



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS



CLÁUDIA DE SOUZA FERREIRA

**O SISTEMA NADPH OXIDASE DE NEUTRÓFILOS E A
FORMAÇÃO DE AGES (PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO
AVANÇADA) EM RATOS DIABÉTICOS**

UNIFAL - MG

2011

CLÁUDIA DE SOUZA FERREIRA

**O SISTEMA NADPH OXIDASE DE NEUTRÓFILOS E A
FORMAÇÃO DE AGES (PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO
AVANÇADA) EM RATOS DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Sinalização Celular.
Orientador: Dra. Maria Rita Rodrigues

Alfenas - MG

2011

Ferreira, Cláudia de Souza

O sistema NADPH oxidase de neutrófilos e a formação de AGES (produtos finais de glicação avançada) em ratos diabéticos / Cláudia de Souza Ferreira. - 2011.

77 f. -

Orientadora: Maria Rita Rodrigues

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2011.

Bibliografia.

1. Produtos Finais de Glicação Avançada. 2. NADPH Oxidase. 3. Espécies de Oxigênio Reativas. 4. Neutrófilos. 5. Diabetes Mellitus. I. Rodrigues, Maria Rita. II. Título.

CDD: 572

CLÁUDIA DE SOUZA FERREIRA

**O SISTEMA NADPH OXIDASE DE NEUTRÓFILOS E A
FORMAÇÃO DE AGES (PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO
AVANÇADA) EM RATOS DIABÉTICOS**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas
pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em 27/05/2011:

Prof.^a Dr.^a Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Instituição: USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva

Instituição: UNIFAL

Assinatura: _____

Prof.^a Dr.^a Maria Rita Rodrigues

Instituição: UNIFAL

Assinatura: _____

Ao meu pai Flávio que me ensinou a acreditar
À minha mãe Vilma que me ensinou a duvidar
E à minha filha Birma que me ensinou a resistir

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo exemplo de luta, amor incondicional e generosidade. Por terem me ensinado a não desistir nunca de sonhos, apesar de todas as adversidades. E à minha irmã Flávia, pelo conforto nas horas difíceis.

À Birma, minha filha, verdadeiro alicerce, sem a qual minha história seria completamente diferente.

A minha amiga Paula, com a qual aprendi a ser melhor. Paciência, inteligência, generosidade, tive sorte de poder contar com você nesses dois anos. Muito obrigada por sempre me ajudar e compartilhar suas experiências.

À Maria Rita Rodrigues, minha orientadora, por ter me acolhido em seu laboratório, acreditar em mim, entender minhas limitações, por sua cumplicidade e companheirismo. Obrigada por todos os ensinamentos e pela dedicação.

À Eliana, nosso braço direito, sempre nos apoiando, consolando e ensinando. O laboratório jamais seria o mesmo sem você.

À Profa. Fernanda Borges de Araújo Paula pela perseverança e ajuda.

Aos alunos de Iniciação Científica pela ajuda inclusive durante as férias, fins de semana e feriados.

Ao laboratório Central de Bioquímica da UNIFAL-MG pela parceria na realização dos experimentos, valeu André pela ajuda.

Ao laboratório de Histologia da UNIFAL-MG e a colaboração do Prof. Tomáz.

Ao laboratório e professores do Departamento de Fisiologia da UNIFAL-MG por estarem sempre dispostos a nos ajudar.

Ao laboratório de Bioquímica básica por compartilhar os equipamentos, em especial ao Gabriel pela presteza, dedicação e pelo bom humor, sempre.

Aos funcionários do Biotério da UNIFAL-MG pela dedicação e o cuidado com os nossos animais, fundamental ao sucesso dos procedimentos.

À Profa. Dra. Ana Campa que abriu as portas do laboratório de Bioquímica Clínica (FCF-USP) ao nosso trabalho e às queridas amigas Melissa, Sabrina e Silene que se esforçaram ao máximo nos ajudando com nossos experimentos e dúvidas.

À Profa. Dra. Noemi Nozome Taniwaki e ao Setor de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, por toda atenção e colaboração.

Ao Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes da UNESP-Bauru-SP por se mostrar solidário e dividir conosco sua experiência.

A todos os colegas de pós-graduação pela ótima companhia nas viagens e disciplinas.

Aos colegas do Laboratório do Hospital Bom Pastor em Varginha, em especial à Regina, obrigada pelo encorajamento.

Aos membros da banca avaliadora, pela grande disposição em participar e contribuir para finalização dessa dissertação.

Ao CNPQ e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos os que me acolheram nessa andança do mestrado, foram tantas Universidades, tantos mestres verdadeiros e amigos verdadeiros.

Além do agradecimento só me resta o desejo de ter incorporado as valiosas lições que aprendi.

RESUMO

Durante algumas das reações que levam à formação de AGEs, espécies reativas de oxigênio são geradas e concorrem paralelamente com o estresse oxidativo e com os danos estruturais e funcionais às macromoléculas. A formação de AGEs *in vivo* pode envolver os neutrófilos, que após estímulo inflamatório, induzem importantes enzimas geradoras de ERO, como o sistema NADPH oxidase. Entretanto ainda permanecem questionamentos sobre a relação entre o Sistema NADPH oxidase de neutrófilos e os AGEs. O presente trabalho visa contribuir para o entendimento do papel do sistema NADPH oxidase e da geração de ERO na formação de AGEs e o impacto da formação destes produtos na função renal destes animais. Foi utilizado um modelo experimental de diabetes induzido pela injeção *i.p.* de aloxano em ratos Wistar que foram divididos em 5 grupos: controle, diabético, diabético tratado com aminoguanidina (AG), diabético tratado com apocinina (AP) e diabético tratado com apocinina e aminoguanidina (AP+AG). A AG é um conhecido inibidor da formação de AGEs, e a AP é inibidor do sistema NADPH oxidase. Os inibidores, ou água foram administrados aos animais por gavagem por 50 dias após a instalação do DM. A formação de ERO reflete a atividade de NADPH oxidase e foi mensurada em neutrófilos peritoneais por quimiluminescência e pelo ensaio de redução do citocromo C. A expressão das subunidades p47^{phox} e a p67^{phox} do sistema NADPH oxidase foi avaliada por imunofluorescência. Os AGEs circulantes foram avaliados por fluorescência e a função renal foi avaliada pela dosagem da uréia e creatinina séricas e análises histológica dos rins. Pelos parâmetros avaliados neste estudo, verificamos que o tratamento com AP, diminuiu a geração de ERO tanto no grupo controle, quanto diabético, mas não afetou a via de formação de AGEs. O que indica que, provavelmente, não há interrelação entre as vias do sistema da NADPH oxidase de neutrófilos e a formação de AGEs, no nosso modelo experimental. O tratamento com a AP atenuou a glomerulonefrite do grupo diabético. A AG, na dose e no tempo administrado, 100mg/Kg por 50 dias, melhorou o perfil glicêmico dos animais diabéticos, preveniu a formação de AGEs e o dano glomerular. Além disso, o tratamento com a AG aumentou a atividade do sistema NADPH oxidase e a expressão das subunidades citosólicas p47^{phox} e a p67^{phox} do sistema. Não podemos afirmar que o aumento da atividade e expressão do sistema NADPH oxidase seja devido à diminuição dos AGEs no nosso sistema ou um efeito isolado da

aminoguanidina, ainda não descrito na literatura. A compreensão do papel desta enzima em modelo experimental de diabetes pode ajudar na compreensão do processo inflamatório persistente que ocorre devido ao acúmulo desses produtos nas complicações da doença, permitindo uma melhor adequação da abordagem clínica e tratamento desses pacientes.

Palavras chave: Produtos Finais de Glicação Avançada, NADPH Oxidase, Espécies de Oxigênio Reativas, Neutrófilos, Diabetes Mellitus.

ABSTRACT

Chronic hyperglycemia observed in diabetes disease leads to the advanced glycation end products (AGEs) formation, which are able to damage the patient organs, especially the kidney. Some AGEs formation reactions may also generate reactive oxygen species (ROS) and they are able to compete with oxidative stress and structural and functional macromolecules damages. Neutrophils are immune cells capable of expressing great amount of important ROS generator enzymes such as NADPH oxidase just after inflammatory stimuli. There are still questions about the relationship between the neutrophil NADPH oxidase system and AGEs despite the information that *in vivo* AGEs formation may involve neutrophils. The present study aims to contribute to the understanding of NADPH oxidase role and its ROS generation in AGEs formation and what is the impact of these products formation in renal function of rat model. Our experimental diabetes model was reached by alloxan i.p. injection in rats. These animals were divided in five groups: control, diabetic, diabetic treated with aminoguanidine (AG), diabetic treated with apocynin (AP) and diabetic treated with apocynin and aminoguanidine (AG + AP). AG is an AGEs formation inhibitor, and AP is a NADPH oxidase inhibitor. The inhibitors compounds or the vehicle (water) were administered by gavage for 50 days after DM confirmation. ROS formation reflects the NADPH oxidase activity and it was measured by chemiluminescence assay and by cytochrome C reduction in peritoneal neutrophils. The expression of NADPH oxidase p47^{phox} and p67^{phox} subunits was assessed by immunofluorescence. Circulating AGEs were analyzed by fluorescence and the renal function was evaluated by serum urea and creatinin concentration and by kidney histological sections. Our results showed that AP treatment decreased ROS generation in both control and diabetic groups, but did not affect the process of AGEs formation. This may indicate that in our experimental model there is no interrelation between the neutrophil NADPH oxidase system and the AGEs formation. It was also observed that the AP attenuated glomerulonephritis in diabetic mice. AG, at the administered dose and time, 100mg/Kg for 50 dias, improved glycemetic control, prevented the AGEs formation and prevented glomerular damage. Furthermore, AG treatment increased the NADPH oxidase activity and its p47^{phox} and p67^{phox} cytosolic subunits expression. We are not able to confirm if the increased activity and expression of NADPH oxidase were caused by the AGEs decrease in our

system or by an isolated effect of aminoguanidine not yet described. Understanding the NADPH oxidase role in experimental diabetes could improve the knowledge about the persistent inflammatory process that occurs due to these products accumulation during the disease complication, allowing a better clinical approach and treatment of these patients.

Keywords: Advanced Glycation End Products, NADPH Oxidase, Reactive Oxygen Species, Neutrophils, Diabetes Mellitus.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | | |
|-----------------------------------|---|---|
| AFGP | - | 1-alquil-2-formil-3,4-diglicosil pirrol |
| AG | - | Aminoguanidina |
| AGEs | - | Produtos Finais de Glicação Avançada |
| Akt | - | Proteína quinase B |
| AP | - | Apocinina |
| AP+AG | - | Apocinina e Aminoguanidina |
| b-FGF | - | Fator de crescimento fibroblástico básico |
| CEL | - | N ^ε -carboxietil-lisina |
| Cl⁻ | - | Íon cloreto |
| CML | - | N ^ε -Carboximetilisina |
| DAB | - | Diaminobenzidina |
| DAG | - | Diacilglicerol |
| DAPI | - | Dihidrocloreto de 4',6-diamino-2-feilindole |
| DL | - | Dose letal |
| DM | - | Diabetes Mellitus |
| DM1 | - | Diabetes Mellitus tipo 1 |
| DM2 | - | Diabetes Mellitus tipo 2 |
| DOLD | - | Dímero de lisina derivado da 3-deoxiglucosona |
| DTNB | - | 5,5'-ditiobis ácido 2-nitrobenzoico |
| FFI | - | 2-(2-fluoril)-4,5-furanil-1-H-imidazol |
| FITC | - | Isotiocianato de fluoresceína |
| ERN | - | Espécie(s) reativa(s) de nitrogênio |
| ERO | - | Espécie(s) reativa(s) de oxigênio |
| GLUTs | - | Receptores de glicose |
| GO | - | Glioxal |
| GOLD | - | Dímero de lisina derivado do glioxal |
| GTP | - | Trifosfato de guanina |
| Hb A1c | - | Hemoglobina glicada |
| HPLC | - | High Performance Liquid Chromatography |
| H₂O₂ | - | Peróxido de Hidrogênio |
| IkkB | - | Fator nuclear KB |
| IL | - | Interleucina |

INF – Interferon
iNOS – Óxido nítrico sintase induzida
i.p. - intraperitoneal
IR – Receptor de insulina
IRS – Substrato do receptor de insulina
LADA – Diabetes autoimune latente
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
MgO – Metilglioxal
MOLD – Dímero de lisina derivado do metilglioxal
MPO - Mieloperoxidase
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NF-κB – Fator nuclear ativador das células B
NO – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintase
O₂^{•-} - Ânion superóxido
OHCl – Ácido hipocloroso
PBS – Tampão fosfato salino
PGN – Tampão fosfato contendo 0,25% de gelatina e 0,1% de azida sódica
PI3q – Fosfatidilinositol 3 quinase
PKB ou Akt – Proteína quinase B
PKC – Proteína quinase C
PMA - 12-miristato 13-acetato de forbol
PMN – Polimorfonuclear(es)
PPD – Parafenileno-diamino
Rac/Rap – Ligantes de nucleotídeo guanina
RAGE – Receptor para AGEs
R-NHCl – Radical cloramina
SOD – Superóxido dismutase
TCA – Ácido tricloro acético
TNB - Ácido 5-tio-2-nitrobenzoico
TNF-α – Fator α de necrose tumoral
VCAM – Molécula de adesão vascular
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Via de sinalização da insulina | 18 |
| Figura 2 - Vias de danos gerados pela hiperglicemia..... | 20 |
| Figura 3 - Hipótese..... | 20 |
| Figura 4 – Sistema NADPH oxidase ativado..... | 22 |
| Figura 5 - Montagem do Sistema NADPH oxidase..... | 22 |
| Figura 6 - Inibidores do Sistema da NADPH oxidase..... | 24 |
| Figura 7 - Ação da apocinina e de seu dímero..... | 26 |
| Figura 8 - Consequências dos AGES..... | 27 |
| Figura 9 - Estrutura molecular da aminoguinidina | 31 |
| Figura 10 - Corte histológico | 52 |
| Figura 11 - Imunodeteccção de p47 ^{phox} | 55 |
| Figura 12 - Imunodeteccção da p67 ^{phox} | 56 |
| Figura 13 - Relação entre as vias de ativação do sistema NADPH oxidase e as vias de formação de AGES. | 65 |
| Gráfico 1 - Peso. | 42 |
| Gráfico 2 - Glicemia..... | 43 |
| Gráfico 3 - Porcentagem da HbA1c..... | 44 |
| Gráfico 4 - Frutosamina..... | 47 |
| Gráfico 5 - Fluorescência de AGES. | 48 |
| Gráfico 6 - Uréia. | 50 |
| Gráfico 7 - Creatinina | 50 |
| Gráfico 8 - Redução do citocromo C. | 58 |
| Gráfico 9 - Avaliação do <i>Burst</i> oxidativo..... | 58 |
| Gráfico 10 - Cinética de emissão de luz..... | 59 |
| Gráfico 11 - Avaliação da produção de HOCl..... | 62 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 | Diabetes Mellitus | 14 |
| 1.2 | Hiperglicemia e vias responsáveis por danos teciduais | 17 |
| 1.3 | Sistema NADPH oxidase | 21 |
| 1.4 | Apocinina: Inibidor do Sistema da NADPH oxidase | 24 |
| 1.5 | Produtos finais de glicação avançada (AGEs) | 26 |
| 1.6 | Aminoguanidina: Inibidor de AGEs | 30 |
| 2 | OBJETIVO GERAL | 32 |
| 2.1 | Objetivos Específicos | 32 |
| 3 | METODOLOGIA | 33 |
| 3.1 | Animais | 33 |
| 3.2 | Indução do diabetes e tratamento com inibidores de AGEs | 33 |
| 3.3 | Recrutamento dos neutrófilos | 34 |
| 3.4 | Obtenção das amostras biológicas | 34 |
| 3.5 | Isolamento de neutrófilos da cavidade peritoneal | 35 |
| 3.6 | Contagem das células e avaliação da viabilidade celular | 35 |
| 3.7 | Determinação da glicemia | 35 |
| 3.8 | Determinações analíticas | 36 |
| 3.9 | Hemograma | 36 |
| 3.10 | Avaliação da atividade do sistema NADPH oxidase | 36 |
| 3.10.1 | Ensaio da redução do citocromo C | 36 |
| 3.10.2 | Quimiluminescência amplificada por luminol | 37 |
| 3.11 | Atividade de Mieloperoxidase (Formação de HOCl) | 38 |
| 3.12 | Quantificação dos AGEs no soro | 38 |
| 3.13 | Preparo das Lâminas Silanizadas | 38 |
| 3.14 | Imunodeteção: avaliação das subunidades p67 ^{phox} e p47 ^{phox} | 39 |
| 3.15 | Análise Histológica | 40 |
| 3.16 | Análise estatística dos dados | 40 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 41 |
| 4.1 | Peso | 41 |
| 4.2 | Perfil glicêmico | 42 |
| 4.2.1 | Dosagem de glicose | 42 |
| 4.2.2 | Hemoglobina glicada | 43 |
| 4.2.3 | Frutosamina | 46 |
| 4.3 | Avaliação da formação e inibição dos AGEs | 47 |
| 4.4 | Dano Renal | 49 |
| 4.4.1 | Uréia e Creatinina | 49 |
| 4.4.2 | Histologia | 51 |
| 4.5 | Modulação do Sistema da NADPH oxidase | 54 |
| 4.5.1 | Imunodeteção das subunidades p47 ^{phox} e p67 ^{phox} | 55 |
| 4.5.2 | Atividade de NADPH oxidase | 57 |
| 5 | CONCLUSÃO | 64 |
| | REFERÊNCIAS | 66 |

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o diabetes mellitus é um problema importante de saúde pública mundial, devido a sua morbidade e mortalidade causada principalmente por complicações em longo prazo como a insuficiência renal e doenças cardiovasculares. A incidência e a prevalência do diabetes aumentam a cada ano em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento.

A alta taxa glicêmica é a principal responsável pelas alterações de vias metabólicas nos diabéticos, considerada como um importante fator no desenvolvimento de danos aos tecidos, sendo que esses efeitos podem ser reversíveis com o controle glicêmico. Alguns autores sugerem que as principais alterações causadas pela hiperglicemia estão ligadas ao aumento do fluxo na via dos polióis; ativação da proteína quinase C (PKC) e aumento da formação de produtos avançados de glicação não enzimáticas (AGEs) (KOYA, KING, 1998). A geração de ERO (espécies reativas de oxigênio) parece ser um ponto em comum entre estas vias metabólicas. Uma fonte importante de ERO é a ativação do sistema enzimático da NADPH oxidase. Esse sistema desempenha um papel-chave nas células fagocíticas durante o processo de defesa do organismo contra patógenos microbianos (SHEN, 2010).

O presente trabalho foi proposto para verificar a relação entre o sistema NADPH oxidase e os produtos finais de glicação avançada (AGEs), uma vez que estes produtos parecem ser um componente importante na morbi-mortalidade do Diabetes mellitus, em especial na falência renal. A seguir apresentamos alguns tópicos que auxiliam a compreensão do nosso trabalho.

1. 1 Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus é uma doença frequente na sociedade moderna e, portanto, tornou-se um problema de saúde pública mundial (ROCHA, et al., 2002). Estima-se que em 2000 existiam mais de 171 milhões de pessoas com diabetes no

mundo, sendo que projeções para 2030 sugerem que esse número possa chegar a 360 milhões (WILD, et al., 2004).

O Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome de hiperglicemia crônica resultante da falta de produção de insulina e/ou de resistência à ação desse hormônio (GROSS, et al. 2002; THE AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2003; ADA, 2010; GAVIN, et al. 2010). A classificação do DM inclui: diabetes mellitus tipo 1 (dependentes de insulina), diabetes mellitus tipo 2 (não insulina dependente), diabetes mellitus idiopático, DM associado a outras doenças ou secundário e diabetes mellitus gestacional (ADA, 2010).

O DM1, comumente encontrado em crianças e adolescentes, tem origem auto-imune e corresponde a 5% a 10% dos casos. Variações desta categoria têm sido propostas mais recentemente, dentre elas o diabetes auto-imune latente (LADA) cujos pacientes desenvolvem o DM1 de uma forma não clássica, a partir dos 20 anos de idade, constituindo significativa fração dos diabéticos adultos (ADA, 2010).

O DM2 representa 90 a 95% dos pacientes diabetes, e, observa-se nestes casos uma predominância de resistência insulínica que pode estar associada tanto a uma deficiência relativa de insulina quanto a defeitos na sua secreção (ADA, 2010). Embora a etiologia específica não seja totalmente conhecida, sabe-se que não ocorre a destruição auto-imune das células β e que está associado a uma forte predisposição genética, cujos fatores ainda não estão totalmente esclarecidos (BLOOMGARDEN, 2001). No entanto, fatores ambientais também são importantes. A maioria dos pacientes com essa forma de DM apresenta sobrepeso ou obesidade, e raramente cetoacidose, ocorrendo apenas quando associada a outras condições como infecções (DOROTA, BOGNA, 2006). O DM2 pode ocorrer em qualquer idade, mas é geralmente diagnosticado após os 40 anos. Já a tolerância diminuída à glicose ou glicemia de jejum alterada, inclui os indivíduos com valores de glicemia intermediários (ADA, 2010).

