

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CLÁUDIA DE SOUZA FERREIRA

**MODULAÇÃO DE NOX2 PELA AMINOGUANIDINA E AS IMPLICAÇÕES
NA FUNÇÃO MICROBICIDA DE NEUTRÓFILOS E NA PRODUÇÃO DE
ESPÉCIES REATIVAS POR CÉLULAS ENDOTELIAIS (HUVEC)**

Alfenas - MG

2016

CLÁUDIA DE SOUZA FERREIRA

**MODULAÇÃO DE NOX2 PELA AMINOGUANIDINA E AS IMPLICAÇÕES
NA FUNÇÃO MICROBICIDA DE NEUTRÓFILOS E NA PRODUÇÃO DE
ESPÉCIES REATIVAS POR CÉLULAS ENDOTELIAIS (HUVEC)**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Federal de Alfenas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Rita Rodrigues (UNIFAL-MG)

Alfenas - MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Ferreira, Cláudia de Souza.

Modulação de NOX2 pela aminoguanidina e as implicações na função microbicida de neutrófilos e na produção de espécies reativas por células endoteliais (HUVEC). / Cláudia de Souza Ferreira. -- Alfenas - MG, 2016. 114 f.

Orientadora: Maria Rita Rodrigues.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Guanidinas. 2. Neutrófilos. 3. Espécies de Oxigênio Reativas. 4. NADPH Oxidase. 5. Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana. I. Rodrigues, Maria Rita. II. Título.

CDD-615.1

CLÁUDIA DE SOUZA FERREIRA

**MODULAÇÃO DE NOX2 PELA AMINOGUANIDINA E AS IMPLICAÇÕES
NA FUNÇÃO MICROBICIDA DE NEUTRÓFILOS E NA PRODUÇÃO DE
ESPÉCIES REATIVAS POR CÉLULAS ENDOTELIAIS (HUVEC).**

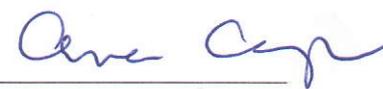
A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 29 de abril de 2016.

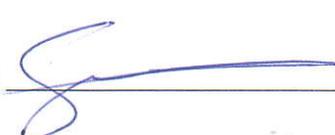
Prof.^a Dr.^a Maria Rita Rodrigues

Instituição: Universidade Federal de Alfenas Assinatura:  _____
UNIFAL-MG

Prof.^a Dr.^a Ana Campa

Instituição: Universidade de São Paulo Assinatura:  _____
USP-SP

Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

Instituição: Universidade Federal de Alfenas Assinatura:  _____
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Leonardo Augusto Almeida

Instituição: Universidade Federal de Alfenas Assinatura:  _____
UNIFAL-MG

*Do meu pai Flávio que me ensinou a acreditar.
À minha mãe Vilma que me ensinou a duvidar.
À minha filha Birma que me ensinou a resistir.
E ao meu amor, Alexandre que me ensinou a compartilhar.*

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 ao Alexandre, por compreender minha ausência e por me motivar a terminar esse trabalho.

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

À minha irmã, cunhado e sobrinho, por me ajudarem com a tarefa de cuidar da Birma durante os experimentos e as disciplinas nas nucleadoras.

As minhas amigas Tayra e Alessandra, com as quais aprendi a ser melhor. Perfeccionismo, inteligência, eficiência e generosidade. Tive sorte de poder contar com vocês nesses dois anos. Muito obrigada por sempre me ajudarem e compartilharem suas experiências e amizade.

À minha querida amiga Paula Comune Pennacchi, por me ensinar os cuidados com a cultura de células e pela ajuda na manutenção das HUVEC em SP.

À professora Dra. 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, Romilda, Lucinda e Márcia sempre nos apoiando, consolando e ensinando. O laboratório jamais seria o mesmo sem vocês.

Aos professores Leonardo A. Almeida, Fernanda B. de Araújo Paula, Marília Gabriella Alves Goulart Pereira, Amanda Latércia Tranches Dias e Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão e pela ajuda com reagentes, equipamentos, doação de cepa de leveduras. Às Professoras: Elisângela Monteiro Pereira e Fernanda B. A. Paula pela oportunidade em trabalhar nos projetos de extensão.

À professora Dra. Ana Campa que abriu as portas do laboratório de Bioquímica Clínica (FCF-USP) ao nosso trabalho e às queridas amigas Maryana, Maysa e Silene que se esforçaram ao máximo nos ajudando com nossos experimentos e dúvidas. À Renata Chaves Albuquerque e prof. Sandro, pela atenção e colaboração com os experimentos no FACS.

À Profa. Dra. Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager da UEM (Maringá-Pr) por se mostrar solidária e dividir conosco sua experiência e reagentes.

Aos professores e colegas Alexandre Vieira e Michael Brian Santiago pela ajuda no experimento de aferição de pressão arterial por canulação.

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

A todos os funcionários do laboratório Central de Bioquímica da UNIFAL-MG pela parceria na realização dos experimentos do doutorado e da extensão. Valeu André, pela ajuda e amizade.

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

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 e ao George 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.

A todos os colegas de pós-graduação pela ótima companhia nos congressos e disciplinas, em especial à Kamila, Laísa, Vanessa, Luciana, Mara, Ana Laura, Érika, Layla, Silvia, Georgia.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Clínica: Bruno, Cleiber, e Mayara pela amizade, colaboração pelos e ótimos momentos que passamos juntos.

Aos colegas do Laboratório do Hospital Bom Pastor em Varginha, em especial ao Rodrigo, obrigada por cobrir minhas férias para realização de experimentos e disciplinas.

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

A Capes, CNPQ e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos os que me acolheram nessa andança do doutorado. Acredito que a experiência do multicêntrico foi realmente valorosa.

RESUMO

Já foi demonstrado que a aminoguanidina (AG), um conhecido inibidor de AGEs (Produtos Finais de Glicação Avançada), aumenta a atividade de NOX2 (Sistema NADPH oxidase fagocítico) em neutrófilos peritoneais de ratos diabéticos. Experimentos adicionais demonstraram que o mesmo efeito ocorre em neutrófilos de ratos não diabéticos. Visando elucidar o mecanismo e a importância deste aumento de NOX2 pela AG em neutrófilos, utilizou-se um modelo experimental de ratos diabéticos e não diabéticos e um modelo *in vitro* com neutrófilos humanos isolados de sangue periférico ou HUVEC, uma linhagem de células endoteliais. Para isso, ratos machos Wistar diabéticos e não diabéticos foram tratados ou não por gavagem com AG (100mg/kg/dia) por 50 dias. Os neutrófilos foram recrutados e isolados do peritônio após 4 horas da injeção de caseinato de sódio e foram usados para avaliar a produção de superóxido, ERO e as atividades fagocítica e candidida destas células. No modelo *in vitro*, neutrófilos isolados de sangue periférico ou HUVEC foram ou não incubados com AG ou Metformina (MET) por 18h em estufa de CO₂. O tratamento *in vivo* com a AG, mostrou aumento na produção de superóxido em comparação com grupos tratados com água, em ambos os grupos, diabéticos e não diabéticos. O aumento de atividade e expressão de NOX2 (p47^{phox} e p67^{phox}) pela AG aumentou as atividades fagocíticas e candidida de *Candida albicans*, entretanto este aumento foi menos pronunciado no grupo diabético. Adicionalmente, os resultados demonstram a eficácia do tratamento com a AG na prevenção de glicação de proteínas, reduzindo os níveis de HbA1C e AGEs, além de reduzir os níveis de ureia e manter os níveis de creatinina no soro dos animais. O tratamento com AG reduziu a pressão arterial e a produção de nitratos no soro dos animais, mas a atividade das enzimas antioxidantes foi mantida. Verificou-se que as HUVEC tratadas com AG ou MET no estado basal ou estimuladas com LPS, tiveram menor produção de ERO. Neutrófilos humanos incubados com AG aumentaram a produção de ERO e de superóxido, enquanto o tratamento com MET manteve a produção de ambos. Além disso, o tratamento com AG aumentou a fagocitose e a atividade candidida de neutrófilos humanos nos tempos avaliados. O tratamento de neutrófilos humanos com MET manteve a expressão das subunidades avaliadas e o tratamento com AG aumentou a expressão de gp91^{phox}. A liberação de IL-8 foi diminuída nos neutrófilos humanos tratados com a MET, e a AG aumentou a liberação de IFN- γ . Em HUVEC a liberação de IL-8 e INF- γ foram mantidas com ambos os

tratamentos. Pode-se sugerir que a AG aumentou a atividade e a expressão de NOX2 em neutrófilos humanos e de ratos e que isso contribuiu diretamente para o aumento da atividade microbicida dos neutrófilos. Além disso, nos neutrófilos humanos, o aumento da liberação de IFN- γ pode ter contribuído para o aumento da expressão de gp91^{phox}. Adicionalmente, a influência da AG em células em processo de diferenciação para um estado mais maduro pode ser diferente dos seus efeitos *in vitro*, em células já maduras.

Palavras-chave: Aminoguanidina. Neutrófilos. ERO. NOX2 (Sistema NADPH oxidase Fagocítico). HUVEC (Células endoteliais de cordão umbilical humano).

ABSTRACT

It has been showed that aminoguanidine (AG), a known inhibitor of AGE (Advanced Glycation End Products) increases the activity of NOX2 (phagocyte system NADPH Oxidase) peritoneal neutrophils of diabetic rats. Additional experiments demonstrated that the same effect occurs in non-diabetic rat neutrophils. To elucidate the mechanism and significance of NOX2 increase in neutrophils by AG, it was used an experimental model of diabetic and non-diabetic rats and an *in vitro* model in which human neutrophils isolated from peripheral blood or HUVEC endothelial cell lineage. For this, Wistar rats diabetic and non-diabetic were treated or not with AG by gavage (100 mg / kg / day) for 50 days. Neutrophils were recruited and isolated from the peritoneum 4h after injection of sodium caseinate and were used to evaluate superoxide generation, ROS and phagocytic and candidida activity of these cells. *In vitro* model, neutrophils isolated from peripheral blood or HUVEC were incubated or not with AG or Metformin (MET) for 18h in CO₂ incubator. *In vivo* treatment with AG showed an increase in superoxide production compared with groups treated with water, in both groups diabetics and non-diabetics. The increased activity and expression of NOX2 (p47^{phox} and p67^{phox}) by AG increased phagocytic and candidida activity of *Candida albicans*, however this increase was less pronounced in the diabetic group. Additionally, the results demonstrate the effectiveness of treatment with AG on preventing glycation of proteins, reducing HbA1c and AGEs, in addition to reducing levels of urea and maintain the creatinine levels in serum of animals. The treatment with AG reduced the blood pressure and the production of nitrates and antioxidant enzymes activity were maintained in animals. It was found that HUVEC treated with AG or MET at baseline, or stimulated with LPS had lower production of ROS. Human neutrophils incubated with AG increase ROS and superoxide while treatment with MET remained the production of both. In addition, treatment with AG increased phagocytosis and candididal activity of human neutrophils at times evaluated. In addition, treatment with AG increased phagocytosis and candidida activity of human neutrophils at times evaluated. The MET treatment maintained the expression of subunits assessed, and treatment with AG caused increased expression of gp91. The release of IL-8 by human neutrophils was decreased by treatment with MET, and AG increased the release of IFN- γ . The release of IL-8 was reduced in human neutrophils treated with MET, and

AG increased IFN- γ . In HUVEC the release of IL-8 and IFN- γ were maintained with both treatments. It can be suggested that the AG used to inhibit the formation of AGEs increased activity and NOX2 expression in human and rat neutrophils and that directly contributed to the increased microbicidal activity by neutrophils. In addition, the human neutrophils the increased of IFN- γ may have contributed to the increased expression of gp91^{phox}. In addition, the influence of AG in cells in differentiation process to more mature state may be different of *in vitro* effects on cells already mature.

Keywords: Aminoguanidine. Neutrophils. ROS. NOX2 (phagocyte system NADPH Oxidase). HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\cdot\text{OH}$	- radical hidroxila
$^1\text{O}_2$	- oxigênio singlete
AG	- aminoguanidina
AGEs	- produtos finais de glicação avançada
CAT	- catalase
Cl^-	- íon cloreto
COx	- cicloxigenase
DGC	- doença granulomatosa crônica
DTNB	- 5,5'-ditiobis ácido 2-nitrobenzoico
NOS	- óxido nítrico sintase
eNOS	- óxido nítrico sintase endotelial
EDRF	- fator de relaxamento derivado do endotélio
EROs	- espécies reativas de oxigênio
ERNs	- espécies reativas de nitrogênio
GPx	- glutationa peroxidase
GSH	- glutationa reduzida
GTP	- trifosfato de guanosina
H_2O_2	- peróxido de hidrogênio
HOCl	- ácido hipocloroso
HUVECs	- células endoteliais de cordão umbilical
iNOS	- óxido nítrico sintase induzida
IL-8	- interleucina 8
IFN-γ	- intérferon gama
L-NAME	- N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride
LOO\cdot	- radical peroxil
LOx	- lipoxigenase
MGG	- May Grunwald e Giemsa
MPO	- mieloperoxidase
NADH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH oxidase	- sistema enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NOX2	- sistema NADPH oxidase fagocítico
NO	- óxido nítrico
$\text{NO}_2\cdot$	- radical dióxido de nitrogênio
ONOO$^-$	- peroxinitrito
$\text{O}_2\cdot^-$	- ânion superóxido
$\cdot\text{OH}$	- radical hidroxila
$^1\text{O}_2$	- oxigênio singlete
PA	- pressão arterial
PKC	- proteína quinase C
PMA	- forbol-12-miristato-13-acetato
SOD	- superóxido dismutase
TNF	- fator de necrose tumoral
VSMC	- célula da musculatura lisa vascular
XO	- xantina oxidase

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Composição das subunidades das isoformas do Sistema NADPH oxidase.	21
Figura 2-	Montagem do Sistema NOX2.	22
Figura 3-	Ativação e montagem do Sistema NADPH oxidase em fagócitos.	23
Figura 4-	Representação esquemática de NOX-4.	24
Figura 5-	Formação de ERO nas células vasculares.	25
Figura 6-	Estrutura molecular da guanidina e biguanidina.	31
Figura 7-	Estrutura molecular do Cloridrato de Metformina	32
Figura 8-	Estrutura molecular da Aminoguanidina	34
Figura 9-	Representação esquemática do tratamento dos animais	40
Figura 10-	Representação esquemática da primeira etapa de experimentos.	41
Figura 11-	Representação esquemática da segunda etapa de experimentos.	42
Figura 12-	Representação esquemática da terceira etapa de experimentos.	42
Figura 13-	Imagem representativa das secções de rim submetidas à coloração H. E.	57
Figura 14-	Imunodeteção das subunidades de p47 phox e p67phox nos neutrófilos peritoneais de ratos.	59
Figura 15-	Efeito do tratamento com AG na PAM, FC e nitritos em ratos Wistar	60
Figura 16-	Produção de ERO por HUVEC por citometria de fluxo com a sonda H2DCFDA.	63
Figura 17-	Expressão de NOX2 em neutrófilos humanos tratados ou não com MET.	71
Figura 18-	Expressão de NOX2 em neutrófilos humanos tratados ou não com AG.	72
Figura 19-	Representação esquemática dos dados obtidos.	89
Gráfico 1-	Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar após o tratamento com AG.	56
Gráfico 2-	Determinação de ERO por quimiluminescência em neutrófilos de ratos.	58

Gráfico 3- Fagocitose e capacidade candidida de neutrófilos peritoneais de ratos.	59
Gráfico 4- Determinação da Atividade das Enzimas Antioxidantes e Peroxidação Lipídica no soro de ratos Wistar.....	61
Gráfico 5- Padronização da concentração de AG em neutrófilos humanos.	65
Gráfico 6- Produção de ERO e anions superóxido por neutrófilos humanos.	66
Gráfico 7- Produção de ERO por neutrófilos humanos tratados com AG, MET e inibidores.....	67
Gráfico 8- Produção de anions superóxido por neutrófilos humanos tratados com AG, MET e inibidores.	68
Gráfico 9- Atividade de enzimas antioxidantes em neutrófilos humanos	69
Gráfico 10- Atividades Fagocítica e Candidida de neutrófilos humanos.	70
Gráfico 11- Determinação de IL-8 e IFN-g no sobrenadante de neutrófilos humanos.	73
Gráfico 12- Determinação de IL-8 e IFN-g no sobrenadante de HUVEC.	73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO	17
2.2	SISTEMA NADPH OXIDASE	18
2.3	NOX2	21
2.4	SISTEMA NADPH OXIDASE VASCULAR.....	23
2.5	NOX E PATOLOGIAS	26
2.6	FAGÓCITOS E O BALANÇO OXIDATIVO (ERO X ENZIMAS ANTIOXIDANTES).....	27
2.7	CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	29
2.8	GUANIDINAS	30
2.8.1	Metformina	31
2.8.2	Aminoguanidina.....	33
2.9	ÓXIDO NÍTRICO E IMPLICAÇÕES FISIOLÓGICAS	35
3	OBJETIVOS.....	38
3.1	OBJETIVO GERAL	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4	METODOLOGIA	40
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	40
4.2	MODELO ANIMAL.....	43
4.3	INDUÇÃO DO DIABETES.....	43
4.4	TRATAMENTO COM AG EM RATOS WISTAR.....	43
4.5	RECRUTAMENTO DOS NEUTRÓFILOS PERITONEAIS.....	44
4.6	ISOLAMENTO DA CAVIDADE PERITONEAL.....	44
4.7	CONTAGEM DAS CÉLULAS E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	44
4.8	DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS	44
4.9	ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS RINS	45
4.10	DETERMINAÇÃO DE NITRITOS	45
4.11	DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA	46

4.12	IMUNODETECÇÃO DAS SUBUNIDADES DE NOX2	46
4.13	MODELO DE CULTURA CELULAR HUMANA	47
4.14	ISOLAMENTO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS DE SANGUE PERIFÉRICO	47
4.15	CULTURA DE HUVEC	48
4.16	TRATAMENTOS COM OS FÁRMACOS E INIBIDORES	48
4.17	AValiação DA PRODUÇÃO DE ERO E ANION SUPERÓXIDO	49
4.18	DETERMINAÇÃO DE ERO POR CITOMETRIA DE FLUXO	50
4.19	DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES FAGOCÍTICA E CANDICIDA DE NEUTRÓFILOS	50
4.20	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE CATALASE.....	51
4.21	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE GPX.....	51
4.22	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE SOD	52
4.23	DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	52
4.24	DETERMINAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS	52
4.25	QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO POR WESTERN BLOT	53
4.26	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
5	RESULTADOS.....	55
5.1	EFEITO DO TRATAMENTO COM AG NO PERFIL BIOQUÍMICO DE RATOS WISTAR	55
5.2	EFEITO DO TRATAMENTO COM AG NOS RINS DE RATOS WISTAR.....	56
5.3	EFEITO DA AG NA PRODUÇÃO DE ERO, NAS ATIVIDADES FAGOCÍTICA E CANDICIDA DE NEUTRÓFILOS DE RATOS WISTAR E NA EXPRESSÃO DE NOX2.....	57
5.4	EFEITO DO TRATAMENTO COM AG NA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA DE RATOS WISTAR	60
5.5	EFEITO DO TRATAMENTO COM AG NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE RATOS WISTAR	61
5.6	EFEITO DO TRATAMENTO COM AG NA PRODUÇÃO DE ERO EM HUVEC	61
5.7	EFEITO DAS GUANIDINAS NA LIBERAÇÃO DE ERO POR NEUTRÓFILOS HUMANOS	63
5.8	EFEITO DO TRATAMENTO COM AG NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE NEUTRÓFILOS HUMANOS	68

5.9	EFEITO DA AG NAS ATIVIDADES FAGOCÍTIICAS E CANDICIDA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS	69
5.10	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NOX2 EM NEUTRÓFILOS TRATADOS COM GUANIDINAS	70
5.11	DETERMINAÇÃO DE INTERLEUCINAS NO SOBRENADANTE CELULAR	72
6	DISCUSSÃO.....	74
7	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS.....	91
	ANEXOS	109
	APÊNDICES	112

1 INTRODUÇÃO

Os pacientes com diabetes mellitus apresentam anormalidades no sistema imunológico que os predispõem a apresentar infecções recorrentes. Esta maior susceptibilidade às infecções seria decorrente de disfunções nos leucócitos, que prejudicaria os processos de aderência, quimiotaxia, fagocitose e destruição intracelular. Há diminuição, também, da ativação espontânea e da resposta neutrofílica, quando comparados a pacientes não diabéticos. Os neutrófilos são as primeiras células a chegar ao local de infecção e são componentes críticos dos processos inflamatórios e antimicrobianos, sua ativação leva a iniciação do *burst* oxidativo, com montagem de NOX2 e a produção de ERO.

As proteínas da família NADPH oxidase (NOX) se dedicam à produção de ERO (espécies reativas de oxigênio), incluindo anions superóxido e peróxido de hidrogênio. Até o momento, sete membros a família NOX, foram identificados e estão envolvidos na regulação de uma infinidade de processos celulares, tais como a diferenciação durante o desenvolvimento embrionário, migração, proliferação, senescência e morte celular.

Durante o mestrado foi estudado o mecanismo pelo qual o diabetes e a glicação de proteínas modulam a função de neutrófilos. Foi relatado um aumento de atividade de NOX2 em neutrófilos peritoneais de ratos diabéticos tratados com AG (aminoguanidina), um conhecido inibidor de AGEs (produtos finais de glicação avançada). O aumento da atividade de NOX2 neste sistema, foi atribuído inicialmente, à diminuição na formação de AGEs, entretanto experimentos adicionais, demonstraram que o mesmo ocorre em ratos não diabéticos.

Diante destes resultados, foi cogitado se este seria um efeito isolado da AG, ainda não descrito na literatura, e, por sua semelhança molecular à metformina (MET), foram testadas ambas guanidinas em neutrófilos humanos e comparados os efeitos, as vias de sinalização ativadas e as consequências fisiológicas. Trabalhos recentes ressaltam a importância destas guanidinas por seus efeitos benéficos no tratamento do diabetes, assim, tentou-se contribuir para elucidação do mecanismo de ação pelo qual elas atuam nos modelos de cultura de células de neutrófilos e HUVEC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

No texto a seguir é apresentada uma revisão de literatura sobre espécies reativas, sistema NOX e os principais alvos desse estudo, que permitirá contextualização dos temas para melhor compreensão dos objetivos do trabalho.

2.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO

O termo espécies reativas é um coletivo que inclui as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN). Um radical livre é um átomo ou molécula com um elétron desemparelhado, como: superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$) e radical peroxil (LOO^{\cdot}) (KALYANARAMAN, 2013). A presença deste elétron não pareado altera a reatividade química dos átomos ou moléculas, tornando-os mais reativos que as espécies não radicalares. Os radicais derivados de oxigênio representam a classe mais importante das espécies radicalares geradas nos sistemas vivos (LIOCHEV; FRIDOVICH, 1994). Um radical livre pode existir independentemente, e apresentar grande instabilidade, reagindo rapidamente com diversos compostos e podendo atacar alvos celulares (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010; HALLIWELL, 1994). Além das espécies radicalares, há também alguns derivados não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) e o ácido hipocloroso ($HOCl$) que assim como os radicalares, podem oxidar grupos tióis, e modificar a ligação covalente de proteínas e glicoproteínas, podendo afetar a atividade enzimática das proteínas (BABIOR, 2002; BOKOCH; KNAUS, 2003; LEE et al., 2009; SUBASINGHE; SYED; KOWLURU, 2011).

O $HOCl$ 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: a reação de Fenton, onde H_2O_2 reage com íons metálicos, como íons ferro, ou, através de reação do $HOCl$ com $O_2^{\cdot-}$. O oxigênio singlete (1O_2) pode ser produzido pela reação de H_2O_2 com o $HOCl$ (BABIOR, 2002; BEDARD; KRAUSE, 2007; BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000).

Além de ERO, os fagócitos também produzem espécies reativas de nitrogênio (ERN). O óxido nítrico (NO) é formado pela reação de oxidação da L-arginina

catalisada pela iNOS (óxido nítrico sintase induzida). O anion superóxido reage com NO formando ONOO⁻, e esta espécie pode se decompor dando origem ao radical hidroxila ([•]OH) e ao radical dióxido de nitrogênio (NO₂[•]) (MARIOTTO; MENEGAZZI; SUZUKI, 2004; TAYLOR et al., 2003). Existem duas isoformas de óxido nítrico sintase: a constitutiva e a induzida. Esta última é encontrada em fagócitos e pode ser induzida por uma variedade de endotoxinas e citocinas (MONCADA; HIGGS, 1993; ZIELONKA; KALYANARAMAN, 2010).

O estresse oxidativo é um distúrbio no estado de equilíbrio, no sistema de pró-oxidantes e antioxidantes, nas células intactas. A célula deve ter um sistema de defesa antioxidante onde exista um equilíbrio entre a produção e a eliminação de ERO durante o metabolismo aeróbico normal. Quando existe maior ocorrência de eventos oxidativos, o sistema pende para o lado pró-oxidativo, o que pode afetar os níveis de antioxidantes como a glutatona e a vitamina E, podendo gerar o dano oxidativo em lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. A severidade deste processo pode levar à morte celular (CAI; GRIENDLING; HARRISON, 2003).

O aumento na produção de ERO e a sua interação com macromoléculas podem alterar o estado redox nas células ou tecidos. As células regulam a manutenção de equivalentes redutores como, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e glutatona (GSH), responsáveis pela energia requerida em processos metabólicos. Contudo, as ERO podem causar a queda na concentração intracelular desses equivalentes redutores, interrompendo assim diversos processos metabólicos. As espécies reativas são geradas tanto enzimaticamente por oxidoredutases, como não enzimaticamente por produtos colaterais de reações que utilizam a transferência de elétrons. Assim, a mitocôndria, o citocromo P450 e suas redutases são responsáveis pela geração de ERO. Outra fonte abundante de ERO é o sistema enzimático NADPH oxidase (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

2.2 SISTEMA NADPH OXIDASE

O sistema NADPH oxidase é encontrado em diversas células de origem mesodermal. Tem como substrato as coenzimas NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida) ou NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e catalisa a transferência de elétrons através da membrana celular (BABIOR, 1999; BEDARD; KRAUSE, 2007). Possui várias isoformas, sete já foram identificadas em

mamíferos e todas possuem a mesma função de geração de ERO, entretanto, os mecanismos de ativação, assim como as subunidades necessárias e sua distribuição intracelular variam entre as isoformas (RODIÑO-JANEIRO et al., 2013).

Por muito tempo se acreditou que a NADPH oxidase fosse exclusiva de fagócitos, mas seis homólogos da gp91phox/NOX2 foram encontrados em células não fagocíticas, as quais são denominadas NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2; sendo que na nova terminologia, a gp91phox é denominada NOX2 e serviu de protótipo para seus homólogos. As DUOX1 e 2 foram os segundos homólogos a serem identificados, no tecido tireoidiano e, portanto, foram inicialmente denominadas ThOX1 e ThOX2 (RODIÑO-JANEIRO et al., 2013). Em estudos subsequentes, descobriu-se que estes dois homólogos possuíam a extremidade C-terminal semelhante a NOX2, mas a extremidade N-terminal possuía um domínio homólogo à peroxidase. Assim, devido à presença de dois tipos de domínios, essas proteínas são hoje conhecidas como DUOX 1 e DUOX 2 (“dual oxidase” 1 e 2) (AMEZIANE-EL-HASSANI et al., 2015; LAMBETH, 2004). Estas enzimas são funcionalmente distintas da oxidase fagocítica e respondem a uma variedade de mediadores humorais, como fatores de crescimento, citocinas e hormônios, assim como a estímulos físicos (tensão de cisalhamento e estiramento cíclico) (QUINN; AMMONS; DELEO, 2006; RODIÑO-JANEIRO et al., 2013). Na TABELA 1 podem ser observados os tecidos ou tipos celulares em que cada componente da família NOX é expresso:

Tabela 1- Distribuição das NADPH oxidases (NOX) humanas

Oxidase	Tecido/ Tipo celular
NOX1	Cólon, endotélio, útero, placenta, músculo liso, próstata, osteoclastos.
NOX2	Células mieloides e linfóides, tecido vascular.
NOX3	Ouvido interno, tecido fetal.
NOX4	Rins, tecido fetal, endotélio, fibroblastos, queratinócitos.
NOX5	Tecido linfóide, testículos, próstata, ovários, pâncreas.
DUOX1	Tireoide, epitélios respiratório e lingual, cerebelo, testículos.
DUOX2	Tireoide, glândulas retais e salivares, epitélios gastrointestinal e respiratório, útero e vesícula biliar.

