v. 119, n. 1, p. 173–181, 2020.

CORBETT, J. A. *et al.* Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. **Diabetes**, Michigan, v. 41, n. 4, p. 552–556, 1992.

CORREIA-SANTOS, A. M. *et al.* Indução de Diabetes Tipo 2 por dieta hiperlipídica e baixa dose de estrptozotocina em ratas wistar. **Medicina (Ribeirão Preto)**, Ribeirão Preto, v. 45, n. 4, p. 436–444, 2012.

COSTA, N. M. B. **Nutrição Experimental: teoria e pratica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2014. 72p.

DA SILVA, A. E. L. *et al.* Fat metabolism during exercise: Mechanisms of regulation. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, Florianópolis, v. 8, n. 4, p. 106–114, 2006.

DA SILVA CHAVES, S. N. *et al.* NOS-2 participates in the behavioral effects of ethanol withdrawal in zebrafish. **Neuroscience Letters**, Connecticut, v. 728, n.1, p. 1-4 , 2020.

DE MOURA, R. F. *et al.* Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 101, n. 8, p. 1178–1184, 2009.

DE SOUZA FERREIRA, Claudia. **Modulação de NOX2 pela aminoguanidina e as implicações na função microbicida de neutrófilos e na produção de espécies reativas por células endoteliais (HUVEC)**. 2016. 114f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016.

DE SOUZA FERREIRA, C. *et al.* Aminoguanidine treatment increased NOX2 response in diabetic rats: Improved phagocytosis and killing of *Candida albicans* by neutrophils. **European Journal of Pharmacology**, Utrecht, v. 772, n.1, p. 83–91, 2016.

DE SOUZA FERREIRA, Cláudia *et al.* Neutrophil dysfunction induced by hyperglycemia: Modulation of myeloperoxidase activity. **Cell Biochemistry and Function**, Birmingham, v. 30, n. 7, p. 604–610, 2012.

DEVASANI, K.; MAJUMDAR, A. Pyrroloquinoline quinone attenuates obesity associated low grade inflammation. **Obesity Medicine**, Shanghai, v. 16, n.1, p. 100134, 2019.

DEY, A.; SWAMINATHAN, K. Hyperglycemia-induced mitochondrial alterations in liver. **Life Sciences**, Strasbourg, v. 87, n. 7, p. 197–214, 2010.

DI NASO, Fabio Cangeri; *et al.* Aminoguanidine reduces oxidative stress and structural lung changes in experimental diabetes mellitus. **Brief Communication**, Brasília, v. 36, n. 4, p. 485–489, 2010.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **Journal of Immunology**, London, v. 141, n. 7, p. 2407–2412, 1988.

E NICO, E. T. M. *et al.* The action of aminoguanidine on the liver of trained diabetic rats. **Journal of Diabetes and Metabolic Disorders**, Cambridge, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2013.

EL-BENNA, J. *et al.* p47phox , the phagocyte NADPH oxidase / NOX2 organizer : structure , phosphorylation and implication in diseases. **Experimental an Molecular Medicine**, Korea, v. 41, n. 4, p. 217–225, 2009.

ELATTAR, S. *et al.* The protective effect of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin d3 and metformin on liver in type 2 diabetic rats. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Neuherberg, v. 173, n.1, p. 235–244, 2017.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, California, v. 5, n. 14, p. 1317–1327, 2003.

GARABADU, D.; KRISHNAMURTHY, S. Metformin attenuates hepatic insulin resistance in type-2 diabetic rats through PI3K/Akt/GLUT-4 signalling independent to bicuculline-sensitive GABA A receptor stimulation. **Pharmaceutical Biology**, Massachusetts, v. 55, n. 1, p. 722–728, 2017.

GÓMEZ, G. I. p. *et al.* Síndrome constitucional asociado a hepatotoxicidade por metformina. **Gastroenterologia y Hepatología**, Barcelona, v. 31, n. 10, p. 643–645, 2008.

GOMEZ, R. S. *et al.* Chemoluminescence generation and MTT dye reduction by polymorphonuclear leukocytes from periodontal disease patients. **Journal of Periodontal Research**, San Francisco, v. 29, n. 2, p. 109–112, 1994.

GUERRERO-ROMERO, F. *et al.* The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Netherlands, v. 95, n. 7, p. 3347–3351, 2010.

GUICHARD, C. *et al.* NOX family NADPH oxidases in liver and in pancreatic islets : a role in the metabolic syndrome and diabetes? **Biochemical Society Transactions**, England, v. 36, n. 5, p. 920–929, 2008.