O DM gestacional é a diminuição da tolerância à glicose, de magnitude variável, diagnosticada pela primeira vez na gestação, podendo ou não persistir após o parto. (ADA, 2010).

O diabetes associado a outras doenças contém várias formas de DM, decorrentes de defeitos genéticos e associados com doenças, como pancreatite, hipertireoidismo ou devido ao uso de fármacos diabetogênicos.

A toxicidade das drogas diabetogênicas, como o aloxano, decorre de sua ação degenerativa sobre as células β pancreáticas (SZKUDELSKI, 2001; SELVIN, et al., 2010). A formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) tem sido responsabilizada, pelo menos em parte, pela destruição das células β pancreáticas durante processos auto-imunes que ocorrem na instalação do DM 1, ou mesmo em diabetes induzido por drogas como o aloxano e a estreptozotocina (SZKUDELSKI, 2001).

Já foi descrito que no diabetes existem alterações fisiológicas que diminuem a capacidade imunológica e a resposta inflamatória desses pacientes, aumentando a susceptibilidade às infecções (HOTAMISLIGIL, 2006). O controle glicêmico está envolvido na patogênese dessas alterações. Há disfunções nos leucócitos, com anormalidades na aderência, quimiotaxia, fagocitose e destruição intracelular. Há diminuição, também, da ativação espontânea e da resposta neutrofílica, quando comparados aos pacientes não diabéticos (KEMPF, et al., 2007). Além, disto, existem teorias de que a hiperglicemia ou a presença dos produtos finais da glicação levam a um estado de persistente ativação dos polimorfonucleares, o que induz a ativação espontânea de cadeia oxidativa e liberação de mieloperoxidase, elastase e outros componentes dos grânulos neutrofílicos, podendo tornar os polimorfonucleares menos responsivos quando estimulados por patógenos e podendo ainda, iniciar um processo patológico, levando à injúria vascular. O aumento da expressão das moléculas de adesão nos polimorfonucleares é importante na patogênese da aterosclerose, uma das principais complicações do diabetes (BORONAT, et al. 2010).

A piora do controle glicêmico leva à inflamação e ruptura das placas ateromatosas (BORONAT, et al. 2010). Além destas alterações o diabetes pode provocar complicações como a insuficiência renal, a cegueira e distúrbios neurológicos (SELVIN, et al. 2010; TESFAYE, et al. 2010).

Entre os mecanismos responsáveis por tais alterações, a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) desempenha um papel crucial no desenvolvimento da macro e microangiopatia, nefropatia, como também compromete o sistema imunológico, tornando o indivíduo diabético mais susceptível a infecções (ROCHA, et al. 2002), uma vez que concentrações elevadas de glicose no sangue por longos períodos favorecem a formação destes produtos (BARBOSA, et al., 2008; MORIYAMA, et al., 2010; TAKINO, et al., 2010).

1.2 Hiperglicemia e vias responsáveis por danos teciduais

A insulina é um hormônio polipeptídico produzido pelas células β do pâncreas cuja síntese é ativada pelo aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições. Sua ação ocorre em vários tecidos periféricos, incluindo fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. Seus efeitos metabólicos imediatos incluem: aumento da captação de glicose, principalmente em tecido muscular e adiposo, aumento da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, bem como bloqueio da produção hepática de glicose, lipólise e proteólise (PESSIN, SALTIEL, 2000; HOU, et al., 2009; PAULI, et al., 2009). A glicose, presente no compartimento extracelular, é transportada para o compartimento intracelular por difusão facilitada, mediante ação dos transportadores de glicose, especialmente GLUTs 1 e 4.

A via de sinalização intracelular dependente de insulina começa com sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase intrínseca, composta por duas subunidades alfa e duas subunidades beta, denominado receptor de insulina (IR) (FIGURA1) (PATTI, KAHN, 1998; HOU, et al., 2009). A ativação do IR resulta em fosforilação em resíduos tirosina de diversos substratos, incluindo substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2) (WHITE, 1998; PESSIN, SALTIEL, 2000). A fosforilação das proteínas IRS cria sítios de ligação para outra proteína citosólica, denominada fosfatidilinositol 3-quinase (PI3q), promovendo sua ativação (BACKER, et al., 1992).

A PI3q é importante na regulação da mitogênese, na diferenciação celular e no transporte de glicose estimulada pela insulina. A ativação da PI3q aumenta a fosforilação em serina da proteína quinase B (PKB ou Akt) e isso permite o transporte de glicose no músculo e no tecido adiposo, através da translocação da proteína Glut-4 para a membrana celular permitindo a entrada de glicose por difusão facilitada (CZECH, CORVERA, 1999). Os transportadores Glut-4 são os principais responsáveis pela captação da glicose circulante nos humanos. Além disso, o sinal transmitido pela PI3q ativa a síntese de glicogênio no fígado e no músculo e da lipogênese no tecido adiposo (SHEPHERD et al, 1995; PESSIN, SALTIEL, 2000).

Apesar desta ser a principal via, foram descritas outras vias pelas quais a glicose penetra em células insulino-dependentes na ausência de insulina. Um exemplo bem estudado é durante o exercício físico, no qual vários fatores colaboram

para estimular a captação de glicose como: aumento na concentração do cálcio no interior da célula, aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) com síntese de óxido nítrico (NO), aumento na concentração de bradicinina ou até mesmo a hipóxia. Ambos atuam aumentando a translocação do Glut-4 para a membrana durante a contração muscular (PAULI, et al., 2009).

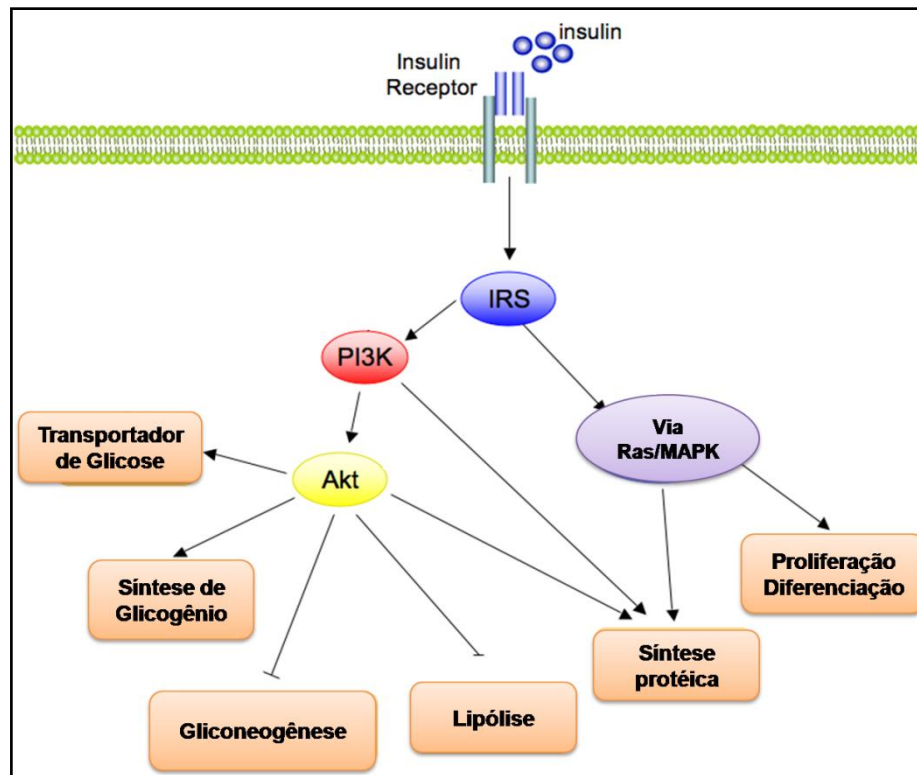


Figura 1 - Via de Sinalização da Insulina.
Fonte: DE LUCA; OLEFSKY. (2008, p.16) (Adaptado pelo autor).

Uma vez dentro da célula, a glicose é metabolizada pela via glicolítica. Menos do que 5% da glicose intracelular é metabolizada pela via da aldose redutase, mesmo em condições de hiperglicemia, o que aumenta o fluxo da via do sorbitol, mudando seu potencial redox, e alterando vias de transdução de sinais. (IDRIS, et al., 2001). O GLUT 1 é superexpresso em condições de altas concentrações extracelulares de glicose e hipóxia, e o aumento do fluxo glicolítico resulta em aumento da síntese de novo de DAG (diacilglicerol) (KAISER, et al., 1993).

Vários mecanismos bioquímicos têm sido propostos para explicar anormalidades estruturais e funcionais associadas com a exposição prolongada dos tecidos vasculares à hiperglicemia, tais como: 1) Formação de produtos avançados de glicação não-enzimática; 2) Aumento da atividade da aldose-redutase, levando a

alterações decorrentes do aumento de sorbitol; 3) Alterações de radicais livres e do estado de oxidação; e 4) Ativação da PKC via acúmulo de DAG induzido pela hiperglicemia (KOYA, KING, 1998; SCHAAN, 2003). Não há uma hipótese que unifique estes mecanismos, mas tanto alteração redox causadas pelo aumento do fluxo na via do sorbitol como o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) induzido por hiperglicemia podem ser responsáveis por todas as outras alterações bioquímicas (REIS, et al., 2008).

O aumento de ERO pode reduzir os níveis de óxido nítrico (NO) e então, ativar a aldose redutase. A ativação da via dos polióis induzido pelo aumento de ERO determina maior conversão de glicose a sorbitol, o que acarreta em redução coenzima NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e da glutatona (responsável pela eliminação do peróxido formado), aumentando o estresse oxidativo induzido por hiperglicemia. Uma vez o NADPH reduzido, há acúmulo de radicais livres nos pacientes diabéticos, podendo levar ao desenvolvimento das complicações do DM (BOSCO, 2005; REIS, et al., 2008). O sorbitol é convertido a frutose, resultando em aumento da relação NADH:NAD⁺, o que aumentaria a síntese de novo de diacilglicerol, e, portanto, ativação da PKC. Por fim, a formação de produtos avançados de glicação não-enzimática (AGEs), induzida pela hiperglicemia crônica do DM, além de causar dano tecidual direto, também pode aumentar a formação de ERO (FIGURA 2) (BROWNLEE, 2001).

O DAG celular é o principal ativador fisiológico da PKC; deriva de múltiplas fontes, incluindo a hidrólise de fosfatidilinosítídeos, metabolismo da fosfatidilcolina por fosfolipases ou síntese de novo. Também é possível que a ativação da via DAG-PKC induzida pela hiperglicemia seja resultado de glico-oxidação, já que existem evidências de que alguns oxidantes como H₂O₂, podem ativar a PKC (BROWNLEE, 2001; SCHAAN, 2003). O aumento do DAG e decorrente ativação da PKC têm sido descritos em tecidos de animais e humanos diabéticos, tais como retina, aorta, coração e glomérulo, mesmo quando o estímulo de hiperglicemia é agudo (CRAVEN, DERUBERTIS, 1989; INOBUCHI et al., 1992; SHIBA, et al., 1993; SCHAAN, 2003).

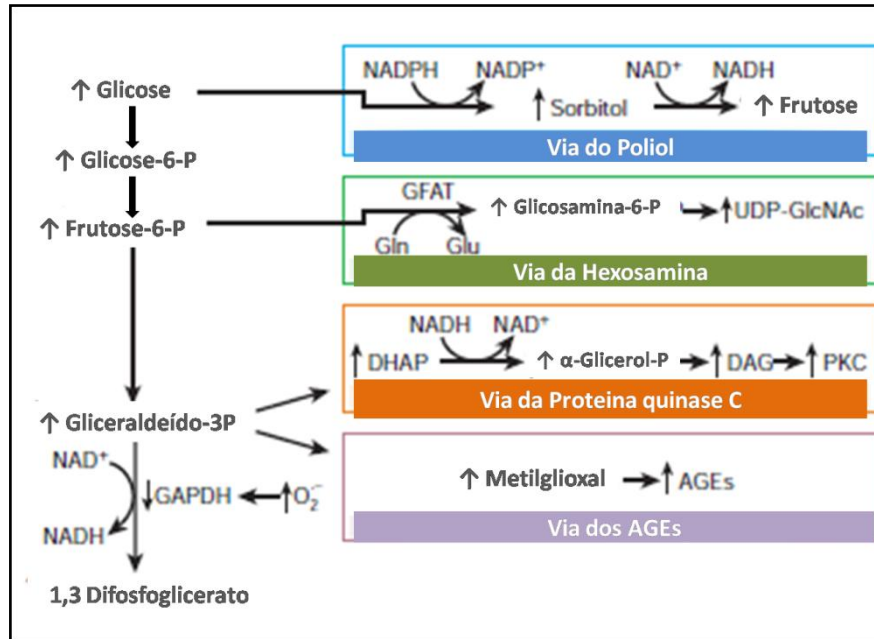


Figura 2 - Vias de danos gerados pela hiperglicemia.
 Fonte: BROWNLEE (2001, p.818) (Adaptado pelo autor).

Sabe-se que no estado diabético ocorre uma ativação da PKC e que essa, ativa o sistema NADPH oxidase. Nossa proposta foi verificar a influência do estado hiperglicêmico na atividade do sistema enzimático em neutrófilos e sua possível correlação com a formação de AGEs (FIGURA 3).

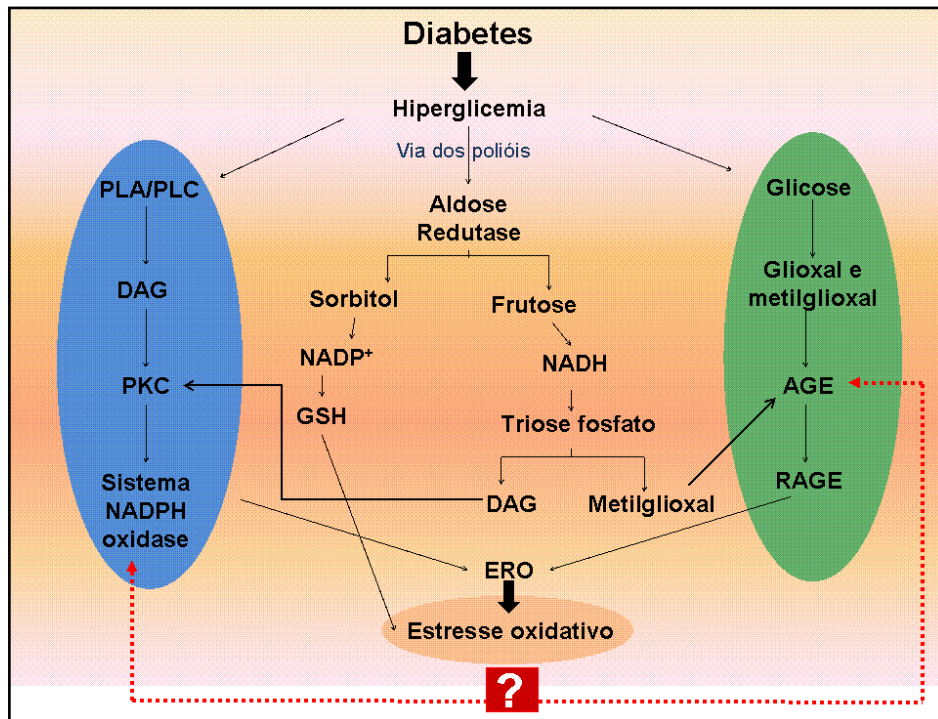


Figura 3 - Principais vias ativadas por hiperglicemia e hipótese de interação entre a via NADPH oxidase e via de formação de AGEs (linha tracejada vermelha).
 Fonte: MEDINA (2006, p.18) (Adaptado pelo autor).

1.3 Sistema NADPH oxidase

O sistema da NADPH oxidase é encontrado em diversas células de origem mesodermal. Tem como substrato as coenzimas NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida) ou NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato). Possui várias isoformas, porém a mais estudada é a tipo leucocitária encontrada em células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos) e linfócitos B, participando de processos de defesa através de produção de espécies reativas (BABIOR, 1999).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) é um importante componente da ativação dos fagócitos e da sua atividade microbicida e tumoricida (BOGDAN et al., 2000). Espécies reativas de oxigênio são geradas através de um processo denominado “burst” oxidativo, decorrente da ativação do sistema NADPH oxidase através da redução de oxigênio molecular por elétrons provenientes, predominantemente, da NADPH acarretando a produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A ativação do sistema enzimático NADPH oxidase é induzida *in vivo* por imunocomplexos, bactérias e diversos metabólitos (glicose, aminoácidos, ácidos graxos, citocinas) (GARCIA, et al., 1999) e *in vitro* por estímulos opsonizados e pelo 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) (PICK, KEISARI, 1980). O PMA ativa a NADPH oxidase por mecanismos independentes de receptor e por estimulação indireta de PKC (BABIOR, 1999). O sistema ativo provoca aumento transitório do consumo de oxigênio, podendo ser de duas a vinte vezes maior que o consumo basal, dependendo da célula e da natureza do estímulo (DRATH, KARNOVSKY, 1975).

O sistema enzimático NADPH oxidase é formado por componentes que se encontram dissociados na célula em repouso. Estes componentes são a $p40^{phox}$, a $p47^{phox}$ e a $p67^{phox}$, agrupadas em um sistema protéico citoplasmático de 240kDa. Também há o citocromo b_{558} , composto pelas proteínas $p22^{phox}$ e NOX2 (também conhecida como $gp91^{phox}$) localizadas nas membranas das vesículas secretórias e dos grânulos específicos citoplasmáticos (GUICHARD et al., 2008). Há ainda outras proteínas de baixa massa molecular, ligantes de nucleotídeo guanina: a Rac 1 e 2 e Rap1a, que também participam do processo (BOKOCH, KNAUS, 2003; ROOS, et al., 2003) (FIGURA 4).

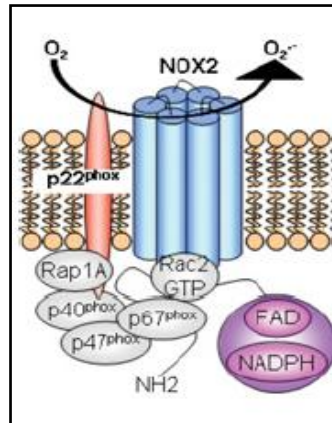


Figura 4 – Sistema NADPH oxidase ativado.
Fonte: GUICHARD et al., (2008, p. 922) (Adaptado pelo autor).

A ativação do sistema NADPH oxidase se inicia pela fosforilação do componente citosólico $p47^{\text{phox}}$, resultando na migração de todas as proteínas citosólicas para a membrana plasmática. Uma vez na membrana, estas proteínas se associam ao citocromo b_{558} que migrou para a mesma através da fusão das vesículas secretórias e dos grânulos específicos. A Rac1/2 liga-se simultaneamente ao trifosfato de guanosina (GTP) e migra para a membrana juntamente com o sistema citosólico (FIGURA 5) (BABIOR, 1999; BEDARD, KRAUSE, 2007).

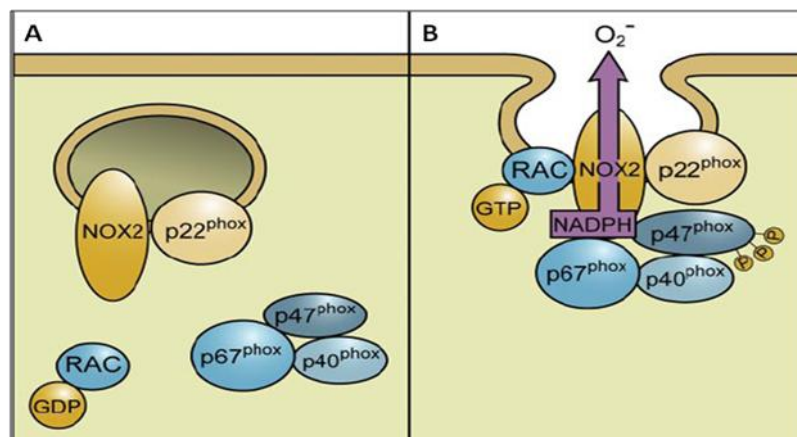


Figura 5 - Montagem do Sistema NADPH oxidase.
Fonte: BEDARD; KRAUSE (2007, p.250).

Quando ativo, o sistema multienzimático NADPH oxidase é responsável pela transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, formando o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) tem pouca atividade microbicida, entretanto, origina ERO mais potentes. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é formado a

partir da dismutação do ânion superóxido, espontaneamente e/ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (BABIOR, 2002; BOKOCH, KNAUS, 2003; SUBASINGHE et al., 2010). O HOCl (ácido hipocloroso) é formado pela reação dependente de H_2O_2 , íons cloreto (Cl^-) e da enzima Mieloperoxidase (MPO). Cloraminas (R-NHCl) podem ser geradas pela reação de HOCl com compostos contendo nitrogênio. Existem dois mecanismos possíveis para a produção de radical hidroxila ($\cdot OH$) por fagócitos mononucleares: reação de Fenton, onde H_2O_2 reage com íons metálicos, como íons ferro ou através de reação de HOCl com ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$). O oxigênio singlete (1O_2) pode ser produzido pela reação de H_2O_2 com o HOCl (BOGDAN et al., 2000; BABIOR, 2002; BEDARD, KRAUSE, 2007).