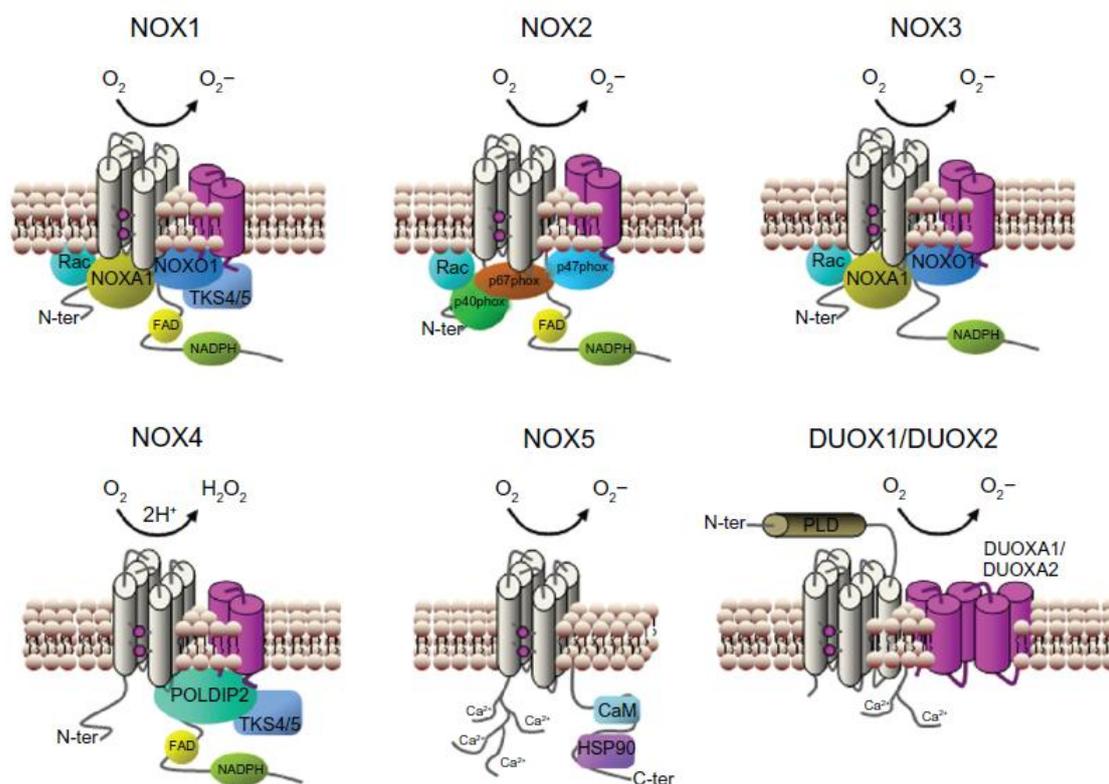
Fonte: QUINN; AMMONS; DELEO (2006, p.3), adaptado pela autora.

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 do NADPH acarretando a produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (EL-BENNA; DANG; PÉRIANIN, 2010).

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 proteico citoplasmático de 240kDa. Também há o citocromo b₅₅₈, composto pelas proteínas p22^{phox} e NOX2 (também conhecida como gp91^{phox}) localizadas nas membranas das vesículas secretórias e dos grânulos específicos citoplasmáticos (GUICHARD et al., 2008). Há ainda outras proteínas de baixa massa molecular, ligantes de nucleotídeo guanina (GTPases): a Rac 1 e 2 e Rap1a, que também participam do processo (BOKOCH; KNAUS, 2003; ROOS, et al., 2003) (FIGURA 1). Kawahara et al. (2005), mostrou que as mutações na região da p22^{phox} rica em prolina resultam na inibição da produção de ERO por NOX1-4, mas não por NOX5 (KAWAHARA et al., 2005). Portanto estes dados indicam que a associação com a p22^{phox} é essencial para a função de muitos, mas não todos os homólogos a NOX2 (QUINN; AMMONS; DELEO, 2006).

Vários grupos identificaram homólogos de p47^{phox} e p67^{phox} em tecido do cólon, os quais foram, posteriormente, designados como NOXO1 (NOX organizador 1) e NOXA1 oxidase (NOX ativador 1), devido a seus respectivos papéis de organização e ativação. NOXO1 é expresso primariamente no testículo e cólon, mas também é encontrado em níveis baixos no pâncreas, fígado, timo e intestino delgado (QUINN; AMMONS; DELEO, 2006). Embora NOXO1 seja estruturalmente semelhante à p47^{phox}, falta o domínio auto-inibitório que se torna fosforilado durante a ativação da p47^{phox}. NOXA1 é altamente expresso no cólon, mas também parece ser expresso em uma ampla gama de tecidos, assim como NOXO1. NOXA1 é estruturalmente semelhante à p67^{phox}, embora seja significativamente menor (BÁNFI et al., 2000; GEISZT et al., 2000; TAKEYA et al., 2015). Tem sido relatado ser um cofator para NOX1 e possivelmente NOX3, embora haja alguma controvérsia sobre este assunto. Estudos realizados por Ueno et al., (2005), sugerem que NOX3 humano é constitutivamente ativo e esta atividade é significativamente reforçada pelo NOXO1 e, em menor medida, por p47^{phox} (UENO et al., 2005).

Figura 1- Composição das subunidades das isoformas do Sistema NADPH oxidase.



Fonte: RODIÑO-JANEIRO (2013, p. 404) (Adaptado pela autora).

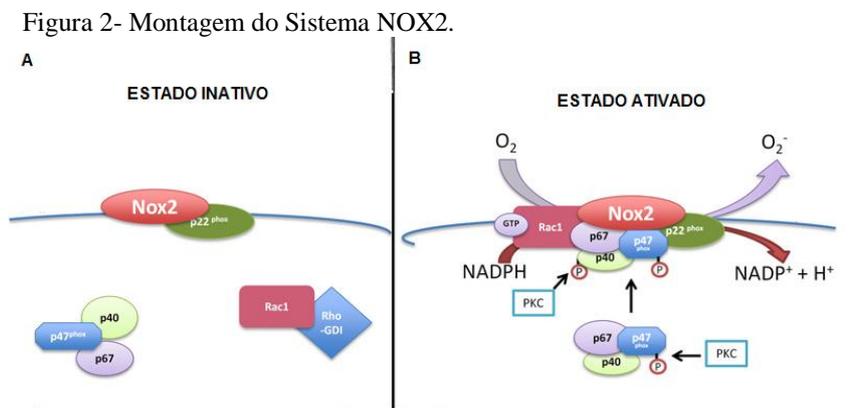
A ativação do sistema enzimático NADPH oxidase é induzida *in vivo* por imunocomplexos, bactérias e diversos metabólitos (glicose, aminoácidos, ácidos graxos, citocinas). O sistema ativo provoca aumento transitório do consumo de oxigênio, podendo ser de duas a 20 vezes maior que o consumo basal, dependendo da célula e da natureza do estímulo (BRIGGS et al., 1975). Nos neutrófilos, a ativação de NOX2 leva a formação de ânions superóxido e a iniciação do *burst* oxidativo.

2.3 NOX2

Os neutrófilos desempenham um importante papel na resposta imune inata contra os agentes patogênicos, e possuem a capacidade de gerar ERO através de sistema NOX2 associado à membrana (BABIOR, 1999; BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000). A produção de O_2^- e seus metabólitos secundários é a função primária de NOX2 de fagócitos, com a finalidade de defesa contra a invasão de microrganismos. Eles são estimulados por vários estímulos como: citocinas, quimiocinas, micróbios, produtos microbianos, vírus e outros antígenos (CROSS; SEGAL, 2004; QUINN; AMMONS; DELEO, 2006;). Portanto, NOX2 é a isoforma de

NADPH oxidase, mais estudada, e pode ser encontrada em células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos) e linfócitos B, além do tecido vascular (BABIOR, 1999; RODIÑO-JANEIRO; 2013).

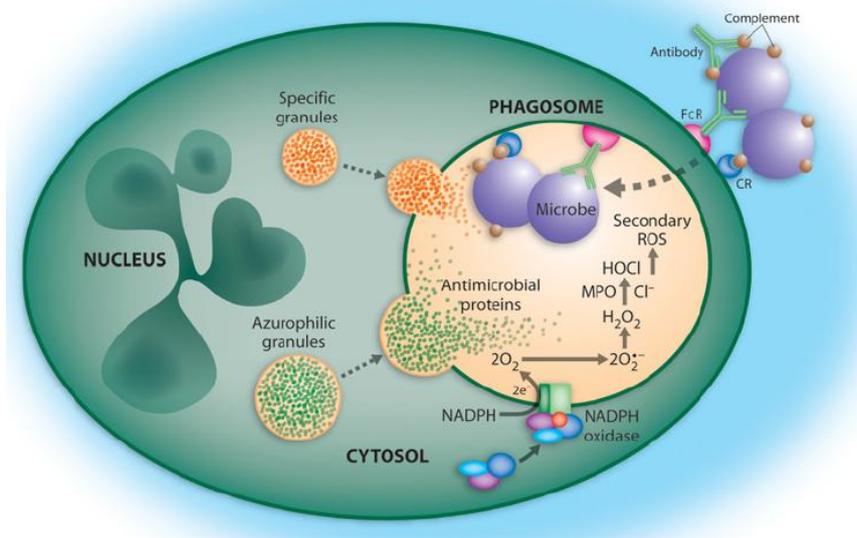
A ativação de NOX2 se inicia pela fosforilação do componente citosólico $p47^{\text{phox}}$, resultando na migração de todas as proteínas citosólicas para a membrana plasmática. Uma vez na membrana, estas proteínas se associam ao citocromo b_{558} . A Rac1/2 liga-se simultaneamente ao trifosfato de guanosina (GTP) e migra para a membrana juntamente com o sistema citosólico (FIGURA 2A e B) (BABIOR, 1999; BEDARD; KRAUSE, 2007).



Fonte: SCARRETTA et al., 2015 (p.389) (Adaptado pela autora).

Quando ativo, NOX2 é responsável pela transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, formando o ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$, o qual tem pouca atividade microbicida, entretanto, origina ERO mais potentes (FIGURA 3).

Figura 3- Ativação e montagem do Sistema NADPH oxidase em fagócitos.



Fonte: QUINN; AMMONS; DELEO (2006, p.5).

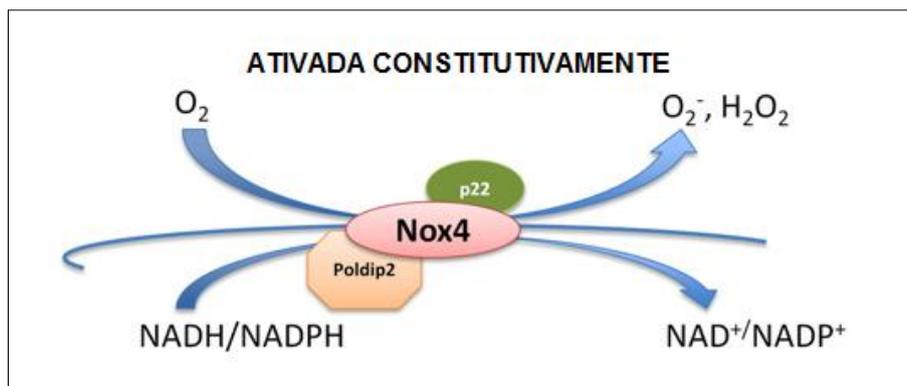
As células endoteliais vasculares também possuem NADPH oxidase semelhante às fagocíticas (NOX2).

2.4 SISTEMA NADPH OXIDASE VASCULAR

As células endoteliais expressam NOX1, NOX2, NOX4 e NOX5, as VSCM expressam NOX1, NOX4 e NOX5 (QUINN; AMMONS; DELEO, 2006; RODIÑO-JANEIRO, 2013). NOX4 é a isoforma mais abundante em células endoteliais, e assim como NOX2 parece ser responsável pelo tônus basal de ERO oriundo da atividade metabólica normal (SCHRÖDER et al.; 2012; PANIERI; SANTORO, 2015).

A produção de ERO por NOX4 é dependente de $p22^{\text{phox}}$, assim como em NOX2, entretanto, a atividade de NOX4 é regulada transcricionalmente e não é dependente de componentes citosólicos ou Rac-GTPase, embora NOX4 possa ser regulada por Poldip2 (proteína polimerase delta-interativa 2). Assim, NOX4 parece ser constitutivamente ativa (FIGURA 4), com produção basal de H_2O_2 , mas sua ativação pode ser potencializada, aumentando a produção de ERO (BEDARD; KRAUSE, 2007; LASSEGUE; SAN MARTIN; GRIENGLING, 2012; MAEJIMA, et al., 2011; MONTEZANO, 2014; SCJARRETTA, et al., 2015).

Figura 4- Representação esquemática de NOX-4.

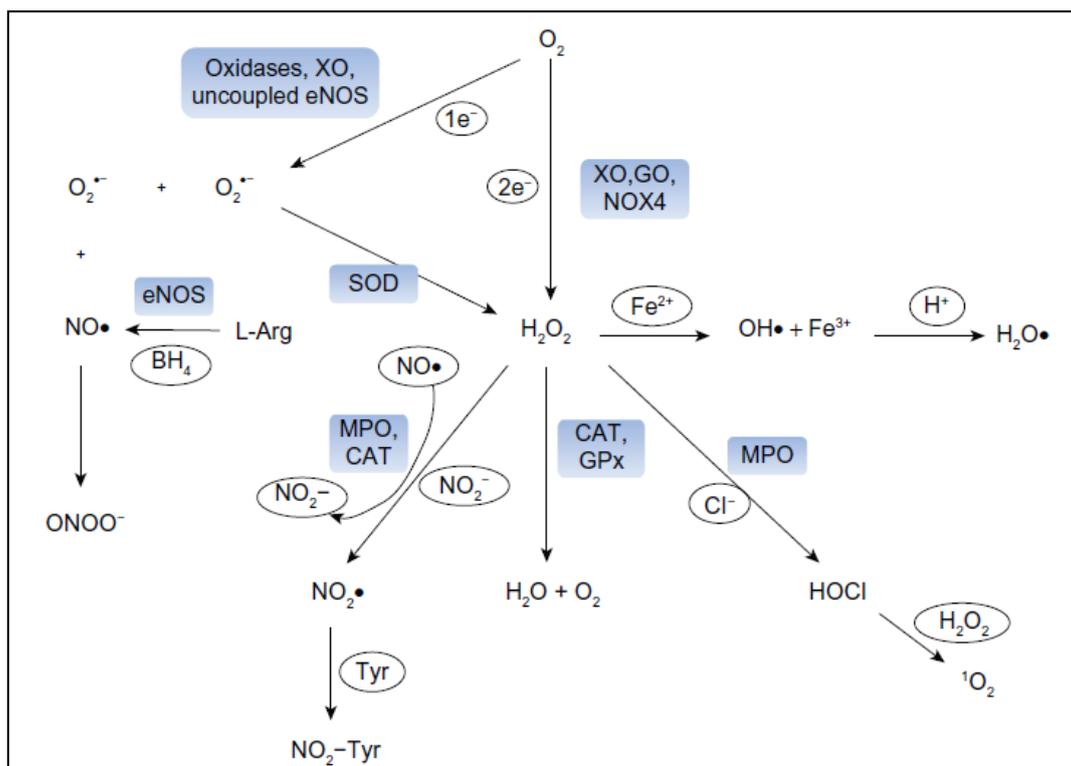


Fonte: SCJARRETTA et al., 2015 (p.389) (Adaptado pela autora).

As células vasculares produzem ERO (FIGURA 5) via: complexo NOX associado à membrana, xantina oxidase (XO), lipoxigenase (LOx), cicloxigenase (COx); ou produzem ERN através da enzima de síntese do óxido nítrico (óxido nítrico sintase endotelial, eNOS), via monóxido de nitrogênio ou fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (TOUYZ; YAO; SCHIFFRIN, 2005).

A redução do oxigênio (O_2) por um elétron provoca a formação de anion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que pode ser dismutado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), espontaneamente ou por uma reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). O óxido nítrico ($NO\cdot$) é produzido por óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) a partir de L-arginina, e tetra-hidrobiopterina. $O_2^{\cdot-}$ e $NO\cdot$ reagem espontaneamente formando peroxinitrito ($ONOO^-$). H_2O_2 também pode ser gerado diretamente do oxigênio por algumas oxidases vasculares, como a xantina oxidase (XO), glicose oxidase (GO) e NOX4. O H_2O_2 pode ser eliminado pela catalase (CAT) ou pela glutatona peroxidase (GPx), formando água e oxigênio ou pode sofrer reações não-enzimáticas para gerar o radical hidroxila ($OH\cdot$). As enzimas MPO são ativadas por H_2O_2 , para formar um radical altamente reativo que pode oxidar $NO\cdot$ para anion dióxido de azoto (NO_2^-) e reagir com o NO_2^- para formar o radical dióxido de nitrogênio ($\cdot NO_2$). O $\cdot NO_2$ pode participar nos eventos de nitração, tais como a formação de nitrotirosinas. Em alternativa, o H_2O_2 pode ser usado pela MPO para formar o ácido hipocloroso (HOCl). O oxigênio singlete (1O_2) é formado a partir da reação de HOCl com H_2O_2 , assim como ocorre em neutrófilos (RODIÑO-JANEIRO et al., 2013).

Figura 5- Formação de ERO nas células vasculares.



Fonte: RODIÑO-JANEIRO (2013, p. 404) (Adaptado pela autora).

Estudos indicam que superóxido em excesso tem ação *scavenger* sobre o óxido nítrico, diminuindo assim sua biodisponibilidade e levando à formação de $ONOO^-$, o qual é capaz de oxidar o cofator tetraidrobiopterina, causando o seu desacoplamento da NO sintase e início da disfunção endotelial. A alteração na biodisponibilidade do NO leva então, à diminuição na vasodilatação (WILLIAMS; GRIENDLING, 2007).

Além disso, foi relatado que as células endoteliais também podem aumentar a produção de NO, via iNOS, o qual tem sido implicado na atividade microbiciada destas células (DE ASSIS et al., 2004; MUTUNGA; PRESTON; SUMPTION, 1998).

Em paralelo com as ações das ERO, as proteínas NOX têm efeitos benéficos e prejudiciais. Elas são importantes moléculas de sinalização que regulam o tônus vascular, expressão, proliferação, migração e diferenciação celular (TAKAC; SCHRÖDER; BRANDES, 2012). Por outro lado, os fatores de risco cardiovasculares e doenças vasculares causam desequilíbrio redox com aumento de ERO e contribuem para a aterosclerose, a disfunção vascular, hipertensão, hipertrofia vascular e trombose (GUZIK et al.; 2000; TAKAC; SCHRÖDER; BRANDES, 2012).

2.5 NOX E PATOLOGIAS

A produção de ERO pelas NOX, em pequenas quantidades, pode funcionar na sinalização fisiológica e, em grandes quantidades, pode originar dano oxidativo (PANIERI; SANTORO, 2015). Os tipos celulares encontrados nas paredes dos vasos possuem NOX 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 Diabetes Mellitus (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).

A participação das ERO já foi descrita em alguns processos, incluindo: a regulação da expressão gênica através da modificação da atividade de fatores de transcrição (OKAMOTO; IWAMOTO; MARU, 2006; WARABI et al., 2007), no controle da expressão de moléculas de adesão no endotélio (CHEN et al., 2003; TRUE; RAHMAN; MALIK, 2000) ou proteínas implicadas na proliferação e migração celular (ABID et al., 2000; EYRIES; COLLINS; KHACHIGIAN, 2004; MOLDOVAN et al., 2006; WOLFRAM KUHLMANN et al., 2004), e na regulação da atividade do citoesqueleto e no controle das concentrações intracelulares de mensageiros secundários como o cálcio (HU et al., 2000). Além disso, a incidência de cada tipo de ERO na modulação de respostas parece variar de acordo com a região e do tipo de célula vascular. Portanto, o efeito final de cada molécula reativa pode variar, dependendo do tecido envolvido (MILLER; DRUMMOND; SOBEY, 2006). Esta complexidade pode explicar parcialmente porque a eliminação direta de ERO por vitaminas antioxidantes não demonstrou um benefício clínico na maioria dos estudos clínicos (WIDDER; HARRISON, 2005).

Além disso, a importância do *burst* oxidativo se faz notar em indivíduos afetados pela doença granulomatosa crônica (DGC), nos quais a NOX2 é parcial ou totalmente deficiente, por não ter um ou mais de seus componentes expressos. Os portadores de DGC estão sujeitos a infecções recorrentes e, como consequência, a uma expectativa de vida menor (DE OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2011).

Portanto, estratégias antioxidantes devem ser cuidadosamente projetadas com base em um forte entendimento de como ERO estão envolvidas em cada processo fisiopatológico.

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

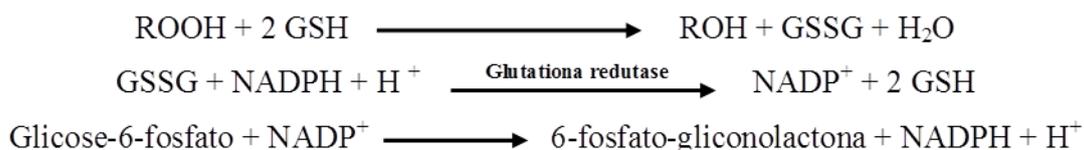
Os neutrófilos são as principais células fagocíticas do sistema imune (KLEBANOFF et al., 2013). Vários agentes solúveis e particulados são capazes de ativar os fagócitos, podendo estar ou não revestidos por proteínas do hospedeiro, tais como imunoglobulinas e/ou complemento. Eles são englobados pelo fagócito e internalizados em vacúolos citoplasmáticos, chamados fagossomos (BRE; TSCHIRHART, 2012). A estes vacúolos fundem-se grânulos, presentes no citoplasma, os quais descarregam potentes enzimas capazes de degradarem uma ampla variedade de substâncias biológicas, incluindo membranas celulares, colágeno, elastina e mucopolissacarídeos. A fusão dos grânulos com o fagossomo forma o fagolisossomo e o processo de liberação dos grânulos é conhecido por degranulação (KABEYA et al., 2013).

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

ERO podem agir patologicamente alterando biomoléculas ou modulando a atividade enzimática. Para tanto, o organismo desenvolveu mecanismos específicos para controlar essa reatividade das ERO (CHANOCK et al., 1994). O sistema de defesa antioxidante do organismo compreende uma gama variada de substâncias que atuam em diferentes níveis. O sistema de defesa primário é constituído por substâncias que impedem a geração de espécies reativas ou as sequestram, impedindo sua interação com alvos celulares. Entre elas estão as enzimas antioxidantes CAT e GPx. Estas enzimas têm um importante papel na resistência oxidante de células inflamatórias. Sabe-se que

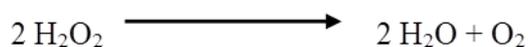
neutrófilos possuem atividade de CAT mais alta de todos os fagócitos, o que pode explicar o possível mecanismo de resistência oxidante destas células. Além disso, a diferenciação de monócitos a macrófagos *in vitro* é acompanhada pela diminuição da CAT e GPx (PIETARINEN-RUNTTI et al., 2000). O balanço entre a produção de oxidantes e a defesa antioxidante pode ter um importante papel na função fagocítica e prevenção de danos oxidativos durante a fagocitose. O sistema da Glutathiona Peroxidase é assim chamado porque envolve mais de um sistema enzimático, a saber: a glutathiona redutase, glicose 6-fosfato desidrogenase e a glutathiona peroxidase. Essas três enzimas funcionam em conjunto para metabolizar o peróxido de hidrogênio e outros peróxidos derivados da oxidação de macromoléculas (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

A reação catalisada pela glutathiona peroxidase é seguida de duas outras reações, onde se regenera o tripeptídeo glutathiona (GSH) na sua forma reduzida e, produz NADPH, pequena molécula que mantém o poder redutor celular.



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

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



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

2.7 CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Os neutrófilos são normalmente as primeiras células imunes a chegarem ao local de infecção. Como tal, são componentes críticos de ambos os processos inflamatórios e antimicrobianos. Ambos os processos são regulados através da produção de citocinas específicas (TERRI, BLAINE, 2004). As interleucinas (IL) tem um amplo espectro de atividades biológicas em diferentes tipos de células. A IL-8, ou CXCL8, é uma citocina pró-inflamatória e faz parte da família quimioquina CXC. As propriedades biológicas de IL-8, incluindo quimiotaxia de neutrófilos e linfócitos T, implicam-na como um fator fundamental em processos inflamatórios agudos, tais como a ativação de neutrófilos, a regulação positiva de moléculas de adesão, e leucocitose, assim como na patogênese de doenças inflamatórias (DJEU et al., 1990; BAGGIOLINI; CLARK-LEWIS, 1992; TANIGUCHI, 1988). Embora IL-8 foi inicialmente considerada um produto apenas de macrófagos, sabe-se hoje que neutrófilos e outras células como: células endoteliais, linfócitos T, eosinófilos, fibroblastos, queratinócitos e hepatócitos também sintetizam IL-8. Pela liberação de IL-8 os neutrófilos têm a capacidade de amplificar o recrutamento de novos neutrófilos para o sítio inflamatório (ROLLINS, 2001).

Como o acúmulo de neutrófilos nos tecidos é uma característica da inflamação, a capacidade de produzir IL-8 regula o recrutamento de novos neutrófilos nos locais inflamatórios. Assim, a regulação da migração de neutrófilos é necessária para controlar reações inflamatórias. A produção excessiva de IL-8 pode estar envolvida na patogênese de vários tipos de doenças inflamatórias. Além disso, várias citocinas e agentes tem sido relatados como inibidores da produção de IL-8. As citocinas, tais como IL-4, IL-10, fator de crescimento transformante- β , e interferon- β neutralizam a indução da produção de IL-8 induzida por IL-1, TNF- α e LPS (MONTESEIRÍN et al., 2004).

A síntese de IL-8 pode ser induzida por LPS, IL-1, TNF e vírus e é dependente da ativação do fator de transcrição NF- κ B. Ela encontra-se associada a processos agudos e crônicos e atua principalmente como quimioatraente para neutrófilos, células T, basófilos e linfócitos (ROLLINS, 2001). A IL-8 age também como fator de ativação e fator angiogênico, sendo produzida rapidamente após um estímulo inflamatório. Ela estimula a degranulação, o *burst* respiratório e a atividade microbicida em leucócitos (FERRANTE, et al., 1988). Receptores para IL-8 têm sido identificados em neutrófilos,

basófilos e linfócitos, além de sítios de ligação em monócitos, eosinófilos, células endoteliais e em eritrócitos (BORISH, STEINKE 2003).

Os interferons constituem uma família de glicoproteínas sintetizadas por diferentes células em resposta à infecção viral, estimulação imunológica ou indutores químicos (BAGGIOLINI et al. 1997). O IFN- γ é produzido principalmente pelas células T CD4+ ativadas, e também por células T CD8+, células NK e por células apresentadoras de antígenos (D'ANDREA et al. 1992; FRUCHT et al. 2001; NATHAN et al. 1983).

As células da imunidade inata, como NK, secretam IFN- γ em resposta ao reconhecimento de componentes antigênicos dos microrganismos ou em resposta a IL-12, funcionando como um mediador da imunidade inata. Na imunidade adquirida, as células T produzem IFN- γ em resposta ao reconhecimento do antígeno, e isto é acentuado pela IL-12 (SEDER et al. 1993; GROHMANN, et al. 2001). O IFN- γ é a mais importante citocina da imunidade celular, aumenta a capacidade de apresentação de antígenos dos fagócitos, aumentando a expressão de moléculas de classe I e II do MHC (Complexo de Histocompatibilidade Principal) e das moléculas co-estimuladoras (BAGGIOLINI, et al. 1997; BORISH; STEINKE, 2003; NATHAN, et al. 1983). A ação do IFN- γ é dependente da via de sinalização JAK/STAT. A ligação da citocina ao receptor ativa o STAT1, que então estimula a transcrição dos genes responsivos ao IFN- γ , esta reação é mediada pelas enzimas JAK1 e JAK 2. Este processo é regulado positivamente pela IL-12 e IL-18 e negativamente pela IL-10 e IL-4 (SEDER et al. 1993; SCHINDLER et al. 2001).

Em fagócitos, o IFN- γ estimula a produção de citocinas e sua função efetora, incluindo fagocitose, produção de ERO, ERN, resultando no aumento da sua atividade microbicida e tumoricida (NATHAN et al. 1983).