GUO, C.; LIU, J.; LI, H. Metformin ameliorates olanzapine-induced insulin resistance via suppressing macrophage infiltration and inflammatory responses in rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Columbia, v. 133, n.1, p. 1-9, 2021.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Antioxidants : Molecules , medicines , and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Martinsried, v. 393, n. 4, p. 561–564, 2010.

HAFEZ, H. M. *et al.* Potential protective effect of etanercept and aminoguanidine in methotrexate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. **European Journal of Pharmacology**, Utrecht, v. 768, n.5, p. 1–12, 2015.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? **The Lancet**, Londres, v. 344, n.1, p. 721–724, 1994.

HOICH, R. I.; NG, F. M. INSULIN-POTENTIATING ACTION OF GLICLAZIDE (DIAMICRON). **Pharmacological Research Communications**, Australia, v. 18, n. 5, p. 419–430, 1986.

IGHODARO, O. M. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Ibadan, v. 108, n.1, p. 656–662, 2018.

IDF- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **IDF diabetes atlas**. 9 ed., 2019. Disponível em <http://www.diabetesatlas.org> Acesso em: 09 set. 2021.

IROBEKHIAN, S. *et al.* Appropriate Insulin Level in Selecting Fortified Diet-Fed , Streptozotocin-Treated Rat Model of Type 2 Diabetes for Anti-Diabetic Studies. **Plos One**, California, v. 12, n. 1, p. 1–21, 2017.

JONES, L. H.; ABDALLA, D. S P; FREITAS, J. C. Effects of indole-3-acetic acid on croton oil- and arachidonic acid-induced mouse ear edema. **Inflammation Research**, Marburg, v. 44, n. 9, p. 372–375, 1995.

JONES, O.T.; HANCOCK, J. Assays of plasma membrane NADPH oxidase. **Methods in enzymology**, Pensilvânia, v. 233, n. 1, p. 222–229, 1994.

JONSCHER, K. R. *et al.* Early PQQ supplementation has persistent long-term protective effects on developmental programming of hepatic lipotoxicity and inflammation in obese mice. **The FASEB Journal**, Massachusetts, v. 31, n. 4, p. 1-15, 2017.

KAWAHARA, T.; QUINN, M. T; LAMBETH, J David. Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. **BMC Evolutionary Biology**, Philadelphia, v. 109, n. p. 1–21, 2007.

KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. **Methods in Enzymology**, Pensilvânia, v. 233, n.1, p. 502–512, 1994.

KHADRE, S. E. M. *et al.* Effect of Metformin and Glimepiride on Liver and Kidney Functions in Alloxan-Induced Diabetic Rats Soheir. **Bulletin of High Institute of Public Health**, Alexandria, v. 41, n. 2, p. 282–310, 2011.

KIM, J. H. *et al.* Serum alkaline phosphatase level is positively associated with metabolic syndrome: A nationwide population-based study. **Clinica Chimica Acta**, Korea, v. 500, n.1, p. 189–194, 2020.

KLEBANOFF, S. J. *et al.* Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of Leukocyte Biology**, Columbia, v. 93, n.1, p. 185–198, 2013.

KURUP, S. B.; MINI, S. Averrhoa bilimbi fruits attenuate hyperglycemia-mediated oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Food and Drug Analysis**, Kerala, v. 25, n. 2, p. 360–368, 2016.

LADDHA, A. P.; KULKARNI, Y. A. NADPH oxidase: A membrane-bound enzyme and its inhibitors in diabetic complications. **European Journal of Pharmacology**, Utrecht, v. 881, n.1, p.1-16, 2020.

LI, H. *et al.* Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* “edulis” and *Passiflora edulis* “flavicarpa”. **Journal of Ethnopharmacology**, Poznan, v. 133, n. 3, p. 1085–1090, 2011.

MAYER-SCHOLL, A.; AVERHOFF, P.; ZYCHLINSKY, A. How do neutrophils and pathogens interact? **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 62–66, 2004.

MOHAMMED, A.; KOORBANALLY, N. A.; ISLAM, S. Ethyl acetate fraction of *Aframomum melegueta* fruit ameliorates pancreatic β -cell dysfunction and major diabetes-related parameters in a type 2 diabetes model of rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Poznan, v. 175, p. 518–527, 2015.