Além de ERO, os fagócitos também produzem ERN. O óxido nítrico (NO) é formado pela reação de oxidação da L-arginina catalisada pela iNOS. Ânion superóxido reage com NO formando peroxinitrito ($ONOO^-$), e esta espécie pode se decompor dando origem a radical hidroxil ($\cdot OH$) e a radical dióxido de nitrogênio ($NO_2\cdot$) (QUINN et al., 1995; TAYLOR et al., 2003; MARIOTTO et al., 2004).

A produção de ERO pela NADPH oxidase, em pequenas quantidades, pode funcionar na sinalização metabólica e, em grandes quantidades, pode originar dano oxidativo. Os tipos celulares encontrados nas paredes dos vasos possuem NADPH oxidase semelhante às fagocíticas, as quais são ativadas em condições fisiológicas. Essas oxidases parecem ter múltiplas utilidades, controlando funções vasculares, respostas à expressão gênica, sinalização em processos celulares, como crescimento, apoptose, migração e remodelação da matriz extracelular. No entanto, em determinadas patologias, como DM e hipertensão arterial, ocorre aumento na produção de ERO que ultrapassa o limiar fisiológico, causando danos celulares, principalmente às células endoteliais (EDELSTEIN, BROWNLEE, 1992). O mecanismo que parece ser comum a todas as células lesadas, como consequência da hiperglicemia, é a produção aumentada de ERO, sendo esta hipótese capaz de unificar todas as vias (REIS et al., 2008).

Vários compostos têm sido testados com o intuito de inibir a ação do sistema NADPH oxidase e conseqüentemente diminuir os danos causados pelas ERO em algumas patologias, como, por exemplo, no tratamento da hipertensão (WILLIAMS, GRIENGLING, 2007).

Dentre os compostos utilizados para inibir o sistema da NADPH oxidase podemos citar: peptídeos inibidores de NADPH oxidase (gp91ds-tat e PR-39),

VAS2870, AEBSF, Estatinas, Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), inibidores de PKC, antioxidantes (como vitamina C) e a Apocinina, os quais agem em diversas vias de sinalização (FIGURA 6) (WILLIAMS, GRIENGLING, 2007). O inibidor utilizado neste estudo foi a apocinina, por inibir a produção de ERO em neutrófilos.

1.4 Apocinina: Inibidor do Sistema da NADPH oxidase

A apocinina age inibindo a translocação da p47^{phox} para membrana celular, impossibilitando a montagem do sistema.

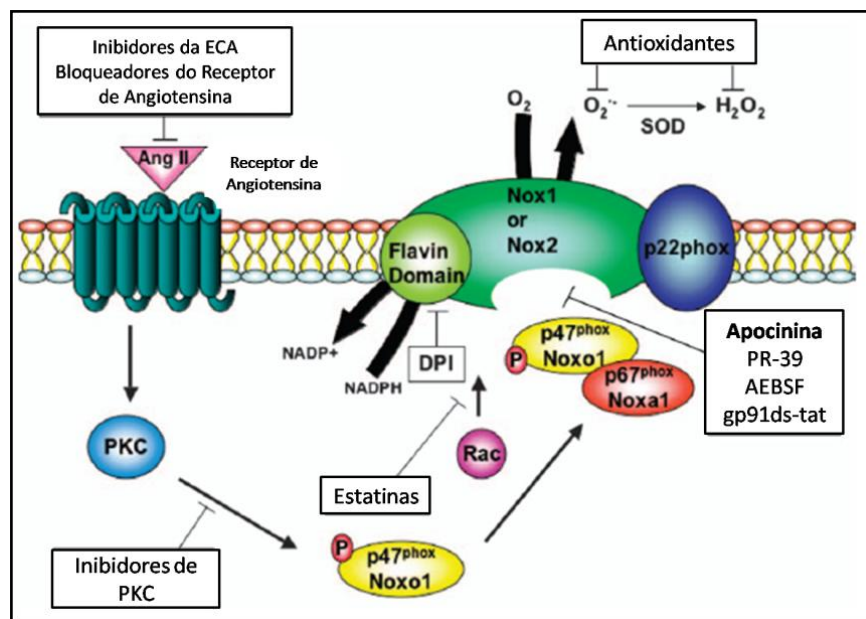


Figura 6 - Inibidores do Sistema da NADPH oxidase.
Fonte: WILLIAMS; GRIENGLING (2007, p.11) (Adaptado pelo autor).

Apocinina também conhecida como acetovanillone ou 4-hidroxi-3-methoxyacetophenone foi primeiramente descrita por Schmiedeberg (1883), após isolamento das raízes de *Apocynum cannabinum* (cânhamo canadense), e, era utilizada como remédio para problemas cardíacos e hidropsia (WORM, 2001). Em 1971, apocinina foi identificada a partir do isolamento de constituintes imunomoduladores da raiz de *Picrorhiza kurroa* (Scrophulariaceae), uma planta

nativa das montanhas do leste do Himalaia conhecida na medicina tradicional da Índia e Sri Lanka, utilizada para tratamento de icterícia e asma. Apocinina é uma acetofenona com um peso molecular de 166,17, possui leve odor de baunilha e tem um ponto de fusão de 115°C (WORM, 2001; STEFANSKA, 2008).

De acordo com estudos recentes, a apocinina é um dos mais seletivos inibidores do sistema da NADPH oxidase, diminuindo efetivamente a formação de ânions superóxido (WILLIAMS, 2007; OLUKMAN, 2010; STEFANSKA, 2010; WINIARSKA, 2010). Simons et al. (1990) já haviam descrito a apocinina como um potente agente antiinflamatório, cuja ação é inibir a produção de ERO dos leucócitos. Por ser um inibidor seletivo da NADPH oxidase, concomitante inibe a produção de ERO (IC50: 10 mM) em neutrófilos humanos ativados (SIMONS, 1990). Curiosamente, não parece interferir com a defesa dos PMN, uma vez que ela não afeta a fagocitose ou morte intracelular (STOLK, 1994; STEFANSKA, 2008). A apocinina impede a translocação da p47^{phox} para Nox2 em leucócitos, monócitos e células endoteliais (STOLK, 1994; JOHNSON, 2002) (FIGURA 7).

A ação inibitória do composto, no entanto, ocorre apenas após um intervalo de tempo. Uma descoberta importante foi a que a apocinina é uma pró-droga que é convertida pela oxidação mediada por peroxidase a um dímero, que tem demonstrado ser mais eficiente do que a própria apocinina (JOHNSON, 2002; KANEGAE, 2010). Tem sido sugerido que apenas o dímero, composto ativo inibidor, é capaz de bloquear a atividade da NADPH oxidase (WORM, 2001).

Os efeitos antiinflamatórios da apocinina *in vitro* incluem: redução do metabolismo oxidativo dos neutrófilos, mediando o dano oxidativo (SIMONS, 1990); diminuição da aderência da linhagem celular monocítica U937 (HOUGEE, 2006); redução da quimiotaxia de granulócitos polimorfonucleares (Muller, Reiter et al., 1999); inibição da formação do peroxinitrito em macrófagos murinos (MUIJSERS, 2000); inibição da destruição da cartilagem mediada pela inflamação na artrite reumatóide (modelo *in vitro*) (LAFEBER, 1999).

Não se sabe muito sobre a cinética da apocinina *in vivo*, mas os aspectos metabólicos de apocinina foram descritos por Daly et al. (STEFANSKA, 2008). Eles demonstraram que após um período de 20 horas de administração intraperitoneal (i.p.) de 120 mg/kg de apocinina em ratos, 80% da apocinina foi recuperada inalterada na urina dos animais.

Os efeitos colaterais da apocinina não são conhecidos, mas sabe-se que tem muito baixa toxicidade (DL 50:9 g/kg) após a administração oral em camundongos (STEFANSKA, 2008).

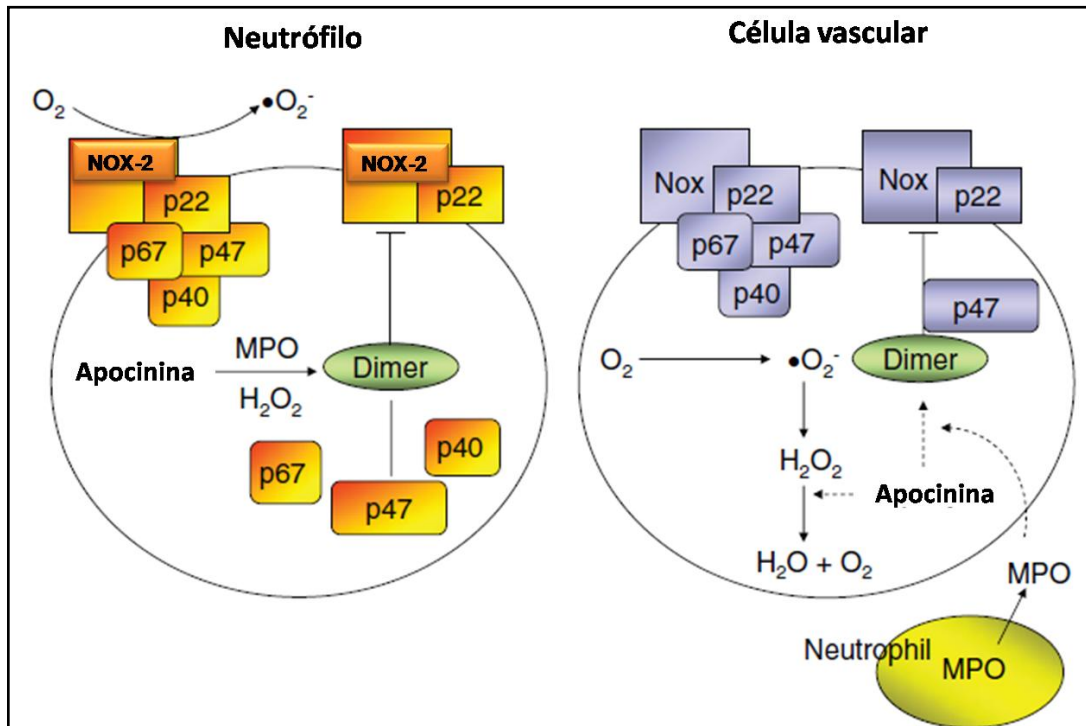


Figura 7 - Ação da Apocinina e de seu dímero.
 Fonte: TOUYZ (2008, p.173).

1.5 Produtos finais de glicação avançada (AGEs)

Vários mecanismos têm sido propostos para justificar como a hiperglicemia induz dano tecidual, incluindo o aumento de fluxo via poliol, o aumento da síntese de diacilglicerol, com conseqüente ativação das isoformas da PKC, alterando o estado redox intracelular, e a produção de produtos finais de glicação avançada (AGEs) (VLASSARA, 1994; GIARDINO, 1998; PEPPA, 2003; BARBOSA, 2008).

AGEs são modificações pós-translacionais que ocorrem em proteínas por uma rede de reações entre resíduos de aminoácidos básicos e hidratos de carbono ou carbonilas reativas. O conjunto dessas reações é percebido como um processo

lento, mas complexo, que ocorre espontaneamente em organismos vivos, sem a ação de enzimas específicas (FERREIRA, 2003).

Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem conseqüências da formação de AGEs que podem contribuir para a patologia diabética. Os AGEs extracelulares interferem com as interações matriz-matriz e célula-matriz (BROWNLEE, 2001), as interações proteína modificada com receptores específicos para AGEs medeiam as alterações patológicas na expressão gênica. Além disso, a formação de AGE no interior das células pode alterar diretamente a função das proteínas intracelulares, tais como o fator de crescimento fibroblástico básico (b-FGF) (FIGURA 8) (GIARDINO, 1998).

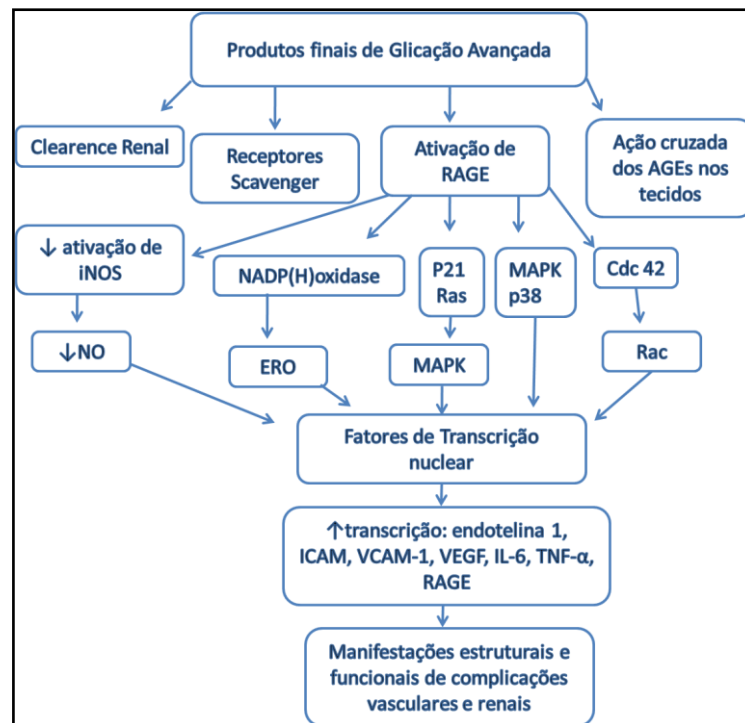


Figura 8 - Consequências dos AGEs.
Fonte: GOH; COOPER (2008, p.1144).

Os produtos finais de glicação avançada constituem uma variedade de substâncias formadas à partir de interações entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucléicos. Neste processo, a molécula de glicose pode ligar-se a estrutura de proteínas, através de uma reação não enzimática denominada reação de Maillard ou glicação. Esta reação é dividida em três estágios: inicial, intermediário e final (BARBOSA, 2008; REIS, 2008; PAGEON 2010; TAKINO, 2010). Inicia-se com a formação de base de Schiff instável, gerada pela condensação de grupamento carbonila de açúcar redutor,

como a glicose, com um grupamento amina, oriundo, por exemplo, do aminoácido lisina. Na seqüência, a base de Schiff sofre rearranjos, tornando essa estrutura mais estável, o produto de Amadori ou produtos iniciais da reação de Maillard. A hemoglobina glicada e a frutossamina são conhecidos exemplos de produtos de Amadori. Os produtos de Amadori gerados possuem grupos carbonilas reativos, que se condensam com grupos aminas primários acessíveis, dando origem aos produtos avançados da reação de Maillard – AGEs. Outro mecanismo pelo qual os AGEs podem ser formados envolve auto-oxidação de açúcares livres na presença de oxigênio e metais livres, levando a formação de compostos carbonila mais reativos, que interagem com proteínas e formam cetoaminas altamente reativas (BARBOSA, 2008).

Deve-se ressaltar que, durante algumas das reações que levam à formação de AGEs, espécies reativas de oxigênio são geradas e concorrem paralelamente com o estresse oxidativo e com os danos estruturais e funcionais às macromoléculas (BARBOSA, 2008; REIS, 2008).

Os AGEs formados podem lesar as células por diferentes mecanismos, tais como, formação de ligações cruzadas com macromoléculas, interação com receptores celulares específicos e glicação intracelular. A formação de ligações cruzadas com o colágeno tem sido demonstrada em pacientes diabéticos e justifica a ocorrência de varias complicações crônicas observadas no diabetes mellitus tais como, rigidez vascular e espessamento de membranas basais. Além disso, a glicação da molécula de colágeno pode inibir a liberação de oxido nítrico derivado do endotélio, com conseqüente vasoconstrição, redução do fluxo plasmático e isquemia tissular (ALVES, et al., 2007). A ligação de AGEs à molécula de colágeno pode alterar a estrutura e função biológica de macromoléculas tais como lipoproteínas, imunoglobulinas, entre outras.

In vivo, a formação destes produtos poderia envolver neutrófilos, monócitos e macrófagos, os quais, após estímulo inflamatório, produzem mieloperoxidase e ativam NADPH oxidase, que induzem a formação de AGEs por meio de oxidação de aminoácidos (BARBOSA, et al., 2008). Imunoglobulinas ligadas ao colágeno têm uma capacidade diminuída para formar complexos antígeno-anticorpo. Além disso, sabe-se que a atividade dos neutrófilos está modificada em diabéticos, devido à diminuição da quimiotaxia, aderência, fagocitose e destruição intracelular, o que

diminui a capacidade imunológica e a resposta inflamatória desses pacientes (KEMPF, et al., 2007).

Os AGEs se acumulam na maioria dos órgãos-alvo que podem ser acometidos no diabetes, como rim e retina e, ainda, nas placas ateroscleróticas. O rim é o principal alvo dos danos mediados por AGEs, tendo em vista que representa o maior sítio de *clearance* destes produtos (LAPOLLA, et al., 2005). Diversos estudos têm utilizado a mensuração de produtos de glicação no soro ou nos tecidos de diabéticos para avaliar o risco de progressão da doença. Os dois parâmetros mais utilizados são a hemoglobina glicada (Hb A1C) e as proteínas glicadas ou frutosaminas (YONEKURA, et al., 2003).

Dados da literatura têm demonstrado a existência de receptores celulares específicos para AGEs, os quais foram identificados em diferentes células, tais como, linfócitos T, monócitos/ macrófagos, fibroblastos, células da musculatura lisa, neurônios, células vermelhas e mesangiais. Entre os diferentes receptores de AGEs, o receptor denominado RAGE é provavelmente a molécula mais bem caracterizada até o momento (ALVES, et al., 2007).

A interação AGE-RAGE nas células endoteliais ativa a transcrição do NF- κ B, levando ao subsequente aumento da expressão de seus genes-alvo, como endotelina-1, molécula de adesão vascular-A (VCAM-1), selectina E, fator tecidual, trombosmodulina, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e de citocinas pró-inflamatórias que incluem a interleucina-1 e 6, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), além do próprio RAGE (FIGURA 8). O bloqueio do RAGE, por sua vez, inibe a ativação do NF- κ B (GOH, COOPER, 2008).

Quanto à glicação intracelular, sabe-se que os AGEs formados podem interagir com nucleotídeos, histonas ou proteínas envolvidas na transcrição do DNA celular e alterar propriedades importantes para a homeostase celular (BLOOMGARDEN, 2001; LAPOLLA, et al., 2005). Sendo assim, os efeitos patológicos dos AGEs estão relacionados à capacidade destes compostos de modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas (BLOOMGARDEN, 2001).

Os AGEs mais representativos são: N ϵ -carboximetil-lisina (CML), de maior concentração no soro, N ϵ -carboxietil-lisina (CEL), pirralina, dímero de lisina derivado do glioxal (GOLD), dímero de lisina derivado do metil glioxal (MOLD), dímero de lisina derivado da 3-deoxiglucosona (DOLD), 1-alquil-2-formil-3,4-diglicosil pirrol

(AFGP) e FFI (2-(2-fluoril)-4,5-furanil-1-H-imidazol) e os fluorófos pentosidina e argipiridina (IKEDA, 1998; AHMED, et al., 2002). Altos níveis de pentosidina têm sido observados no plasma, hemácias e urina de pacientes diabéticos. Esse aumento tem sido correlacionado com a idade e duração do diabetes. Além disso, existe uma relação linear entre os níveis de pentosidina e a severidade das complicações micro e macro angiopáticas (LAPOLLA, et al., 2005).

Como a participação dos AGEs já foi descrita em várias patologias, como diabetes mellitus, aterosclerose, insuficiência renal, processos inflamatórios, Alzheimer e durante o processo de envelhecimento (AHMED, et al., 2002; CULBERTSON, et al., 2003; ALVES, et al., 2007), vários compostos capazes de reduzir a formação de AGEs vêm sendo testados *in vivo* e *in vitro*. Estes compostos têm sido denominados “anti-AGE”, entre os quais estão os medicamentos, suplementos e substâncias naturais obtidas de alimentos e de vegetais (SOARES, et al., 2000; MATSUDA, et al., 2003; VOZIYAN, et al., 2003). Entre os medicamentos mais estudados para o tratamento das complicações diabéticas, destacam-se a aminoguanidina, a aspirina e a metformina. Porém, alguns efeitos colaterais associados ao uso crônico destes medicamentos, têm limitado o estabelecimento da dosagem segura para sua utilização terapêutica como inibidores da formação de AGEs em pacientes diabéticos (BLOOMGARDEN, 2001).

Apesar dos avanços das pesquisas nesta linha, muitos estudos são ainda necessários para estabelecer o potencial terapêutico destes compostos para os portadores de diabetes ou de outras patologias associadas ao acúmulo de AGEs.