2.8 GUANIDINAS

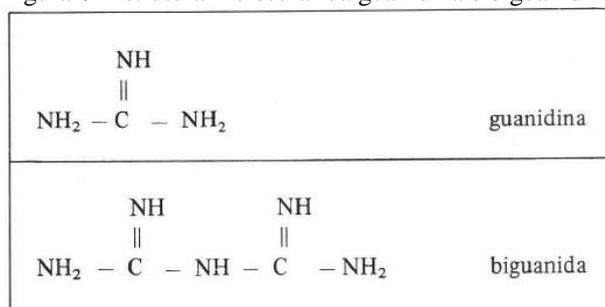
As guanidinas são bases fortes que se destacam entre as mais importantes bases nitrogenadas empregadas em síntese orgânica. A guanidina (FIGURA 6) foi isolada por Strecker como um produto de degradação da guanina, uma das bases purínicas constituintes dos ácidos ribonucleico (RNA) e desoxirribonucleico (DNA). Embora a guanidina e seus sais ocorram na natureza apenas na forma de traços, muitos dos seus

derivados são importantes constituintes de organismos vivos, como a creatina e a arginina. A guanidina, obtida a partir de seus sais (nitrato, sulfato, cloridrato ou carbonato) é utilizada como intermediário na síntese de fármacos com a sulfaguanidina e compostos relacionados, bem como na obtenção de derivados purínicos como o ácido fólico. Os cloridratos e tiocianatos de guanidina estão entre os mais potentes desnaturantes de proteínas e possibilitam o isolamento de substâncias como o interferon (XAVIER, 1997).

2.8.1 Metformina

As biguanidas são compostas por duas moléculas de guanidinas ligadas por cadeias de radicais metílicos (FIGURA 6). Este grupo de compostos normoglicemiantes orais foram desenvolvidos independentemente das sulfoniluréias. Em 1918, Watanabe descobriu em coelhos, que a guanidina apresentava ação normoglicemiante (ZACARELLI, 1987).

Figura 6- Estrutura molecular da guanidina e biguanidina.



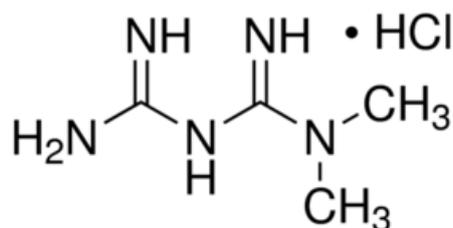
Fonte: (ZACARELLI, 1987, p. 11).

A biguanida metformina tem sido utilizada para reduzir a glicemia desde 1957 na Europa e desde 1995 nos EUA. No entanto, apesar de ser o medicamento mais prescrito em todo o mundo para o tratamento antidiabético, o seu mecanismo de ação não está totalmente esclarecido. A metformina (MET) e a fenformina são derivados da guanidina (FIGURA 7). Descoberto em 1920 em extratos da planta *Galega officinalis* (lilás), guanidina isoamileno, também chamado galegine, tem sido usado durante séculos para o tratamento de DM. A fenetilbiguanida (Phenformin) não é mais utilizada em seres humanos, por motivos de segurança. A terapia com MET é indicada para DM tipo 2, síndrome dos ovários policísticos, síndrome metabólica e para prevenção do DM. A MET reduz os níveis de glicose e melhora a sensibilidade à insulina, diminui a

ingestão de alimentos e a diminuição de peso corporal (SALPETER et al., 2008). Além disso, a MET melhora os marcadores de risco cardiovascular, incluindo o perfil lipídico, a esteatose hepática, a modulação de marcadores inflamatórios e, possivelmente, a redução do risco de câncer (PERNICOVA; KORBONITS, 2014).

No Brasil, a MET (FIGURA 7) é utilizada na terapia para o DM há muitos anos. O mecanismo de ação de MET é a alteração do metabolismo da energia da célula. A MET exerce efeito de redução da glicose hepática, inibindo a gliconeogênese e opondo-se à ação do glucagon. A MET pode diminuir a tumorigênese, tanto indiretamente, através da redução dos níveis de insulina sistêmica, como diretamente, através da indução de estresse energético (PERNICOVA; KORBONITS, 2014).

Figura 7- Estrutura molecular do Cloridrato de Metformina



Fonte: (ZACARELLI, 1987, p. 11).

A MET atua como um inibidor metabólico e altera o metabolismo energético celular. Ela é usada principalmente em pacientes com DM tipo 2, e seu principal mecanismo de ação neste cenário de doença é a inibição da gliconeogênese hepática. MET interage com o complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, diminuindo os níveis de ATP celular e causando acúmulo de AMP. AMP se liga ao sítio P da adenilato ciclase e inibe a sua ação em resposta ao glucagon, interrompendo, a sinalização cAMP-PKA. Como resultado, a atividade das enzimas da via gliconeogênica são inibidas em favor da glicólise. Este mecanismo é provavelmente o principal mecanismo pelo qual a MET reduz a produção hepática de glicose. Além disso, a redução da carga de energia leva à ativação da AMPK e regulação negativa da expressão gliconeogênica. Grande parte dos componentes reguladores do modelo de ação de MET, bem como os parâmetros que determinam a sua cinética e especificidade permanece indefinidos (VIOLLET et al., 2011).

Evidências laboratoriais da ação antimitótica da MET é promissora, embora os resultados de estudos epidemiológicos permanecem controversos. As semelhanças entre

células metabólicas pró-inflamatórias ativadas e células cancerosas sugerem que os inibidores metabólicos podem modular células imunitárias. Muitos detalhes de seu mecanismo de ação continuam a ser pesquisados na tentativa de desenvolver novas terapias à base de MET (PERNICOVA; KORBONITS, 2014).

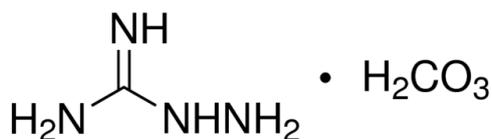
2.8.2 Aminoguanidina

A AG, também conhecida como pimagedina (FIGURA 8), foi o primeiro candidato à fármaco testado com o propósito de inibir as reações que levam à formação de AGEs (produtos finais de glicação avançada), sendo seguido pela piridoxamina e alagebrium, candidatos a fármacos 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 MET, 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 de agentes amino (aspirina) (GOH, COOPER, 2008).

Em modelos animais, um dos agentes mais notáveis usado para prevenir a formação de AGEs é a AG, uma hidrazina, que inibe tanto a formação de AGEs, e, em concentrações 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 AG em ratos diabéticos reduz AGEs e limita alterações estruturais e funcionais nos tecidos (GIARDINO, 1998; GOH, COOPER, 2008).

Figura 8- Estrutura molecular da Aminoguanidina Bicarbonato



Fonte: SLIMAN, et al., (2010, p.10).

Numa linha contrária aos que mostram um efeito nefrotóxico da AG (PHILIS-TSIMIKAS et al., 1995; SKAMARAUSKAS; MCKAY; HUNT, 1996) estudos mais recentes, demonstraram uma ação protetora em neurônios da retina de camundongos com retinopatia induzida por oxigênio pela inibição da apoptose (DU et al., 2013). Ozturk et al., (2012), em estudo com ratos diabéticos, demonstraram o efeito protetor da AG sobre a sobrevivência de ratos diabéticos com feridas aleatórias dorsais. Nos grupos diabéticos e não diabéticos a administração de AG reduziu significativamente o MDA e os níveis de NO e aumentou significativamente o conteúdo de GSH e atividade da enzima SOD, e mostrou um papel importante da AG na prevenção de necrose. Luo et al., (2013), verificaram que AG aliviou significativamente o aumento da produção NO e aliviou a congestão pela reperfusão do miocárdio. Mostrando que os inibidores seletivos de iNOS podem ser úteis no tratamento de certas doenças associadas com a isquemia e reperfusão (LUO et al., 2013). E Nico et al., (2013), mostram que a AG não é hepatotóxica, quando utilizada em concentração de 1g/L para o tratamento de complicações decorrentes do DM, e confirmou que a associação da AG com a prática de exercício físico moderado ameniza os danos causados pelo DM, sem a utilização de insulina.

O estudo ACTION (1999) avaliou a segurança e eficácia da AG em relação à taxa de progressão de nefropatia diabética. No geral, 690 pacientes com DM tipo 1 com diagnóstico conhecido de nefropatia e retinopatia foram inscritos. Após 2 a 4 anos, a terapia com AG foi bem sucedida na redução da proteinúria de 24 horas e na prevenção da diminuição da taxa de filtração glomerular. Por outro lado, o efeito sobre os níveis de creatinina no soro não foi significativa. Além disso, uma minoria dos doentes tratados com AG, em comparação com os controles, apresentou progressão da retinopatia. Em geral, este estudo demonstrou que a inibição da produção de AGEs pode resultar em uma atenuação clinicamente significativa de complicações do DM. O estudo ACTION II avaliou o efeito da AG na progressão da doença renal de 599 pacientes com DM tipo 2 em comparação com placebo. Devido a efeitos secundários em pacientes que

receberam doses elevadas, tais como sintomas gripais, alterações hepáticas, distúrbios gastrointestinais e anemia, houve uma interrupção precoce do estudo. Assim, até o momento não foi possível comprovar um papel definitivo e seguro da administração de AG em humanos (BOLTON et al., 2004; FREEDMAN et al., 1999).

Recentemente, reportou-se um aumento da expressão e atividade de NOX2 em neutrófilos peritoneais de ratos diabéticos tratados com AG por 50 dias, com melhora da função renal (DE SOUZA FERREIRA, 2016).

Entretanto, o estresse oxidativo contribui para a progressão de nefropatia diabética, e o sistema NOX é considerado uma das principais fontes de anion superóxido na nefropatia diabética (KASHIHARA et al., 2010; SINGH, WINOCOUR, FARRINGTON, 2011). O superóxido reage imediatamente com NO formando peroxinitrito, um intermediário altamente reativo, que restringe a biodisponibilidade do NO e leva a danos oxidativos e citotoxicidade (ITO et al., 2015; KALYANARAMAN, 2013; WILCOX, 2005).

2.9 ÓXIDO NÍTRICO E IMPLICAÇÕES FISIOLÓGICAS

O óxido nítrico (NO) é um vasodilatador sintetizado por três isoformas de NO sintase (NOS): endotelial (e), neuronal (n) e induzível (i). Nos rins, o NO tem vários efeitos protetores, incluindo a regulação da hemodinâmica renal, a secreção de renina, a inibição da reabsorção de sódio tubular, o *feedback* tubuloglomerular (TGF) e atividade nervosa simpática renal (GARVIN, HERRERA, ORTIZ, 2013). A inibição crônica de NOS induz ao dano renal, proteinúria e lesão esclerótica glomerular em ratos (BAYLIS; MITRUKA; DENG, 1992), a expressão de eNOS e nNOS está diminuída nos rins de ratos com insuficiência renal crônica (FUJIHARA et al., 2002). Além disso, em condições diabéticas, a nefropatia pode ser agravada utilizando um inibidor de NOS (L-NAME) e reduzida utilizando um precursor de NO (L-arginina) em ratos obesos Otsuka Long-Evans Tokushima (ITO et al., 2015; KAMIJO, HIGUCHI, HORA, 2006).

Todas as três isoenzimas de NOS são semelhantes estruturalmente, porém reguladas de modo diverso. A iNOS ou isoforma II não é expressa constitutivamente, sendo induzida nos macrófagos e outras células por lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos e/ou citocinas (DING; NATHAN; STUEHR, 1988). Uma vez induzida, a iNOS é capaz de produzir NO por longo tempo, e isso vem a caracterizar seu envolvimento em vários processos patológicos. Assim, o alto nível de NO produzido

por macrófagos ou por neutrófilos ou outras células ativadas, que deve ser tóxico para micróbios, parasitas ou células tumorais, pode também lesar células saudáveis vizinhas, sendo este mecanismo responsável por vários processos inflamatórios e autoimunes (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

O aumento das doenças crônicas levou a identificação de vários modificadores importantes no mecanismo de redox celular. Entre eles estão angiotensina II (angio II), aldosterona, hiperglicemia/hiperinsulinemia, lipídios modificados, aumento de sal, e o sistema nervoso periférico. Modificações dos mecanismos de redox celular resultam da produção anormal de $O_2^{\cdot-}$ e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os quais são mediados por várias vias de sinalização, como fatores de transcrição, tirosina kinases/fosfatases, canais iônicos, fatores mitogênicos e citocinas (TOUYZ, BRIONES, 2011). Entre essas vias de sinalização, as EROs tem efeito distinto no rim e vários mecanismos celulares renais, incluindo transporte tubular de sódio, *feedback* tubuloglomerular, fluxo sanguíneo medular, migração e crescimento celular, hipertrofia, expressão de genes inflamatórios e de matrix extracelular e apoptose. Esses efeitos na geração de EROs dentro do rim dependem da concentração, do local de geração e do balanço de vias pró e antioxidantes (NISTALA et al, 2008).

O sistema NOX renal e vascular está envolvido na patogênese da hipertensão, e requer Rac1/Rac2 e Rap1 para ativar alguns sistemas (OELZE et al., 2006). As NOX renal e vascular compartilham várias características com NOX2 de neutrófilos. Entretanto, há diferenças funcionais e organizacionais das NOX fagocíticas e não-fagocíticas, como a localização perinuclear de todas as subunidades, o que facilita o recrutamento rápido das subunidades para gerar ERO para o propósito de sinalização. Em células mesangiais, NO inibe a expressão de NOX1 sugerindo *cross-talk* entre NO e o sistema de geração de superóxido (ORIENT et al., 2007).

Os mecanismos de regulação da pressão arterial em longo prazo são mecanismos hormonais e fundamentalmente ligados à volemia. Os mecanismos em curto prazo estão diretamente ligados a reflexos neurais, que modificam as variáveis hemodinâmicas que determinam a pressão. A homeostase do volume dos fluidos corporais e a regulação em longo prazo da pressão arterial (PA) estão intimamente relacionadas, via mecanismo de *feedback* rim/fluidos corporais (GUYTON, 1980; 1990). O componente central desse mecanismo é o efeito da PA na excreção renal de sódio e água, o chamado mecanismo natriurese/diurese pressórica. Este mecanismo permite que a manutenção da PA em longo prazo seja alcançada via controle da excreção de sódio e água, e, se a ingestão

destes permanecer constante, o volume do fluido extracelular, o volume sanguíneo, e o débito cardíaco diminuem até que a PA seja restaurada ao valor de controle prévio ao aumento da PA (AIRES, 2012).

Anormalidades no mecanismo de pressão/diurese/natriurese provocam distúrbio no ponto de equilíbrio da PA, determinando, por exemplo, a instalação da hipertensão. De acordo com a teoria de Guyton, et al. (1980; 1990), este seria o mecanismo central de controle a longo prazo, sendo que, para ocorrer alteração sustentada da PA, seria necessário haver alteração do *feedback* rim/fluidos corporais (AIRES, 2012).

3 OBJETIVOS

Há diversos trabalhos que utilizam AG como inibidor de AGEs, tanto em humanos quanto em animais, e seus resultados parecem bastantes controversos. O efeito da AG no aumento de ERO e superóxido em neutrófilo também precisa ser mais profundamente investigado, além de seu efeito em outros tipos celulares. Portanto, os objetivos deste trabalho foram divididos em geral e específicos e são descritos abaixo.

3.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para a elucidação do mecanismo pelo qual a AG promove o aumento de atividade de NOX2 em neutrófilos e em células endoteliais (HUVEC).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar se o tratamento com AG ou MET altera parâmetros celulares e fisiológicos de animais diabéticos ou não diabéticos. Conforme descrito abaixo.

- a) Para avaliar se a AG modula os parâmetros abaixo relacionados em ratos Wistar diabéticos, induziu-se o diabetes nos animais por aloxano e, os animais foram tratados ou não com AG. Os parâmetros avaliados foram:
 - os parâmetros bioquímicos (perfil glicêmico e função renal dos animais);
 - a atividade e expressão de NOX2 em neutrófilos peritoneais;
 - a atividade fagocítica e microbicida de neutrófilos peritoneais.

- b) Para avaliar se a AG modula os parâmetros abaixo relacionados em ratos Wistar não-diabéticos, utilizou-se neutrófilos peritoneais de ratos Wistar não-diabéticos, tratados ou não com AG. Os parâmetros avaliados foram:
 - a expressão de NOX2 em neutrófilos peritoneais;
 - a atividade fagocítica e microbicida de neutrófilos peritoneais de ratos Wistar;
 - a liberação de nitrito no soro dos animais;
 - a atividade das enzimas antioxidantes (catalase, SOD e GPx) no soro dos animais;
 - a Pressão Arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) dos animais.

- c) Para avaliar se a AG ou a MET modulam os parâmetros abaixo relacionados foram realizados experimentos em neutrófilos isolados de sangue periférico de humanos, e, em linhagem de células endoteliais HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) tratados ou não com AG ou MET. As células foram cultivadas na presença ou não de inibidores da PKC (queleritrina), de NOX (apocinina) ou iNOS (L-NAME). Os parâmetros avaliados foram:
- a atividade e a expressão da NOX2 em neutrófilos;
 - a produção de ERO em HUVEC;
 - a atividade fagocítica e microbicida de neutrófilos;
 - a liberação de IL-8 e IFN- γ por neutrófilos e HUVEC.

4 METODOLOGIA

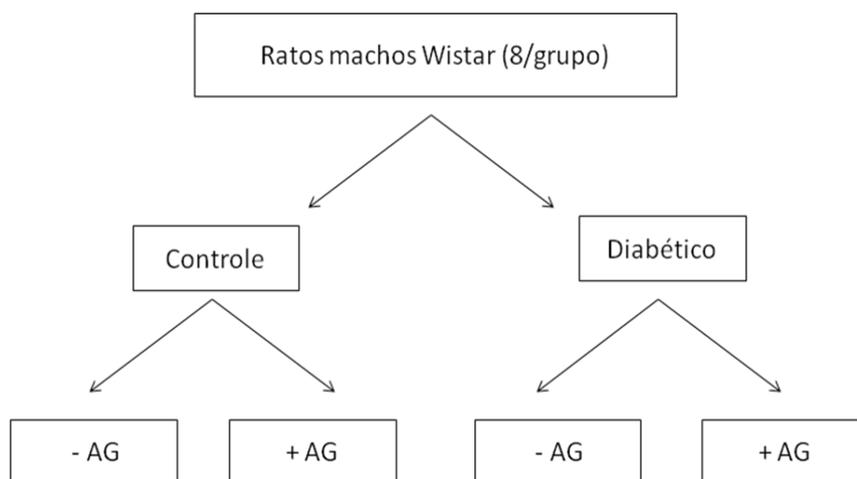
As informações específicas referentes aos modelos experimentais utilizados, o delineamento experimental, a coleta de material, bem como os testes e as técnicas utilizadas estão descritas a seguir.

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em quatro grupos (FIGURA 9). Os experimentos foram realizados em três etapas, sendo que, na primeira etapa (FIGURA 10) foi realizada uma complementação dos experimentos obtidos no mestrado. E foram utilizados animais diabéticos ou não tratados com AG, dos quais foram obtidos: soro para as análises bioquímicas, os rins para a análise histológica e o lavado peritoneal contendo os neutrófilos para avaliação da atividade e expressão de NOX2.

Tratamento *in vivo* com a AG

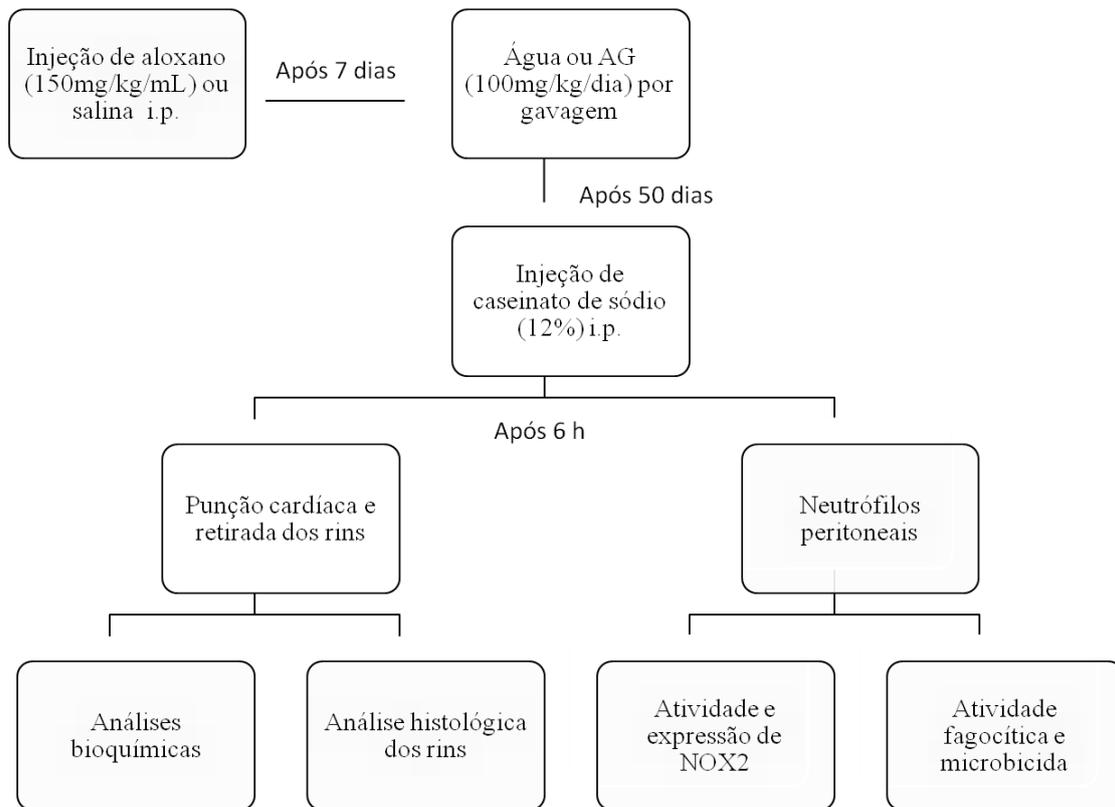
Figura 9- Representação esquemática do tratamento dos animais



Fonte: autoria própria.

Figura 10- Representação esquemática da primeira etapa de experimentos.

Primeira etapa – Ratos Wistar diabéticos e não-diabéticos

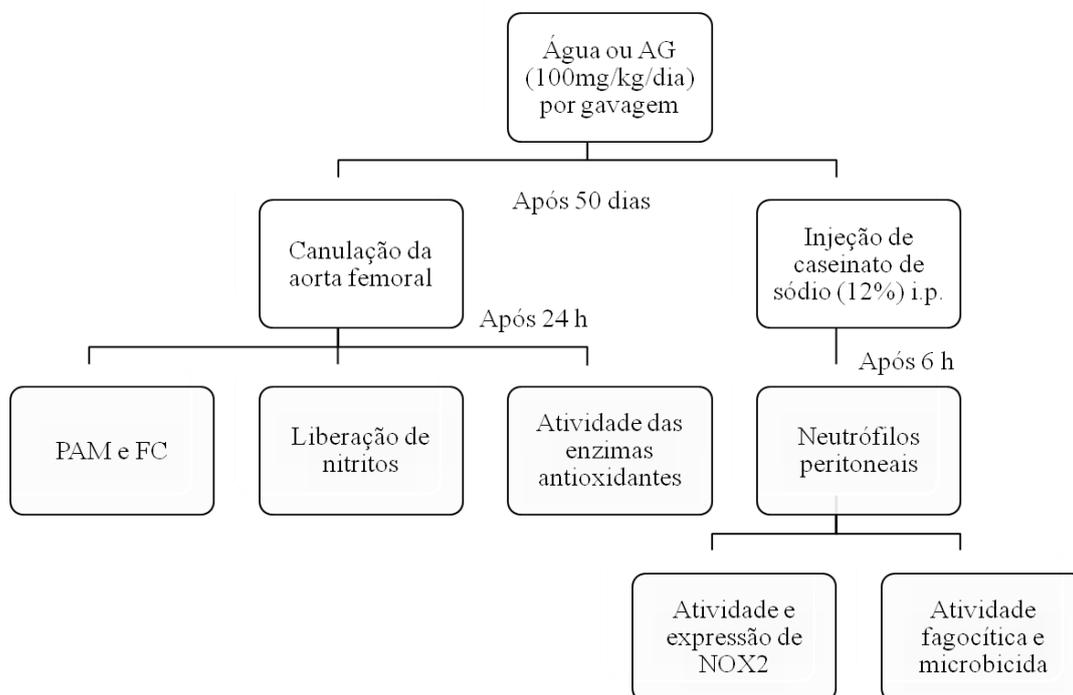


Fonte: autoria própria.

Na segunda etapa foram utilizados ratos Wistar não-diabéticos, para avaliar o efeito da AG na PAM e na FC, na liberação de nitritos e na atividade das enzimas antioxidantes (FIGURA 11). Além disso, foi recolhido o lavado peritoneal dos animais para obtenção de neutrófilos e para repetição do experimento de determinação de ERO e atividade fagocítica e microbicida frente à *Candida albicans*.

Figura 11- Representação esquemática da segunda etapa de experimentos.

Segunda etapa – Ratos Wistar não-diabéticos



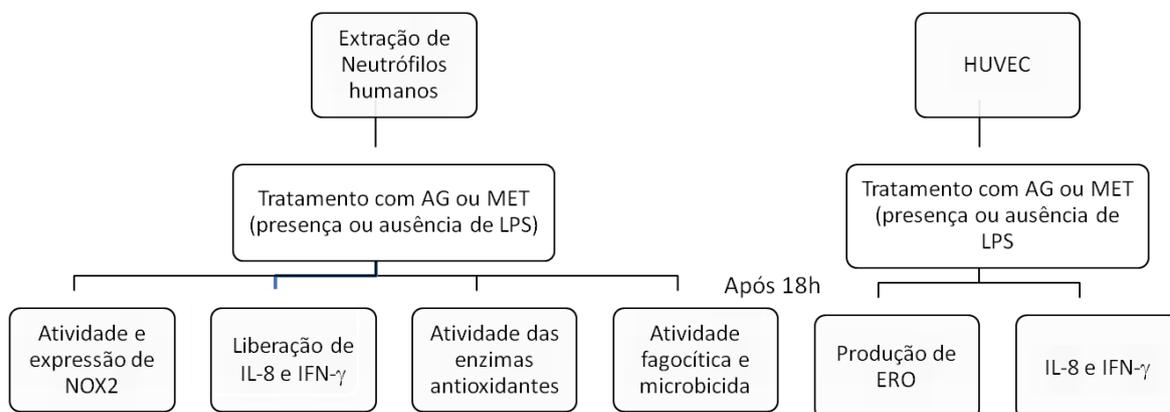
Fonte: autoria própria.

Na terceira etapa, foram avaliados os neutrófilos humanos extraídos de sangue periférico e a cultura de HUVEC (FIGURA 12), após 18h de incubação com AG. Nesses experimentos foram utilizados inibidores na tentativa de elucidar as vias de aumento de ERO.

Tratamento *in vitro* com a AG

Figura 12- Representação esquemática da terceira etapa de experimentos.

Terceira etapa – Cultura de células



Fonte: autoria própria.

4.2 MODELO ANIMAL

Foram utilizados 100 ratos machos Wistar, com peso de 280 ± 50 g, obtidos no Biotério da Universidade Federal de Alfenas e mantidos em caixas de polietileno, com água e ração comercial *ad libitum* e mantidos em ciclo de claro-escuro de 12 horas. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal da UNIFAL-MG sob o protocolo de número CEUA 4752/2012 (ANEXO A) e foram conduzidos de acordo com a declaração de Helsinki para o bem estar de animais de experimentação.

Inicialmente os animais foram randomizados em quatro grupos principais conforme descrito a seguir:

- a) controle: animais não diabéticos, tratados com água por gavagem, e com glicemia abaixo de 150 mg/dL;
- b) diabético: animais submetidos à administração de aloxano, tratados com água por gavagem e com glicemia acima de 250 mg/dL;
- c) controle + AG: animais controle tratados com AG, por gavagem, durante 50 dias;
- d) diabético + AG: animais diabéticos tratados com AG, por gavagem, durante 50 dias.

4.3 INDUÇÃO DO DIABETES

Para induzir o diabetes foi administrado Aloxano (em solução salina a 0,9%), na concentração de 150mg/kg de animal, pela via intraperitoneal (i.p.) (SZKUDELSKI, 2001) e aos controles foi administrado salina. Foram considerados diabéticos, os animais que apresentaram glicemia e glicosúria acima de 250 mg/dL verificado por kit comercial, cinco dias após a indução (STOPPA, et al., 2006).

O tratamento por gavagem foi iniciado sete dias após a administração do aloxano e confirmação do estado diabético.

4.4 TRATAMENTO COM AG EM RATOS WISTAR

Para investigar a relação entre a AG e o aumento de ERO, a AG bicarbonato (Sigma) foi administrada aos animais por gavagem (100mg/kg/dia) por sete semanas

(50 dias) após uma semana de indução do diabetes (OGUZ et al., 2013; OZYAZGAN et al., 2000; VLASSARA et al., 1994).

4.5 RECRUTAMENTO DOS NEUTRÓFILOS PERITONEAIS

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.

4.6 ISOLAMENTO DA CAVIDADE PERITONEAL

Após o sacrifício, os animais tiveram a cavidade intraperitoneal lavada com 15 mL de PBS. As células obtidas do lavado peritoneal foram lavadas em PBS, contadas e mantidas em gelo até a realização dos ensaios.