MOKASHI, P. *et al.* Swertisin rich fraction from *Enicostema littorale* ameliorates hyperglycemia and hyperlipidemia in high-fat fed diet and low dose streptozotacin induced type 2 diabetes mellitus in rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Columbia, v. 96, n.1, p. 1427–1437, 2017.

MYHRE, O. *et al.* Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. **Biochemical Pharmacology**, Kansas, v. 65, n. 10, p. 1575–1582, 2003.

NOROUZIRAD, R. *et al.* Dietary inorganic nitrate attenuates hyperoxia-induced oxidative stress in obese type 2 diabetic male rats. **Life Sciences**, Strasbourg, v. 230, n.1, p. 188–196, 2019.

ORLANDI, Lidiane. **Influência da dieta rica em frutose sobre a hiperalgesia e comportamento doentio em ratos**. 2016. 111 f. Tese (Doutorado em ciências fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016.

ORMAN, Dogan *et al.* Aminoguanidine mitigates apoptosis, testicular seminiferous tubules damage, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Tissue and Cell**, Siena, v. 47, n. 3, p. 284–290, 2015.

OYANGUI, Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 142, n. 1, p. 290–296, 1984.

PIETARINEN-RUNTTI, P *et al.* Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. **American journal of physiology Cell physiology**, Germany, v. 278, n. 1, p. 118–125, 2000.

PINTO JÚNIOR, D. A. C.; SERAPHIM, P. M. Dieta de cafeteria por quatorze semanas pode causar obesidade e resistência insulínica em ratos Wistar. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 313–319, 2012.

POLAT, A. *et al.* Protective role of aminoguanidine on gentamicin-induced acute renal failure in rats. **Acta Histochemica**, Madrid, v. 108, n. 5, p. 365–371, 2006.

REIS, J. S. *et al.* Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 52, n. 7, p. 1096–105, 2008.

REN, H. *et al.* Metformin alleviates oxidative stress and enhances autophagy in diabetic kidney disease via AMPK/SIRT1-FoxO1 pathway. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Louisville, v. 500, n.1, p. 1-13, 2020.

ROBSON, R.; KUNDUR, A. R.; SINGH, I. Oxidative stress biomarkers in type 2 diabetes mellitus for assessment of cardiovascular disease risk. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, Bengaluru, v. 12, n. 3, p. 455–462, 2018.

RODIÑO-JANEIRO, B. K. *et al.* Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology. **Vascular health and risk management**, France, v. 9, n. 1, p. 401–428, 2013.

RODRIGUES, M. R. *et al.* Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. **Biochemical and biophysical research communications**, Martinsried, v. 292, n. 4, p. 869–873, 2002.

ROSENFELD, G. Corante pancreático para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do may-grunwald e do giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias Instituto Butantan**, São Paulo, v. 20, n.1, p. 329–335, 1947.

SAMUEL, V. T.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. **The Lancet**, Reino Unido, v. 375, n.1, p. 2267–2277, 2010.

SANTOMAURO JUNIOR, A. C. *et al.* Metformina e AMPK : Um Antigo Fármaco e Uma Nova Enzima no Contexto da Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 120–125, 2008.

SHAHWAN, M. J. *et al.* Association between abnormal serum hepatic enzymes, lipid levels and glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. **Obesity Medicine**, Shanghai, v. 16, n.1, p.1-15, 2019.

SHEMESH, O. *et al.* Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. **Kidney International**, Paris, v. 28, n. 5, p. 830–838, 1985.

SHIROOIE, S. *et al.* Evaluation of the effects of metformin administration on morphine tolerance in mice. **Neuroscience Letters**, Connecticut, v. 716, n.18, p.1-5 , 2020.

SIL, S. *et al.* Nitric oxide synthase inhibitor, aminoguanidine reduces intracerebroventricular colchicine induced neurodegeneration, memory impairments and changes of systemic immune responses in rats. **Journal of Neuroimmunology**, Missouri, v. 303, n. 1, p. 51–61, 2016.

SINET, P. M. *et al.* Increase in glutathione peroxidase activity in erythrocytes from trisomy 21 subjects. **Biochemical Biophysical Research Communications**, Martinsried, v. 67, n. 3, p. 910-915, 1975.

SINNHUBER, R. O.; YU, T. C. The 2-Thiobarbituric Acid Reaction, An Objective Measure of the Oxidative Deterioration Occurring in Fats and Oils. **Journal Japan Oil Chem Society**, Tokyo, v. 26, n. 1, p. 259–267, 1977.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de diabetes**. São Paulo: Ac. Farmacêutica, 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de diabetes**. São Paulo: Ac. Farmacêutica, 2019.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: Um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 5, p. 329–337, 2007.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiological Reviews**, Birmingham, v. 84, n. 4, p. 1381–1478, 2004.