1.6 Aminoguanidina: Inibidor de AGEs

A aminoguanidina, também conhecida como pimagedina (FIGURA 9), foi a primeira droga testada com o propósito de inibir as reações que levam à formação de AGEs, sendo seguido pela piridoxamina e alagebrium, drogas que atuam neles já formados (GOH, COOPER, 2008). Várias drogas já incorporadas ao arsenal terapêutico do dia-a-dia têm demonstrado atuar também na inibição da formação dos produtos finais da glicação avançada, como a metformina, os bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina II e até alguns inibidores da enzima conversora de

angiotensina, como o temocaprilat, quelantes de íons metálicos (desferroxamina e penicilamina), antioxidantes (vitamina C ou E) e o grupo agentes amino (aspirina) (GOH, COOPER, 2008).

Em modelos animais, um dos agentes mais notáveis usado para prevenir a formação de AGEs é a aminoguanidina (AG), a hidrazina, que inibe tanto a formação de AGEs, e, em doses mais altas, também inibe a atividade da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (SLIMAN, et al., 2010).

Em sistemas modelo, o mecanismo pelo qual a AG inibe a formação de AGEs demonstrou envolver a captura de compostos dicarbonílicos intermediários reativos formados a partir de rearranjos de oxidação de enediol de produtos de Amadori, tais como metilglioxal (MgO), glioxal (GO), e 3-deoxiglicosona (3-DG) (GIARDINO, et al., 1998; THORNALLEY, 2003). Já foi descrito que a AG pode atuar como um antioxidante *in vivo*, extinguindo os radicais hidroxila e inibindo peroxidação lipídica em células e tecidos e impedindo oxidação induzida por apoptose (SLIMAN, et al., 2010). Foi descrito ainda que a administração de aminoguanidina em ratos diabéticos reduz AGEs e limita alterações estruturais e funcionais nos tecidos (GIARDINO, 1998; GOH, COOPER, 2008) .

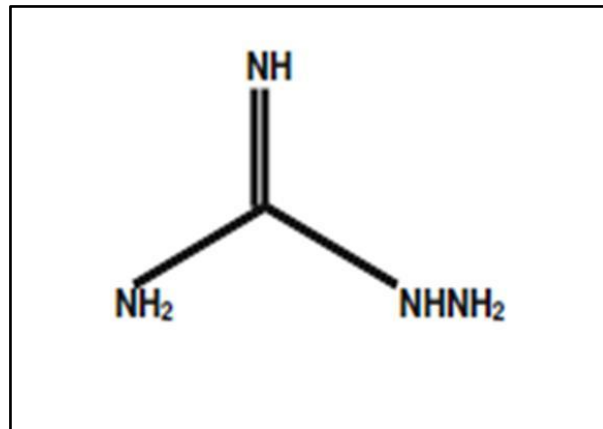


Figura 9 - Estrutura molecular da aminoguanidina.
Fonte: SLIMAN, et al. (2010, p.10).

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a relação entre o sistema NADPH oxidase de neutrófilos e os AGEs em ratos diabéticos induzido por aloxano.

2.1 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos se subdividem em:

- a) Avaliar o perfil glicêmico dos animais através do monitoramento da glicemia de jejum e proteínas glicadas;
- b) Avaliar a formação de AGEs por fluorimetria nos animais tratados e não tratados com o inibidor de NADPH oxidase e com o inibidor de AGEs;
- c) Avaliar a atividade do Sistema NADPH oxidase em neutrófilos peritoneais nos animais tratados e não tratados com inibidores de NADPH oxidase e AGEs;
- d) Avaliar a expressão das subunidades p47^{phox}, p67^{phox} do sistema NADPH oxidase de neutrófilos peritoneais por Imunofluorescência nos animais tratados e não tratados com inibidores de NADPH oxidase e AGEs;
- e) Avaliar a função renal dos animais através da determinação da uréia e creatinina e análise histológica dos rins.

3 METODOLOGIA

Abaixo se encontra listada a metodologia utilizada neste trabalho.

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar, com peso de 280 ± 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* e foram divididos em grupos experimentais aleatórios contendo pelo menos 8 animais.

Os grupos foram utilizados conforme descrito a seguir:

- Controle: animais não diabéticos e não tratados com os inibidores e com glicemia abaixo de 150 mg/dL.
- Diabético: animais submetidos à administração de aloxano e não tratados com os inibidores, com glicemia acima de 250 mg/dL.
- Diabético AP (diabético tratado com Inibidor de NADPH oxidase): animais diabéticos tratados com apocinina durante 50 dias.
- Diabético AG (diabético tratado com Inibidor de AGEs): animais diabéticos tratados com aminoguanidina durante 50 dias.
- Diabético AP+AG (diabético tratado com Inibidor de AGEs e NADPH oxidase): animais diabéticos tratados com aminoguanidina e apocinina por 50 dias.

3.2 Indução do diabetes e tratamento com inibidores de AGEs

Para induzir o diabetes foi administrado Aloxano em solução salina a 2%, na dosagem de 150mg/kg, via peritoneal (SZKUDELSKI, 2001). Foram considerados diabéticos, os animais que apresentaram glicosúria acima de 250 mg/dL verificado por reação de Trinder 5 dias após a indução (STOPPA, et al., 2006).

Para inibir a formação de produtos finais de glicação proteica (AGEs) foi administrado ao grupo de ratos aminoguanidina (100mg/dia) por gavagem durante 50 dias (EDELSTEIN, BROWNLEE, 1992).

Para inibição da enzima NADPH oxidase, foi administrado ao grupo de ratos apocinina (16mg/kg/dia) por gavagem durante 50 dias (SOO, et al., 2009).

Para inibição de ambos, enzima e AGEs foi administrado aminoguanidina e apocinina na concentração citada acima durante 50 dias.

O tratamento com os inibidores foi iniciado 7 dias após a administração do aloxano e confirmação do estado diabético.

3.3 Recrutamento dos neutrófilos

O recrutamento dos neutrófilos foi realizado pela administração intraperitoneal prévia de 2 mL de caseinato de sódio 12% (diluído em salina 0,9%) e após um período de 4 horas (pico de migração de neutrófilos para o peritônio) os animais foram sacrificados e a lavagem peritoneal com PBS estéril realizada.

3.4 Obtenção das amostras biológicas

Os animais foram anestesiados por inalação com éter etílico. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética, registrado sob o nº 250/2010 (ANEXO A). O sangue foi colhido por punção cardíaca, para obtenção de soro e sangue total (hemograma). Em seguida, foram submetidos à eutanásia, aumentando-se a anestesia. Após a obtenção do lavado peritoneal, para obtenção dos neutrófilos, os rins foram retirados e fixados em formol para obtenção dos cortes histológicos.

3.5 Isolamento de neutrófilos da cavidade peritoneal

Após o sacrifício, os animais tiveram a cavidade intraperitoneal lavada com 15 mL de PBS estéril. A suspensão celular foi obtida por aspiração com seringa e agulha e foi colocada em tubo de polipropileno de fundo curvo. As células de todos os grupos foram contadas e mantidas em gelo até a realização dos ensaios.

3.6 Contagem das células e avaliação da viabilidade celular

Para a contagem das células do peritônio, 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). As células foram contadas em Câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada com Azul de Tripán 0.1%. Para avaliação da morfologia celular as lâminas foram coradas pelo método MGG modificado por Rosenfeld (ROSENFELD, 1947).

3.7 Determinação da glicemia

O índice de glicose foi acompanhado através da dosagem de glicosúria/glicemia através do método colorimétrico pela utilização de kit comercial específico (Analisa®) e a leitura foi realizada em Bioplus® (Bio 2000). Foram coletadas amostras de urina dos animais uma vez por semana a partir da indução do diabetes para dosar a glicosúria. A glicemia em jejum foi confirmada no soro dos animais logo após o sacrifício. Os animais que não apresentaram glicosúria/glicemia acima de 250 mg/dL, ou tiveram o quadro diabético revertido ao longo do experimento foram excluídos.

3.8 Determinações analíticas

O índice de glicose foi acompanhado através de glicosúria em urina colhida dos ratos com 10 dias após injeção de aloxano. Após a coleta de sangue por punção cardíaca a glicemia foi determinada por método enzimático baseado na reação de Trinder.

As dosagens da uréia e creatinina foram feitas por kit comercial, usando o método de Jaffé para creatinina e o método enzimático colorimétrico para uréia (Berthelot modificado) em aparelho automatizado (HumaStar 80, Human®).

A concentração de proteínas no soro e no plasma foi determinada pelo método de Biureto, enquanto que as concentrações de proteínas em homogeneizados de tecido renal foram determinadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

A concentração de frutossamina foi medida por kit comercial por método cinético (Analisa ®). A concentração de hemoglobina glicada (Hb A1c) foi avaliada por cromatografia de troca iônica, através de kit comercial (Analisa®).

3.9 Hemograma

O sangue foi colhido por punção cardíaca em tubo contendo EDTA e foram realizadas as contagens das séries vermelha, branca e plaquetária dos animais em aparelho SYSMEX KX da Roche®.

3.10 Avaliação da atividade do sistema NADPH oxidase

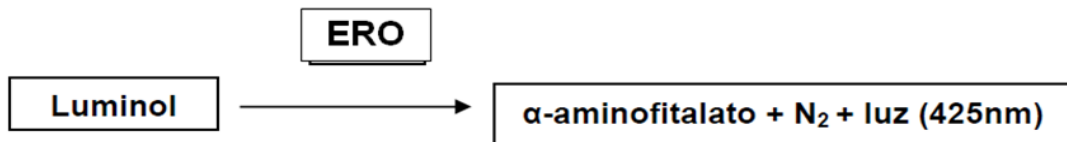
Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio direta e indiretamente produzidas pelo sistema NADPH oxidase utilizamos duas técnicas.

3.10.1 Ensaio da Redução do Citocromo C

A produção de superóxido pelo sistema NADPH oxidase em neutrófilos foi monitorado pela redução do Citocromo C. O ensaio foi realizado em cubeta de plástico de 1 mL contendo 1×10^6 célula, 100 μ M de citocromo C e catalase (20 μ g/mL) em PBS com glicose 10 mM, pH 7,4. As cubetas foram mantidas a 37°C por 10 minutos em espectrofotômetro para equilíbrio do sistema. A produção de superóxido foi iniciada pela adição de PMA (100ng/mL). Após a adição do estímulo a reação foi monitorada em espectrofotômetro por 3 minutos em comprimento de onda de 550 nm (PUNCHARD, 1996).

3.10.2 Quimiluminescência amplificada por Luminol

A intensidade de quimiluminescência foi 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 foi usado 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 como controle, sem células, sem luminol, sem PMA, e com a enzima superóxido dismutase (SOD). Todos os tubos foram lidos separadamente durante 30 minutos no luminômetro e os resultados expressos em RLU/minuto.

3.11 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 (RODRIGUES, et al., 2003).

3.12 Quantificação dos AGEs no soro

Os AGEs são quantificados pela medida da fluorescência como descrito por Zilin et al. (2001). Foi determinada a quantidade de proteínas no soro, pelo método de Biureto. Em seguida pipetou-se 70uL de amostra e seguiu-se a ruptura da membrana por clorofórmio (330uL) e precipitação de proteínas (TCA 0,15M -ácido tricloracético- 1,6 mL) seguida de agitação em vórtex e centrifugação à 12000g por 15min. O espectrofluorímetro foi ajustado nos comprimentos de onda de 350nm (excitação) e 440nm (emissão) com abertura de fenda de 5 nm. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente em cubeta de 1 cm de caminho ótico. Os resultados foram expressos em unidade arbitrária específica dividida pela concentração de proteínas no soro (UA/g proteína) (ALHAMDANI, et al., 2007).

3.13 Preparo das Lâminas Silanizadas

As lâminas foram lavadas com detergente neutro, mantidas em água corrente por 30 minutos e em água destilada por mais 30 minutos, foram então secas e então passaram por uma bateria de banhos:

- a) Água destilada : 15 segundos com 5 mergulhos
- b) Acetona pura : 15 segundos com 5 mergulhos

- c) Acetona pura : 15 segundos com 5 mergulhos
- d) Silano 4% em solução de acetona : 10 segundos
- e) Acetona pura : 15 segundos com 5 mergulhos
- f) Acetona pura : 15 segundos com 5 mergulhos
- g) Água destilada : 15 segundos.

Após a sequência de banhos as lâminas foram postas para secar em estufa (60°C) e armazenadas para o uso.

3.14 Imunodeteção: avaliação das subunidades p67^{phox} e p47^{phox} do sistema NADPH oxidase em neutrófilos

Para detectar a presença do sistema da NADPH oxidase foram realizados ensaios de imunofluorescência usando anticorpo policlonal específico para as subunidades p67^{phox} e p47^{phox} (Millipore) (PINTO, et al., 2007). As células foram coletadas em PBS, centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C e uma gota (20 µL) foi aplicada sobre cada lâmina silanizada. A lâmina foi mantida em câmara úmida por 45 minutos para adesão e logo depois foi incubada com o fixador paraformaldeído comercial 4% por 45 minutos.

As lâminas foram então lavadas com PBS e em seguida incubadas cloreto de amônio 50 mM em PBS por 30 minutos para torná-las permeáveis. Passado esse período as células foram bloqueadas com PGN por 40 minutos e com PGN/saponina por 45 minutos. Em seguida incubamos as lâminas com o anticorpo anti-p67^{phox} e anti-p47^{phox} (1:100) por 1 hora a temperatura ambiente. Lavamos e incubamos as lâminas com conjugado fluorescente (anti-IgG de cabra acoplado a fluoresceína isotiocianato (FITC) (1:100) e DAPI para corar o DNA do núcleo das células durante 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, montamos as lâminas em lamínulas contendo glicerol tamponado com pH alcalino e 0,1% de parafenileno-diamino (PPD), um inibidor do decaimento de fluorescência.

3.15 Análise Histológica

Após obtenção da punção cardíaca e lavado peritoneal os rins foram retirados para análise histológica. Os rins foram lavados em soro fisiológico, abertos longitudinalmente com bisturi e imediatamente fixados em paraformaldeído comercial 4%. O material foi aparado para isolar a área de interesse, região medular, e mantido no fixador por 24 horas. Passado o período de fixação, 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 realizados cortes de 7 μ m em micrótomo *Leica*®, os cortes foram aderidos em lâminas de vidro e corados pelo método Hematoxilina-Eosina, conforme rotina do Laboratório de Histologia e Biologia Celular da UNIFAL-MG. Para análise histológica foram contados 10 campos por lâmina. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico acoplado a um computador pelo sistema de captura de imagens *Digital Sight, NIS-Element BR*®.

3.16 Análise estatística dos dados

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média, de no mínimo três experimentos independentes feitos em duplicata. As análises foram realizadas através de comparações entre os grupos controle, diabético e diabéticos tratados (com AG, AP e AP+AG). Os dados foram analisados por meio de comparações utilizando análise de variância *one way* (ANOVA) e o teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas no programa estatístico *Graph Pad Instat*® (1993) considerando diferença significativa quando $p < 0,01$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos a formação de AGEs no modelo experimental de diabetes induzido por aloxano e a influência destes produtos de glicação sobre alguns parâmetros bioquímicos e sobre a modulação do sistema enzimático da NADPH oxidase. Além disso, bloqueamos a via de AGEs e do sistema NADPH oxidase e verificamos a existência de interrelação entre estas vias.

Para tanto, tratamos ratos Wistar pela via intraperitoneal com 150mg/kg de aloxano. Após a confirmação do DM, iniciou-se o tratamento com água, aminoguanidina (AG), apocinina (AP) ou apocinina+aminoguanidina (AP+AG) por gavagem durante 50 dias. O grupo controle foi composto por animais não diabéticos tratados com água.

Para caracterizar nosso modelo experimental, avaliamos alguns parâmetros, entre eles o peso desses animais no início do experimento e no momento de sacrifício.

4.1 Peso

Durante os cinquenta dias de tratamento, os animais (ratos machos Wistar, com peso de 280 ± 50 g) foram mantidos sob as mesmas condições de luz e temperatura e receberam água e ração comercial *ad libitum*. Como pode ser observado no gráfico abaixo (GRÁFICO 1), os animais não diabéticos apresentaram ganho de peso maior do que os animais diabéticos tratados ou não com os inibidores. O tratamento com os inibidores não alterou o peso final dos animais diabéticos. Diversos trabalhos relatam a associação entre diabetes e diminuição do peso corporal (THALLAS-BONKE, et al., 2008).

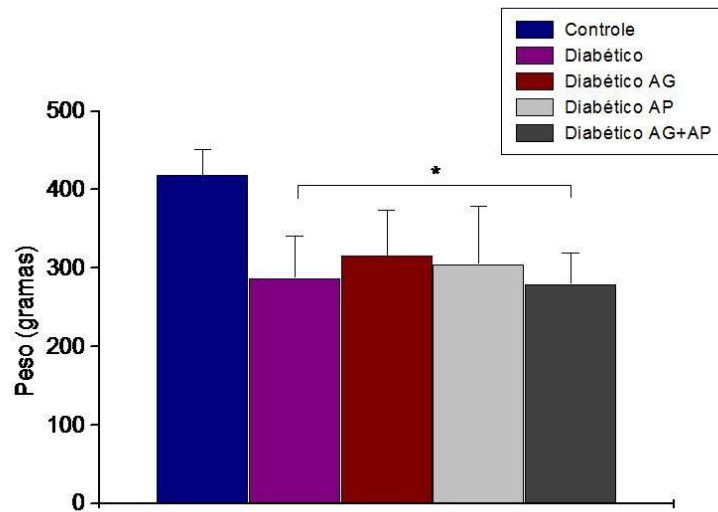


Gráfico 1 - Efeito do estado diabético no peso dos animais dos grupos controle (n=12), diabético sem tratamento (n=12), diabético tratado com AG (n=12), diabético tratado com AP (n=12), diabético tratado com AP+AG (n=12) ao final do experimento. (* $p < 0,01$ vs. grupo controle - Tukey-Kramer).

4.2 Perfil glicêmico

Quanto à glicemia, a análise estatística mostrou que houve diferença entre os animais controle e os diabéticos ($p < 0,01$), e entre os grupos diabético e diabético tratado com aminoguanidina e aminoguanidina associado à apocinina, indicando melhora de índice glicêmico pelo tratamento. Quando analisada a concentração de glicose sanguínea, verificou-se um aumento significativo no grupo diabético quando comparado ao grupo controle, mostrando que a indução do diabetes pelo aloxano foi efetiva.

4.2.1 Dosagem de glicose

A dosagem da glicosúria foi realizada sete dias após indução do diabetes e acompanhada semanalmente a fim de excluir animais com possível reversão do estado diabético ao longo dos dois meses de experimento. A glicemia dos animais foi aferida no momento do sacrifício.

Nossos resultados (GRÁFICO 2) sugerem que houve redução da hiperglicemia nos grupos tratados com AG e AP+AG quando comparados ao grupo diabético tratado com água, entretanto, no grupo tratado apenas com AP não houve redução da glicemia. Thallas-Bonke et al. (2008), obtiveram resultados semelhantes, onde os animais diabéticos apresentaram glicose plasmática cinco vezes superior aos controle, e o tratamento com apocinina não contribuiu para diminuição da glicemia. Os nossos dados sugerem que o efeito de redução da glicemia seja devido apenas à aminoguanidina. A aminoguanidina contém hidrazina em sua estrutura química, inibindo a formação dos AGEs (THORNALLEY, 2003; NASO, et al., 2010).

Como a glicemia indica apenas um estado momentâneo, avaliamos a glicação das proteínas hemoglobina e frutossamina.

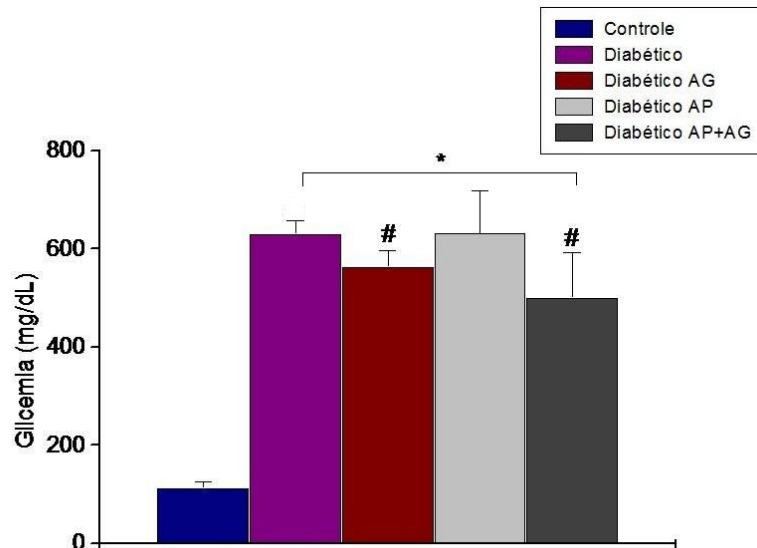


Gráfico 2 - Avaliação da glicemia dos animais dos grupos controle (n=8), diabético sem tratamento (n=12), diabético tratado com AG (n=11), diabético tratado com AP (n=11), diabético tratado com AP+AG (n=12) no momento do sacrifício. (* $p < 0,01$ vs. grupo controle, # $p < 0,01$ vs. grupo diabético - Tukey-Kramer).