4.7 CONTAGEM DAS CÉLULAS E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Para a contagem dos neutrófilos peritoneais, as células foram diluídas em líquido de Turk (ácido acético 3% e azul de metileno 1%) (diluição 1/20) e contadas em Câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada com Azul de Tripán 0,1% e foram contadas como mortas as células nas quais o corante penetrou.

Para os neutrófilos humanos foi utilizado o ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio) que se baseia na verificação da atividade de atividade e integridade mitocondrial, interpretada como uma medida de viabilidade celular (GOMEZ et al., 1994). Os neutrófilos humanos foram contados em contador hematológico automatizado (Counter 19 Wiener lab[®]).

Para avaliação da morfologia celular os neutrófilos foram fixados em lâminas e foram corados pelo método MGG modificado por Rosenfeld (ROSENFELD, 1947).

4.8 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

A glicose foi acompanhada através de determinação da glicosúria em urina colhida dos ratos a partir de 10 dias após injeção de aloxano, e semanalmente. Após a coleta de sangue por punção cardíaca a glicemia de jejum foi determinada por kit comercial enzimático baseado na reação de Trinder. As dosagens da uréia e creatinina foram feitas por kit comercial, usando respectivamente o método enzimático colorimétrico (Berthelot modificado) e o método de Jaffé em aparelho automatizado (LabMax Plenno®, Labtest Diagnostica). 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 hemoglobina glicada (Hb A1c) foi avaliada por cromatografia de troca iônica, através de kit comercial (Analisa®).

4.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS RINS

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 7µm em micrótomo Leica®, os cortes foram aderidos em lâminas de vidro e corados pelo método Hematoxilina-Eosina, este experimento foi realizado em colaboração com o Prof. Tomaz, no Laboratório de Histologia 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®.

4.10 DETERMINAÇÃO DE NITRITOS

Foi determinada a liberação de nitritos em soro dos animais pelo método de Griess, o qual permite uma medida indireta da produção de NO (DING; NATHAN; STUEHR, 1988). As determinações foram realizadas em triplicata.

4.11 DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

Para verificar o efeito da AG em NOX2, utilizou-se o modelo de determinação de pressão arterial de ratos Wistar, através da canulação da artéria femoral. O qual foi realizado em colaboração com os professores Alexandre Vieira e Michael Brian Santiago. Na véspera dos experimentos, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/kg, i.p.) e submetidos ao implante cirúrgico de cânulas de polietileno. As cânulas utilizadas foram confeccionadas a partir de um tubo de polietileno (PE-10) de 4 a 5 cm soldado a outro tubo de polietileno (PE-50) com comprimento ajustado (aproximadamente 15 cm) de acordo com o tamanho do animal, e foram obstruídas na extremidade livre do PE-50 com pinos de metal. Os animais foram submetidos à canulação da artéria femoral. Após o implante a cânula foi exteriorizada na região escapular dorsal do rato com o auxílio de um trocater e fixada com linha de sutura. Estes procedimentos foram realizados como descrito por VIEIRA et al. (2012).

Um dia após a cirurgia de canulação da artéria, o tubo PE 50 arterial foi conectado a um transdutor de pressão (Statham P 23 Db) acoplado a um sistema computadorizado de registro (Mac Lab/Power Lab - ADInstruments[®]). Os registros da PAM e FC foram feitos em animais não anestesiados e com movimentação livre.

4.12 IMUNODETECÇÃO DAS SUBUNIDADES DE NOX2

Foram realizados ensaios de imunofluorescência para detectar a presença do sistema NOX2 usando anticorpo policlonal específico para as subunidades p67phox e p47phox (Millipore) (PINTO, et al., 2007). Os neutrófilos peritoneais de ratos foram coletados em PBS, centrifugados a 1200 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 incubou-se as lâminas com o anticorpo anti-p67phox e anti-

p47phox (1:100) por 1 hora a temperatura ambiente. Lavou-se e incubou-se 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, montou-se as lâminas em lamínulas contendo glicerol tamponado com pH alcalino e 0,1% de parafenileno-diamino (PPD), um inibidor do decaimento de fluorescência.

4.13 MODELO DE CULTURA CELULAR HUMANA

Foram utilizados neste trabalho, dois tipos de células: neutrófilos extraídos de sangue periférico e HUVEC (célula endotelial de cordão umbilical humano). Ambos os tipos celulares foram tratados com inibidores de NOX: apocinina ou SOD, inibidor de PKC: queleritrina e inibidor de iNOS: L-NAME. Para a determinação da produção de ERO ou de superóxido as células foram estimuladas com PMA (12- miristato 13-acetato de forbol) ou LPS (lipopolissacarídeo bacteriano de *E.coli* O26:B6).

Os neutrófilos humanos, extraídos de sangue periférico e as HUVEC, foram incubados em estufa com 5% CO₂, a 37°C por 18h com meio RPMI suplementado com 5% de SFB. Após a incubação, as células foram centrifugadas e o sobrenadante celular foi retirado. As células foram ressuspensas em PBSA e mantidas em banho de gelo até a realização dos ensaios.

4.14 ISOLAMENTO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS DE SANGUE PERIFÉRICO

Foi utilizado sangue periférico de 10 doadores aparentemente saudáveis. Como critérios de inclusão dos doadores foram considerados os seguintes parâmetros: aparência de boa saúde em geral e idades entre 20 e 40 anos que tenham assinado o TCLE. E os critérios de exclusão dos doadores foram: história de qualquer doença aguda ou crônica; uso recente de qualquer tipo de medicação; uso recente de álcool, drogas ou o tabagismo ativo. Os doadores voluntários recrutados para a doação de sangue para a extração de neutrófilos foram esclarecidos sobre a pesquisa e assinaram um termo de livre consentimento autorizando a doação de sangue (APENDICE A). Número do parecer do CEP 564.925 (ANEXO B).

O sangue foi colhido em tubos plásticos com citrato de sódio, e posteriormente diluído na proporção 1:1 com PBS 10mM, pH 7,4 estéril. A diluição foi colocada sobre

10mL de Histopaque-R (densidade: 1,077g/ml). O material então foi centrifugado a 2500 rpm à temperatura ambiente por 20 minutos. Ao infranadante foram adicionados 20 mL de Dextran 5%, diluído em PBS estéril para sedimentação de eritrócitos. O material foi mantido em banho de gelo por 45 minutos, sendo o sobrenadante e centrifugado a 2500 rpm à temperatura ambiente por 5 minutos.

O infranadante foi submetido à hemólise em 5mL de água gelada com agitação constante por 1 minuto. A isotonicidade foi restabelecida com 5mL de NaCl 2.7% e 15mL de PBS estéril. O material restante foi centrifugado em 2500 rpm à temperatura ambiente por 5 minutos, e o infranadante ressuspensionado em 1mL de PBS. A contagem de células totais foi realizada em contador automatizado Couter Winer[®] e a viabilidade celular avaliada com Azul de Tripan 0,1% em Câmara de Neubauer (BOYUM, 1968). As células foram mantidas em banho de gelo até a realização dos ensaios.

4.15 CULTURA DE HUVEC

As células foram gentilmente cedidas pela professora Daniela Basseri (USP-Química), por intermédio da professora Ana Campa (USP-FCF).

As HUVEC foram cultivadas em meio de crescimento RPMI 1640 (pH 7,4) complementado com 10 % de soro fetal bovino, 4% L-glutamina 200 mM; penicilina (100 IU/ml) e estreptomicina (100 ug/ml) à 37 °C em estufa umidificada com 5% de CO₂. Ao atingir a 90-100% de confluência, as células foram divididas usando tripsina/EDTA (Sigma). Todos os experimentos foram realizados utilizando células HUVEC a partir da terceira passagem. Ao longo dos experimentos, as culturas de células permaneceram livres de contaminantes, inclusive micoplasma (testado por PCR). Para estimular a produção de ERO pelas HUVEC foram testados vários estímulos, entretanto o que promoveu o que teve melhor resultado foi o LPS (1ug/mL) a 37°C por 45 min. (STACEY; VISSERS; WINTERBOURN, 2012).

4.16 TRATAMENTOS COM OS FÁRMACOS E INIBIDORES

Foi realizado um ensaio de citotoxicidade por MTT com os neutrófilos tratados com AG até a concentração de 500mM e utilizou-se a menor concentração (0,5mM) testada no ensaio de quimiluminescência. Para a MET, foi usada a concentração de 0,5mM, estabelecida pela literatura (PARK et al., 2013). Para os inibidores, utilizaram-

se as seguintes concentrações: Apocinina e L-NAME 100 μ M (FARLEY et al., 2008; STEFFEN et al., 2012), Queleritrina 20 μ M (SIOMBOING et al., 2001) e a enzima superóxido dismutase (SOD) 0,03 mg/mL.

4.17 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ERO E ANION SUPERÓXIDO

Para avaliar a produção de ERO direta e indiretamente por NOX2 foram utilizadas duas técnicas.

4.17.1 Ensaio da Redução do Citocromo C

A produção de superóxido por NOX2 em neutrófilos de ratos foi monitorado pela redução do Citocromo C. O ensaio realizou-se em cubeta de plástico de 1 mL contendo 2×10^6 células, 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. Iniciou-se a produção de superóxido pela adição de PMA (16ng/mL). Após a adição do estímulo PMA, monitorou-se a reação em espectrofotômetro por 3 minutos em comprimento de onda de 550 nm (PUNCHARD, 1996).

4.17.2 Quimiluminescência amplificada por Luminol e Lucigenina

Acompanhou-se a intensidade de quimiluminescência em luminômetro com volume final de 0,3 mL. A reação foi iniciada com PMA (53 ng/ensaio). O luminol e a lucigenina foram usados como substrato na concentração de 1 mM. Realizaram-se todas as reações em PBS, pH 7,4 e acompanhadas por 30 minutos (GOMEZ et al., 1994; JONES; HANCOCK, 1994). O luminol é uma espécie química capaz de ser oxidada pelas ERO geradas e atua como sonda para amplificar a quimiluminescência celular proporcional à produção total de ERO. A lucigenina, por sua vez, é oxidada somente pelo ânion superóxido, e atua como sonda para a quantificação deste radical e avaliação da atividade de NOX2.

Realizaram-se reações como controle negativo: sem células, sem luminol, sem PMA, e com SOD. Todos os *ependorfs* foram lidos separadamente durante 30 minutos

em luminômetro e os resultados foram expressos como a área integrada sob o perfil de quimiluminescência registrado, expressos em RLU/minuto.

4.18 DETERMINAÇÃO DE ERO POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para determinar a formação de ERO em HUVEC utilizou-se a sonda fluorescente 2',7'-diacetato dichlorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA)(cedida gentilmente pela Profa. Dra. Sueli de Oliveira Silva da UEM/Paraná). A determinação foi realizada em citometro de fluxo FACSCalibur™ BD, da FCF/USP-SP com auxílio da técnica Renata Chaves Albuquerque.

Essa sonda é comumente utilizada e pode reagir com várias ERO, incluindo peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e peroxinitrito. O H₂DCFDA é permeável e se difunde passivamente nas células e é retido no nível intracelular após clivagem por esterases intracelulares. Após a oxidação por ERO, o H₂DCFDA não fluorescente é convertido para o altamente fluorescente 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF) (KALYANARAMAN et al., 2012).

A metodologia utilizada foi a de Miyoshi (2010), com modificações. Para verificar a produção de ERO somente em células vivas, utilizou-se o iodeto de propídio (PI) (1µg/mL) para excluir as em apoptose ou necrose, as quais liberam ERO. O PI é uma molécula que se intercala no DNA, desde que a membrana celular esteja permeável. (MIYOSHI et al., 2010). Realizou-se a determinação por citometria de fluxo e as HUVEC (2 x 10⁵) foram avaliadas com ou sem tratamento com AG ou MET, no estado basal, e com ativação por LPS (1µg/mL).

4.19 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES FAGOCÍTICA E CANDÍDIDA DE NEUTRÓFILOS

Após a separação dos neutrófilos o pellet foi ressuspenso em PBSA contendo: 100mM de cloreto de cálcio, 50mM de cloreto de magnésio e 100µM de glicose. Utilizou-se em cada experimento 2x10⁶ células/mL, sendo que os neutrófilos foram usados imediatamente após a extração, não ultrapassando quatro horas após o isolamento.

A cepa de *Candida albicans* utilizada foi a ATCC 10231, gentilmente cedida pela prof^a. Amanda Latercia Tranches Dias. A atividade microbicida dos neutrófilos frente à *C. albicans* foi acompanhada na presença e ausência de AG.

Os neutrófilos (2×10^6) foram incubados em tubos de plástico estéreis a 37°C (para evitar a aderência das células) com *C. albicans* opsonizadas com uma proporção de 1:10 (2×10^7) a 37°C em 1 ml de PBS contendo glicose sob agitação (10 rpm). Depois de 30, 60, 90 e 120 min de incubação, uma alíquota de 50 µl das suspensões foi aderida a lâmina de vidro em citocentrífuga (Sorocito FANEM). Após a centrifugação, as lâminas foram coradas com Wright e May-Giemsa (SAMPAIO et al., 2001). Foram contados como células fagocíticas os neutrófilos com uma ou mais leveduras anexadas. No entanto, este método não distingue as leveduras engolfadas daquelas que estão ligadas à superfície do neutrófilo (SAMPAIO et al., 2001). A percentagem de células fagocíticas e o número de células de levedura foram contados em 200 neutrófilos por lâmina. Pelo teste de exclusão do corante foi determinada a atividade candidida e a viabilidade das leveduras.

4.20 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE CATALASE

A catalase foi determinada no soro dos ratos de acordo com o método descrito por Ernest Beutler (BEUTLER, 1975). Para o homogenato de neutrófilos foi determinada segundo Aebi (1984). Alíquotas de homogenato de neutrófilos (correspondendo a 35µg de proteínas) foram incubadas com PBS pH 7,4. A reação foi iniciada com a adição de H₂O₂ 10mM e a absorbância foi monitorada por um minuto. A cinética de decomposição do H₂O₂ foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do mesmo a 240nm ($43,6M^{-1}cm^{-1}$). Os resultados foram expressos em U/mg, onde U corresponde a atividade da enzima que promove a hidrólise de 1µM de H₂O₂ por minuto.

4.21 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE GPX

A atividade de GPx foi determinada no soro dos ratos de acordo com o método descrito por Wendel (1981). E no homogenato de neutrófilos segundo Sinet et al. (1975) e se baseia na oxidação do NADPH acompanhada a 340nm a 37°C. Alíquotas de homogenato de neutrófilos (correspondendo a 35µg de proteínas) foram incubadas em

PBS pH 7,4 com glutatona reduzida 1mM, NADPH 0,2mM e glutatona reductase 1,8U/mL durante três minutos a 37°C. A absorbância foi monitorada em espectrofotômetro a 340nm. Após três minutos de incubação, foi adicionado t-butil-hidroxiperoxido 0,9mM para iniciar a reação. A absorbância foi monitorada por mais cinco minutos. A cinética de oxidação do NADPH foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do mesmo a 340nm ($6,22M^{-1}cm^{-1}$).

4.22 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE SOD

A atividade da enzima SOD foi determinada no soro dos ratos e no homogenato de neutrófilos segundo Oyanagui (1984). Alíquotas de soro ou homogenato de neutrófilos (correspondendo a 35ug de proteínas) foram incubadas com hidroxilamina 3mM, hipoxantina 0,07mM e xantina oxidase $3,4 \times 10^{-3}$ U/mL a 37°C, durante 30 minutos na ausência de luz. Após a incubação, foi adicionado ácido sulfanílico, a-naftilenodiamino e ácido acético glacial, sendo mantidos a temperatura ambiente por 20 minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 550nm.

4.23 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Para verificar a peroxidação lipídica no soro dos animais, realizou-se a determinação de malonaldeído (MDA) com ácido tiobarbitúrico (TBARS). Nessa reação, duas moléculas de TBARS reagem com uma molécula de MDA formando um cromógeno róseo que tem absorbância máxima em solução ácida (532-535 nm). A absorbância foi medida em espectrofluorímetro a 535nm (DRAPER; HADLEY, 1990).

4.24 DETERMINAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Para a determinação de IL-8 e INF- γ em HUVEC foram utilizadas 2.10^5 células por poço, tendo como estímulo celular LPS, na concentração de 1ug.

Para os neutrófilos foram utilizadas 1.10^6 células por poço, sendo utilizado 1ug de LPS como estímulo, por 4h ou 12h. A placa submetida à cultura foi centrifugada em a 1500rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante livre de células foi coletado e

submetido a congelamento em tubos criogênicos a -80°C até o momento do ensaio de quantificação das citocinas por ELISA.

A determinação das citocinas foi feita por imunoenensaio quantitativo. A determinação de IL-8 foi realizada por ELISA pelo kit Human IL-8/CXCL8 (Sigma), e as concentrações de INF-g, pelo kit Human IFN gamma (sigma), conforme as instruções do fabricante.

4.25 QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO POR WESTERN BLOT

Os neutrófilos e as HUVEC foram lisados em tampão Ripa pH 7,5 (Tris HCl (50mM), NaCl (150mM), EDTA (1mM), 1% SDS, 1% Triton X-100) contendo pool de inibidores de proteases comercial (Sigma[®]), Benzamidina (5ul/ml), Leupeptina (2ul/ml) e fluoreto de metilfenilsulfonil (PMSF - 100 mg/mL). A lise foi realizada em sonicador ultrassônico, e, as amostras foram centrifugadas a 14000rpm, 4°C , por 10 min. As amostras foram congeladas em freezer -70°C até a realização da quantificação e do procedimento.

A concentração de proteínas das amostras foi quantificada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976) (microensaio).

Realizou-se a eletroforese de proteínas em gel de separação 15% de acrilamida, sob o gel de empilhamento a 5% de acrilamida. As amostras contendo 50ug de proteínas foram desnaturadas por fervura em banho-maria (95°C) em tampão de amostra por 3 minutos. A eletroforese foi realizada em cuba vertical a 120V, com pelo menos um poço contendo padrão de massa molecular (Sigma marker wide range 6,5 a 200 KDa). Os géis foram corados com Coomassie blue e descorados até completa visualização das bandas protéicas ou submetidos à transferência para membrana de nitrocelulose.

As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (com poros de 0,45 um de diâmetro) em sistema de transferência por 2h, sob amperagem constante de 1 mA/cm^2 de membrana. Após a transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau a 0,5% por aproximadamente 5 minutos (até o aparecimento das bandas protéicas). As membranas foram descoradas com água destilada e bloqueadas com BSA 5% por 1h, depois lavadas com TBS-T e incubadas com o anticorpo primário específico *overnigth*.

Os anticorpos primário utilizados foram: NOXA2/p67phox da abcam[®]; RbpAb to cytochrome b245 ligth chain da abcam[®]; p47phox rabbit Ab da cell signaling[®]; NOX3 da sigma; anti-beta actin, clone EA23Y rabbit monoclonal da millipore[®].

No dia seguinte realizaram-se as lavagens com TBS-T e a incubação com o anticorpo secundário ligado a HRP (proteína de cabra anti-IgG de coelho peroxidase e HRP - Merck[®]). A membrana foi revelada por quimiluminescência com o reagente ECL (GE Healthcare[®]) em filme fotográfico (GE Healthcare[®]).

4.26 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Submeteram-se os dados ao teste de normalidade. Foi utilizado o teste de variância ANOVA one ou two-way, sendo que as amostras normais foram avaliadas por teste t de Student's e os dados não normais foram analisados por Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, dependendo da quantidade de grupos. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como diferentes significativamente.

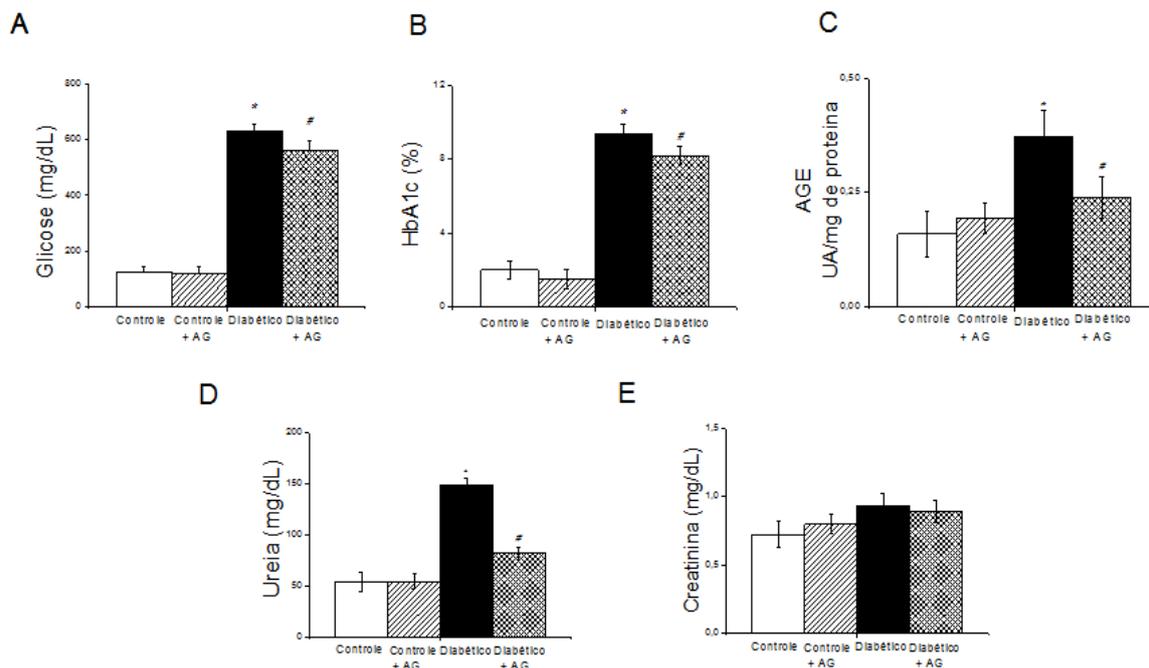
5 RESULTADOS

No sentido de elucidar o mecanismo pelo qual a AG gera aumento da atividade de NOX2 de neutrófilos, e verificar se este efeito está associado à guanidinas, como a MET, realizaram-se os seguintes ensaios com AG e/ou MET com os respectivos resultados.

5.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM AG NO PERFIL BIOQUÍMICO DE RATOS WISTAR

Para avaliarmos o efeito da AG no perfil bioquímico de ratos Wistar, os animais diabéticos e não diabéticos (controle) foram tratados com AG, ou não. No gráfico 1, pode-se observar que o modelo de diabetes foi bem caracterizado com aumento de glicemia. A AG manteve os níveis de glicemia, hemoglobina glicada e dos AGEs dos animais controles (GRÁFICO 1 A). A AG foi capaz de diminuir a HbA1c e os AGEs nos animais diabéticos (GRÁFICO 1 B e C). O tratamento com AG foi capaz de melhorar a função renal dos animais tratados, não apresentando nenhum efeito nefrotóxico (GRÁFICO 1 D e E).

Gráfico 1- Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar após o tratamento com AG.



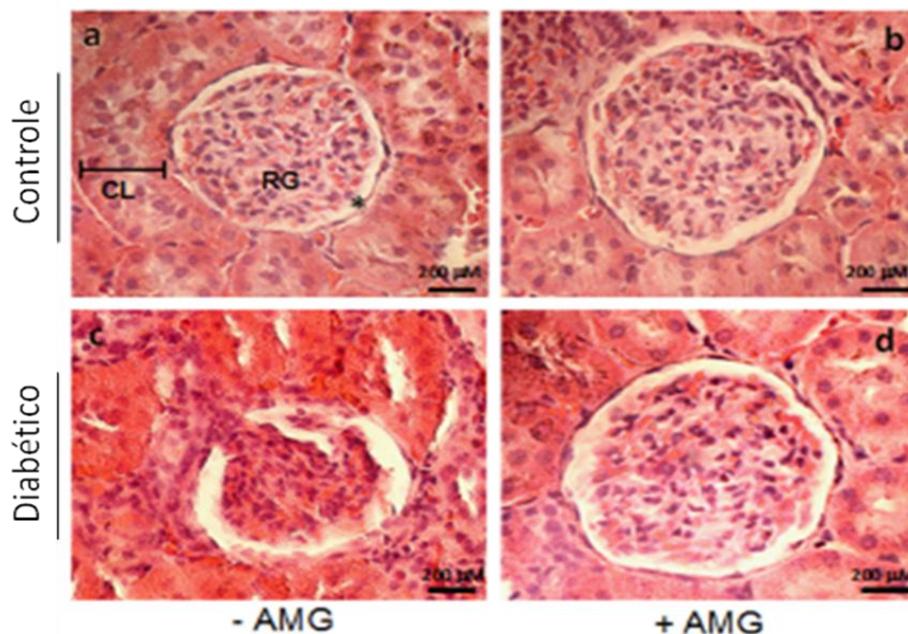
Legenda: **A.** Avaliação da glicemia dos animais no momento do sacrifício. **B.** Avaliação da HbA1c no sangue total. **C.** AGEs fluorescentes no soro dos animais. **D.** Determinação de ureia no soro. **E.** Determinação de creatinina no soro. Grupos: controle (n=8), controle + AG (n=8), diabético (n=8) e diabético + AG (n=8). Os gráficos de barras são expressos em média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes em triplicata. * $p < 0.05$ Controle vs. Diabético; # $p < 0.05$ Diabético vs. Diabético + AG.

Fonte: autoria própria.

5.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM AG NOS RINS DE RATOS WISTAR

O rim é o principal alvo de danos mediados pelos AGEs, pois representa o principal local para a depuração desses produtos. Foi realizada análise histológica qualitativa do rim usando microscopia de luz e coloração por HE para avaliar a morfologia dos glomérulos (FIGURA 13). Glomeruloesclerose foi definida como glomérulos com esclerose ou expansão mesangial. Como pode ser observado na (FIGURA 13a – controle, b - controle tratado com AG), há glomérulos normais, sem evidência de danos. Na Figura 13c (diabético) observa-se um extenso dano glomerular, aspecto inflamado e espessamento da membrana basal. Na Figura 13d (diabéticos tratados com AG), pode-se observar que a AG protegeu o glomérulo dos danos causados pelo diabetes.

Figura 13- Imagem representativa das secções de rim submetidas à coloração H. E.



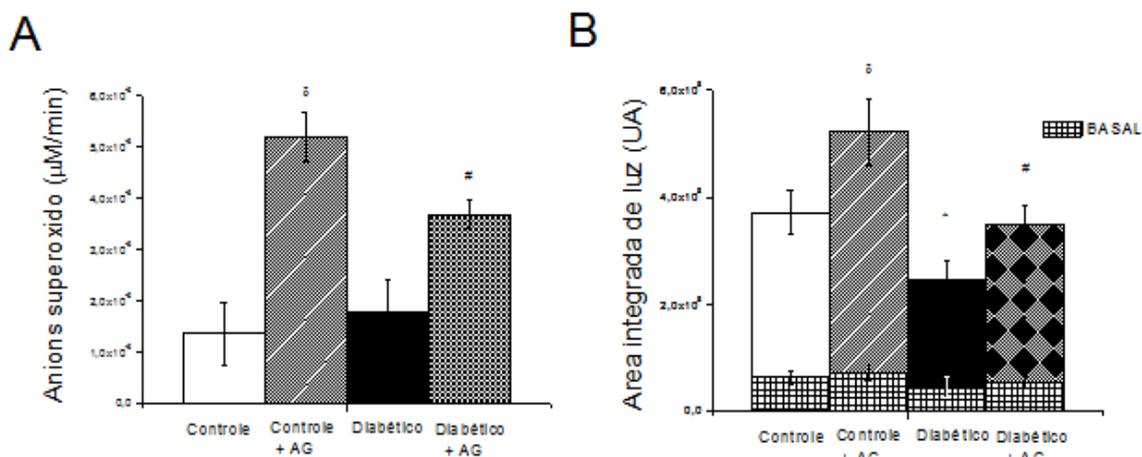
Legenda: **a.** Controle - O labirinto cortical com a região do corpúsculo renal ao centro. A cápsula de Bowman delimita o espaço capsular. **b.** Controle + AG - A região do labirinto cortical com um corpúsculo renal, cápsula do folheto parietal e espaço capsular, sem alterações histológicas aparentes. Os glomérulos não apresentaram alterações no volume, no arranjo das células e nos capilares glomerulares. **c.** Diabético - ao centro está a porção do labirinto do corpúsculo renal cortical. O espaço capsular glomerular está aumentado e a cápsula de Bowman apresenta folheto visceral mais espesso. O glomérulo renal é mais condensado, com o arranjo típico de processo inflamatório. O espaço capsular exibiu alterações com deposição de substâncias. **d.** Diabetes + AG - ao centro está a porção do labirinto do corpúsculo renal cortical, sem alterações histológicas aparentes. (n = 5 por grupo). *Espaço capsular; CL: labirinto cortical; RG: glomérulo renal; AMG: aminoguanidina.