STOPPA, G. R. *et al.* Aminoguanidine prevented impairment of blood antioxidant system in insulin-dependent diabetic rats. **Life Sciences**, Strasbourg, v. 78, n. 12, p. 1352–1361, 2006.

TAN, M. H. *et al.* Metformin: From Research to Clinical Practice. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, Atlanta, v. 45, n. 4, p. 819–843, 2016.

TASLIDERE, E. *et al.* Anti-Apoptotic Effects of Aminoguanidine Against Liver Damage on Experimental Diabetes in Rats. **Journal of Turgut Ozal Medical Center**, Malatya, v. 21, n. 2, p. 111–118, 2014.

TELLI, E. M. R. P.; FRIGERI, Michele; MELLO, Sandra Regina. Avaliação da atividade de enzimas hepáticas em dependentes, ex-dependentes e não usuários do etanol. **Brazilian Journal of Clinical Analysis**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 3, p. 245–52, 2016.

TISS, M. *et al.* Fermented soy milk prepared using kefir grains prevents and ameliorates obesity, type 2 diabetes, hyperlipidemia and Liver-Kidney toxicities in HFFD-rats. **Journal of Functional Foods**, Wageningen, v. 67, n.1, p.1-8, 2020.

VADLA, G. P. A.; VELLAICHAMY, E. Beneficial effects of aminoguanidine against streptozotocin-induced pathological changes in diabetic mice kidney. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, Malatya, v. 3, n. 3, p. 221–226, 2013.

VIANA, M. R.; RODRIGUEZ, T. T. Complicações cardiovasculares e renais no diabetes mellitus. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 10, n. 3, p. 290–296, 2011.

VIOLLET, B. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. **Clinical science**, London, v. 122, n. 6, p. 253–270, 2012.

WAMBOLDT, C.; KAPUSTIN, J. Evidence-Based Treatment of Diabetic Peripheral Neuropathy. **The Journal for Nurse Practitioners**, São Paulo, v. 2, n. 6, p. 370–378, 2006.

WANG, H. *et al.* Proinflammatory and proapoptotic effects of methylglyoxal on neutrophils from patients with type 2 diabetes mellitus. **Clinical Biochemistry**, Minnesota, v. 40, n. 16–17, p. 1232–1239, 2007.

WANG, Yi Wei *et al.* Metformin: A review of its potential indications. **Drug Design, Development and Therapy**, Germany, v. 11, p. 2421–2429, 2017.

WATT, J. *et al.* The effect of reactive oxygen species on whole blood aggregation and the endothelial cell-platelet interaction in patients with coronary heart disease. **Thrombosis Research**, Ontario, v. 130, n. 2, p. 210–215, 2012.

WILSON, R. D.; ISLAM, M. S. Fructose-fed streptozotocin-injected rat: An alternative model for type 2 diabetes. **Pharmacological Reports**, Poland, v. 64, n. 1, p. 129–139, 2012.

WOJCICKA-BENTYN, J. *et al.* Extremely elevated activity of serum alkaline phosphatase in gestational diabetes: A case report. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Philadelphia, v. 190, n. 2, p. 566–567, 2004.

YAMAUCHI, A. *et al.* Effects of aminoguanidine on serum advanced glycation endproducts, urinary albumin excretion, mesangial expansion, and glomerular basement membrane thickening in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Milano, v. 34, n. 3, p. 127–133, 1997.

ZABAD, I. E. M.; AMIN, M. N.; EL-SHISHTAWY, M. M. Protective effect of vanillin on diabetic nephropathy by decreasing advanced glycation end products in rats. **Life Sciences**, Strasbourg, v. 239, n. 1, p.1-8, 2019.

ZHOU, G. *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action Find the latest version : Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **The Journal of Clinical Investigation**, London, v. 108, n. 8, p. 1167–1174, 2001.

ANEXO A - CERTIFICADO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada " Aumento da atividade de NOX2 por aminoguanidina e as implicações no sistema redox de ratos diabéticos tipo 2", registrada com o nº 33/2017, sob a responsabilidade de Maria Rita Rodrigues, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 03/07/2017 a 10/12/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	90
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 03 de Julho de 2017.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida

Coordenador CEUA-UNIFAL