4.2.2 Hemoglobina glicada

Para verificar se o tratamento ajudou a prevenir a manutenção prolongada das glicemias dos animais desde a indução do diabetes até o dia do sacrifício, utilizamos a dosagem da hemoglobina glicada, pois a formação da hemoglobina

glicada ocorre de forma irreversível e progressiva no eritrócito e é proporcional aos níveis glicêmicos encontrados no sangue. A hemácia é livremente permeável à molécula de glicose, sendo que a hemoglobina fica exposta às mesmas concentrações da glicose plasmática. Uma vez que a hemoglobina glicada se acumula dentro das hemácias, apresenta, portanto, uma meia-vida dependente das mesmas (PETERSON, et al., 1998). Como pode ser analisado no Gráfico 3, o grupo diabético teve a maior porcentagem de hemoglobina glicada quando comparado ao grupo controle ($p < 0,01$).

A determinação da HbA_{1c} para avaliação da glicemia dos diabéticos é de grande utilidade porque avalia o real quadro glicêmico das últimas 8 a 12 semanas (60 a 90 dias) (BURTIS; ASHWOOD, 2008).

A concentração de hemoglobina glicada (Hb A_{1c}) foi avaliada por cromatografia de troca iônica, através de kit comercial (Analisa®). Os resultados apresentam-se em porcentagem da HbA_{1c} em relação à hemoglobina total como mostrado no gráfico abaixo (GRÁFICO 3).

O método preconizado para dosagem de HbA_{1c} pelo NGSP (*National Glycohemoglobin Standardization Program*) é por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Aqui, utilizamos a cromatografia de resina de troca catiônica, pois este método apresentou um intervalo de confiança de 95% quando comparado ao HPLC, segundo o fabricante.

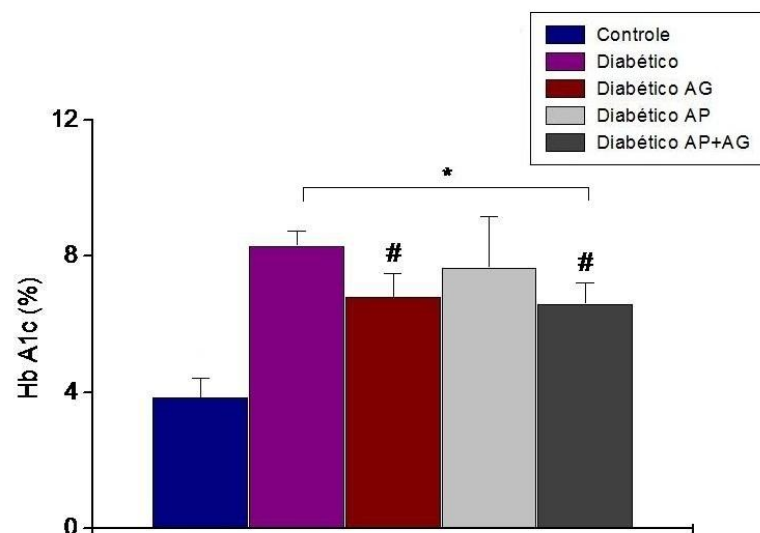


Gráfico 3- Porcentagem da Hb A_{1c} nos grupos controle (n=8), diabéticos sem tratamento (n=10), diabéticos tratados com AG (n=7), diabéticos tratados com AP (n=6), diabéticos tratados com AP+AG (n=6). (* $p < 0,01$ vs. grupo controle, # $p < 0,01$ vs. grupo diabético - Tukey-Kramer).

Como se pode observar, os animais que receberam somente AG ou AP+AG tiveram redução da glicação da hemoglobina, quando comparados aos diabéticos e os diabéticos tratados apenas com apocinina. Não houve reversão ao estado controle, mas os níveis encontraram-se diminuídos.

Diversos estudos têm utilizado a mensuração de produtos de glicação no soro ou nos tecidos de diabéticos para avaliar o risco de progressão da doença. Os dois parâmetros mais utilizados são a hemoglobina glicada (HbA1c) e as proteínas glicadas ou frutossaminas (YONEKURA, et al., 2003). Entretanto, trabalhos que analisaram a hemoglobina glicada em animais diabéticos tratados com aminoguanidina não encontraram diferença entre os animais diabéticos e em tratamento com aminoguanidina (KELLY, et al., 2001; STOPPA, et al., 2006). As possíveis causas podem ser o tempo ou o tipo de tratamento. Neste trabalho nós tratamos os animais por um intervalo de tempo maior (50 dias), para possibilitar a glicação da hemoglobina. E, além disso, o tratamento por gavagem garantiu que todos os animais recebessem a mesma quantidade da droga. Os trabalhos publicados utilizam o método de tratamento com aminoguanidina na água de beber, isso pode influenciar na quantidade de droga ingerida.

Nos animais tratados com apocinina não foi observada diferença, isto está condizente com a literatura (THALLAS-BONKE, et al., 2008). Não há relatos na literatura, até o momento, de tratamento com AP+AG *in vivo*, e, como pode ser observado, a redução da hemoglobina glicada foi equiparada ao grupo tratado com aminoguanidina.

Como a hemoglobina glicada pode ser influenciada por estados anêmicos, foi realizado o hemograma dos animais (TABELA 1) para verificar se a indução do diabetes, ou os tratamentos modificaram o eritrograma destes animais.

Tabela 1 - Eritrograma e contagem de leucócitos (n=8)

| Média (\pm DP) | Hemácias (10^6) | Hemoglobina (mg/dL) | Hematócrito(%) | Leucócitos |
|-------------------|---------------------|---------------------|-------------------|--------------------|
| Controle | 9,0 (\pm 0,4) | 16,0 (\pm 0,6) | 48,4 (\pm 2,1) | 4180 (\pm 1403) |
| Diabético | 8,8 (\pm 0,5) | 15,5 (\pm 0,7) | 50,8 (\pm 2,3) | 3670 (\pm 2411) |
| D. Aminoguanidina | 8,0 (\pm 0,6) | 14,8 (\pm 0,8) | 46,1 (\pm 2,6) | 4238 (\pm 1881) |
| D. Apocinina | 8,7 (\pm 0,4) | 15,4 (\pm 0,8) | 49,3 (\pm 2,6) | 4678 (\pm 2014) |
| D. AP+AG | 8,4 (\pm 0,4) | 14,9 (\pm 0,7) | 50,9 (\pm 3,0) | 3750 (\pm 2011) |

O sangue foi colhido por punção cardíaca em tubo contendo EDTA e foram realizados eritograma e leucograma dos animais. Como pode-se observar na tabela 1, a média dos parâmetros do grupo diabético pouco se diferenciou das médias dos grupos tratados. O tratamento não modificou a contagem dos leucócitos dos animais (ANOVA). Para nos certificar que não houve interferência da hemoglobina, dosamos frutossamina, a qual não é alterada por alterações da hemoglobina total.

4.2.3 Frutossamina

É o nome genérico dado a todas as proteínas séricas glicadas (principalmente a albumina). Este teste mensura a glicação de proteínas, resultante da interação da glicose plasmática e a lisina, presente na molécula de albumina e de outras proteínas. Como a albumina, maior componente da frutossamina, tem meia-vida curta, cerca de 2 a 3 semanas, o teste da frutossamina reflete o controle glicêmico de curto prazo. A utilidade clínica do teste de frutossamina não está bem estabelecida, sendo esse recurso, geralmente, recomendado em situações nas quais o teste de HbA_{1c} apresente algum problema. Além disso, não há estudos demonstrando a utilidade do teste como marcador do desenvolvimento de complicações relacionadas ao diabetes (COHEN, et al., 2003). Como pode ser observado no Gráfico 4, houve diferença ($p < 0,01$) entre os grupos diabéticos comparados ao controle, e, como esperado, o tratamento com aminoguanidina foi capaz de diminuir a glicação proteica ($p < 0,01$) durante o tratamento. Os animais tratados com AP+AG também tiveram diminuição na frutossamina ($p < 0,01$). Entretanto, não houve redução da frutossamina no grupo tratado somente com apocinina.

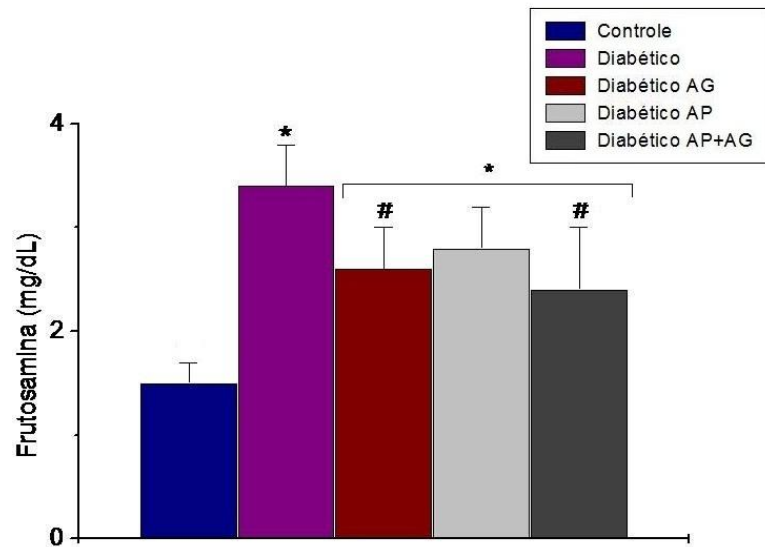


Gráfico 4 - Avaliação da Frutosamina nos animais dos grupos controle (n=8), diabéticos sem tratamento (n=10), diabéticos tratados com AG (n=8), diabéticos tratados com AP (n=8), diabéticos tratados com AP+AG (n=8). (* $p < 0,01$ vs. grupo controle, # $p < 0,01$ vs. grupo diabético - Tukey-Kramer).

4.3 Avaliação da formação e inibição dos AGEs

Há entre os AGEs compostos naturalmente fluorescentes, como por exemplo a pentosidina e argipiridina (LYONS, et al., 1991). Essa fluorescência de AGEs foi avaliada no soro conforme descrito previamente.

Como pode-se observar no gráfico abaixo (GRÁFICO 5) houve diferença nos níveis de fluorescência entre os grupos controle, diabéticos não tratados e os diabéticos tratados com AG e AP+AG ($p < 0,01$), sendo que os animais diabéticos não tratados apresentaram os maiores índices de fluorescência, indicando maior concentração de AGEs. Nossos resultados, demonstram que o tratamento com AG preveniu da formação dos AGEs.

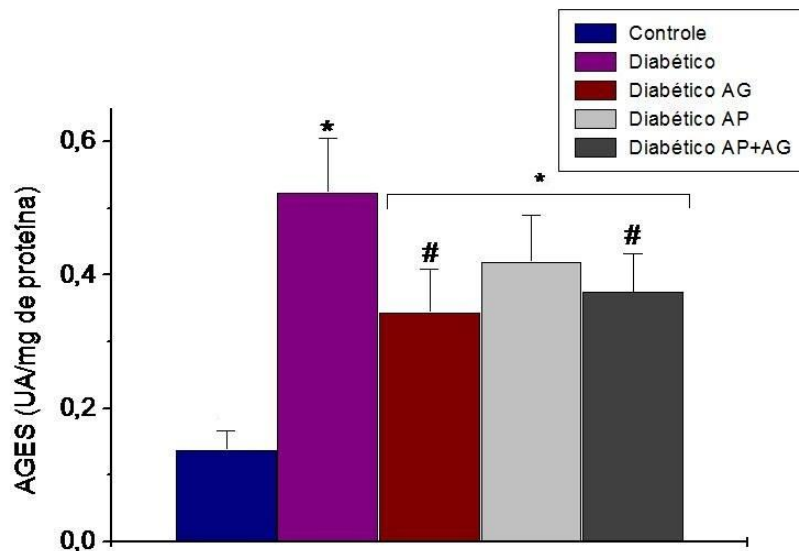


Gráfico 5 - Fluorescência de AGEs no soro dos grupos controle (n=8), diabéticos sem tratamento (n=9), diabéticos tratados com AG (n=8), diabéticos tratados com AP (n=9), diabéticos tratados com AP+AG (n=8). (*p<0,01 vs. grupo controle, # p<0,01 vs. grupo diabético - Tukey-Kramer).

Os níveis circulantes dos AGEs fluorescentes foram aumentados significativamente pelo diabetes, entretanto não foram afetados pelo tratamento com apocinina. O mesmo resultado também foi encontrado por Thallas-Bonke e col. quando analisaram AGEs não fluorescentes (THALLAS-BONKE, et al., 2008).

O fato do grupo tratado com apocinina não apresentar redução na formação dos AGEs, nos leva a supor que, provavelmente, não há interrelação (*cross-talk*) entre as vias do sistema da NADPH oxidase e a formação de AGEs, no nosso modelo experimental.

A apocinina inibe a translocação da p47^{phox} para membrana celular, impossibilitando a montagem do sistema (FIGURA 7), diminuindo a formação de ânions superóxido. É esperada também uma diminuição de outras ERO, uma vez que elas se formam a partir do ânion superóxido (WILLIAMS e GRIENGLING, 2007; OLUKMAN, et al., 2010; STEFANSKA, et al., 2010; WINIARSKA, et al., 2010).

No grupo tratado com AP+AG houve uma redução dos AGEs comparados ao grupo diabético. Este resultado foi semelhante ao encontrado no grupo tratado somente com AG. Como o grupo tratado somente com a apocinina não apresentou diferença com o grupo diabético sem tratamento, podemos supor que o que vemos no Gráfico 5 é somente o efeito da aminoguanidina.

Dados de literatura indicam que ratos diabéticos quando tratados com inibidores da formação de AGES apresentam correção de disfunções ao nível de células endoteliais e redução do infiltrado celular inflamatório implicando, assim, a via da glicação não enzimática como importante ao que se refere às complicações diabéticas (XIAO, et al., 2009).

4.4 Dano Renal

O rim é o principal alvo dos danos mediados por AGEs, tendo em vista que representa o maior sítio de clearance destes produtos (LAPOLLA, et al., 2005). Inúmeras funções são executadas pelos rins. Eles atuam na manutenção do equilíbrio ácido-básico; regulam a produção de eritrócitos; atuam na regulação do volume sanguíneo, da pressão arterial, e no nível de glicose do sangue (BURTIS; ASHWOOD, 2008). Por essa razão investigamos o efeito do DM e dos AGEs nos rins.

4.4.1 Uréia e Creatinina

A uréia é o principal produto do metabolismo protéico. É sintetizada no fígado a partir de CO_2 e amônia, circula no sangue e é filtrada nos rins, sendo que a maior parte é excretada na urina. Por ser mais sensível a alterações primárias das condições renais, é um marcador que tem forte importância em casos que envolvam esta condição (BURTIS; ASHWOOD, 2008). Entretanto, não é tão específica para avaliação da função renal como a creatinina, uma vez que é influenciada pelo grau de hidratação e da dieta do indivíduo.

A creatinina é um produto da degradação da fosfocreatina no músculo, é, geralmente, produzida em uma taxa constante, sendo diretamente proporcional à massa muscular. Ela avalia o ritmo de filtração glomerular, uma vez que sua concentração no sangue aumenta à medida que a taxa de filtração renal é reduzida (BURTIS; ASHWOOD, 2008).

As determinações da uréia e creatinina foram realizadas no soro através de kit comercial por método colorimétrico.

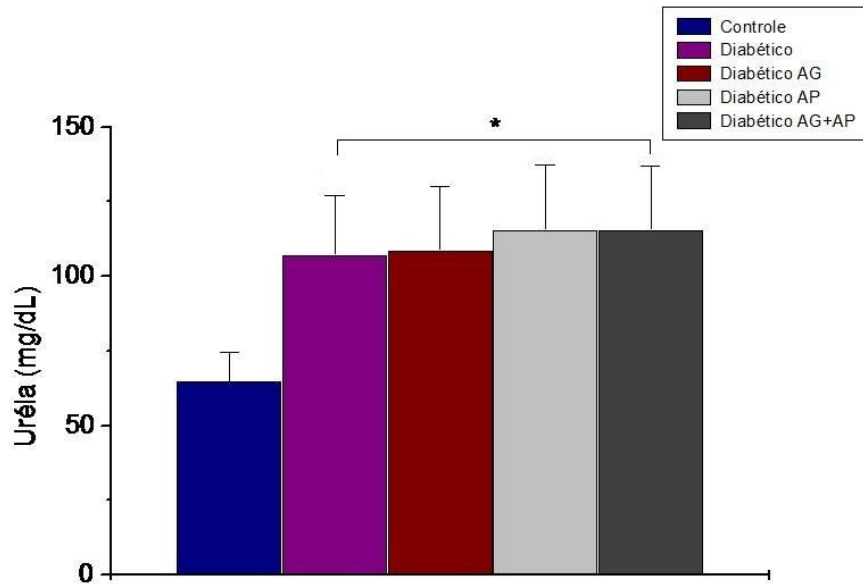


Gráfico 6 - Uréia dos animais controles (n=8), diabéticos sem tratamento (n=9), diabéticos tratados com AG (n=9), diabético tratado com AP (n=11), diabético tratado com AP+AG (n=12). (* $p < 0,01$ vs. grupo controle - Tukey-Kramer).

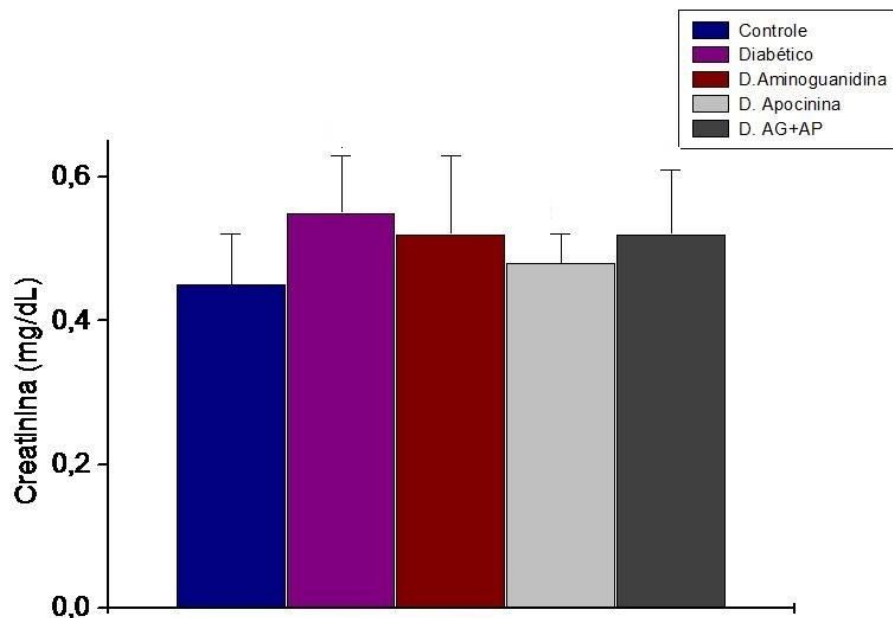


Gráfico 7 - Creatinina dos animais controles (n=8), diabéticos sem tratamento (n=9), diabéticos tratados com AG (n=9), diabético tratado com AP (n=11), diabético tratado com AP+AG (n=12).

Pode-se observar nos Gráficos 6 e 7 que houve diferença significativa entre os níveis de uréia no soro dos animais controles e animais diabéticos, submetidos ou não aos tratamentos ($p < 0,01$). O tratamento com a AG, AP ou AP+AG não influenciou nos níveis de uréia e creatinina. Os valores dos níveis de creatinina entre os grupos não foi diferente.

4.4.2 Histologia

A disfunção renal associada ao diabetes reflete o comportamento disfuncional de cada um dos principais tipos de células do glomérulo (podócitos, endotélio capilar e células mesangiais) (MCCARTY, 2006). A expansão de matriz mesangial glomerular e o espessamento da membrana basal dos capilares glomerulares são manifestações precoces e clássicas da nefropatia diabética (SCHAAN, 2003).

Para avaliar o dano causado pelo estado diabético e os tratamentos realizados, foram confeccionadas lâminas do rim para análise histológica por microscopia óptica, conforme protocolo descrito anteriormente.

O sistema renal é formado por um conjunto de estruturas histológicas responsáveis pelos mecanismos de filtrações glomerulares e tubulares. O glomérulo renal é constituído por uma rede de capilares fenestrados, sem diafragma, oriundos da arteríola aferente e pela cápsula de *Bowman* contendo dois folhetos, visceral e parietal. Esse último é formado por células epiteliais planas que limitam o espaço capsular onde se acumula o filtrado glomerular (FIGURA 10.a, seta 1).