Fonte: autoria própria.

5.3 EFEITO DA AG NA PRODUÇÃO DE ERO, NAS ATIVIDADES FAGOCÍTICA E CANDICIDA DE NEUTRÓFILOS DE RATOS WISTAR E NA EXPRESSÃO DE NOX2.

Encontrou-se um aumento na atividade de NOX2 (GRÁFICO 2 A) e na produção de ERO (GRÁFICO 2 B), em ambos os grupos de animais tratados com a AG, tanto o diabético como o controle.

Gráfico 2- Determinação de ERO por quimiluminescência em neutrófilos de ratos Wistar.

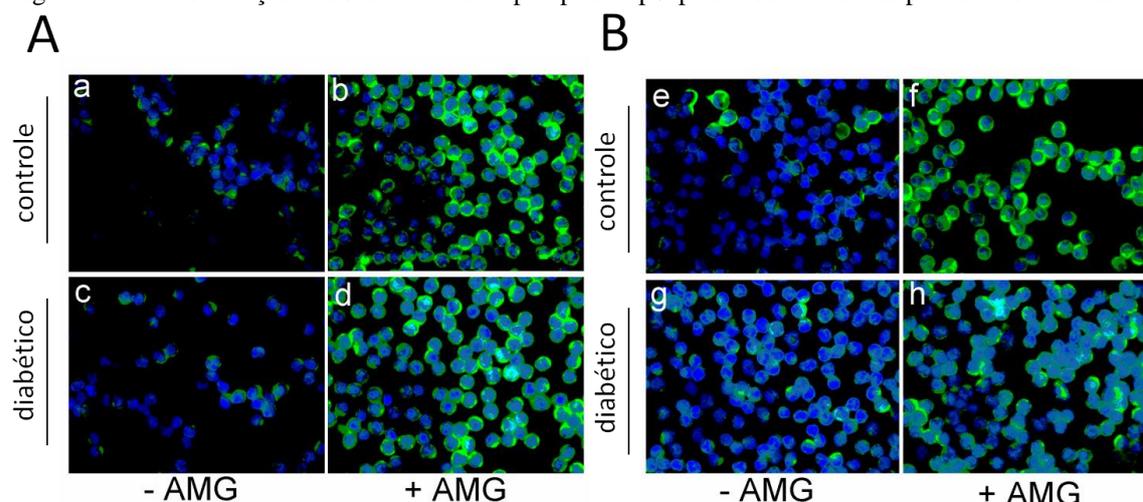


Legenda: **A.** Determinação de ânions superóxido em neutrófilos peritoneais de ratos wistar. **B.** Determinação do pool de ERO em neutrófilos peritoneais de ratos wistar. Valores da média \pm desvio padrão da área integrada de emissão de luz obtido de neutrófilos do peritônio de ratos. As barras quadriculadas são as médias das reações sem PMA (ERO basal). Grupos: Controle (n=8), Controle + AG (n=8), Diabético (n=8) e Diabético + AG (n=8). Os gráficos de barras são expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata. * $p < 0.05$ vs. Grupo controle, # $p < 0.05$ vs. Grupo Diabético.

Fonte: autoria própria.

Para compreender o aumento de ERO e superóxido nos neutrófilos peritoneais de ratos, foi realizada a imunodeteção das subunidades p47 e p67 de NOX-2. E como pode ser visualizado (FIGURA 14) houve um aumento de ambas as subunidades nos grupos tratados com AG (FIGURA 14 b,d,f,h). O estado diabético não influenciou na expressão das subunidades (FIGURA 14 c, d, g, h).

Figura 14- Imunodeteccção das subunidades de p47 phox e p67phox nos neutrófilos peritoneais de ratos.

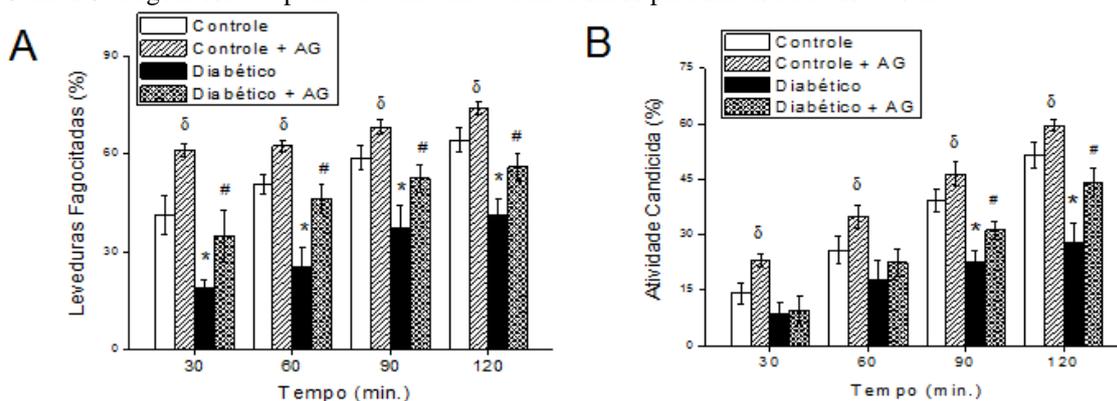


Legenda: **A.** Imunodeteccção de p47phox nos neutrófilos peritoneais de ratos Wistar. **B.** Imunodeteccção de p67phox em neutrófilos peritoneais de ratos Wistar. Foram utilizados anticorpos primários anti-p47 phox e anti-p67phox e anticorpo secundário marcado com FITC, o qual fluoresce a 518 nm (verde). O núcleo foi marcado com DAPI (azul). Cada figura representa 10 campos diferentes. Aumento de 100x objetiva de imersão. **a.** Controle, **b.** Controle + AG, **c.** Diabético, **d.** Diabético + AG, **e.** Controle, **f.** Controle + AG, **g.** Diabético e **h.** Diabético + AG (n = 5 por grupo).

Fonte: autoria própria.

Esse aumento de ERO culminou com aumento de fagocitose e atividade candidida *ex vivo* (GRÁFICO 3 A e B). O efeito de aumento de NOX2 ocorreu tanto em animais normais como em animais diabéticos tratados com AG.

Gráfico 3- Fagocitose e capacidade candidida de neutrófilos peritoneais de ratos Wistar.



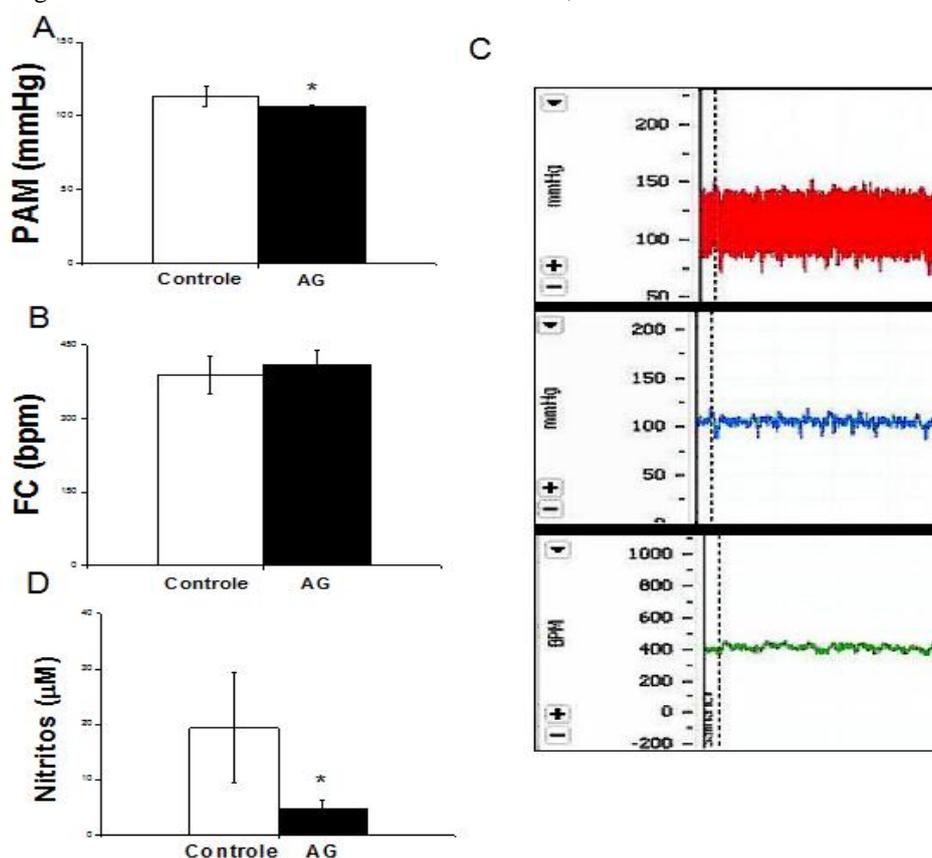
Legenda: **A.** Capacidade fagocítica de neutrófilos peritoneais de ratos Wistar frente à *C. albicans*. Avaliou-se a porcentagem de neutrófilos que fagocitaram uma ou mais leveduras (% fagocitose). **B.** Capacidade candidida de neutrófilos peritoneais de ratos Wistar frente à *C. albicans*. Avaliou-se a viabilidade das leveduras (% mortas). Os dados correspondem a dois experimentos feitos em duplicata. Grupos: controle (n=5), controle + AG (n=5), diabético (n=5) e diabético + AG (n=5). δ p < 0.05 Controle vs Control+AG; * p < 0,05 Controle vs Diabético; # p < 0.05 Diabético vs Diabético + AG.

Fonte: autoria própria.

5.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM AG NA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA DE RATOS WISTAR

Para verificar os efeitos cardiovasculares do tratamento com a AG, utilizou-se o modelo de determinação de pressão arterial de ratos Wistar, através da canulação da artéria femoral. Houve uma redução significativa na PAM média (FIGURA 15 A) nos animais tratados com AG. Entretanto a FC foi mantida (FIGURA 15 B), as mudanças na pressão arterial pulsátil, PAM e a FC está representado (FIGURA 15 C). A AG diminuiu a produção de nitratos no soro dos animais tratados (FIGURA 15 D).

Figura 15- Efeito do tratamento com AG na PAM, FC e nitratos em ratos Wistar



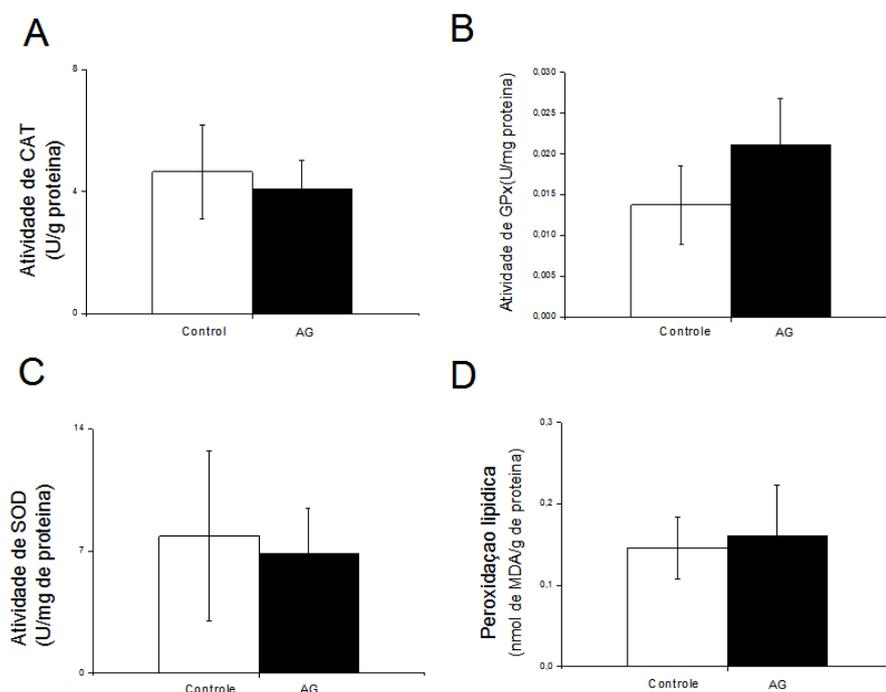
Legenda: **A.** Pressão arterial média (PAM) em mmHg. **B.** Frequência cardíaca (FC) em bpm. **C.** Representante das mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg, em vermelho), PAM (em azul) e frequência cardíaca (em verde). **D.** Determinação de nitratos, no soro de ratos wistar. Um dia após a cirurgia de canulação da artéria, o tubo PE 50 arterial foi conectado a um transdutor de pressão (Stathan P 23 Db) acoplado a um sistema computadorizado de registro (Mac Lab/Power Lab). Os registros da PAM e FC foram feitos em animais não anestesiados e com movimentação livre. Grupos: controle (n=5), AG (n=5). *p < 0.05 Grupo controle vs. Grupo tratado com AG.

Fonte: autoria própria.

5.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM AG NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE RATOS WISTAR

Para avaliar o efeito da AG na atividade das enzimas antioxidantes, o sangue dos ratos Wistar, utilizados para o experimento de PAM e FC, foram coletados. A atividade da CAT (GRÁFICO 4 A), bem como da GPx e da SOD foram mantidas pela AG (GRÁFICO 4B). O mesmo perfil foi encontrado para a peroxidação lipídica (GRÁFICO 4 C e D).

Gráfico 4- Determinação da Atividade das Enzimas Antioxidantes e Peroxidação Lipídica no soro de ratos Wistar.



Legenda: **A.** Atividade de catalase (CAT) no soro de ratos Wistar. **B.** Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx) no soro de ratos Wistar. **C.** Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) no soro de ratos Wistar. **D.** Peroxidação Lipídica no soro de ratos Wistar. Ensaio em triplicata (n=8).

Fonte: autoria própria.

5.6 EFEITO DO TRATAMENTO COM AG NA PRODUÇÃO DE ERO EM HUVEC

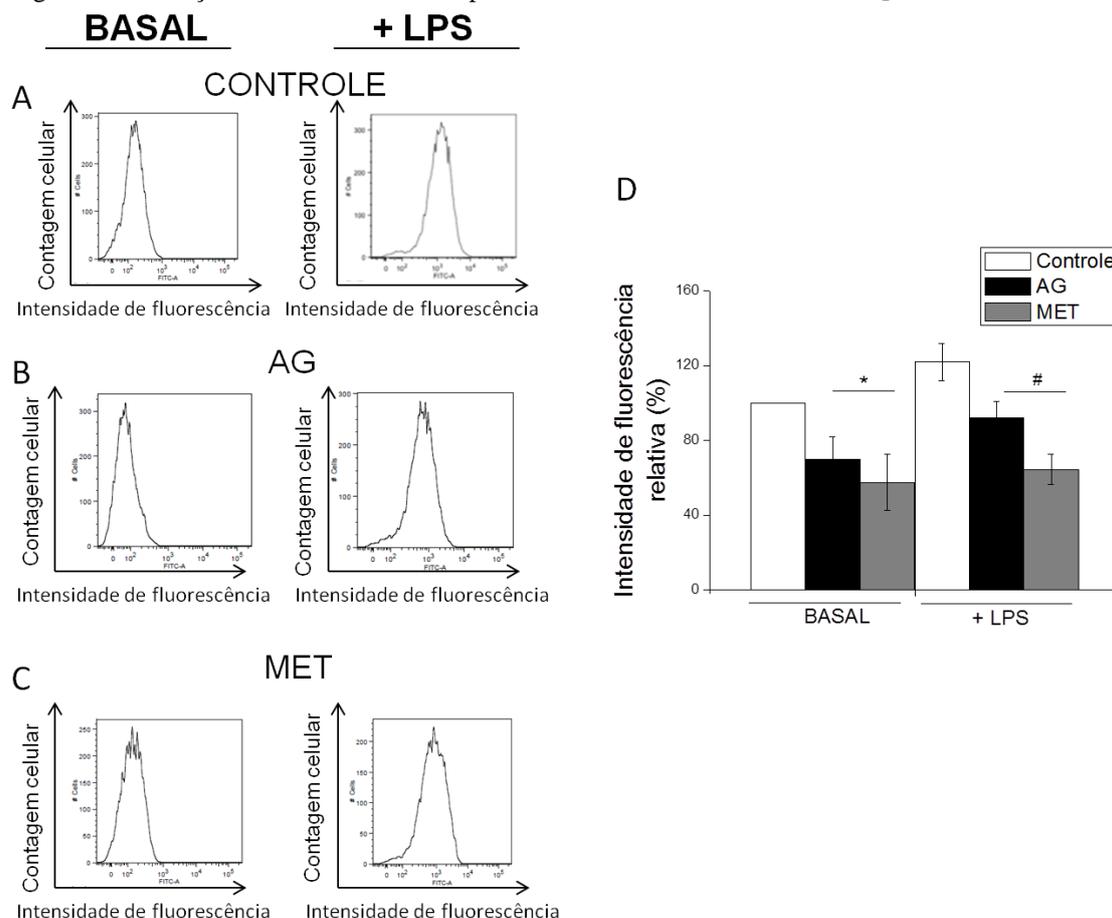
Foi realizada a padronização do cultivo da linhagem HUVEC, e realizou-se a determinação de ERO por quimiluminescência, entretanto, essa metodologia não é

sensível para HUVEC. Assim, a determinação de ERO em HUVEC foi realizada por citometria de fluxo utilizando a sonda H₂DCFDA (2μM).

Foi realizada a determinação de ERO de HUVEC tratadas com AG ou MET por 18h, em estufa à 37 °C e 5% de CO₂. As células foram estimuladas ou não com LPS (1ug/mL).

Podem ser visualizados os gráficos de intensidade de fluorescência pela contagem de células coradas com DCF (FIGURA 16 A-C). As células estimuladas com LPS apresentam um deslocamento de pico para a direita (aumento da intensidade de fluorescência). Houve uma diminuição da intensidade de fluorescência nas HUVEC tratadas com AG e MET (FIGURA 16 D).

Figura 16- Produção de ERO em HUVEC por citometria de fluxo com a sonda H₂DCFDA.



Legenda: **A.** Produção de ERO por HUVEC não estimuladas (basal) e estimuladas com LPS. **B.** Produção de ERO por HUVEC tratadas com AG não estimuladas (basal) e estimuladas com LPS. **C.** Produção de ERO por HUVEC tratadas com MET não estimuladas (basal) e estimuladas com LPS. **D.** Valores de média em relação ao controle (100%) de três experimentos independentes (n=6). *p < 0.05. Grupo controle vs. Grupos tratados #p < 0.05 Grupo controle+LPS vs. Grupos tratados+LPS.

Fonte: autoria própria.

5.7 EFEITO DAS GUANIDINAS NA LIBERAÇÃO DE ERO POR NEUTRÓFILOS HUMANOS

Aqui, foram avaliados os efeitos das guanidinas: AG e MET em neutrófilos humanos, extraídos de sangue periférico. A concentração de MET utilizada nos ensaios foi de 50mM, conforme a literatura (PARK et al., 2013).

Após o teste de citotoxicidade (TABELA 2), foi avaliada a produção de ERO em várias concentrações de AG.

Tabela 2- Determinação da citotoxicidade da AG em neutrófilos humanos.

Neutrófilos	Viabilidade (%)
Controle	99,1 ± 0,7
AG 100 uM	99,2 ± 0,3
AG 250uM	99,0 ± 0,7
AG 500uM	99,5 ± 0,5
AG 100mM	99,9 ± 0,01
AG 250mM	99,7 ± 0,5
AG 500mM	99,4 ± 0,7

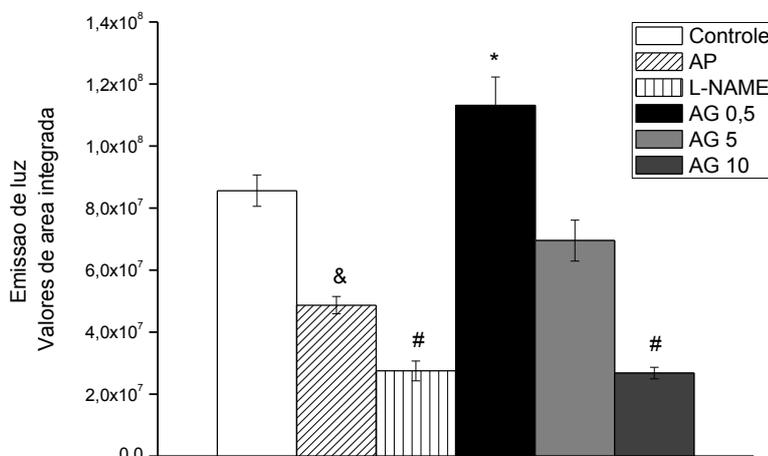
Fonte: autoria própria.

Três concentrações de AG (0,5 mM, 5mM e 10 mM) apresentaram diferença na produção de ERO (GRÁFICO 5), desta forma utilizou-se a menor concentração (0,5mM), que foi a mesma encontrada na literatura para MET.

Foram realizados vários ensaios para avaliar a influência da AG (0,5mM) em neutrófilos humanos, extraídos de sangue periférico, após um período de 18h de incubação. Foi usado como controle positivo o LPS na concentração de 0,1ug, o qual também foi incubado por 18h. Para a determinação de ERO e superóxido, os neutrófilos foram tratados antes da reação (10min.) com os seguintes inibidores:

- a) AP - Apocinina (0,1mM): inibidor de NOX2;
- b) L-NAME (0,1mM): inibidor de iNOS;
- c) QUE - Queleritrina (20uM): inibidor de PKC;
- d) SOD - Superóxido dismutase (0,03 mg/mL): inibidor de anions superóxido.

Gráfico 5- Padronização da concentração de AG em neutrófilos humanos pela determinação de ERO.



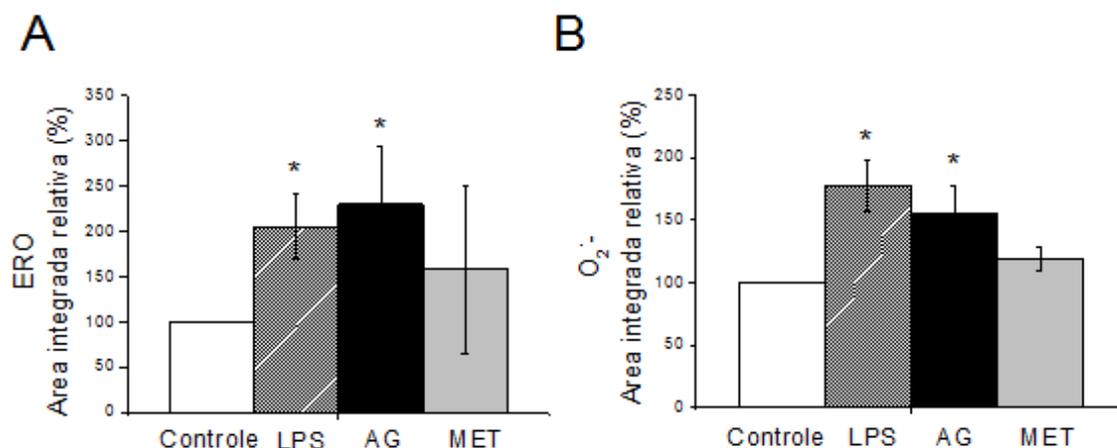
Legenda: Produção de ERO por neutrófilos humanos. Valores da média \pm desvio padrão da área integrada de emissão de luz. Grupos: Controle (n=5), AG (aminoguanidina) (n=5 para cada concentração), AP (apocinina) (n=5). Os gráficos de barras são expressos em média \pm desvio padrão (cada ensaio foi realizado em duplicata de reação). *p < 0.05 Grupo controle vs. Grupo tratado com AG; & Grupo controle p < 0.05 vs. Grupo tratado com AP; # p < 0.05 Grupo controle vs. Grupo tratado com L-NAME.

Fonte: autoria própria.

Após a padronização, e o estabelecimento da concentração de 0,5mM de AG, procederam-se os ensaios de quimiluminescência para avaliar o pool de ERO (GRÁFICO 6 A) e a produção de ânions superóxido (GRÁFICO 6 B) pelos neutrófilos mantidos em cultura.

Como cada doador apresentou diferentes picos de respostas, padronizou-se calcular a área integrada relativa, sempre comparando com o controle respectivo (considerado 100%). Como pode ser visualizado (GRÁFICO 6) a AG causou o mesmo efeito que o LPS, aumentando a produção de ERO e de $O_2^{\cdot -}$ (GRÁFICO 6 A e B). Entretanto, nos neutrófilos tratados com MET foi mantida a produção de ERO e de $O_2^{\cdot -}$ (GRÁFICO 6 A e B).

Gráfico 6- Produção de ERO e anions superóxido por neutrófilos humanos.



Legenda: **A.** Pool de ERO por quimiluminescência em neutrófilos humanos. Neutrófilos (1×10^6 células/ensaio) foram incubados com luminol (1mM) e PMA (53 ng/ensaio). Valores da média \pm desvio padrão da área integrada de emissão de luz relativa em relação ao controle (100%) de quatro experimentos independentes (n=8). **B.** Determinação de anions superóxido por quimiluminescência em neutrófilos humanos. Neutrófilos (1×10^6 células/ensaio) foram incubados com lucigenina (1mM) e PMA (53 ng/ensaio). Valores da média \pm desvio padrão da área integrada de emissão de luz relativa em relação ao controle (100%) de quatro experimentos independentes (n=8). # $p < 0.05$ Grupo controle vs. Grupos tratados.

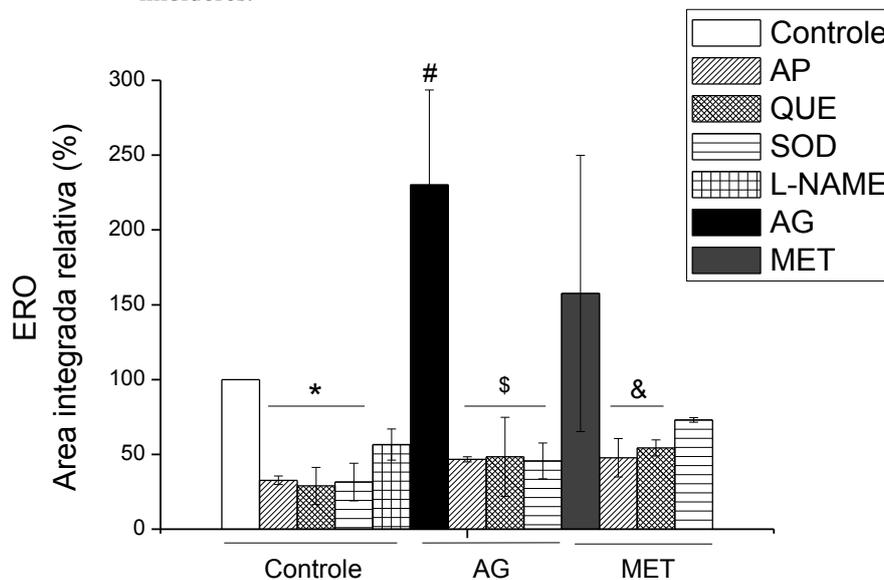
Fonte: autoria própria.

Para tentar elucidar qual a via que estava influenciando a produção de ERO, foram usados alguns inibidores para cada um dos tratamentos. A AP e a SOD são inibidores de NOX e a QUE é um inibidor de PKC. Somente para o controle foi utilizado o L-NAME, um inibidor de iNOS. Os inibidores foram incubados com os neutrófilos, antes de cada reação por 10 min., e a reação foi iniciada após o estímulo com PMA.

Os neutrófilos tratados com AG apresentaram um aumento na produção do pool de ERO e os tratados com MET, mantiveram os mesmos níveis do controle (GRÁFICO 7). Todos os tratamentos não influenciaram o nível basal de ERO.

Todos inibidores diminuíram a produção de ERO (GRÁFICO 7), sendo que nos neutrófilos controles os inibidores AP, QUE, SOD apresentaram em torno de 60% de inibição e L-NAME 40% de inibição. Para os neutrófilos tratados com AG a inibição foi maior: AP, QUE e SOD inibiram em torno de 80% da produção de ERO. Nos neutrófilos tratados com MET os inibidores AP e QUE promoveram uma inibição em torno de 60% da produção de ERO e com a SOD em torno de 50%.

Gráfico 7- Produção de ERO por neutrófilos humanos tratados com AG, MET e inibidores.