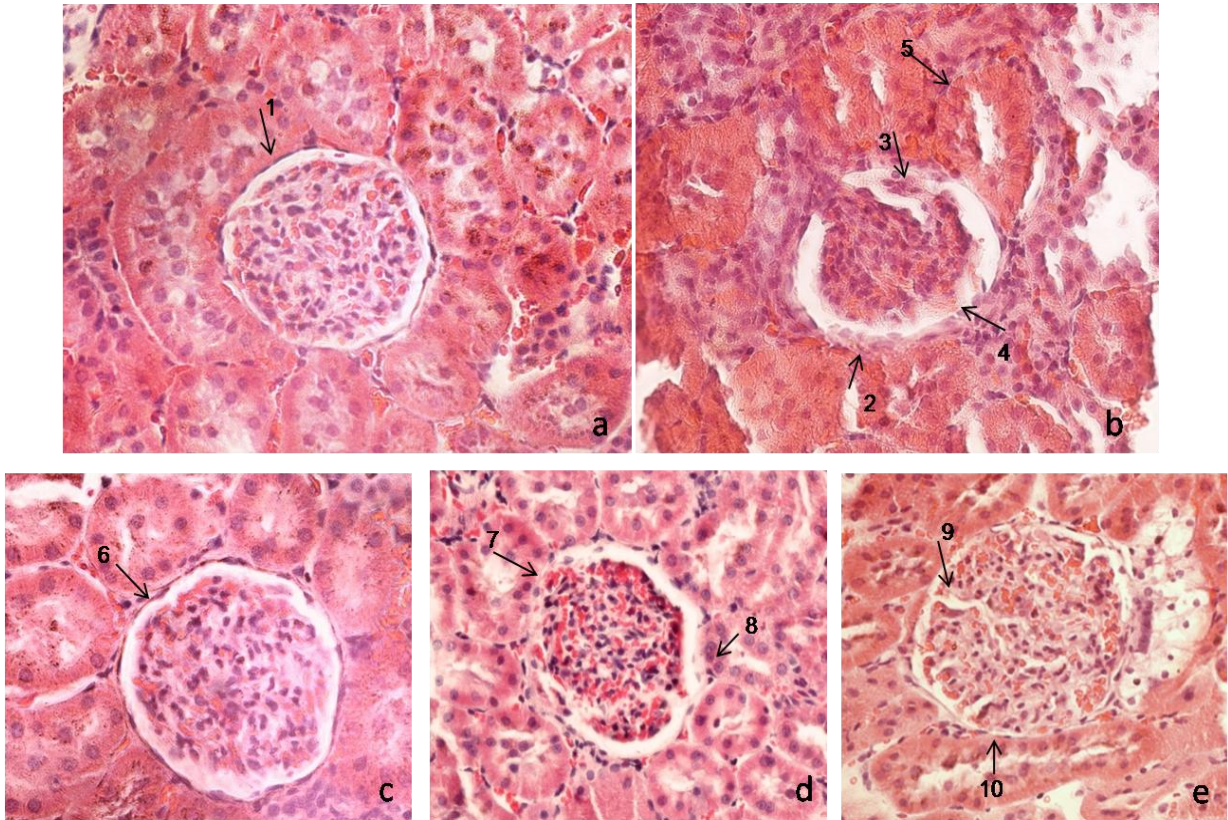


Figura 10 - Corte Histológico da zona medular renal de ratos Wistar, em aumento de 40x, corados por Hematoxilina-Eosina. Glomérulos representativos de 10 campos por lâmina de cada animal.

- a) Glomérulo de animal controle,
- b) Glomérulo de animal diabético,
- c) Glomérulo de animal tratado com aminoguanidina,
- d) Glomérulo de animal tratado com apocinina,
- e) Glomérulo de animal tratado com apocinina e aminoguanidina.

A cápsula de *Bowman* é revestida por uma camada simples de células pavimentosas (FIGURA 10.a, seta 1), porém, nos animais diabéticos não tratados (FIGURA 10.b, seta 4) observamos o espessamento do espaço de *Bowman*, com alteração na morfologia celular nesta região, devido a presença de mais de uma camada celular (FIGURA 10.b, seta 2). Pode ser visualizado (FIGURA 10.b setas 3 e 4) a presença de material amorfo no espaço de *Bowman*, que geralmente é preenchido apenas por ultra-filtrado de plasma. A maior parte dos glomérulos desses animais apresentava-se com acentuada lobulação (aspecto de folhas de trevo) (FIGURA 10.b). Esse aumento da lobulação é um indicativo da ocorrência de glomerulonefrite de classe 1 segundo a classificação de *Banff* (OSTERBY, et al., 1987; WHITE, BILOUS, 2000). Além disto, notou-se um desarranjo na estrutura dos túbulos renais (FIGURA 10.b, seta 5). Esses resultados corroboram com dados da literatura que relatam a predominância de lesões secundárias ao diabetes mellitus

nos glomérulos, bem como nos túbulos e interstício renal (VAZIRI, et al., 2003; XIAO, et al., 2009).

Nos animais tratados com aminoguanidina (FIGURA 10.c, seta 6) não se verificou a presença de alterações estruturais nos glomérulos e túbulos. Esses resultados são condizentes com trabalhos que mostram que a administração de aminoguanidina em ratos diabéticos reduz AGEs e limita alterações estruturais e funcionais nos tecidos (KELLY, et al., 2001). Neste sentido, também foi demonstrado que a aminoguanidina teve um efeito protetor contra necrose do túbulo renal, edema intracelular, redução da cápsula de *Bowman* e, provavelmente, diminuição da filtração glomerular (POLAT, et al., 2006). Apesar de já ter sido descrito propriedades nefrotóxicas para a aminoguanidina, na dose e no tempo administrados neste estudo, não observamos este efeito (PHILIS-TSIMIKAS, et al., 1995; SKAMARAUSKAS, et al., 1996)

Quando analisamos o grupo diabético tratado com apocinina (FIGURA 10.d) verificamos a presença de alargamento glomerular (FIGURA 10.d, seta 7) e início de lobulação glomerular (FIGURA 10.d, seta 8), tais como observado em outros trabalhos (THALLAS-BONKE, et al., 2008; SOO MIN, et al., 2009).

Nos diabéticos, inúmeros fatores interagem para aumentar a atividade da NADPH oxidase mesangial, como o aumento de síntese de novo de diacilglicerol - refletindo a exposição a níveis elevados de glicose e ácidos graxos livres - resulta em aumento da atividade de determinadas isoformas da proteína quinase C (PKC), mais notadamente PKC-beta (KOYA, KING 1998; TUTTLE, ANDERSON, 2003). A PKC estimula a atividade NADPH oxidase através da fosforilação da p47^{phox} e p67^{phox}, induzindo migração para a membrana plasmática e montagem do sistema enzimático NADPH (KITADA, et al., 2003).

McCarty (2006) relata que o aumento da atividade da NADPH oxidase mesangial pode ser atribuída a uma série de mecanismos de interação - ativação da PKC, regulação local da atividade da angiotensina II, a estimulação de receptores RAGE, e (possivelmente) aumento de estiramento cíclico. Presumivelmente, esses vários mecanismos ativam a NADPH oxidase de formas distintas, mas complementares, levando à hiperatividade substancial desta enzima (McCARTY, 2006). Asaba et al. (2005) mostrou que a apocinina reduz a proteinúria e retardada a expansão mesangial nos ratos diabéticos tipo 1 durante o período de 4-8 semanas (ASABA, et al., 2005). Volumes glomerulares diminuídos em ratos diabéticos foram

comparados com ratos tratados com apocinina. A hipertrofia renal é considerada como a característica precoce de nefropatia diabética que acaba levando a proteinúria e fibrose renal (LIU, et al., 2006). Thallas-Bonke et al (2008) em estudo *in vivo*, mostraram um aumento na geração de superóxido citosólico renal, que é amenizada pela apocinina, indicando um papel para NADPH oxidase. Isso foi visto no contexto do aumento de expressão da subunidade p47^{phox} da NADPH oxidase glomerular em rins de animais diabéticos, que foi melhorado pelo tratamento com apocinina. De fato, estudos anteriores em aortas de roedores têm mostrado que superóxido vascular é normalizado por um inibidor da PKC e que a principal fonte de superóxido foi proveniente da NADPH oxidase (HEITZER, et al., 1999).

Na Figura 10.e observamos que os glomérulos dos animais tratados com AP+AG apresentaram alterações estruturais mais discretas do que o animal diabético sem tratamento, houve um discreto desarranjo na estrutura do glomérulo (FIGURA 10.e, seta 9). Provavelmente, a aminoguanidina é a responsável pelo efeito que observamos neste grupo (AP+AG), pela semelhança com o grupo AG. Não foram encontrados trabalhos na literatura avaliando o efeito na estrutura renal de animais com ambos os tratamentos simultaneamente.

É interessante notar que nossos resultados indicam que tanto o acúmulo de AGEs nos tecidos como circulantes não são afetados pela NADPH oxidase, neste modelo, uma vez que a apocinina não atenuou o aumento dos parâmetros induzidos pelo diabetes.

Neste trabalho avaliamos a modulação do sistema NADPH oxidase, através da medida de atividade enzimática e marcação das subunidades p47^{phox} e p67^{phox} por imunofluorescência.

4.5 Modulação do Sistema da NADPH oxidase

Conforme já foi descrito, o sistema enzimático NADPH oxidase é formado por componentes que se encontram dissociados na célula em repouso. Os componentes citosólicos são as proteínas p40^{phox}, a p47^{phox} e a p67^{phox} e o componente de membrana, o citocromo b₅₅₈, composto pelas proteínas p22^{phox} e NOX2 (também conhecida como gp91^{phox}), além de outras proteínas de baixo peso molecular: a Rac

1 e 2 e Rap1a (BOKOCH, KNAUS 2003; ROOS, et al., 2003; GUICHARD, et al., 2008) (FIGURA 4).

Como o sistema NADPH oxidase é ativado via fosforilação da $p47^{\text{phox}}$ e $p67^{\text{phox}}$ (KITADA, et al., 2003), avaliamos a presença destas subunidades por imunofluorescência no nosso modelo.

4.5.1 Imunodeteção das subunidades $p47^{\text{phox}}$ e $p67^{\text{phox}}$ do sistema NADPH oxidase

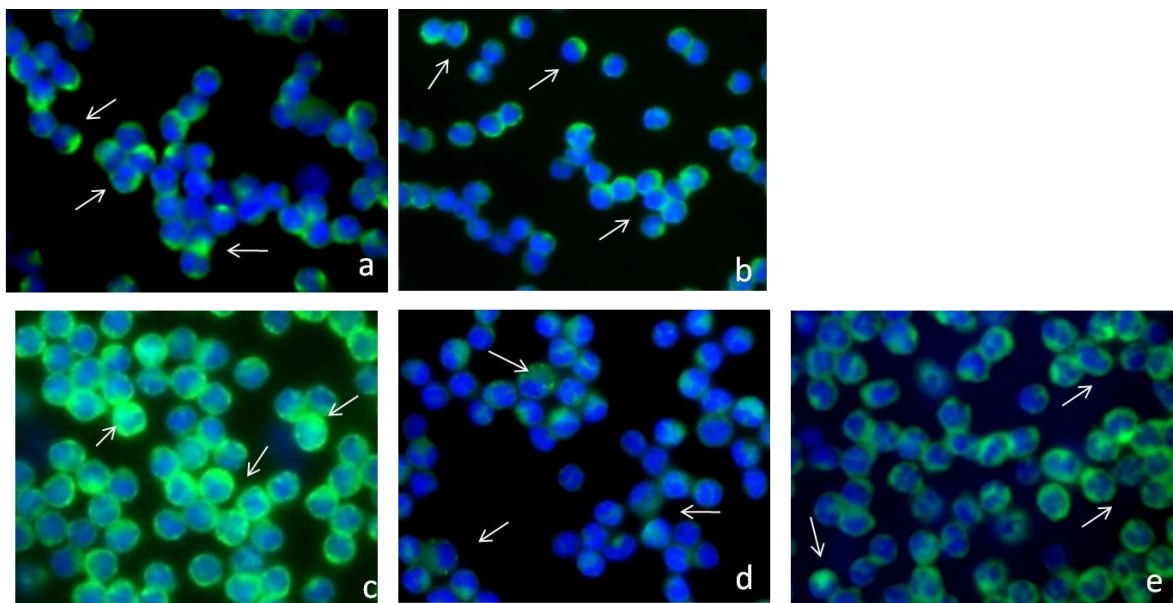


Figura 11 - Imunodeteção de $p47^{\text{phox}}$ em neutrófilos de peritônio de ratos Wistar. As figuras representam 10 campos diferentes. Para a imunofluorescência da $p47^{\text{phox}}$ foi utilizado anticorpo primário anti- $p47^{\text{phox}}$ (1:50) e secundário específico (1:50) marcado com FITC que fluoresce em 518 nm (verde). O núcleo foi marcado com DAPI (azul). Aumento de 100x em imersão.

- a) Neutrófilos do grupo controle,
- b) Neutrófilos do grupo diabético,
- c) Neutrófilos do grupo diabético tratado com aminoguanidina,
- d) Neutrófilos do grupo diabético tratados com apocinina
- e) Neutrófilos do grupo diabético tratados com AP+AG.

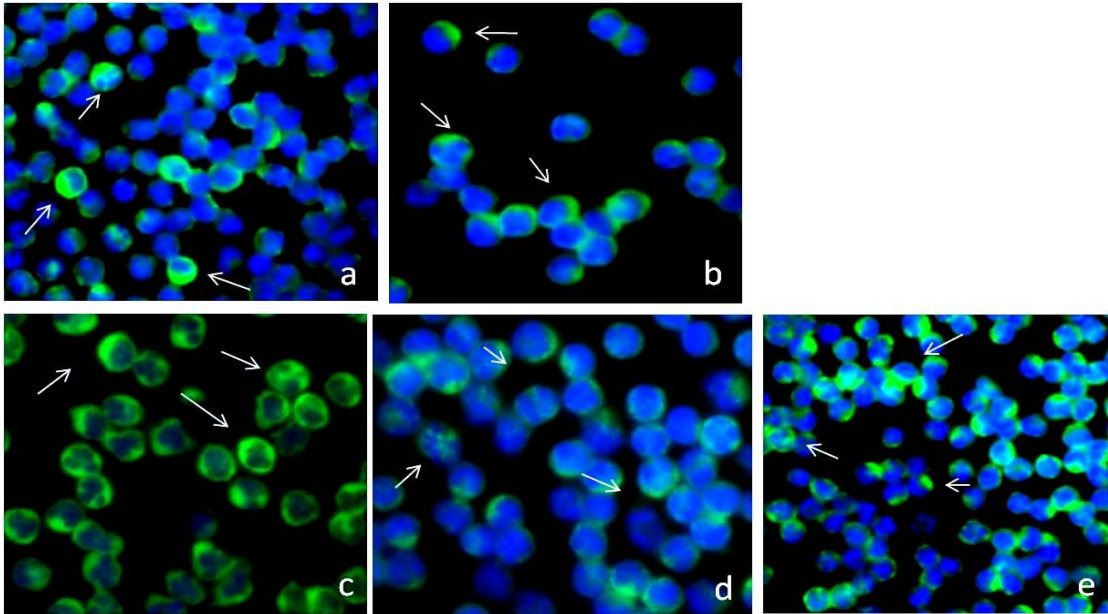


Figura 12 - Imunodeteção da p67^{phox} em neutrófilos de peritônio de ratos Wistar. As figuras representam 10 campos diferentes. Para a imunofluorescência da p67^{phox} foi utilizado anticorpo primário anti-p67^{phox} (1:50) e secundário específico (1:50) marcado com FITC que fluoresce em 518 nm (verde). O núcleo foi marcado com DAPI (azul). Aumento de 100x em imersão.

- a) Neutrófilos do grupo controle,
- b) Neutrófilos do grupo diabético,
- c) Neutrófilos do grupo diabético tratado com aminoguanidina,
- d) Neutrófilos do grupo diabético tratados com apocinina
- e) Neutrófilos do grupo diabético tratados com AP+AG.

Aqui, neutrófilos foram recolhidos do peritônio de ratos e aderidos em lâminas silanizadas, onde receberam o tratamento com anticorpos específicos. É possível notar que a marcação tanto da subunidade p47^{phox} (FIGURA 11) quanto da p67^{phox} (FIGURA 12) do sistema NADPH oxidase nos animais diabéticos é semelhante aos animais controle. Podemos verificar que nos animais tratados com AG a marcação está bem mais intensa, enquanto que nos animais tratados com a apocinina, a marcação é mais discreta. O grupo tratado com AP+AG teve uma marcação mais semelhante ao grupo tratado com a AG. Por este tipo de experimento, só podemos observar a presença da proteína e a sua distribuição na célula. Aparentemente, as subunidades estão dispersas no citosol em todos os grupos, exceto no grupo tratado com a apocinina, que está presente em menor quantidade, mas de forma mais pontual (FIGURA 11.d e 12.d). Acreditamos que essa localização deve ser importante para a função destas proteínas. Fizemos uma busca na literatura e não encontramos uma explicação para este aumento na marcação das subunidades p47^{phox} e p67^{phox} no grupo tratado com a aminoguanidina.

Verificamos a atividade do sistema NADPH oxidase em neutrófilos peritoneais.

4.5.2 Atividade de NADPH oxidase

Os neutrófilos são células fagocíticas extremamente importantes na defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores e partículas estranhas. Após estimulação o neutrófilo é capaz de produzir um metabolismo oxidativo, não mitocondrial, referido na literatura como “burst” oxidativo ou respiratório.

O “burst” oxidativo é decorrente da ativação do sistema NADPH oxidase através da redução de oxigênio molecular por elétrons provenientes do NADPH acarretando a produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). O ânion superóxido tem pouca atividade microbicida, entretanto origina ERO mais potentes (Winterbourn, Vissers et al., 2000). A ativação do sistema enzimático NADPH oxidase é induzida *in vivo* por bactéria e imunocomplexos e *in vitro* por estímulos opsonizados e pelo mitógeno PMA, que ativa o sistema por estimulação indireta de PKC (BABIOR, 1999).

Quando os neutrófilos são ativados, as ERO geradas podem, via oxidação, converter moléculas como o luminol a derivados intermediários instáveis e excitados, que quando retornam ao seu estado fundamental emitem luz na forma de fótons. Esta produção de luz, durante a reação química, é conhecida por quimiluminescência e é uma das características do *burst* oxidativo, podendo ser um indicador da ativação do metabolismo oxidativo. Desta forma, o luminol tem sido utilizado para avaliar a produção de ERO durante a estimulação dos neutrófilos (GASBARRINI, et al., 1998). Aqui nós avaliamos a produção de ânion superóxido através do ensaio de redução do citocromo C (GRÁFICO 8) e o “pool” de ERO foi monitorado por quimiluminescência (GRÁFICO 9 e 10).

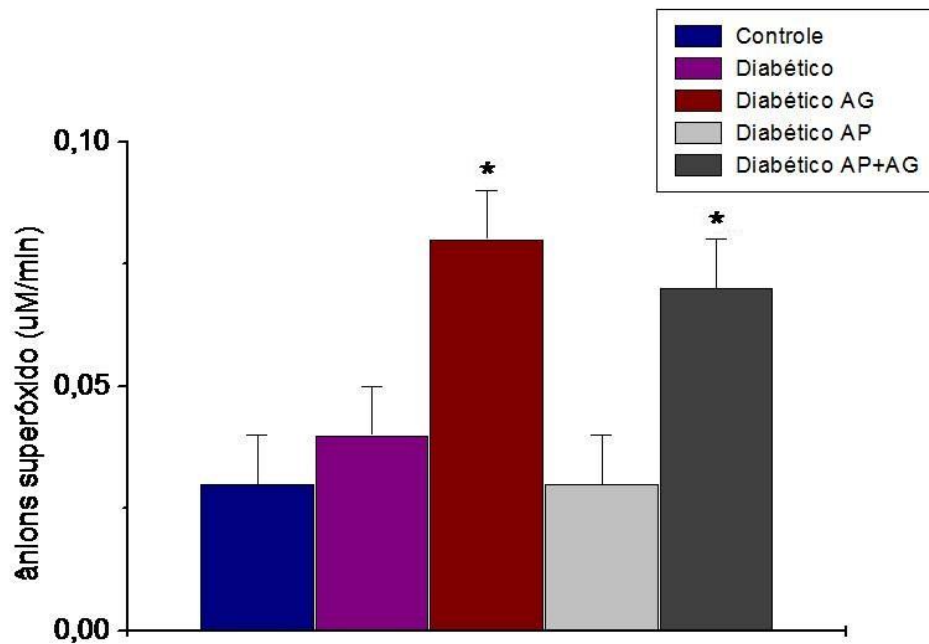


Gráfico 8- Redução do Citocromo C em neutrófilos de peritônio de animais controle (n=7), diabéticos sem tratamento (n=6), diabéticos tratados com AG (n=5), diabéticos tratado com AP (n=6) e diabético tratado com AP+AG (n=5). (*p<0,01 vs. grupo controle e diabético - Tukey-Kramer).

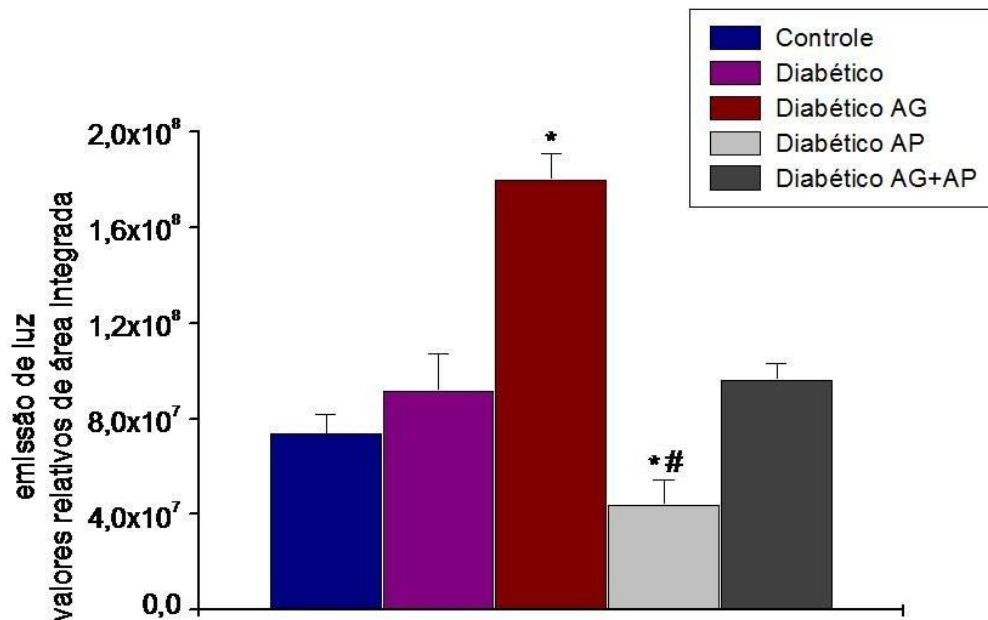


Gráfico 9 - Avaliação do *Burst* Oxidativo por quimiluminescência. Valores da média \pm desvio padrão da área integrada de emissão de luz obtido de neutrófilos de peritônio de ratos. Grupos: controle (n=4), diabéticos sem tratamento (n=4), diabéticos tratados com AG (n=4), diabéticos tratados com AP (n=4) e diabéticos tratados com AP+AG (n=5). (*p<0,01 vs. grupo controle, # p<0,01 vs. grupo AG - Tukey-Kramer).

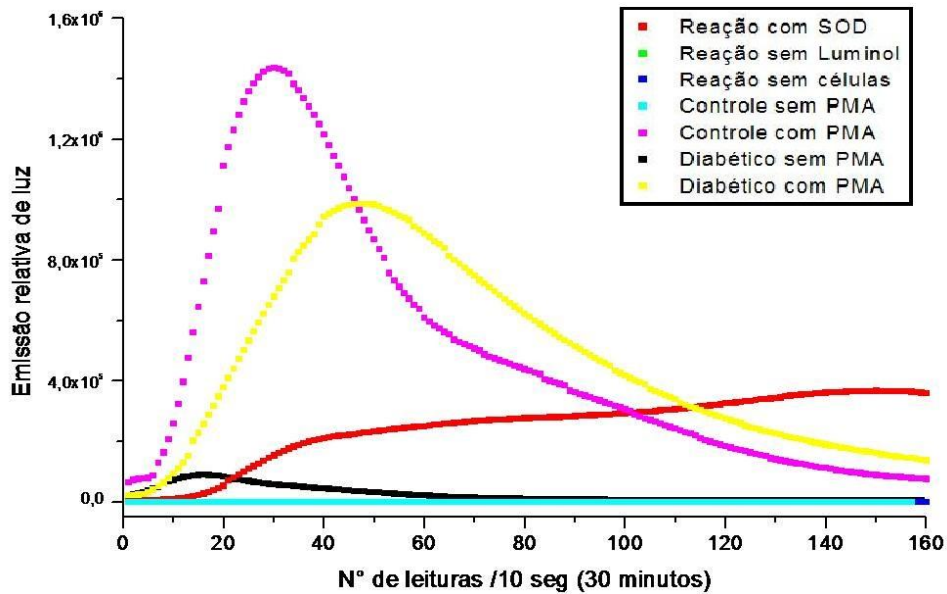


Gráfico 10 - Cinética de emissão de luz obtidas quando neutrófilos peritoneais (1×10^6 células/ensaio) de ratos Wistar foram incubados com luminol (1mM) e PMA (16 ng/ensaio). Representativo de três experimentos.

A produção de ânion superóxido, que reflete a atividade do sistema NADPH oxidase, não foi diferente entre os grupos controle e diabético, como pode ser observado no Gráfico 8. Da mesma forma, quando consideramos o “pool” de geração de ERO, o grupo controle é semelhante ao grupo diabético (GRÁFICO 9). Entretanto, quando observamos o Gráfico 10, podemos notar que: 1) a cinética de produção de ERO pelos neutrófilos do grupo diabético é diferente do grupo controle. Pela análise da área integrada de emissão de luz (GRÁFICO 9), a mesma quantidade de ERO está sendo formada, mas quando observamos a cinética de produção de ERO (GRÁFICO 10), o grupo diabético, aparentemente, tem uma resposta mais tardia ao estímulo PMA; e 2) que neutrófilos de ratos diabéticos foram capazes de produzir uma pequena quantidade de ERO mesmo sem a adição de PMA, ao contrário de neutrófilos de ratos controle, que praticamente não produziram ERO.

Inoguchi et al. (2000) demonstraram, em cultura de células endoteliais, que a produção de ERO por células expostas a altos níveis de glicose é semelhante ao de células estimuladas com PMA. Isto pode ser devido a uma maior concentração de DAG intracelular, resultando numa maior translocação da PKC para a membrana e,

conferindo, com isso, uma maior sensibilidade à estimulação da PKC nos neutrófilos de diabéticos.

No nosso modelo, a diferença observada tanto na resposta ao PMA, quando a diferença entre o grupo diabético e controle sem a adição do PMA, pode ser reflexo da hiperglicemia crônica, uma vez que os animais permaneceram num estado hiperglicêmico por cerca de 50 dias ou pelo aumento dos produtos de glicação avançada nos animais diabéticos (GRÁFICO 5). Já foi descrito que a hiperglicemia ou mesmo a presença dos produtos finais de glicação podem levar os neutrófilos a um estado persistente de ativação, o que induz a ativação espontânea de cadeia oxidativa, podendo tornar estas células menos responsivas a estímulos (ROOS, et al., 2003). Também já foi descrito que existem alterações fisiológicas que prejudicam a resposta imunológica e inflamatória em pacientes diabéticos, aumentando a susceptibilidade às infecções (HOTAMISLIGIL, 2006). Aqui, nós observamos que a quantidade de ERO é semelhante, entretanto o perfil de liberação destas ERO é diferente, o impacto disso pode ser uma célula menos responsiva a patógenos. Dados do nosso laboratório mostraram que a atividade de fagocitose e *killing* de *C.albicans* por neutrófilos de animais diabéticos são consideravelmente prejudicadas em relação à de neutrófilos de animais não diabéticos. Os neutrófilos de animais diabéticos necessitam do dobro do tempo para fazer a fagocitose e o *killing* da mesma quantidade de leveduras que os animais controle (dados não mostrados).

Surpreendentemente, o grupo tratado com aminoguanidina apresentou uma produção maior de ERO do que os grupos controle e diabético (GRÁFICO 8 e 9). Pelos parâmetros avaliados aqui, não podemos afirmar que este efeito seja devido ao bloqueio de uma via de formação de AGEs ou um efeito isolado da aminoguanidina. Uma vez que dados da literatura demonstraram que a aminoguanidina, dependendo das condições, pode funcionar de maneira dúbia, tanto como antioxidante, quanto pró-oxidante (PHILIS-TSIMIKAS, et al., 1995). A aminoguanidina, é também utilizada para inibir a atividade da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (SLIMAN, et al., 2010). Entretanto, neste trabalho, não avaliamos a formação de ERN.

O aumento na produção de ERO observado no grupo tratado com AG poderia ser indício de uma melhora da capacidade de defesa dos neutrófilos. É conhecido que a produção de ERO pela NADPH oxidase, em pequenas quantidades, pode funcionar na sinalização metabólica, tendo um efeito benéfico e, em grandes

quantidades pode ultrapassar o limiar fisiológico, causando danos às células (EDELSTEIN, BROWNLEE, 1992). Nós observamos durante o experimento, que os animais do grupo tratado com a AG aparentavam um estado geral melhor do que os animais diabéticos não tratados ou tratados com AP, embora isto não tenha refletido no peso final destes animais (GRÁFICO 1). Neste sentido, o perfil glicêmico e análise histológica dos rins também mostraram uma melhora no quadro dos animais tratados com AG quando comparados com os animais diabéticos sem tratamento.

Conforme esperado, o grupo tratado com apocinina, inibidor do sistema NADPH oxidase, apresentou uma diminuição da produção ERO (cerca de 40%) (GRÁFICO 9). A apocinina tem sido usada como um eficiente inibidor do sistema NADPH oxidase. Ela impede a migração da subunidade $p47^{\text{phox}}$, componente citosólico para a membrana e esse efeito pode estar relacionado com a sua conjugação com grupos tióis essencial. Curiosamente, não parece interferir com a defesa dos PMN, uma vez que ela não afeta a fagocitose ou morte intracelular (STOLK, et al., 1994; STEFANSKA, PAWLICZAK, 2008).

Já no grupo tratado com apocinina associado à aminoguanidina (AP+AG) não houve diminuição na produção de ânion superóxido (GRÁFICO 8), apresentou um perfil semelhante ao grupo tratado somente com AG. Acreditamos ser a aminoguanidina, a responsável por esta resposta.

O mecanismo de inibição da Apocinina está ligado à ativação prévia através da ação de peroxidases. Esta ação inibitória, no entanto, ocorre apenas após um intervalo de tempo, pois ela primeiro é convertida a um dímero, através da sua oxidação mediada pela mieloperoxidase. Alguns estudos têm demonstrado que o dímero é mais eficiente do que a própria apocinina (JOHNSON, et al., 2002; KANEGAE, et al., 2010), outros sugerem que apenas o dímero é capaz de bloquear a atividade da NADPH oxidase (WORM, 2001).

No nosso trabalho, o tratamento com a apocinina foi feito durante 50 dias e os ensaios de atividade são feitos num sistema *in vitro*. Apesar de não se saber muito sobre a cinética da apocinina *in vivo*, já foi demonstrado que ela tem muito baixa toxicidade e que após um período de 20 horas de administração (i.p.), 80% da apocinina foi recuperada inalterada na urina dos animais (STEFANSKA, PAWLICZAK, 2008). Podemos supor que estamos trabalhando num sistema no qual a apocinina está inalterada e só terá sua ação, quando os neutrófilos forem ativados e o dímero formado. Isto explicaria o intervalo de tempo necessário para se observar

o efeito inibitório da apocinina. Quando avaliamos a atividade da NADPH oxidase através do ensaio de redução do citocromo C (GRÁFICO 8), podemos observar que o grupo diabético tratado com a apocinina produziu a mesma quantidade de ânions superóxido que o grupo controle e o grupo diabético. Neste ensaio, avaliamos a produção de ânions superóxido nos primeiros 3 minutos após a ativação celular pelo PMA. Porém, quando avaliamos o efeito da apocinina na geração de ERO (GRÁFICO 9), podemos observar um efeito mais pronunciado deste composto. No ensaio de quimiluminescência, a reação é monitorada por 30 minutos, tempo suficiente para a formação do dímero. Sabemos que a produção de ânions superóxido após a ativação celular é rápida, mas não podemos dizer que todas as células (1×10^6 céls) entram em contato com o PMA no tempo de reação do ensaio de redução do citocromo C (3 minutos). Esta produção continua por mais algum tempo como podemos verificar no Gráfico 9. Podemos sugerir ainda que uma das principais ERO formada no nosso sistema é o ânion superóxido uma vez que, quando adicionamos a superóxido dismutase (SOD) à reação, a quimiluminescência é fortemente reduzida (GRÁFICO 10).

Como a apocinina requer ativação pela mieloperoxidase (MPO) (Ximenes, Kanegae et al., 2007), nós avaliamos também a atividade desta enzima no nosso modelo (GRÁFICO 11).

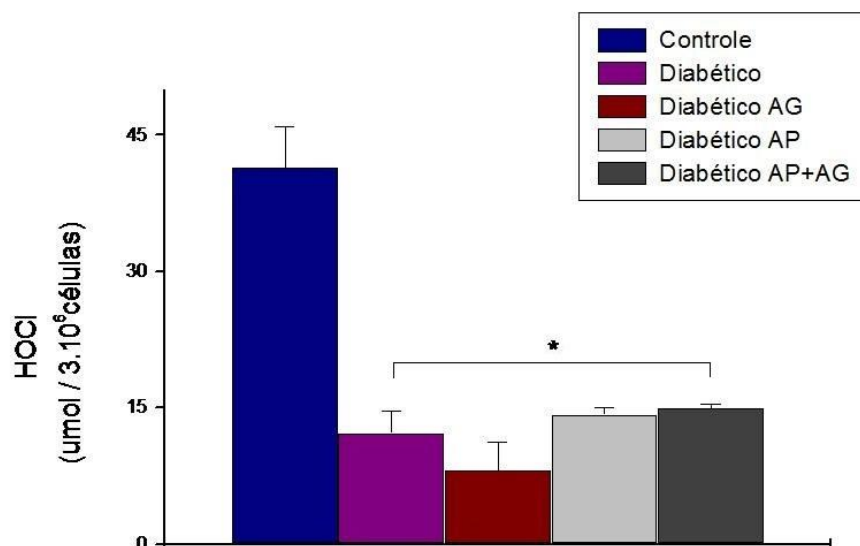


Gráfico 11 - Avaliação da produção de HOCl por neutrófilos peritoneais (3×10^6 células/mL) dos grupos controle (n=6), diabéticos sem tratamento (n=4), diabéticos tratados com AG (n=4), diabéticos tratados com AP (n=4) e diabéticos tratados com AP+AG (n=4). As células foram estimuladas com PMA (100 ng/mL) e a formação de taurina-cloramina foi medida pela oxidação de TNB. (* $p < 0,01$ vs. grupo controle - Tukey-Kramer).

A hiperglicemia diminuiu a atividade da MPO, como podemos ver no Gráfico 11. Os animais diabéticos, independente do tratamento, possuem uma atividade aproximadamente quatro vezes menor que os animais não diabéticos (controle). A atividade deficiente de MPO poderia prejudicar a conversão da apocinina em seu dímero, explicando assim, o fato de não termos observado diminuição na geração de ânions superóxido (GRÁFICO 8). Uma vez que já foi relatado que este composto não inibe a oxidase em células desprovidas ou deficientes de MPO (VEJRAZKA, et al., 2005).

O efeito inibitório da apocinina somente pode ser observado no Gráfico 9, quando a reação foi monitorada por mais tempo. Podemos supor que: 1) a atividade de MPO, mesmo baixa, é suficiente para gerar o dímero, no entanto é necessário um tempo maior para que isto ocorra; e 2) que se a atividade de MPO estivesse mais elevada, o efeito inibitório da apocinina na geração de ERO (GRÁFICO 9) poderia ter sido ainda mais pronunciado. Estas hipóteses se justificam, uma vez que verificamos o mesmo perfil de resposta no grupo tratado com AP+AG. No Gráfico 8 podemos observar que o grupo AP+AG não teve diferença do grupo AG, ou seja, não houve tempo ou atividade de MPO suficiente para a formação do dímero. No entanto, no Gráfico 9 podemos observar que o grupo AP+AG teve a produção de ERO reduzida pela metade. Outros estudos seriam necessários para avaliar o tempo e a quantidade de MPO necessários para verificar o máximo de atividade inibitória deste composto.

Podemos concluir então que a hiperglicemia não afetou a atividade do sistema NADPH oxidase de neutrófilos. Entretanto, o tratamento com a AG elevou de maneira substancial a atividade deste sistema enzimático, enquanto que a apocinina teve um efeito inibitório na atividade do sistema NADPH oxidase.

5 CONCLUSÃO

Pelos parâmetros avaliados neste estudo, podemos concluir que o tratamento com a apocinina, inibidor do sistema NADPH oxidase, diminuiu a geração de ERO, mas não afetou as vias de formação de AGEs no nosso modelo experimental (FIGURA 13 A).

O fato do grupo tratado com apocinina não apresentar redução na formação dos AGEs, nos leva a supor que, provavelmente, não há interrelação entre as vias do sistema da NADPH oxidase e a formação de AGEs, no nosso modelo experimental.

A aminoguanidina, na dose e no tempo administrados, melhorou o perfil glicêmico dos animais diabéticos, preveniu a formação de AGEs e aparentemente preveniu o dano glomerular. O tratamento com a aminoguanidina aumentou a atividade do sistema NADPH oxidase e a expressão das subunidades citosólicas p47^{phox} e a p67^{phox} do sistema (FIGURA 13 B).

Podemos supor que o aumento da atividade e expressão do sistema NADPH oxidase seja devido à diminuição dos AGEs, no nosso sistema. Entretanto, não podemos excluir a possibilidade de isso ser um efeito isolado da aminoguanidina, ainda não descrito na literatura.

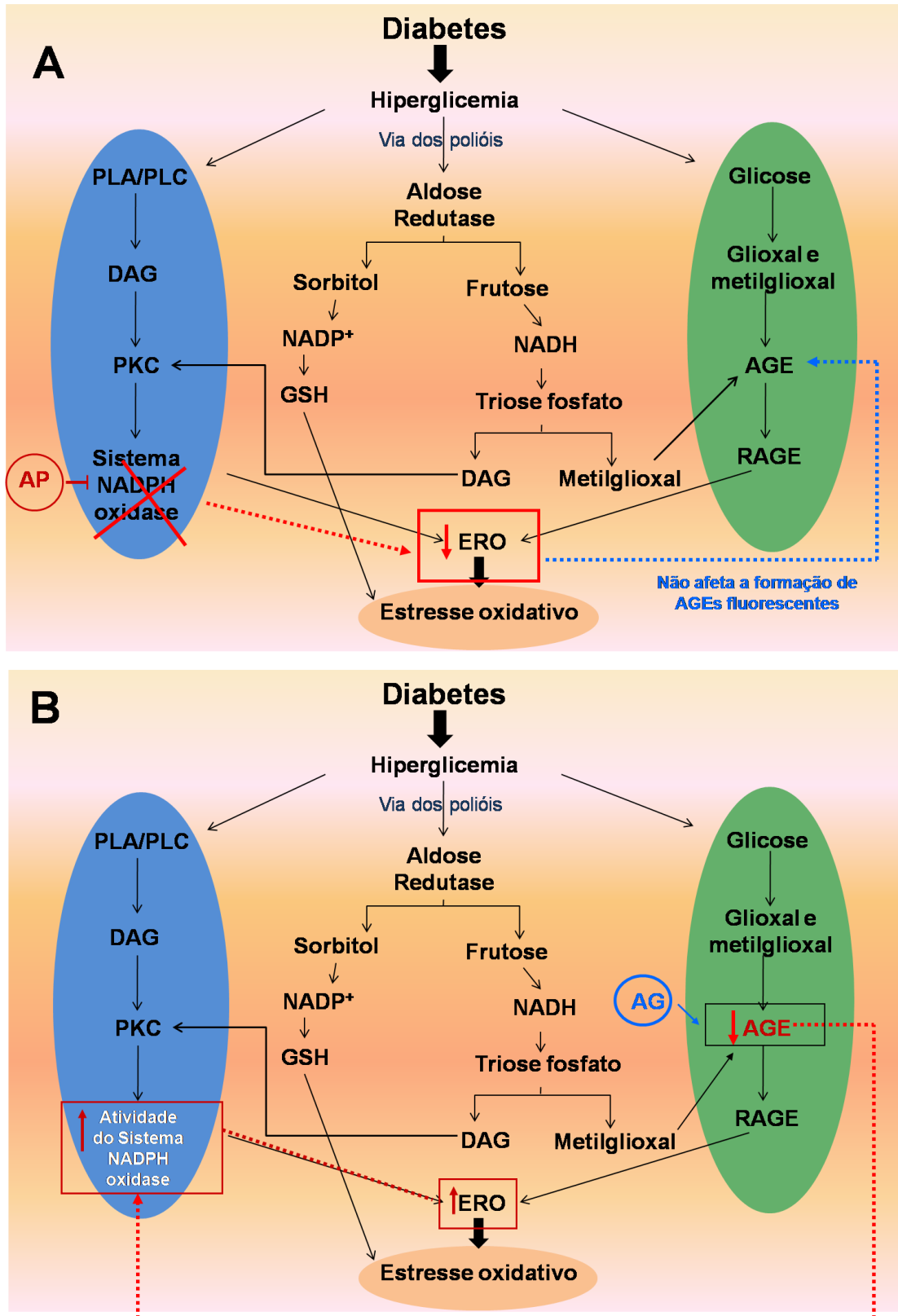


Figura 13 - Ilustração esquemática da relação entre as vias de ativação do sistema NADPH oxidase e as vias de formação de AGEs.

A- Efeito da Apocinina;

B- Efeito da Aminoguanidina.

Fonte: MEDINA (2006, P.18) (Adaptado pelo autor).