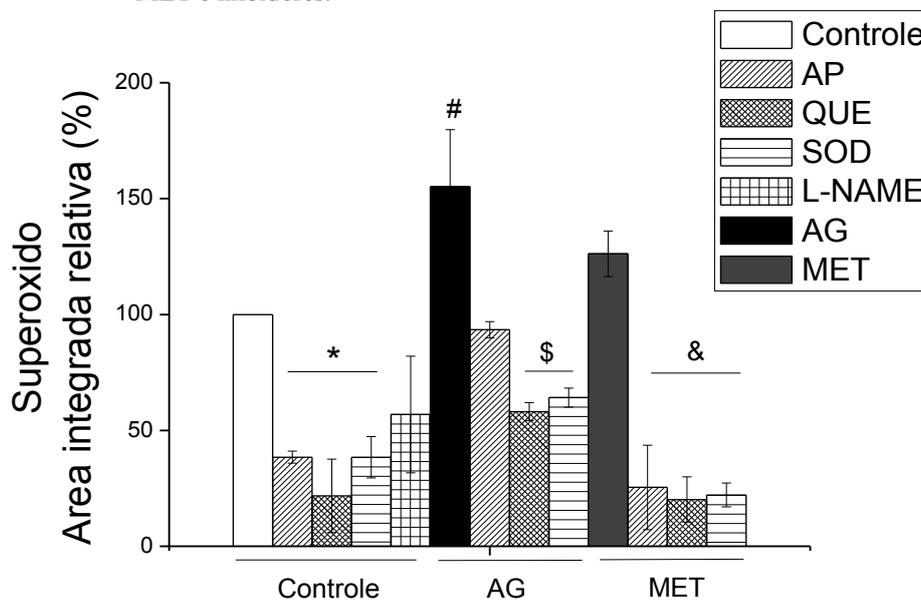
Legenda: Pool de ERO por quimiluminescência amplificada por luminol em neutrófilos humanos. Valores da média \pm desvio padrão da área integrada de emissão de luz relativa em relação ao controle (100%) de quatro experimentos independentes (n=4). *p < 0.05 Grupo controle vs. Grupos tratados com inibidores; #p < 0.05 Grupo controle vs. Grupos tratados com AG; \$p < 0.05 Grupo AG vs. Grupos tratados com inibidores; &p < 0.05 Grupo tratado com MET vs. Grupos tratados com inibidores.

Fonte: autoria própria.

Quanto à determinação de $O_2^{\cdot-}$, os neutrófilos tratados com AG tiveram um aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ quando estimulados com PMA. Os tratados com MET, não tiveram diferença quanto à produção de $O_2^{\cdot-}$.

Todos inibidores diminuíram a produção de $O_2^{\cdot-}$ (GRÁFICO 8), sendo que nos neutrófilos controles os inibidores AP, QUE e L-NAME apresentaram em torno de 60% e SOD 50% de inibição. Para os neutrófilos tratados com AG, a AP inibiu em torno de 40%, a QUE e a SOD cerca de 60% da produção de superóxido. Nos neutrófilos tratados com MET a inibição foi maior: AP, QUE e SOD inibiram em torno de 80% da produção de superóxido.

Gráfico 8- Produção de ânions superóxido por neutrófilos humanos tratados com AG, MET e inibidores.



Legenda: Determinação por quimiluminescência amplificada por lucigenina em neutrófilos humanos. Neutrófilos (1×10^6 células/ensaio) foram incubados com lucigenina (1mM) e PMA (53 ng/ensaio). Valores da média \pm desvio padrão da área integrada de emissão de luz relativa em relação ao controle (100%) de quatro experimentos independentes (n=4). *p < 0.05 Grupo controle vs. Grupos tratados com inibidores; #p < 0.05 Grupo controle vs. Grupos tratados com inibidores; \$p < 0.05 Grupo AG vs. Grupos tratados com inibidores; &p < 0.05 Grupo tratado com MET vs. Grupos tratados com inibidores.

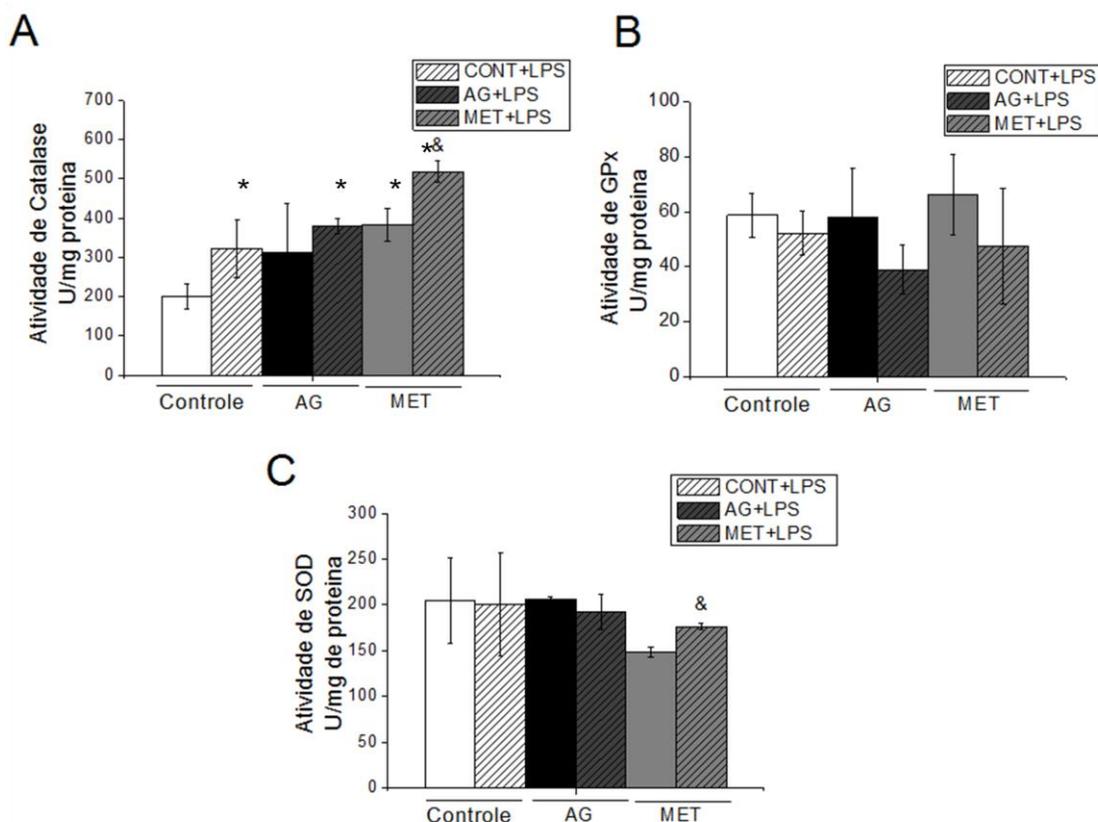
Fonte: autoria própria.

5.8 EFEITO DO TRATAMENTO COM AG NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Como o perfil de inibição da produção de superóxido nos neutrófilos tratados com MET foi potencializado, foram avaliadas as atividades das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx no homogenato de neutrófilos incubados ou não com AG e MET após 18h de cultura, a fim de verificar se a MET apresenta efeito antioxidante.

E como pode ser visualizado (GRÁFICO 9 A) houve um aumento da atividade da CAT nos neutrófilos estimulados por LPS em todos os grupos, além disso, o grupo tratado somente com a MET também apresentou um aumento da atividade de CAT. Os níveis de GPx nos neutrófilos foram mantidos pelos tratamentos (GRÁFICO 9 B). Houve aumento da atividade da SOD nos neutrófilos tratados com MET e estimulados por LPS comparado ao grupo não estimulado (GRÁFICO 9 C).

Gráfico 9- Atividade de enzimas antioxidantes em neutrófilos humanos



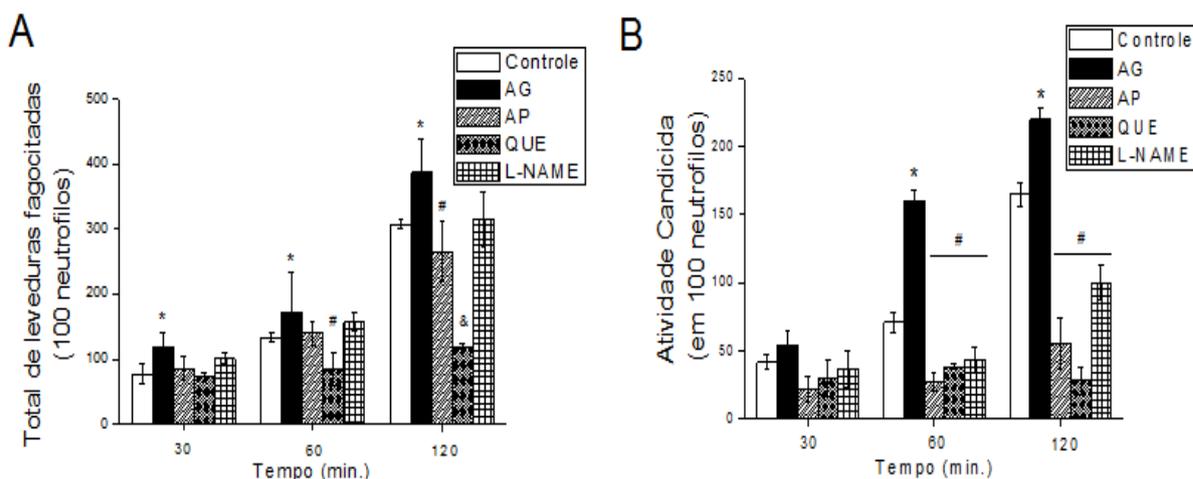
Legenda: **A.** Atividade de catalase (CAT). **B.** Atividade da Glutaciona Peroxidase (GPx). **C.** Atividade da Superóxido Dismutase (SOD). Ensaio em triplicata. Grupos: Controle (n=5), AG (aminoguanidina) (n=5), MET (metformina) (n=5), estimulados ou não com LPS (1 μ g/mL). Os gráficos de barras são expressos em média \pm desvio padrão (cada ensaio foi realizado em duplicata de reação). * p < 0.05 Grupos estimulados com LPS vs. Grupo Controle. & p < 0.05 Grupo MET vs. Grupo MET+LPS.

Fonte: autoria própria.

5.9 EFEITO DA AG NAS ATIVIDADES FAGOCÍTICAS E CANDICIDA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Como pode ser visualizado, (GRÁFICO 10), o tratamento com AG proporcionou um aumento da fagocitose em todos os tempos (GRÁFICO 10 A), e houve maior morte de *Candida albicans* (GRÁFICO 10 B) nos tempos de 60 e 120 min. Os inibidores AP, QUE e L-NAME proporcionaram diminuição da atividade candidica.

Gráfico 10- Atividades Fagocítica e Candidica de neutrófilos humanos.



Legenda: **A.** Ensaio de Fagocitose e **B.** Atividade candidica de *Candida albicans* por neutrófilos humanos. Neutrófilos humanos (1×10^6 células/ensaio) e *Candida albicans* ATCC 10231 (5×10^6) foram tratados ou não com AG ou inibidores: AP (apocinina), QUE (queleritrina), L-NAME. Os neutrófilos foram incubados por 30, 60 ou 120 minutos em BM 37°C , em seguida foram confeccionadas lâminas e coradas por MGG. Os gráficos de barras são expressos em média \pm desvio padrão ($n=4$) (Contagem de 100 neutrófilos por experimento). * $p < 0.05$ Grupo controle vs. Grupos tratados com AG; # $p < 0.05$ Grupo tratado com AG vs. Grupos tratados com inibidores; & $p < 0.05$ Grupos tratados com AG vs. Grupos tratados com inibidores.

Fonte: autoria própria.

Não foram avaliadas as atividades fagocíticas e candidicas da MET, uma vez que não foi encontrado diferença na produção de *pool* de espécies reativas ou da atividade de NOX2 nos neutrófilos tratados com MET em relação aos controles.

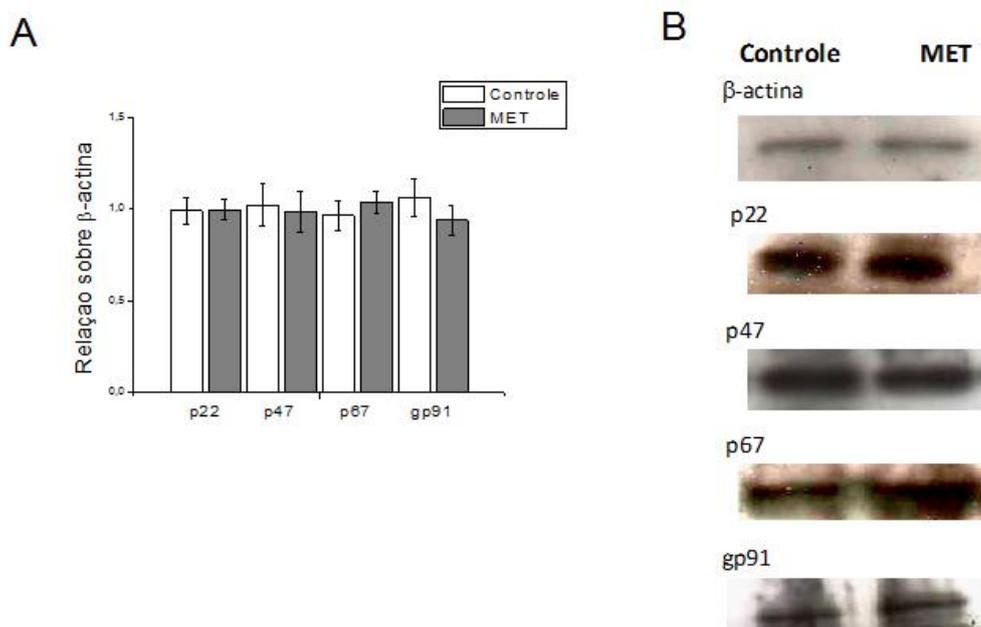
5.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NOX2 EM NEUTRÓFILOS TRATADOS COM GUANIDINAS

Conforme já foi descrito, o sistema enzimático NOX2 é formado por subunidades, as quais se encontram dissociadas na célula em repouso.

Foi avaliada a presença de algumas subunidades por *Western blot* nos neutrófilos humanos tratados com as guanidinas: AG e MET. Para isso, utilizaram-se os anticorpos anti-p22, anti-p47, anti-p67, anti-gp91 e como controle de massa foi utilizado o anticorpo anti β -actina.

Quando avaliada a expressão das subunidades de NOX2 tratadas com MET, por 18h, foi verificado que os conteúdos proteicos foram mantidos em relação ao grupo controle (FIGURA 17).

Figura 17- Expressão de NOX2 em neutrófilos humanos tratados ou não com MET.

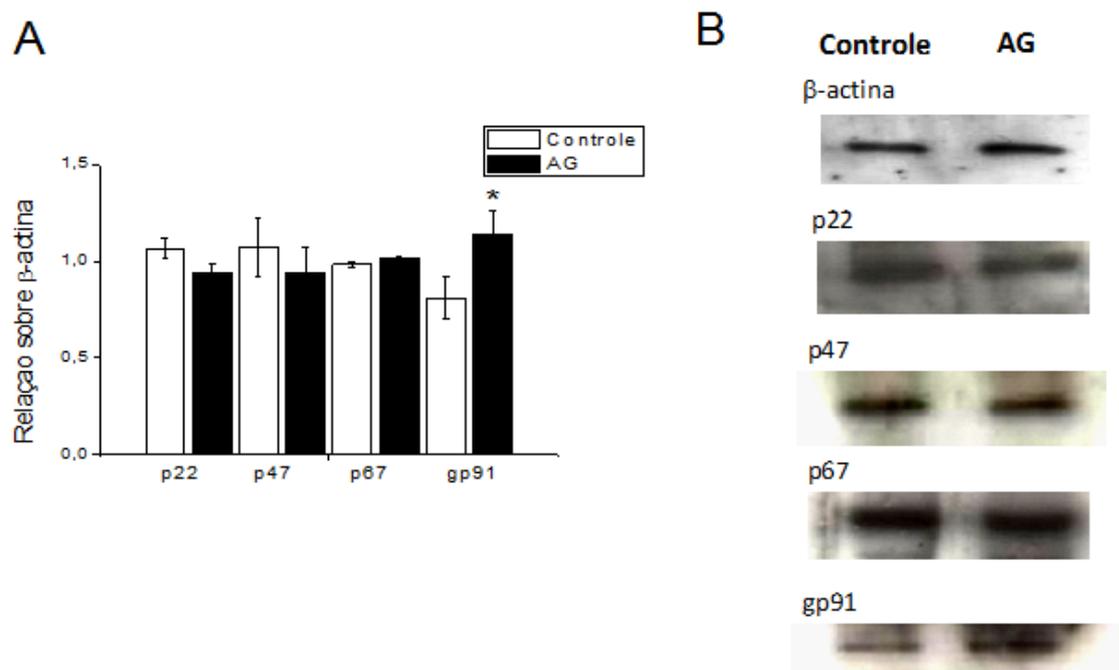


Legenda: **A.** Expressão de NOX2 em neutrófilos humanos (50ug proteína) em relação à β-actina. Controle (n=4), MET (n=4). Os gráficos de barras são expressos em média ± desvio padrão. **B.** Figura demonstrativa da expressão de NOX2 em neutrófilos humanos (50ug proteína) em relação à β-actina.

Fonte: autoria própria.

Observou-se que em neutrófilos tratados com AG por 18h os conteúdos proteicos das proteínas p22, p47 e p67, foram mantidos em relação ao grupo controle. No entanto, houve aumento da expressão de gp91 em neutrófilos tratados com AG (FIGURA 18).

Figura 18- Expressão de NOX2 em neutrófilos humanos tratados ou não com AG.



Legenda: **A.** Expressão de NOX2 em neutrófilos humanos (50ug proteína) em relação à β -actina. Controle (n=4), AG (n=4). Os gráficos de barras são expressos em média \pm desvio padrão. **B.** Figura demonstrativa da expressão de NOX2 em neutrófilos humanos (50ug proteína) em relação à β -actina.

Fonte: autoria própria.

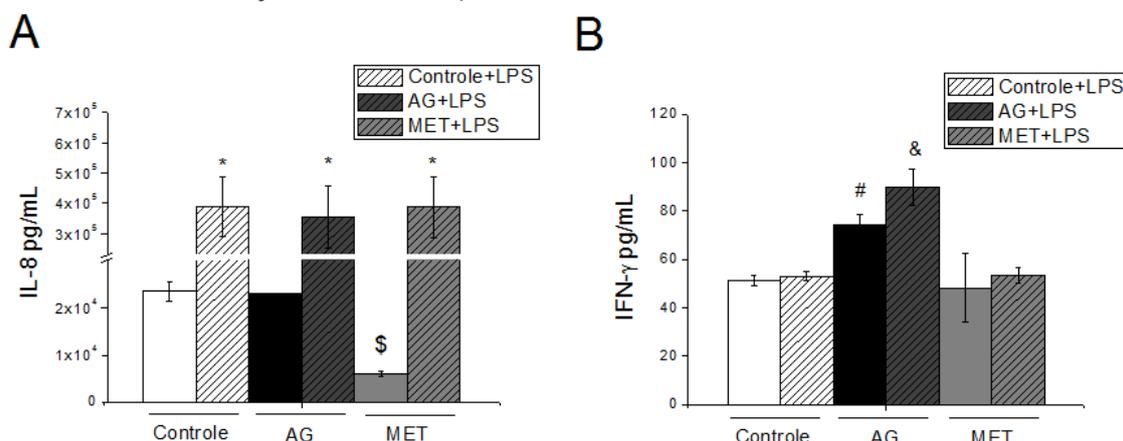
5.11 DETERMINAÇÃO DE INTERLEUCINAS NO SOBRENADANTE CELULAR

Também foi relatado que a função microbicida de neutrófilos contra *C. albicans* é potencializado por citocinas através do aumento da produção de superóxido (KATRAGKOU et al., 2011; BONFIM-MENDONÇA et al., 2014).

Neste trabalho, foram avaliadas a liberação de IL-8 e de IFN- no sobrenadante das culturas de neutrófilos e HUVEC, após 18h de incubação com AG ou MET.

A liberação de IL-8 pelos neutrófilos tratados com MET foi menor que no grupo controle, e o tratamento com AG manteve os níveis de liberação, comparado ao controle (GRÁFICO 11 A). Quando estimuladas com LPS (1ug) por 18h, houve aumento da liberação de IL-8 em todos os grupos, independente do tratamento (GRÁFICO 11 A).

Quanto à liberação de IFN- γ em neutrófilos, apenas o tratamento com AG apresentou aumento da liberação de IL-8 nos neutrófilos estimulados ou não com LPS (GRÁFICO 11 B).

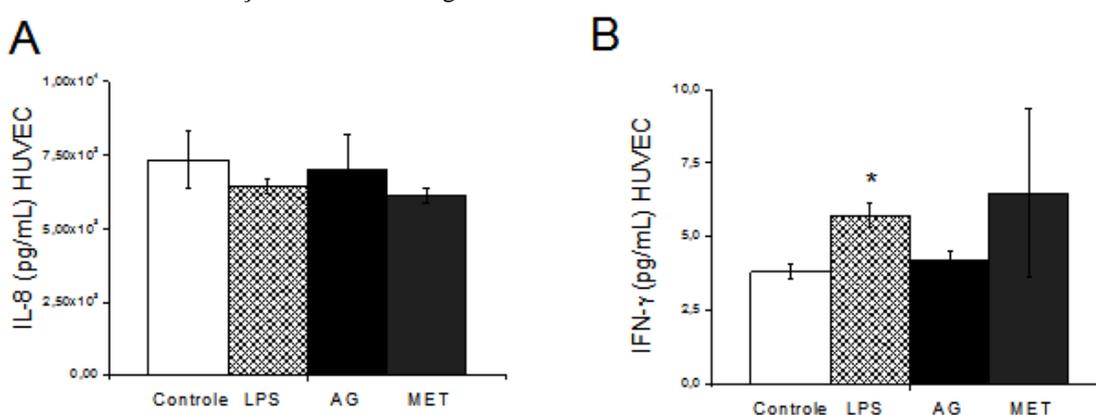
Gráfico 11- Determinação de IL-8 e IFN- γ no sobrenadante de neutrófilos humanos.

Legenda: Determinações de interleucinas por ELISA a partir de sobrenadante de neutrófilos humanos incubados com AG ou MET e estimulados ou não com LPS (1 μ g/mL) por 18h. **A.** Determinação de IL-8 (pg/mL). **B.** Determinação de IFN- γ (pg/mL). Valores da média \pm desvio padrão. Grupos: Controle (n=5), AG (aminoguanidina) (n=5), MET (metformina) (n=5), estimulados ou não com LPS (1 μ g/mL). Os gráficos de barras são expressos em média \pm desvio padrão (cada ensaio foi realizado em duplicata de reação). *p < 0.05 Grupo Controle vs Grupos estimulados com LPS; \$ p < 0.05 Grupo Controle vs Grupo MET; #p < 0.05 Grupo Controle vs. Grupo AG & p < 0.05 Grupo AG vs. Grupo AG+LPS.

Fonte: autoria própria.

A liberação de IL-8 por HUVEC tratadas com AG, MET ou LPS foi mantida comparada ao controle (GRÁFICO 12 A). Quanto à liberação de IFN- γ em HUVEC, houve aumento da liberação apenas no grupo controle estimulado com LPS (GRÁFICO 12 B).

Gráfico 12- Determinação de IL-8 e IFN-g no sobrenadante de HUVEC.



Legenda: HUVEC foram incubados com AG ou MET e estimulados ou não com LPS (0,1 μ g/mL) por 18h. **A.** Determinação de IL-8 (pg/mL). **B.** Determinação de IFN- γ (pg/mL). Valores da média \pm desvio padrão. Grupos: Controle (n=5), AG (aminoguanidina) (n=5), MET (metformina) (n=5), estimulados ou não com LPS (1 μ g/mL). Os gráficos de barras são expressos em média \pm desvio padrão (cada ensaio foi realizado em duplicata de reação). *p < 0.05 Grupo Controle vs Grupo Controle +LPS.

Fonte: autoria própria.

6 DISCUSSÃO

A aminoguanidina (AG), também conhecida como pimagedina, foi o primeiro candidato a fármaco testado para inibir as reações que levam à formação de AGEs (GOH; COOPER, 2008). Neste estudo, os animais diabéticos (glicemia >250 mg/dL) e não diabéticos (glicemia <150 mg/dL) foram tratados por sete semanas com AG (100mg/kg/dia). No momento da eutanásia, foi dosado a glicemia dos animais, e verificou-se um aumento nos animais diabéticos, mostrando o efeito do aloxano. Entretanto, o tratamento com AG manteve os níveis da glicemia (GRÁFICO 1 A). Os resultados demonstram a eficácia do tratamento com a AG na prevenção de glicação de proteínas; tanto para HbA1C e AGEs (GRÁFICO 1 B e C). Estudos anteriores relataram que a administração de AG reduz AGEs em ratos diabéticos e limita as alterações estruturais e funcionais em tecidos (GOH; COOPER, 2008; OZTURK et al., 2012; STADLER et al., 2005).

O comprometimento da função renal é uma complicação crônica microvascular muito frequente em pacientes diabéticos e em modelos animais de diabetes induzidos por drogas, como o aloxano. Assim, foram avaliados os níveis de uréia e creatinina sérica para avaliar se o estado diabético ou o tratamento com a AG afetaram a função renal. Os níveis de ureia e de creatinina no soro dos animais diabéticos foram maiores do que nos animais controle, mostrando um leve comprometimento renal (GRÁFICO 1 D e E). O tratamento com a AG foi eficaz na redução dos níveis de ureia (GRÁFICO 1 D) no soro, mas manteve os de creatinina (GRÁFICO 1 E). Sabe-se que nos casos de lesão renal, os níveis de ureia elevam-se prontamente, enquanto os níveis de creatinina sobem de forma mais gradual (DABLA, 2010).

Estudos já relataram efeitos nefrotóxicos para a AG em ensaios clínicos. No entanto, a toxicidade foi observada apenas em concentrações muito elevadas (ACTION I e II) (BOLTON et al., 2004; FREEDMAN et al., 1999). Aqui, no período de tratamento e na dose usada, a AG não apresentou efeito nefrotóxico no grupo diabético e nem no grupo controle como pode ser visualizado no corte histológico (FIGURA 13).

A produção de ERO tem sido proposta como a causa principal de complicações diabéticas, incluindo a nefropatia diabética (ALLEN et al., 2003; HUANG et al., 2007). Uma vez que a AG diminuiu a formação de AGEs, foi avaliado o efeito da glicação de proteínas sobre a liberação de ERO por neutrófilos.

Curiosamente, verificou-se um aumento na produção de ERO por neutrófilos de animais tratados com AG (GRÁFICO 2). Os neutrófilos produzem moléculas reativas de oxigênio por meio da ativação de NOX2 via PKC, gerando assim superóxido. O efeito da hiperglicemia e da glicação de proteínas na atividade de NOX2 em neutrófilos de ratos foi avaliado pela produção de anions superóxido pelo ensaio de redução do citocromo C. A produção de superóxido por neutrófilos de animais diabéticos e não diabéticos foi mantida. No entanto, o grupo tratado com AG mostrou aumento na produção de anions superóxido (GRÁFICO 2 B) em comparação com os grupos tratados apenas com água. Este aumento associado à AG foi observado em ambos os grupos diabéticos e não diabéticos.

ERO potentes, tais como peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila, peroxinitrito e HOCl são gerados a partir anions superóxido (IMLAY, 2013). Assim, avaliou-se também a produção de ERO e verificou-se que a hiperglicemia diminui a produção de pool de ERO por neutrófilos peritoneais. Por outro lado, observou-se um aumento no pool de ERO nos grupos tratados com AG (GRÁFICO 2 A).

O aumento de superóxido, o qual reflete a atividade de NOX2, foi mais pronunciado do que o aumento observado no pool de ERO (GRÁFICO 2 A e B). Ao avaliar o pool de ERO, as medições utilizadas incluem o HOCl produzido pela atividade de MPO. Em estudo anterior, foi verificado que a MPO se encontra diminuída em animais diabéticos (DE SOUZA FERREIRA et al., 2012). Além disso, a atividade e expressão de MPO são mantidas pelo tratamento com a AG (DE SOUZA FERREIRA et al., 2016). Pode-se supor que em neutrófilos peritoneais de ratos, a AG atua principalmente no sistema NOX2, pela regulação da expressão dos seus componentes.

Assim, avaliou-se a expressão de p47phox (FIGURA 14 A) e p67phox (FIGURA 14 B), subunidades citosólicas de NOX2. Os resultados demonstram que não houve diferença entre os grupos controles e diabéticos, que mostram que a hiperglicemia e a glicação de proteínas não afetam a expressão de subunidades p47phox e p67phox (FIGURAS 14 c, d, g, h). No entanto, a AG aumenta claramente a marcação destas subunidades (FIGURAS 14 b, d, f, h). Coletivamente, estes dados sugerem que o tratamento com AG aumenta a produção de ERO, principalmente através do aumento da produção de superóxido por NOX2.