REFERÊNCIAS

- AHMED, N. et al. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. **Biochem. J.**, London, v. 364, pt 1, p. 1-14, 2002.
- ALHAMDANI, M. S. et al. Decreased formation of advanced glycation end-products in peritoneal fluid by carnosine and related peptides. **Perit. dial. int.**, Downsview, CA, v. 27, pt 1, p. 86-89, 2007.
- ALVES, C. et al . Mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao diabetes melito. **Arq. bras. endocrinol. metab.**, São Paulo, v. 51, n. 7, Oct. 2007.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, Alexandria, US, v. 33 Suppl 1, p. 62-69, Jan. 2010.
- ASABA, K. et al. Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy. **Kidney int.**, New York, v. 67 pt.5 p. 1890-1898, May, 2005.
- BABIOR, B. M. NADPH Oxidase: an update. **Blood: the journal of hematology**, New York, v. 93, pt. 5, p.1464-1476, 1999.
- BABIOR, B. M. The leukocyte NADPH oxidase. **Isr. Med. Assoc. J.**, Israel, v. 4 pt. 11, p. 1023-1024, 2002.
- BACKER, J. M. et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **EMBO J.**, Oxford, v. 11, pt.9, p. 3469-3479, Sept. 1992.
- BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, Luci Tojal. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arq. bras. endocrinol. metab.**, São Paulo, v. 52, n. 6, Aug. 2008 .
- BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol. rev.**, Bethesda, v. 87, pt.1, p. 245-313, Jan. 2007.
- BLOOMGARDEN, Z. T. European Association for the Study of Diabetes Annual Meeting, 2000: pathogenesis of type 2 diabetes, vascular disease, and neuropathy. **Diabetes Care**, Alexandria, US, v. 24, pt. 6, p. 1115-1119, 2001.

BOGDAN, C. et al. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr. opin. immunol.**, Philadelphia, v. 12, pt.1, p. 64-76, 2000.

BOKOCH, G. M.; KNAUS U. G. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! **Trends biochem. sci.**, Cambridge, v. 28, pt. 9, p. 502-508, 2003.

BORONAT, M. Differences in cardiovascular risk profile of diabetic subjects discordantly classified by diagnostic criteria based on glycated hemoglobin and oral glucose tolerance test. **Diabetes Care**, Alexandria, US, v. 33, pt. 12, p. 2671-2673, 2010.

BOSCO, A. et al . Retinopatia diabética. **Arq. bras. endocrinol. metab.**, São Paulo, v. 49, n. 2, Apr. 2005 .

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. biochem.**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, London, v. 414, pt. 6865, p. 813-820, 2001.

BURTIS, Carl A; ASHWOOD, Edward R. (Ed.). Tietz fundamentals of clinical chemistry. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, c2001. xxv, 1091 p., il.

COHEN, R. M. et al. Discordance Between HbA1c and Fructosamine. **Diabetes Care**, Alexandria, US, v. 26, pt. 1, p. 163-167, 2003.

CRAVEN, P. A.; DERUBERTIS F. R. Protein kinase C is activated in glomeruli from streptozotocin diabetic rats. Possible mediation by glucose. **J. clin. invest.**, New York, v. 83, pt. 5, p. 1667-1675, 1989.

CULBERTSON, S. M. et al. Paradoxical impact of antioxidants on post-Amadori glycoxidation: counterintuitive increase in the yields of pentosidine and Nepsilon-carboxymethyllysine using a novel multifunctional pyridoxamine derivative. **J. biol. chem.**, Baltimore, v. 278, pt. 40, p. 38384-38394, 2003.

CZECH, M. P.; CORVERA S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. **J. biol. chem.**, Baltimore, v. 274, pt. 4, p. 1865-1868, 1999.

DE LUCA, C.; OLEFSKY, J. M. Inflammation and insulin resistance. **FEBS lett.** Amsterdam, v. 582, pt. 1, p. 97-105, 2008.

DOROTA, Z.; BOGNA W.-W. Type 2 diabetes mellitus as inflammatory disease. **Diabetes res. clin. pract.**, Amsterdam, v. 74, pt. 2, S12-S16, 2006.

DRATH, D. B.; KARNOVSKY M. L. Superoxide production by phagocytic leukocytes. **J. exp. med.**, New York, v. 141, pt.1, p. 257-262, 1975.

EDELSTEIN, D.; BROWNLEE M. Aminoguanidine ameliorates albuminuria in diabetic hypertensive rats. **Diabetologia**, Berlim, v. 35, pt. 1, p. 96-97, 1992.

FERREIRA, A. E. et al. A quantitative model of the generation of N(epsilon)-(carboxymethyl) lysine in the Maillard reaction between collagen and glucose. **Biochem. j.**, London, v. 376, pt.1, p. 109-121, 2003.

GARCIA, C. et al. Effects of adrenaline on glucose and glutamine metabolism and superoxide production by rat neutrophils. **Clin. sci.**, London, v. 96, pt. 6, p. 549-555, 1999.

GASBARRINI, A. et al. Chemiluminescent Real Time Imaging of Post-Ischemic Oxygen Free Radicals Formation in Livers Isolated From Young and Old Rats. **Free radic. biol. med.**, New York, v. 24, pt.2, p. 211-216, 1998.

GAVIN, J. R. et al. A new look at established therapies: practical tools for optimizing insulin use. **Diabetes educ.**, Chicago, v. 36, Suppl 2, p. 26-38, 2010.

GIARDINO, I. et al. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. **Diabetes**, New York, v. 47, pt. 7, p. 1114-1120, 1998.

GOH, S. Y.; COOPER, M. E. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. **J. clin. endocrinol. metab.**, Philadelphia, v. 93, pt. 4 p. 1143-1152, 2008.

GOMEZ, R. S. et al. Chemoluminescence generation and MTT dye reduction by polymorphonuclear leukocytes from periodontal disease patients. **J. periodontal. res.**, Copenhagen, v. 29, pt. 2, p. 109-112, 1994.

GROSS, J. L. et al. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arq. bras. endocrinol. metab.**, São Paulo, v. 46, n. 1, Feb. 2002.

GUICHARD, C. et al. NOX family NADPH oxidases in liver and in pancreatic islets: a role in the metabolic syndrome and diabetes? **Biochem. Soc. Trans.**, London, v. 36, pt. 5, p. 920-929, 2008.

HEITZER, T. et al. Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: Evidence for an involvement of protein kinase C. **Kidney int.**, New York, v. 55, pt. 1, p. 252-260, 1999.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, London, v. 444, pt. 7121, p. 860-867, 2006.

HOU, J. C. et al. Insulin granule biogenesis, trafficking and exocytosis. **Vitam. horm.**, New York, v. 80, p. 473-506, 2009.

HOUGEE, S. et al. Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. **Eur. j. pharmacol.**, Amsterdam, v. 531, p. 264-269, 2006.

IDRIS, I. et al. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. **Diabetologia**, Berlin, v. 44, pt. 6 p. 659-673, 2001.

IKEDA, K. et al. Immunochemical approaches to AGE-structures: characterization of anti-AGE antibodies. **J. immunol. methods.**, Amsterdam, v. 215, pt. 1, p. 95-104, 1998.

INOGUCHI, T. et al. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 89, pt.22, 11059-11063, 1992.

INOGUCHI, T. et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. **Diabetes**, New York, v. 49, pt. 11, p. 1939-1945, 2000.

JOHNSON, D. K. et al. Inhibition of NADPH Oxidase Activation in Endothelial Cells by ortho -Methoxy-Substituted Catechols. **Endothelium**, Yverdon, v. 9, pt. 3, p. 191-203, 2002.

JONES, O. T.; HANCOCK J. T. Assays of plasma membrane NADPH oxidase. **Methods enzymol.**, New York, v. 233, p. 222-229, 1994.

KAISER, N. et al. Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. **Diabetes**, New York, v. 42, pt. 1, p. 80-89, 1993.

KANEGAE, M. P. P. et al. Diapocynin versus apocynin as pretranscriptional inhibitors of NADPH oxidase and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. **Biochem. biophys. res. commun.**, New York, v. 393, pt. 3, p. 551-554, 2010.

KELLY, D. J. et al. Aminoguanidine Ameliorates Overexpression of Prosclerotic Growth Factors and Collagen Deposition in Experimental Diabetic Nephropathy. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Baltimore, v. 12, pt. 10 p. 2098-2107, 2001.

KEMPF, K. et al. The metabolic syndrome sensitizes leukocytes for glucose-induced immune gene expression. **J. mol. med.**, Heidelberg v. 85, pt. 4, p. 389-396, 2007.

KITADA, M. et al. Translocation of Glomerular p47phox and p67phox by Protein Kinase C- β Activation Is Required for Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy" **Diabetes**, New York, v. 52, pt. 10 p. 2603-2614, 2003.

KOYA, D.; KING, G. L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. **Diabetes**, New York, v. 47, pt. 6, p. 859-866, 1998.

LAFEBER, F. P. et al. Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, Oxford, v. 38, pt.11, p. 1088-1093, Apr. 1999.

LAPOLLA, A. et al. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. **Clin. biochem.**, Toronto, v. 38, pt. 2, p. 103-115, 2005.

LIU, B. C. et al. Connective tissue growth factor is associated with the early renal hypertrophy in uninephrectomized diabetic rats. **Chin. med. j.**, Beijing, v. 119, pt. 12, p. 1010-1016, 2006.

LYONS, T. J. et al. Decrease in skin collagen glycation with improved glycemic control in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **J. clin. invest.**, New York, v. 87, pt. 6 p. 1910-1915, 1991.

MARIOTTO, S. et al. Biochemical aspects of nitric oxide. **Curr. pharm. des.**, San Francisco, v. 10, pt. 14, p. 1627-1645, 2004.

MATSUDA, H. et al. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. **Bioorg. med. chem.**, Oxford, v. 11, pt. 24, p. 5317-5323, 2003.

MCCARTY, M. F. Adjuvant strategies for prevention of glomerulosclerosis. **Med Hypotheses**, Edinburgh, v. 67, pt. 6, p. 1277-1296, 2006.

- MEDINA, Leonardo Oliveira. **Diabetes Tipo 2: modulação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em granulócitos por plasma autólogo.** 2006. 70p. Dissertação (mestrado em biomedicina) - Programa de Pós-Graduação e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, 2006.
- MORIYAMA, T. et al. Involvement of advanced glycation end-products, pentosidine and N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine, in doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. **Toxicology**, Amsterdam, v. 268, pt. 2, p. 89-97, 2010.
- MUIJSERS, R. B. et al. Apocynin inhibits peroxynitrite formation by murine macrophages. **Br. j. pharmacol.**, London, v. 130, pt. 4, p. 932-936, 2000.
- MULLER, A. A. et al. Plant-derived acetophenones with antiasthmatic and anti-inflammatory properties: inhibitory effects on chemotaxis, right angle light scatter and actin polymerization of polymorphonuclear granulocytes. **Planta med.**, Stuttgart, v. 65, pt. 7, p. 590-594, 1999.
- NASO, F. C. D. et al. Aminoguanidina reduz o estresse oxidativo e as alterações estruturais pulmonares em diabetes mellitus experimental. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 36, p. 485-489, 2010.
- OLUKMAN, M. et al. Apocynin restores endothelial dysfunction in streptozotocin diabetic rats through regulation of nitric oxide synthase and NADPH oxidase expressions. **J. diabetes its complicat.**, New York, v. 24, pt.6, p. 415-423, 2010.
- OSTERBY, R. et al. Advanced diabetic glomerulopathy. Quantitative structural characterization of nonoccluded glomeruli. **Diabetes**, New York, v. 36, pt. 5, p. 612-619, 1987.
- PAGEON, H. Reaction of glycation and human skin: the effects on the skin and its components, reconstructed skin as a model. **Pathol. Biol.**, Paris, v. 58, pt. 3, p. 226-231, 2010.
- PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The insulin receptor -a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **J. basic clin. physiol. pharmacol.**, London, v. 9, p. 89-109, 1998.
- PAULI, J. R. et al . Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. **Arq. bras. endocrinol. metab.**, São Paulo, v. 53, n. 4, p. 399-408, Jun., 2009 .
- PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. Glucose, Advanced Glycation End Products and Diabetes Complications: what is new and what works. **Clinical Diabetes**, New York, v. 21, p. 186-187, 2003.

PESSIN, J. E.; SALTIEL A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J. clin. invest.**, New York, v. 106, pt. 2, p. 165-169, 2000.

PETERSON, K. P. et al. What is hemoglobin A1c? An analysis of glycosylated hemoglobins by electrospray ionization mass spectrometry. **Clin. chem.**, New York, v. 44, pt. 9, p. 1951-1958, 1998.

PHILIS-TSIMIKAS, A. et al. Aminoguanidine has both pro-oxidant and antioxidant activity toward LDL. **Arterioscler. thrombos. vasc. biol.**, Dallas, v. 15, pt. 3, p. 367-376, 1995.

PICK, E.; KEISARI Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J. immunol. methods.**, Amsterdam, v. 38, p. 161-170, 1980.

PINTO, C. C. et al. Arterial hypertension exacerbates oxidative stress in early diabetic retinopathy. **Free radic. res.**, Yverdon, v. 41, pt. 10, p. 1151-1158, 2007

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

PUNCHARD, N. A. K. E. D. **Free Radicals - A Practical Approach**. New York, Oxford University Press, 1996.

QUINN, A. C. et al. Nitric oxide: an endogenous gas. **Br. j. anaesth.**, Altrincham , v. 74, pt. 4, p. 443-451, 1995.

REIS, J. S. et al . Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. **Arq. bras. endocrinol. metab.**, São Paulo, v. 52, n. 7, p. 1096-1105.Oct. 2008 .

ROCHA, J. L.L. et al. Aspectos relevantes da interface entre diabetes mellitus e infecção. **Arq. bras. endocrinol. metab.**, São Paulo, Jun 2002, vol.46, n.3, p.221-229.

RODRIGUES, M. R. et al. Interferon-gamma independent oxidation of melatonin by macrophages. **J. pineal res.**, New York, v. 34, pt.1, p. 69-74, 2003.

ROOS, D. et al. Oxidative killing of microbes by neutrophils. **Microbes infect.**, Paris, v. 5, pt. 14, p. 1307-1315, 2003.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantan.**, São Paulo, v. 20, p. 315-328, 1947.

SCHAAN, B. D. O papel da proteína quinase C no desenvolvimento das complicações vasculares do diabetes mellitus. **Arq. bras. endocrinol. metab.**, São Paulo, v. 47, p. 654-662, 2003.

SELVIN, E. et al. Glycated Hemoglobin and the Risk of Kidney Disease and Retinopathy In Adults with and Without Diabetes. **Diabetes**, New York, v. 60, p. 298-305, Jan. 2011.

SHEN, G. X. Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase. **J Physiol Pharmacol**, Canada, v. 88, pt. 3, p. 241-248, 2010.

SHEPHERD, P. R. et al. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. **Biochem. j.**, London, v. 305, pt. 1, p. 25-28, 1995.

SHIBA, T. et al. Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. **Am. j. physiol.**, Bethesda, v. 265, pt. 1, p 783-793, 1993.

SIMONS, J. M. et al. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. **Free radic. biol. med.**, New York, v. 8, n.3, p. 251-258, 1990.

SKAMARAUSKAS, J. T. et al. Aminoguanidine and its pro-oxidant effects on an experimental model of protein glycation. **Free radic. biol. med.**, New York, v. 21, n. 6, p. 801-812, 1996.

SLIMAN, S. et al. Hyperglycemic oxoaldehyde, glyoxal, causes barrier dysfunction, cytoskeletal alterations, and inhibition of angiogenesis in vascular endothelial cells: aminoguanidine protection. **Mol. cell. biochem.**, The Hague, v. 333, n.1, p. 9-26, 2010.

SOARES, J. M.; COSTA, S. T.; CECIM, M. Níveis glicêmicos e de colesterol em ratos com Diabetes Mellitus aloxano induzido, tratados com infusão de Bauhinia candicans ou Syzygium Jambolanum. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 113-118, Mar. 2000 .

SOO MIN, N. et al. Effects of NADPH oxidase inhibitor on diabetic nephropathy in OLETF rats: The role of reducing oxidative stress in its protective property. **Diabetes res. clin. pract.**, Amsterdam, v. 83, n.2, p. 176-182, 2009.

STEFANSKA, J.; PAWLICZAK, R. Apocynin: molecular aptitudes. **Mediat. inflamm.**, New York, Published online, Dec., 2008. doi: 10.1155/2008/106507.

STEFANSKA, J. et al. Apocynin decreases hydrogen peroxide and nitrate concentrations in exhaled breath in healthy subjects. **Pulm. pharmacol. ther.**, London, v. 23, n.1, p. 48-54, 2010.

STOLK, J. et al. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. **Am. j. respir. cell mol. biol.**, New York, v. 11, n. 1, p. 95-102, 1994.

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

SUBASINGHE, W. et al. Phagocyte-like NADPH oxidase promotes cytokine-induced mitochondrial dysfunction in pancreatic β -cells: Evidence for regulation by Rac1. **Am. j. physiol, regul. integr. comp. physiol.**, Bethesda, v. 300, p.12-20, 2010.

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

TAKINO, J. et al. The formation of intracellular glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products and cytotoxicity. **J. gastroenterol.**, Tokyo, v. 45, n. 6, p. 646-655, 2010.

TAYLOR, E. L. et al. Nitric oxide: a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. **Cell death differ.**, Oxford, v. 10, n.4, p. 418-430, 2003.

TESFAYE, S. et al. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. **Diabetes Care**, Alexandria, US, v. 33, n. 10, p. 2285-2293, 2010.

THALLAS-BONKE, V. et al. Inhibition of NADPH Oxidase prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C- α -dependent pathway. **Diabetes**, New York, v. 57, n.2, p. 460-469, 2008.

THE AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, A. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 26, Suppl 1, p. 5-20, 2003.

THORNALLEY, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Arch. biochem. biophys.**, New York, v. 419, n.1, p. 31-40, 2003.

TUTTLE, K. R.; ANDERSON, P. W. A novel potential therapy for diabetic nephropathy and vascular complications: protein kinase C β inhibition. **Am. j. kidney dis.**, New York, v. 42, n. 3, p. 456-465, 2003.

VAZIRI, N. D. et al. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. **Kidney int.**, New York, v. 63, n. 1, p. 179-185, 2003.

VEJRAZKA, M. et al. Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells. **Biochim. biophys. acta, Gen. subj.**, Amsterdam, v. 1722, n.2, p. 143-147, 2005.

VLASSARA, H. et al. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. **Lab invest.**, Baltimore, v. 70, n. 2, p. 138-151, 1994.

VOZIYAN, P. A. et al. Modification of proteins in vitro by physiological levels of glucose: pyridoxamine inhibits conversion of Amadori intermediate to advanced glycation end-products through binding of redox metal ions. **J. biol. chem**, Baltimore, v. 278, pt. 47, p. 46616-46624, 2003.

WHITE, K. E.; BILOUS, R. W. Type 2 Diabetic Patients with Nephropathy Show Structural Functional Relationships that Are Similar to Type 1 Disease. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Baltimore, v. 11, n. 9, p. 1667-1673, 2000.

WHITE, M. F. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. **Mol. cell. biochem.**, The Hague, v. 182, p. 3-11, 1998.

WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, Alexandria, US, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

WILLIAMS, H. C.; GRIENGLING, K. K. NADPH Oxidase Inhibitors: New Antihypertensive Agents? **J. cardiovasc. pharmacol.**, New York, v. 50, n. 1, p. 9-16, 2007.

WINIARSKA, K. et al. Inhibition of renal gluconeogenesis contributes to hypoglycaemic action of NADPH oxidase inhibitor, apocynin. **Chem. biol. interact.**, Amsterdam, v. 189, p. 119-126, 2010.


WORM, E. V. **Investigations on apocynin, a potent NADPH oxidase inhibitor.** Proefschrift Universiteit Utrecht, Gdansk, 2001.

XIAO, H. et al. Peroxynitrite plays a key role in glomerular lesions in diabetic rats. **J. nephrol.**, Milano, v. 22, n. 6, p. 800-808, 2009.


XIMENES, V. F. et al. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: Proposal for NADPH oxidase inhibition. **Arch. biochem. biophys.**, New York, v. 457, n. 2, p. 134-141, 2007.

YONEKURA, H. et al. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. **Biochem j.**, London, v. 370, pt. 3, p. 1097-1109, 2003.

ZILIN, S. et al. The determination of AGE-peptides by flow injection assay, a practical marker of diabetic nephropathy. **Clin. chim. acta.**, Amsterdam, v. 313, p. 69-75, 2001.

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP: 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063




Alfenas, 25 de Maio de 2010.

Profª. Maria Rita Rodrigues

Prezada Professora;

O projeto sob sua coordenação, registrado sob o nº ~~250~~ 250/2010, intitulado "Papel da NADPH oxidase na formação dos AGEs em ratos diabéticos", sob sua coordenação, está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido, portanto, apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.



Prof Dr Carlos Giovanni de Oliveira Nascimento
Presidente do CEUA – Unifal-MG