A importância de NOX2 de neutrófilos, na defesa do organismo contra patógenos é bem conhecida (BEDARD; KRAUSE, 2007; SHEN, 2010). Além disso, tem sido descrito que a presença de AGEs tornam os neutrófilos menos responsivos aos

estímulos (ROOS; BRUGGEN; MEISCHL, 2003). Assim, foi avaliado o efeito da AG na capacidade fagocítica e candidida de neutrófilos peritoneais de ratos frente a *C. albicans*. A levedura *C. albicans* é um patógeno oportunista, especialmente para os pacientes diabéticos e imunocomprometidos (DANTAS et al. 2015, GAZENDAM et al., 2014; KABEYA et al., 2013; MORRAN et al., 2015). Adicionalmente, a defesa contra agentes patogênicos microbianos é dependente do metabolismo oxidativo (DANTAS et al., 2015; ROOS; BRUGGEN; MEISCHL, 2003;).

Como mostrado, a hiperglicemia e a glicação protéica (GRÁFICO 1 A e B) diminuíram a capacidade fagocítica de neutrófilos frente à *C. albicans* nos ratos diabéticos em todos os tempos de avaliação. A atividade fagocítica e microbicida de neutrófilos *ex vivo* frente *C. albicans* em ratos tratados com AG foi maior do que ratos não tratados em todos os intervalos de tempo avaliados, tanto em ratos diabéticos, como não diabéticos (GRÁFICO 3 A e B). Entretanto, os neutrófilos de animais diabéticos foram menos responsivos do que os neutrófilos de animais controle tratados com AG (GRÁFICO 3 B).

A alteração da função dos neutrófilos em animais diabéticos pode ser gerada por vários mecanismos, entretanto, os resultados aqui apresentados sugerem que a glicação proteica pode ter um papel importante, prejudicando a capacidade microbicida, por afetar a geração de ERO através de NOX2.

O efeito demonstrado nos neutrófilos tratados com AG é significativo, uma vez que os neutrófilos são o principal componente do sistema imune contra *C. albicans* (NETEA et al., 1999). Da mesma forma, outros estudos demonstraram a inibição do crescimento de *C. albicans ex vivo* por neutrófilos e aumento da susceptibilidade a candidíase em humanos e ratos granulocitopênicos (MORRAN et al., 2015; NETEA et al., 1999).

Quando coloniza e invade os tecidos, *C. albicans* é exposta à espécies reativas (ERO e ERN). As quais são essenciais para a atividade antimicrobiana de células fagocíticas (ARATANI et al., 1999, 2002). AG atua como um inibidor para iNOS, causando uma diminuição nos níveis de ERN (ARA et al., 2006; BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000; SHERWANI et al., 2010). Foi relatado anteriormente que AG reduz a formação de peroxinitrito, um potente oxidante, que é produzido pela reação de óxido nítrico com anions superóxido (ABRAHAM; RABI; SELVAKUMAR, 2009; RADI et al., 1991; RADI, 2004). Aqui, em contraste, observou-se que a AG causou um aumento na produção de superóxido por NOX2. Este

aumento da atividade NOX2 pode ser um mecanismo compensatório para a inibição iNOS e a consequente diminuição da produção ERN.

Por outro lado, uma maior expressão e ativação da iNOS, leva a uma maior produção de NO, o que contribui para a disfunção vascular e hipertensão. A função vascular depende da produção e biodisponibilidade equilibrada de NO, que é mantido pela atividade normal da eNOS, e a fisiopatologia da hipertensão arterial está relacionada à disfunção endotelial (CAU; CARNEIRO; TOSTES, 2012).

Como a AG é utilizada para inibir a atividade da iNOS, foram avaliados os efeitos na pressão arterial e na FC basal do tratamento com AG em ratos Wistar normotensos. Os resultados obtidos mostram que o tratamento com AG reduziu a PAM (FIGURA 15A), porém manteve a FC dos animais (FIGURA 15B). Além disso, o tratamento com AG diminuiu a produção de nitratos no soro dos animais (FIGURA 15D).

Os mecanismos de controle da PA em longo prazo envolvem o mecanismo de *feedback* rim/fluidos corporais (GUYTON, 1980; 1990). Uma hipótese seria que a AG estaria envolvida nos mecanismos regulatórios da PA em longo prazo, uma vez que não houve alteração na FC dos animais tratados. Entretanto, este não foi o objetivo deste trabalho. Portanto, outros experimentos devem ser realizados no intuito de entender este mecanismo.

Mattson et al., (1998) relataram que a infusão intravenosa aguda de AG (60mg/kg/hora, durante 40 min.), em ratos Sprague-Dawley anestesiados, não alterou a pressão arterial média, nem o fluxo sanguíneo do córtex renal, mas aumentou ligeiramente o fluxo de sangue na zona medular renal dos animais (MATTSON et al., 1998). Nos ratos conscientes, a infusão contínua de AG durante seis dias aumentou a pressão arterial média em 14 mmHg, sendo reversível ao suspender a infusão (MATTSON et al., 1998). A linhagem diferente dos animais, a forma de administração ou mesmo a concentração da AG utilizada no nosso estudo podem ter sido responsáveis pelos resultados diferentes observados no estudo citado acima.

No trabalho de Corman et al., (1998) avaliou-se a associação do acúmulo de AGEs com hipertrofia cardíaca e enrijecimento arterial. Ratos normotensos WAG/Rij foram tratados a partir de 24 ou 30 meses de idade com AG hemissulfato na água de beber (equivalente a 50mg/dia/kg). A AG impediu a hipertrofia cardíaca e reduziu em 30% o aumento da superfície mesangial nos ratos idosos. A prevenção da rigidez arterial e hipertrofia cardíaca, na ausência de mudanças no colágeno e no teor de

elastina sugere que o efeito da AG está relacionado com diminuição na ligação cruzada na matriz extracelular induzida pela idade (CORMAN et al., 1998).

Estudos demonstram que a MET previne as complicações cardiovasculares do diabetes e da obesidade por meio de mecanismos que envolvem a inibição da lipólise, a redução dos níveis circulantes de ácidos graxos livres e a inibição da produção de lipoproteína de baixa densidade (PARK et al., 2013; WULFFELÉ et al., 2004).

Aqui, não foram avaliados os efeitos cardiovasculares produzidos pelo tratamento com MET em ratos Wistar normotensos, uma vez que há muitos trabalhos na literatura que afirmam que a MET reduz a pressão arterial em animais experimentais (BHALLA et al., 1996; KOSEGAWA et al., 1996; MUNTZEL; ABE; PETERSEN, 1997; MUNTZEL; HAMIDOU; BARRETT, 1999; VERMA; BHANOT; MCNEILL, 1994a, 1994b;).

Muntzel et al., (1999) demonstraram que a MET (500 mg/kg/dia, por 1 mês) não afeta a pressão arterial nos ratos espontaneamente hipertensos (SHR) que ingeriram uma dieta normal, entretanto nos animais SHR alimentados com uma dieta de alto teor salino, ela anulou o aumento da PAM.

Verma et al., (1994) trataram ratos SHR e seus controles Wistar-Kyoto (WKY) com MET (500 mg/kg/dia), que atenuou o aumento da pressão arterial sistólica nos SHR, mas não teve nenhum efeito nos WKY. Além disso, aumentaram os níveis de insulina no plasma nos animais SHR tratados com MET para os mesmos dos SHR não tratados, sugerindo que tanto a hiperinsulinemia pode contribuir para o aumento da pressão arterial em SHR e que o mecanismo subjacente está intimamente associado com a expressão de ambas as desordens.

Pode-se supor que, neste modelo, o tratamento com AG atenuou a PAM basal de ratos, através da ativação de uma via alternativa de regulação. O NO é uma biomolécula com funções oxidantes e a sua diminuição está associada à redução do estresse oxidativo (HERMANN; FLAMMER; LÜSCHER, 2006). A nossa hipótese é que a diminuição do estresse oxidativo poderia estar envolvida no efeito observado da AG sobre a PAM de ratos normotensos. Assim, dosou-se a atividade das enzimas antioxidantes no soro dos animais e dosou-se ERO em HUVEC, para avaliar o efeito da AG e MET no estresse oxidativo celular e sistêmico.

O sistema de defesa antioxidante compreende uma gama variada de substâncias, as quais impedem a geração de espécies reativas ou as sequestram, impedindo sua interação com alvos celulares (ANSAR; ALHEFDHI; ALEEM, 2015). Os antioxidantes

podem ser enzimáticos, como por exemplo: superóxido dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GPx) e Catalase (CAT), ou não-enzimáticos como as vitaminas A,C e E (ABRAHAM; RABI, 2011; RAFIGHI et al., 2013).

As enzimas antioxidantes: CAT, SOD e GPx têm um importante papel na resistência oxidante de células inflamatórias. O balanço entre a produção de oxidantes e a defesa antioxidante tem um importante papel na função fagocítica e prevenção de danos oxidativos durante a fagocitose (PIETARINEN-RUNTTI et al., 2000).

A redução na concentração de glutathione pode levar a uma diminuição na capacidade antioxidante total, pois ela ajuda na reciclagem de antioxidantes celulares, inibe os danos por radicais livres, e desempenha um papel fundamental na desintoxicação de compostos nocivos (OSEN; ODESANMI; OLADELE, 2015). A enzima antioxidante SOD, é uma das enzimas mais importante presente praticamente em todos os organismos aeróbios, pois catalisa a dismutação de $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 . A GPx é uma enzima selênica, que catalisa a degradação de H_2O_2 e hidroperóxidos à custa de glutathione reduzida (GSH). A CAT catalisa a conversão de H_2O_2 em H_2O e O_2 .

Os radicais livres agem principalmente nos lipídios das membranas celulares, oxidando-os e gerando peroxidação lipídica (PL). A qual é especificamente perigosa para a célula, pois se propaga como uma reação em cadeia infinita (ANSAR; ALHEFDHI; ALEEM, 2015).

Neste modelo, quando foi avaliado o efeito do tratamento com AG na atividade das enzimas antioxidantes: CAT, GPx e SOD; e na PL observou-se que a atividade foi mantida, em relação ao grupo controle (GRÁFICO 4).

Estes resultados corroboram com os de Stoppa et al., (2006), onde animais controle tratados ou não com AG (água de beber 0,1%) por 54 dias (STOPPA et al., 2006), mantiveram a atividade de GPx, CAT, SOD e PL.

Resultados semelhantes também foram obtidos em um estudo no qual o pré-tratamento com AG impediu a PL e preveniu a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes (GPx e CAT) somente nos rins de ratos tratados com AG após a indução de estresse oxidativo por ciclofosfamida (ABRAHAM; RABI, 2011).

Assim, AG pode ser útil para a prevenção de danos oxidativos, sem alterações da peroxidação lipídica e da atividade das enzimas antioxidantes no estado basal. Além disso, como o tratamento com AG diminuiu a produção de nitratos no soro dos animais

(FIGURA 15 D), isso indicaria que a AG pode prevenir o dano oxidativo nas células e tecidos.

No nível celular, ERO estão envolvidas em múltiplos mecanismos de sinalização molecular que controlam a pressão arterial. Entre os sistemas de produção de ERO, as NOX, as quais são expressas em diferentes células do sistema cardiovascular, são claramente as enzimas mais importantes relacionadas com o desenvolvimento de hipertensão. NOX exercem um papel central no relaxamento dependente do endotélio, e na sinalização redox de angiotensina II (Ang II) que regula o tônus vascular (SANTILLO et al., 2015).

As ERO são moléculas altamente difusíveis e reativas produzidas pela redução de oxigênio molecular. Elas são normalmente produzidas, pelo sistema NOX2, durante o *burst* respiratório de fagócitos como um mecanismo de defesa contra agentes patogênicos. No entanto, estudos indicam que as NOX estão presentes numa grande variedade de células e tecidos, como nas células vasculares (BEDARD; KRAUSE, 2007; QUINN, AMMONS, DELEO, 2006). Tem sido demonstrado que as NOX cardiovasculares desempenham papéis importantes em processos fisiológicos, como a regulação da pressão arterial, bem como eventos patológicos, incluindo hipertensão e aterosclerose (MANEA et al., 2015; QUINN, AMMONS, DELEO, 2006). A força de cisalhamento ativa várias respostas de sinalização, incluindo a ativação de MAPKs e eNOS, causando aumento da formação de ERN, e culminando em aumento da formação de NO[•], o qual promove proteção da função endotelial (BRETÓN-ROMERO et al., 2012).

Neste trabalho, foi verificado que as HUVEC tratadas com AG ou MET tanto no estado basal, quanto as estimuladas com LPS, tiveram menor produção de ERO (FIGURA 16 D).

Ouslimani et al., (2005) mostram que a MET ao nível farmacológico de 10^{-5} mol/L, foi capaz de modular a produção intracelular de ERO tanto em células endoteliais aórticas bovinas quiescentes (BAECs) como nas estimuladas por elevados níveis de glicose (30 mmol/L por 2 horas) ou angiotensina II (10^{-7} mol/L, 1 hora). A produção intracelular de ERO foi medida por DCF. Experimentos realizados na presença de apocinina ou de rotenona, um inibidor da cadeia respiratória mitocondrial indicou que MET exerceu o seu efeito, em parte, através da inibição da formação de ERO produzido principalmente por NOX e também, em menor grau, pela cadeia respiratória mitocondrial (OUSLIMANI et al., 2005).

Já foi demonstrado que as ERO podem funcionar de maneira antagônica nas células endoteliais. Um aumento moderado de ERO pode promover a proliferação e sobrevivência celular. No entanto, quando a carga de ERO atinge um nível tóxico, pode sobrecarregar a capacidade antioxidante e ser um gatilho para a morte celular. As células endoteliais normais, em condições fisiológicas, mantêm a homeostasia redox com um baixo nível de ERO basal, controlando o balanço entre a geração (pró-oxidantes) e a eliminação (capacidade antioxidante) de ERO (PANIERI, SANTORO, 2015).

Assim, pode-se sugerir que ambas as guanidinas, em HUVEC, teriam um papel antioxidante, cujo mecanismo de ação leva a uma diminuição da produção de ONOO^- , uma vez que este é formado quando o H_2O_2 reage com nitrito, ou pela reação de anion superóxido com NO^\cdot (HOU et al., 2015). Diminuindo assim a produção de ERO e ERN, o que explicaria um dos mecanismos para diminuição da PAM em modelos animais.

Como os resultados em neutrófilos de ratos mostraram um resultado contrário, quanto à ativação de NOX, e como há várias isoformas de NOX, que são funcionalmente distintas e respondem a uma variedade de mediadores humorais, tais como fatores de crescimento, citocinas e hormônios, bem como fatores mecânicos (BRANDES, KREUZER, 2005; CHEN, THOMAS, KEANEY, 2003; RAY, SHAH, 2005), verificou-se como o tratamento com a AG e a MET interferem na NOX-2 de neutrófilos humanos extraídos de sangue periférico.

Como não foram encontrados trabalhos na literatura para tratamento de neutrófilos humanos com AG, inicialmente, foram realizados ensaios para avaliar a citotoxicidade da AG sobre neutrófilos humanos extraídos de sangue periférico. Para isso, baseou-se em trabalhos nos quais foram utilizadas células endoteliais, macrófagos humanos e fibroblastos (KELSO et al., 2011; SOUZA PINTO et al., 2012). Aqui, usaram-se concentrações mais elevadas para avaliar a segurança de seu uso. Até a concentração de 50 mM/mL não houve efeito citotóxico para os neutrófilos (viabilidade 99%). Desta forma, foi testado o efeito de três concentrações de AG (0,5 mM, 5mM e 10 mM) na produção de ERO por neutrófilos humanos. As três concentrações de AG utilizadas apresentaram diferença na produção de ERO (GRÁFICO 5). Deste modo, trabalhou-se com a menor concentração (0,5mM), que foi a mesma encontrada na literatura para MET (PARK et al., 2013).

Após a padronização e o estabelecimento da concentração de 0,5mM de AG que seria utilizada (GRÁFICO 5), foram realizados os ensaios de quimiluminescência,

amplificados por luminol ou lucigenina, para avaliar o pool de ERO produzidas pelos neutrófilos isolados de sangue humano (GRÁFICO 6 A) e a produção de anions superóxido (GRÁFICO 6 B). Como cada doador apresentou diferentes picos de respostas, padronizou-se calcular a área integrada relativa, sempre comparando com o controle respectivo (100%).

A AG causou o mesmo efeito que o LPS, como pode ser visualizado (GRÁFICO 6 A e B), aumentando a produção de ERO e de superóxido. O aumento na produção de ERO observado no grupo tratado com AG pode ser um indício de uma melhora na capacidade de defesa dos neutrófilos. É conhecido que a produção de ERO pela NOX2, 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 (AMEZIANE-EL-HASSANI et al., 2015).

Quanto ao tratamento com a MET, verificou-se que nos neutrófilos tratados com MET foi mantida a produção de ERO e de superóxido (GRÁFICO 6 A e B).

Trabalhos têm mostrado que a MET ativa a proteína quinase AMPK, considerada como um “sensor de energia” celular (TURBAN et al., 2012; PARK et al., 2013), além de outras vias de sinalização (CHO et al., 2015; GONG et al., 2013; ZAKIKHANI et al., 2010).

Os neutrófilos humanos foram previamente tratados com alguns inibidores para os ensaios de quimiluminescência (GRÁFICO 7 e 8). Todos inibidores diminuam a produção de ERO em neutrófilos (GRÁFICO 7), sendo que nos neutrófilos não tratados os inibidores AP, QUE, SOD e L-NAME apresentaram em torno de 60% de inibição e L-NAME 40%. Para os neutrófilos tratados com AG a inibição foi potencializada: AP, QUE e SOD inibiram em torno de 80% de produção de ERO. Nos neutrófilos tratados com MET: AP e QUE inibiram em torno de 60% e a SOD inibiu em torno de 50% das ERO produzidas.

Todos inibidores diminuam a produção de superóxido (GRÁFICO 8), sendo que nos neutrófilos controles os inibidores AP, QUE apresentaram, respectivamente, em torno de 60% e SOD 50% de inibição. Para os neutrófilos tratados com AG, AP e QUE a inibição da produção de $O_2^{\cdot -}$ foi em torno de 40%, e para a SOD em torno de 60%. Nos neutrófilos tratados com MET a inibição foi potencializada: AP, QUE e SOD inibiram em torno de 80% do superóxido produzido.

A potencialização da inibição da produção de superóxido por neutrófilos tratados com MET poderia ser um indício de atividade antioxidante, portanto, foi determinada a atividade das enzimas antioxidantes no homogenato de neutrófilos, e houve aumento da atividade de CAT no grupo tratado somente com MET e em todos os grupos estimulados com LPS (GRÁFICO 9). A atividade de GPx não foi alterada pelos tratamentos (GRÁFICO 9 B). A atividade de SOD foi mantida em todos os grupos, com exceção do grupo tratado com MET e estimulado com LPS, que apresentou um aumento significativo de atividade de SOD (GRÁFICO 9 C).

Além disso, a adição de SOD e AP à reação reduziu a quimiluminescência (GRÁFICO 8), reforçando a hipótese de que uma das principais ERO formadas neste sistema é o anion superóxido. O que nos levar a acreditar que o aumento de ERO e superóxido nos neutrófilos tratados com AG, poderia estar relacionado com o aumento das atividades fagocítica e/ou microbicida.

A ativação de NOX2 induzida pela fagocitose ocorre rapidamente, concomitante com ligação de vários receptores fagocíticos. Os detalhes da sinalização induzida pela fagocitose para a ativação de NOX continuam a ser definidos, e podem variar dependendo do tamanho da partícula, dos receptores envolvidos e das alterações de potencial induzidos pelos próprios microrganismos (NUNES; DEMAUREX; MARY, 2013). Neste trabalho, foram avaliadas apenas as atividades fagocítica e candidida de neutrófilos tratados com a AG. Como a MET não alterou a produção de ERO, a capacidade de fagocitose e microbicida de neutrófilos tratados com MET não foi avaliada aqui. Entretanto, estudos anteriores já demonstraram que a MET aumenta a fagocitose em modelos *in vitro* e *ex vivo* (ŁABUZEK et al., 2010; PARK et al., 2013).

Park et al., (2013) trataram neutrófilos com MET e avaliaram sua capacidade de fagocitar e matar os microrganismos *E.coli* e *S. aureus*, e verificaram um aumento tanto da fagocitose como da morte por neutrófilos, frente a ambas as bactérias, via ativação de AMPK. Outro trabalho também verificou o aumento de fagocitose em micróglias de ratos tratadas com MET, e, além disso, mostraram que MET aumentou a acidificação dos compartimentos lisossomais/endossomais nas micróglias de ratos, também através do aumento da atividade de AMPK (ŁABUZEK et al., 2010).

Aqui, os neutrófilos humanos extraídos de sangue periférico e incubados por 18h com AG, apresentaram um aumento de fagocitose em todos os tempos avaliados (GRÁFICO 10 A), assim como maior atividade candidida (GRÁFICO 10 B). Somente o inibidor QUE diminuiu a fagocitose, nos tempos de 60 e 120 minutos. Entretanto, todos

os inibidores diminuíram a atividade candida dos neutrófilos a partir de 60 min. A inibição da atividade candida dos neutrófilos pelo L-NAME (GRÁFICO 10) reforça a importância de ERN na morte de microrganismos.

O efeito de inibição da QUE, um inibidor de PKC, na fagocitose das leveduras pelos neutrófilos (GRÁFICO 10 A), sugere a importância da PKC no processo de fagocitose. Estudos mostram que isoformas de PKC são translocadas para a membrana plasmática após a fagocitose, via ativação pelo DAG (diacilglicerol) (LEE; HARRISON; GRINSTEIN, 2003; KORCHAK; ROSSI; KILPATRICK, 1998). Entretanto, o papel da PKC no processo de fagocitose não está bem definido.

A ação antimicrobiana rápida e sustentada nos neutrófilos depende da cooperação sinérgica entre os muitos agentes tóxicos gerados e liberados para o fagossomo. A atividade de NOX2 proporciona uma maior atividade microbicida aos neutrófilos, e pode ser comprovada em neutrófilos de pacientes com DGC, os quais possuem função microbicida comprometida, por possuírem NOX2 não funcional. Na vigência da DGC, os pacientes sofrem de infecções repetidas e com risco de morte. Vários trabalhos evidenciam o H_2O_2 como um produto de NOX2 necessário para a atividade microbicida. Entretanto, cepas de estreptococos, pneumococos, e lactobacilos que geram H_2O_2 em grandes quantidades são mortos de forma eficiente por neutrófilos DGC e raramente causam infecções nestes pacientes, reforçando a importância daquela espécie reativa (KLEBANOFF et al., 2013; NUNES; DEMAUREX; MARY, 2013). Sabe-se que a MPO tem um importante papel na morte de microrganismos e que na vigência de DGC ela desempenha uma contribuição categórica na defesa do organismo. Experimentos do nosso grupo de pesquisa mostraram que o tratamento com AG não modula a MPO, tanto em neutrófilos de ratos, como em humanos (DE SOUZA FERREIRA et al., 2016; LIMA, 2016).

Pode-se sugerir, com estes dados, que a AG é capaz de estimular a propriedade candida de neutrófilos, em um mecanismo associado ao aumento da produção de superóxido. Este aumento da produção de superóxido induzida por AG é muito interessante, uma vez várias funções adicionais à sua atividade microbicida têm sido propostas para os anions superóxido. Tais funções incluem apoptose, senescência, proliferação celular, detecção de oxigênio e transdução de sinal (BEDARD; KRAUSE, 2007; WILLIAMS, GRIENGLING, 2007).

A partir disso, a hipótese seria se o aumento de ERO, em especial de superóxido e das atividades fagocítica e microbicida nos neutrófilos tratados com AG, poderia estar

relacionado ao aumento da expressão de NOX2. Portanto, foi avaliada a expressão das proteínas que compõe NOX2 em neutrófilos humanos.

Quando avaliado o efeito da MET na expressão das subunidades de NOX2 de neutrófilos humanos, foi verificado que a expressão das subunidades em relação ao controle foi mantida (GRÁFICO 10). Assim, pode-se conjecturar que o mecanismo pelo qual a MET aumenta a atividade fagocítica e candidida de neutrófilos, já descrito em outros trabalhos, não está diretamente relacionado ao aumento de sua atividade ou ao aumento do conteúdo proteico de NOX2 (GRÁFICO 6 e FIGURA 17). Estes trabalhos demonstraram um aumento da atividade fagocítica e candidida de neutrófilos e micróglia, promovido pela MET, via AMPK (PARK et al 2013; LABUZEK et al, 2010),

Já que o tratamento com a AG aumenta a atividade de NOX2 em neutrófilos humanos, foi verificado se este aumento era decorrente de um aumento da expressão das subunidades de NOX2.

Os resultados indicam que o tratamento *in vitro* com AG por 18h, manteve a expressão das subunidades de NOX2 de neutrófilos humanos, quando comparados ao controle. Exceto da subunidade gp91^{phox}, a qual apresentou um aumento da expressão deste conteúdo proteico nos neutrófilos tratados com a AG (FIGURA 18). Esse resultado difere do encontrado em neutrófilos peritoneais de animais tratados por sete semanas com AG. Pode-se supor que isso se deva aos modelos experimentais distintos. Em ratos, o tratamento foi de 50 dias e foram utilizados neutrófilos retirados do peritônio (*ex vivo*), um microambiente rico em líquidos e proteínas onde o neutrófilo permanece em contato com diferentes tipos celulares por um tempo maior. E no modelo humano, os neutrófilos no seu estágio mais maduro, são isolados de sangue periférico e tratados *in vitro* com a AG.

Os resultados deste estudo sugerem que a influência de AG em células mielóides enquanto se diferenciam para um estado maduro pode ser diferente dos seus efeitos *in vitro*, em células já maduras, no seu estado terminal (BERTON et al., 1986; CASSATELLA et al., 1988; LIESER, 1993; NEWBURGER et al., 1988; TENNENBERG; FEY). Trabalhos anteriores já demonstraram esta adversidade de efeitos em um mesmo tipo celular em estágios de maturação diferentes (ELLISON et al., 2015).

Além disso, aqui não foi avaliado o processo de fosforilação das subunidades. A ativação de NOX depende da fosforilação, especialmente, da subunidade p47phox

(GROEMPING; RITTINGER, 2005). A fosforilação de p47phox parece ser chave na translocação das outras subunidades para a membrana, que são processos importantes na montagem e interferem diretamente na atividade da NOX2 de fagócitos (CAIRNS et al., 2012).

Os mediadores inflamatórios tais como fator de necrose tumoral α (TNF- α) ou endotoxinas podem melhorar o *burst* oxidativo fagossomal (EL-BENNA, DANG, GOUGEROT-POCIDALO, 2008). Alguns estudos fornecem novos conhecimentos sobre como a detecção de micróbios ou a exposição a citocinas podem regular a atividade de NOX2 e fagossomos (ELLISON et al., 2015; NUNES; DEMAUREX; MARY, 2013). As ERO têm sido propostas como moléculas de sinalização que regulam diversas respostas em neutrófilos, incluindo a expressão das citocinas. Tem sido descrito que o ânion superóxido induz a ativação de NF-kB e aumenta a expressão, em neutrófilos, de TNF- α e da CXCL2 (proteína-2 inflamatória de macrófagos). No entanto, o papel de ERO em neutrófilos na expressão das citocinas é até agora controverso (HIDALGO et al., 2015).

Portanto, aqui, foi avaliado a liberação de duas citocinas inflamatórias no sobrenadante de neutrófilos, IL-8 e IFN- γ para melhor compreensão do mecanismo pelo qual a AG e a MET aumentam a fagocitose de neutrófilos. A liberação de IL-8 pelos neutrófilos tratados com MET foi menor que no grupo controle, e o tratamento com AG manteve os níveis de liberação, comparado ao controle (GRÁFICO 11 A). Quando estimuladas com LPS (1 μ g) por 18h, houve aumento da liberação de IL-8 em todos os grupos, independente do tratamento (GRÁFICO 11 A). Hidalgo et al., (2015), mostraram que a liberação de IL-8 induzida por fMLP é dependente de NOX, e que ERO podem desempenhar um papel redundante de sinalização celular, ativando as vias PI3K/Akt e NF-kB nos neutrófilos. Também foi relatado que a função microbicida de neutrófilos contra *C. albicans* é potencializado por TNF- α através do aumento da produção de superóxido (BONFIM-MENDONÇA et al., 2014; DE ASSIS et al., 2004; KATRAGKOU et al., 2011;).

Quanto à liberação de IFN- γ pelos neutrófilos, apenas os neutrófilos tratados com AG apresentaram aumento da liberação desta citocina, sendo que esse aumento foi maior nos neutrófilos estimulados com LPS (GRÁFICO 11 B).

Até o momento, os estudos com IFN- γ avaliaram principalmente as suas interações com células de imunidade adaptativa, incluindo os macrófagos e linfócitos.

Efeitos sobre a imunidade inata, particularmente leucócitos polimorfonucleares (PMN) neutrófilos e monócitos, são menos definidos. Os dados encontrados em relação aos PMN sugerem que o IFN- γ pode estar envolvido na modulação da transdução de sinal, da expressão gênica, de fagocitose, motilidade e apoptose, bem como a geração de ânions superóxido pela enzima NOX2 (ELLIS; BEAMAN, 2004).

O IFN- γ é utilizado para tratar a DGC, uma doença hereditária da atividade bactericida de células fagocíticas no qual a deficiência de uma ou mais subunidades de NOX2 leva a uma inatividade da enzima causando uma diminuição ou ausência da produção de ânion superóxido (AMBRUSO, JOHNSTON, 2012). O tratamento de pacientes com DGC com IFN- γ levou a uma produção de superóxido pela NOX2 sugerindo que os pacientes com expressão reduzida de uma proteína phox pode se beneficiar da administração de IFN- γ (ELLISON et al., 2015).

Além disso, já foi descrito que IFN- γ medeia a ação antimicrobiana por ativação de fagócitos para rápida absorção e degradação de partículas patogênicas, e pela indução de enzimas celulares, como indoleamina 2, 3-dioxigenase (IDO), que causam a privação de triptofano e iNOS que produz o NO microbicida (CHEN et al., 2003).

Em contraste com os macrófagos e os neutrófilos, as células endoteliais desempenham um papel quiescente na resposta imune do hospedeiro, agindo como barreira ao influxo de microrganismos e liberando quimioatraentes para recrutar fagócitos profissionais para os locais de infecção. No entanto, há dados de que as células endoteliais participam mais ativamente da defesa do hospedeiro (DE ASSIS et al, 2004; HONG, et al, 1998; ZHANG B, et al , 1997). Após a exposição à citocinas ou a agentes infecciosos, as células endoteliais podem gerar aumento de ERO e expressar características fenotípicas de macrófagos (ROBINSON et al., 1991).

A liberação de IL-8 por HUVEC tratadas com AG ou MET e estimuladas com LPS foi mantida comparada ao controle (GRÁFICO 12 A). Esse resultado difere dos encontrados na literatura, nos quais LPS estimula o aumento de IL-8 em HUVEC estimuladas com LPS, nas mesmas condições (MAKÓ et al., 2010; MIYOSHI et al., 2010). Entretanto, quanto à liberação de IFN- γ em HUVEC, houve aumento da liberação apenas no grupo controle estimulado com LPS (GRÁFICO 12 B).

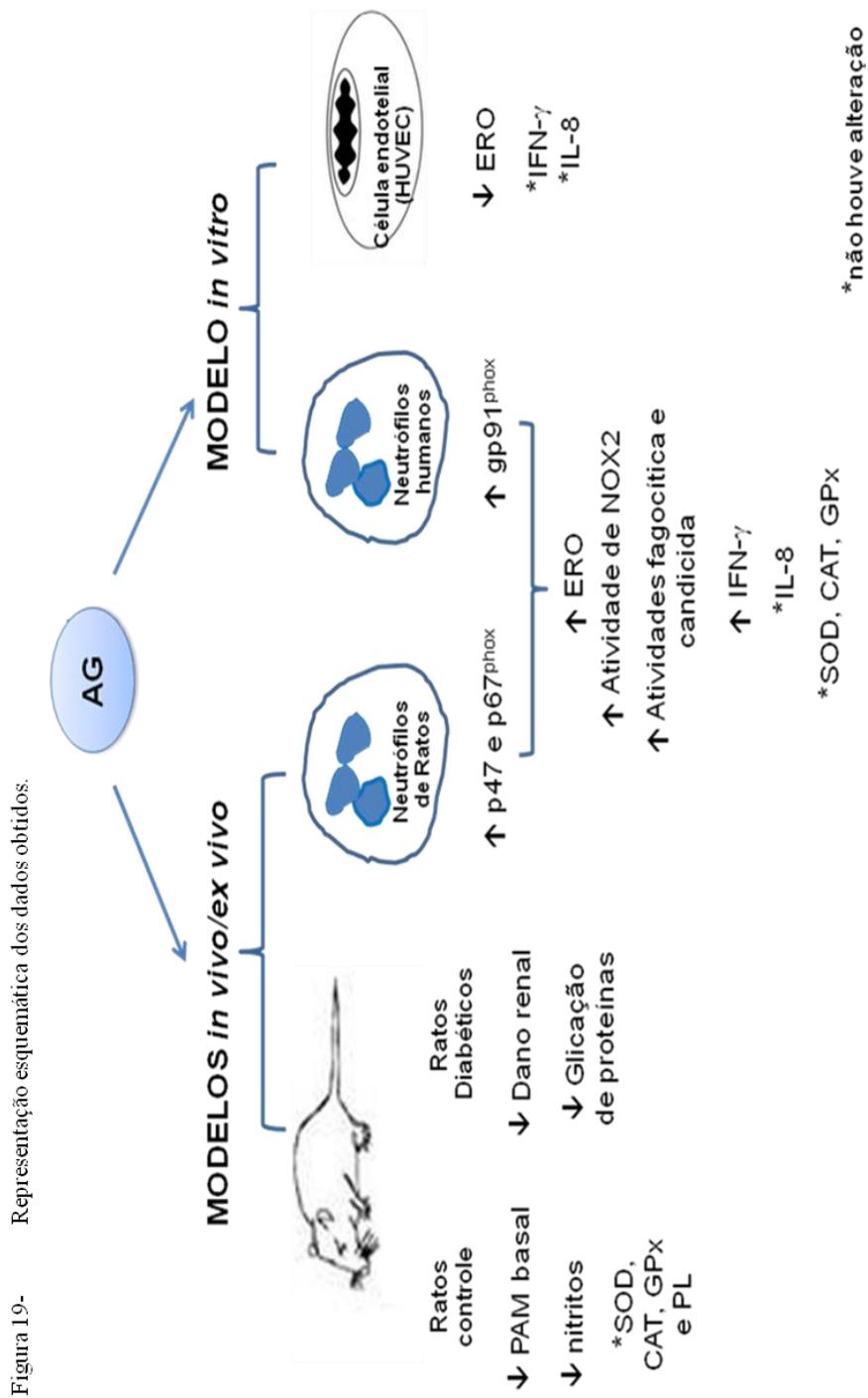
As células endoteliais respondem ao LPS através de receptores *toll-like* com a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina-6 (IL-6), IL-8, MCP-1 (proteína-1 quimioatraente de monócitos), e um aumento da expressão de moléculas de

adesão. Foi demonstrado que o LPS induz a geração de ERO em células endoteliais, semelhante ao TNF- α , de um modo dependente de NOX (MIYOSHI et al., 2010; PARK et al., 2004; PARK et al., 2006).

Miyoshi et al., (2010) mostraram que a IL-8 induz diretamente a produção de ERO nas HUVEC, e também medeia a indução da produção de ERO em HUVEC pelo LPS. E sugerem que a sinalização de LPS/IL-8 em HUVEC é predominantemente mediada por NOX1.

Dados da literatura demonstraram que a AG, dependendo das condições, pode funcionar de maneira dúbia, tanto como antioxidante, quanto pró-oxidante (PHILIS-TSIMIKAS, et al., 1995), que são reforçados pelos resultados obtidos aqui (FIGURA 19).

Figura 19- Representação esquemática dos dados obtidos.



Fonte: autoria própria.

7 CONCLUSÃO

Em resumo, pode-se sugerir que a AG, utilizada para inibir a formação de AGEs, aumentou a atividade de NOX2 em neutrófilos humanos e de ratos e que isso contribuiu diretamente para o aumento da atividade microbicida dos neutrófilos. É provável que a diferença de expressão de NOX2 entre neutrófilos peritoneais de ratos (DE SOUZA FERREIRA, 2016) e neutrófilos humanos e o perfil de resposta encontrado em HUVECs deva-se às características particulares de cada tipo celular nos diferentes modelos experimentais. Este fenômeno foi independente da hiperglicemia, uma vez que o aumento da produção de ERO e atividade microbicida por neutrófilos ocorreram tanto em animais diabéticos, como em não diabéticos.

Isto é particularmente interessante no diabetes e em outras doenças associadas ao acúmulo de AGEs, onde a função de neutrófilos está prejudicada. Além de outras condições de neutropenia e de disfunção de neutrófilos que geralmente resulta em infecções bacterianas e fúngicas recorrentes. Estudos adicionais poderiam reforçar a possibilidade de uma possível combinação da AG com outros fármacos e/ou antibióticos com a finalidade de oferecer uma estratégia terapêutica adicional nestas condições.

REFERÊNCIAS

ABID, M. R. et al. NADPH oxidase activity is required for endothelial cell proliferation and migration. **FEBS letters**, v. 486, n. 3, p. 252-256, 2000.

ABRAHAM, P.; RABI, S. Protective effect of aminoguanidine against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats. **Redox Rep.**, v. 16, n. 1, p. 8-14, 2011.

ABRAHAM, P.; RABI, S.; SELVAKUMAR, D. Protective effect of aminoguanidine against oxidative stress and bladder injury in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rat. **Cell biochem. funct.**, v. 27, n. 1, p. 56–62, 2009.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 1352 p.

AMBRUSO DR, JOHNSTON RB Jr. Primary Immunodeficiency: Chronic Granulomatous Disease and Common Immunodeficiency Disorders. In: Wilmott RW, Boat TF, Bush A, Chernick V, Deterding R, Ratjen F, editors. **Kendig and Chernick's Disorders of the Respiratory Tract in Children**. 8 ed. WB Saunders Co; 2012.

AMEZIANE-EL-HASSANI, R. et al. NADPH oxidase DUOX1 promotes long-term persistence of oxidative stress after an exposure to irradiation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 112, n. 16, p. 5051–5056, 2015.

ANSAR, S.; ALHEFDHI, T.; ALEEM, A. M. Status of trace elements and antioxidants in premenopausal and postmenopausal phase of life : a comparative study. **Int. J. Clin. Exp. Med.**, v. 8, n. 10, p. 19486–19490, 2015.

ARA, C. et al. Protective effect of aminoguanidine against oxidative stress in an experimental peritoneal adhesion model in rats. **Cell biochem. funct.**, v. 24, n. 5, p. 443–448, 2006.

ARATANI, Y. et al. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 4, p. 1828–1836, 1999.

ARATANI, Y. et al. Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Medical mycology**, v. 40, n. 6, p. 557–63, 2002.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, n. 5, p. 1464–1476, 1999.

BABIOR, B. M. The leukocyte NADPH oxidase. **Isr. Med. Assoc. J.**, v. 4, n. 11, p. 1023–1024, 2002.

BAGGIOLINI, M.; CLARK-LEWIS, I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. **FEBS letters**, v. 307, n. 1, p. 97–101, 1992.

BÁNFI, B. et al. A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOX-1. **Science (New York, N.Y.)**, v. 287, n. 5450, p. 138–142, 2000.

BAGGIOLINI, M., B. DEWALD, et al. Human chemokines: an update. **Annu Rev Immunol.** v. 15, p.675-705, 1997.

BAYLIS C, MITRUKA B, DENG A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. **The Journal of clinical investigation**, v. 90, n. 1, p. 278–281, 1992.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 245–313, 2007.

BERTON, G. et al. Gamma interferon is able to enhance the oxidative metabolism of human neutrophils. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 138, n. 3, p. 1276–1282, 1986.

BHALLA, R. C. et al. Vascular effects of metformin. Possible mechanisms for its antihypertensive action in the spontaneously hypertensive rat. **Am. J. Hypertens.**, v. 9, n. 6, p. 570–576, 1996.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 12, n. 1, p. 64–76, 2000.

BOKOCH, G. M.; KNAUS, U. G. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! **Trends Biochem. Sci.**, v. 28, n. 9, p. 502–508, 2003.

BOLTON, W. K. et al. Randomized Trial of an Inhibitor of Formation of Advanced Glycation End Products in Diabetic Nephropathy. **Am. J. Nephrol.**, v. 24, n. 1, p. 32–40, 2004.

BONFIM-MENDONÇA, P. D. S. et al. β -Glucan Induces Reactive Oxygen Species Production in Human Neutrophils to Improve the Killing of *Candida albicans* and *Candida glabrata* Isolates from Vulvovaginal Candidiasis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1-14, 2014.

BORISH, L. C., STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, n.2, 460-752, 2003.

BRE, S.; TSCHIRHART, E. J. New Insights into the Regulation of Neutrophil NADPH Oxidase Activity in the Phagosome : A Focus on the Role of Lipid and Ca (2+) Signaling. **Antioxid. Redox Signal**, v. 18, n. 6, p.661-676, 2012.

BRETÓN-ROMERO, R. et al. Free Radical Biology & Medicine Critical role of hydrogen peroxide signaling in the sequential activation of p38 MAPK and eNOS in laminar shear stress. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 52, n. 6, p. 1093–1100, 2012.

BRIGGS, R. T. et al. Localization of NADH oxidase on the surface of human polymorphonuclear leukocytes by a new cytochemical method. **J. Cell Biol.**, v. 67, n. 3, p. 566–586, 1975.

CAI, H.; GRIENDLING, K. K.; HARRISON, D. G. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 24, n. 9, p. 471–478, 2003.

CAIRNS, B. et al. NOX inhibitors as a therapeutic strategy for stroke and neurodegenerative disease. **Curr. Drug Targets**, v. 13, n. 2, p. 199–206, 2012.

CASSATELLA, M. A. et al. Interferon-gamma activates human neutrophil oxygen metabolism and exocytosis. **Immunology**, v. 63, n. 3, p. 499–506, 1988.

CAU, S. B.; CARNEIRO, F. S.; TOSTES, R. C. Differential modulation of nitric oxide synthases in aging: Therapeutic opportunities. **Front Physiol.**, v. 3, p. 1–11, 2012.

CHANOCK, S. J. et al. The respiratory burst oxidase. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 40, p. 24519–24522, 1994.

CHEN, X. L. et al. M. Rac1 and superoxide are required for the expression of cell adhesion molecules induced by tumor necrosis factor-alpha in endothelial cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 305, n. 2, p. 573–580, 2003.

CHO, K. et al. Antihyperglycemic mechanism of metformin occurs via the AMPK/LXR α /POMC pathway. **Sci. Rep.**, v. 5, p. 1-7, 2015.

CORMAN, B. et al. Aminoguanidine prevents age-related arterial stiffening and cardiac hypertrophy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 95, n. 3, p. 1301–1306, 1998.

CROSS AR, SEGAL AW. The NADPH oxidase of professional phagocytes-prototype of the NOX electron transport chain systems. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1657, p. 1–22, 2004.

DABLA, P. K. Renal function in diabetic nephropathy. **World J. Diabetes**, v. 1, n. 2, p. 48–56, 2010.

D'ANDREA, A., et al. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. **J. Exp. Med.**, v. 176, n.5, p. 1387-1398, 1992.

DANTAS, Ada S. et al. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. **Biomolecules**, v. 5, n. 1, p. 142–165, 2015.

DE ASSIS M. C. et al. *Pseudomonas aeruginosa* -induced production of free radicals by IFN γ plus TNF α -activated human endothelial cells: mechanism of host defense or of bacterial pathogenesis? **Immunology and Cell Biology**, v. 82, p. 383–392, 2004.

DE OLIVEIRA-JUNIOR, E. B. et al. The human NADPH oxidase: Primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. **Scand. J. Immunol.**, v. 73, n. 5, p. 420–427, 2011.

DE SOUZA FERREIRA, C. et al. Neutrophil dysfunction induced by hyperglycemia: Modulation of myeloperoxidase activity. **Cell biochem. funct.**, 2012.

DE SOUZA FERREIRA, C. et al. Aminoguanidine treatment increased NOX2 response in diabetic rats: Improved phagocytosis and killing of *Candida albicans* by neutrophils. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 772, p. 83–91, 2016.

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

DJEU, J. Y. et al. Functional activation of human neutrophils by recombinant monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/IL-8. **J. Immunol.**, v. 144, n. 6, p. 2205–2210, 1990.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 421–31, 1990.

DU, A.J. et al. Effects of aminoguanidine on retinal apoptosis in mice with oxygen-induced retinopathy. **Int. J. Ophthalmol.**, v. 6, n. 4, p. 436–41, 2013.

EDELSTEIN, D.; BROWNLEE, M. Mechanistic studies of advanced glycosylation end product inhibition by aminoguanidine. **Diabetes**, v. 41, p. 26–29; 1992.

E NICO, E. T. et al. The action of aminoguanidine on the liver of trained diabetic rats. **J. Diabetes Metab. Disord.**, v. 12, n. 40, p. 1–9, 2013.

EL-BENNA, J.; DANG, P. M.; PÉRIANIN, A. Peptide-based inhibitors of the phagocyte NADPH oxidase. **Biochem. Pharmacol.**, v. 80, p. 778–785, 2010.

EL-BENNA, J.; DANG, P. M.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. **Semin. Immunopathol.**, v. 30, n. 3, p. 279–289, 2008.

ELLIS TN, BEAMAN BL. Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function. **Immunology**. v. 112, p. 2-12, 2004.

ELLISON, M. A. et al. INF-gamma enhances Nox2 activity by upregulating phox proteins when applied to differentiating PLB-985 cells but does not induce Nox2 activity by itself. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–19, 2015.

EYRIES, M.; COLLINS, T.; KHACHIGIAN, L. M. Modulation of growth factor gene expression in vascular cells by oxidative stress. **Endothelium**. v. 11, n. 2, p. 133–139, 2004.

FARLEY, K. S. et al. Alveolar macrophage inducible nitric oxide synthase-dependent pulmonary microvascular endothelial cell septic barrier dysfunction. **Microvasc. Res.**, v. 76, n. 3, p. 208–216, 2008.

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

FERRANTE, A., M. NANDOSKAR, et al. Effects of tumour necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha and beta on human neutrophil migration, respiratory burst and degranulation. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 86, n.1, p. 911982-911988.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 46, n. 3, p. 265–271, 2000.

FREEDMAN, B. I. et al. Design and baseline characteristics for the aminoguanidine clinical trial in overt type 2 diabetic nephropathy (ACTION II). **Control Clin. Trials**, v. 20, n. 5, p. 493–510, 1999.

FRUCHT, D. M., et al. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. **Trends Immunol.**, v. 22, n.10, p. 556-560, 2001.

FUJIHARA C. K.; et al. Evidence for the existence of two distinct functions for the inducible NO synthase in the rat kidney: effect of aminoguanidine in rats with 5/6 ablation. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 13, n. 9, 2278–2287, 2002.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373–6, 1980.

GARVIN J.L.; HERRERA M.; ORTIZ P.A. Regulation of renal NaCl transport by nitric oxide, endothelin, and ATP: clinical implications. **Annual review of physiology**, v. 73, p. 359–376, 2011.

GAZENDAM, R. P. et al. Two independent killing mechanisms of *Candida albicans* by human neutrophils: Evidence from innate immunity defects. **Blood**, v. 124, n. 4, p. 590–597, 2014.

GEISZT, M. et al. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 97, n. 14, p. 8010–8014, 2000.

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.**, v.

93, n. 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.**, v. 29, n. 2, p. 109–112, 1994.

GONG et al. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Pharmacogenet. Genomics**, v. 11, p. 820-827, 2012.

GROEMPING, Y.; RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. **Biochem. J.**, v. 386, n. 3, p. 401–416, 2005.

GROHMANN, U., et al. Positive regulatory role of IL-12 in macrophages and modulation by IFN-gamma. **J. Immunol.**, v.167, n.1, p. 221-227, 2001.

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.**, v. 36, pt. 5, p. 920–929, 2008.

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

GUYTON A. C. **Arterial Pressure and Hypertension**. Philadelphia, Saunders, 1980.

GUYTON A. C. Long-term arterial pressure control: an analysis from animal experiments and computer and graphic models. **Am. J. Physiol.**, v. 259, n.5, pt 2, p. 865-877, 1990.

GUZIK, T. J. et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. **Circ Res.**, v. 86, n. 9, p. 85–90, 2000.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet.**, v. 344, n. 8924, p. 721–724, 1994.

HERMANN, M.; FLAMMER, A.; LÜSCHER, T. F. Nitric Oxide in Hypertension. **J. Clin. Hypertens. (Greenwich)**, v.8, n.12, p. 17–29, 2006.

HIDALGO, M. A. et al. fMLP-Induced IL-8 Release Is Dependent on NADPH Oxidase in Human Neutrophils. **J. Immunol. Res.**, v. 2015, p. 1–14, 2015.

HONG JE, et al. Superoxide dismutase-dependent, catalase-sensitive peroxides in human endothelial cells infected by *Rickettsia rickettsii*. **Infect. Immun.**, v.66, p. 1293–1298, 1998.

HOU, X. et al. Dihydromyricetin protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage by regulating mitochondrial pathways. **Life Sci.**, v. 130, p. 38–46, 2015.

HU, Q. et al. NADPH oxidase activation increases the sensitivity of intracellular Ca²⁺ stores to inositol 1,4,5-trisphosphate in human endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 21, p. 15749–15757, 2000.

IMLAY, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 11, n. 7, p. 443–454, 2013.

ITO D., et al. Chronic Running Exercise Alleviates Early Progression of Nephropathy with Upregulation of Nitric Oxide Synthases and Suppression of Glycation in Zucker Diabetic Rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p.1-21, 2015.

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

KABEYA, L. M. et al. 7-Hydroxycoumarin modulates the oxidative metabolism, degranulation and microbial killing of human neutrophils. **Chem. Biol. Interact.**, v. 206, n. 1, p. 63–75, 2013.

KALYANARAMAN, B. Redox Biology Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students : Oxidants , antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biol.**, v. 1, n. 1, p. 244–257, 2013.

KALYANARAMAN, B. et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 52, n. 1, p. 1–6, 2012.

KAMIJO H, HIGUCHI M, HORA K. Chronic inhibition of nitric oxide production aggravates diabetic nephropathy in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. **Nephron. Physiology**, v. 104, n. 1, p. 12–22, 2006.

KATRAGKOU, A. et al. Effects of interferon- γ and granulocyte colony-stimulating factor on antifungal activity of human polymorphonuclear neutrophils against *Candida albicans* grown as biofilms or planktonic cells. **Cytokine**, v. 55, n. 3, p. 330–334, 2011.

KASHIHARA N.; et al. Oxidative stress in diabetic nephropathy. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 34, p. 4256–4269, 2010.

KAWAHARA, T. et al. Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 36, p. 31859–31869, 2005.

KELSO, B. G. et al. Pyridoxine restores endothelial cell function in high glucose. **Metab. Syndr. Relat. Disord.**, v. 9, n. 1, p. 63–68, 2011.

KLEBANOFF, S. J. et al. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **J. Leukoc. Biol.**, v. 93, n. 2, p. 185–198, 2013.

KOJDA, G.; HARRISON, D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. **Cardiovasc. Res.**, v. 43, n. 3, p. 562–71, 1999.

KORCHAK H.M., ROSSI M.W., KILPATRICK L.E. Selective role for b-Protein Kinase C in signaling for O₂ generation but not degranulation or adherence in differentiated HL60 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 27292–27299, 1998.

KOSEGAWA, I. et al. Metformin decreases blood pressure and obesity in OLETF rats via improvement of insulin resistance. **Hypertens. Res.**, v. 19, n. 1, p. 37–41, 1996.

ŁABUZEK, K. et al. Metformin increases phagocytosis and acidifies lysosomal/endosomal compartments in AMPK-dependent manner in rat primary microglia. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 381, n. 2, p. 171–186, 2010.

LAMBETH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 3, p. 181–189, 2004.

LASSEGUE, B.; SAN MARTIN, A.; GRIENDLING, K. K. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. **Circ. Res.**, v.110, p. 1364–1390, 2012.

LEE, J. H. et al. Effects of dietary supplementation with red-pigmented leafy lettuce (*Lactuca sativa*) on lipid profiles and antioxidant status in C57BL/6J mice fed a high-fat high-cholesterol diet. **Br. J. Nutr.**, v. 101, n. 8, p. 1246–1254, 2009.

LEE, W. L.; HARRISON, R. E.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1299–1306, 2003.

LIMA, T. F. O. **Modulação da mieloperoxidase e elastase de neutrófilos pela aminoguanidina**. 2016. 58f. Dissertação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNIFAL, MG, Alfenas, 2016.

LIOCHEV, S. I.; FRIDOVICH, I. The role of O₂⁻ in the production of HO₂·: in vitro and in vivo. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 16, n. 1, p. 29–33, 1994.

LUNDQVIST, H.; DAHLGREN, C. Isoluminol-enhanced chemiluminescence: a sensitive method to study the release of superoxide anion from human neutrophils. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 20, n. 6, p. 785–92, 1996.

LUO, Y. et al. Differential effects of selective and non-selective nitric oxide synthase inhibitors on the blood perfusion of ischemia-reperfused myocardium in dogs. **Med. Sci. Monit. Basic Res.**, v. 19, p. 181–186, 2013.

MAEJIMA, Y. et al. Regulation of myocardial growth and death by NADPH oxidase. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 50, p. 408–416, 2011.

MAKÓ V. et al. Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1 β , TNF- α , and LPS. **Cytometry A.**, v. 77, n.10, p. 962-970, 2010.

MANEA, S.A. et al. Regulation of Nox enzymes expression in vascular pathophysiology: Focusing on transcription factors and epigenetic mechanisms. **Redox Biol.**, v. 5, p. 358–366, 2015.

MARIOTTO, S.; MENEGAZZI, M.; SUZUKI, H. Biochemical aspects of nitric oxide. **Curr. Pharm. Des.**, v. 10, n. 14, p. 1627–1645, 2004.

MATTSON, D. L. et al. Inducible nitric oxide synthase and inflammation. **Hypertension**, v. 31, p. 15–20, 1998.

MILLER, A. A.; DRUMMOND, G. R.; SOBEY, C. G. Novel isoforms of NADPH-oxidase in cerebral vascular control. **Pharmacol. Ther.**, v. 111, n. 3, p. 928–948, 2006.

MIYOSHI T. et al. The role of endothelial interleukin- 8 / NADPH oxidase 1 axis in sepsis. **Immunology**, v. 131, p. 331–339, 2010.

MOLDOVAN, L. et al. Reactive oxygen species in vascular endothelial cell motility. Roles of NAD(P)H oxidase and Rac1. **Cardiovasc. Res.**, v. 71, n. 2, p. 236–246, 2006.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, n. 27, p. 2002–2012, 1993.

MONTESEIRÍN, J. et al. Human neutrophils synthesize IL-8 in an IgE-mediated activation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 76, n. 3, p. 692–700, 2004.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research. **Antioxid. Redox Signal**, v. 20, p. 164–182, 2014.

MORRAN, M. P. et al. Immunogenetics of type 1 diabetes mellitus. **Mol. Aspects Med.**, v. 42, p. 42–60, 2015.

MUNTZEL, M. S.; ABE, A.; PETERSEN, J. S. Effects of adrenergic, cholinergic and ganglionic blockade on acute depressor responses to metformin in spontaneously hypertensive rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 281, n. 2, p. 618–23, 1997.

MUNTZEL, M. S.; HAMIDOU, I.; BARRETT, S. Metformin Attenuates Salt-Induced Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 33, n. 5, p. 1135–1140, 1999.

MUTUNGA M, PRESTON PM, SUMPTION KJ. Nitric oxide is produced by Cowdria ruminantium-infected bovine pulmonary endothelial cells in vitro and is stimulated by gamma interferon. **Infect. Immun.**, v. 66: p. 2115–2121, 1998.

MYHRE, O. et al. Evaluation of the probes 20,70-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. **Biochem. Pharmacol.**, v. 65,

p. 1575–1582, 2003.

NATHAN, C. F., et al. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J. Exp. Med.**, v. 158, n.3, p. 670-689, 1983.

NETEA, M. G. et al. Increased susceptibility of TNF-alpha lymphotoxin-alpha double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida albicans*. **J. Immunol.**, v. 163, n. 3, p. 1498–1505, 1999.

NEWBURGER, P. E. et al. H. Induction of phagocyte cytochrome b heavy chain gene expression by interferon gamma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 85, n. 14, p. 5215–5219, 1988.

NUNES, P.; DEMAUREX, N.; MARY, C. Regulation of the NADPH Oxidase and Associated Ion Fluxes During Phagocytosis. **Traffic.**, n. 12, p. 1–14, 2013.

OELZE, M. et al. Nebivolol inhibits superoxide formation by NADPH oxidase and endothelial dysfunction in angiotensin II-treated rats. **Hypertension**, v. 48, n. 4, p. 677–684, 2006.

OGUZ, F. et al. Aminoguanidine prevents testicular damage-induced-2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in male rats. **Andrologia**, v. 45, n. 4, p. 225–231, 2013.

OKAMOTO, A.; IWAMOTO, Y.; MARU, Y. Oxidative stress-responsive transcription factor ATF3 potentially mediates diabetic angiopathy. **Mol. Cell Biol.**, v. 26, n. 3, p. 1087–1097, 2006.

ORIENT, A. et al. Novel sources of reactive oxygen species in the human body. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 22, n. 5, p. 1281–1288, 2007.

OSANI, O. A.; ODESANMI, O. E.; OLADELE, F. C. Antioxidative and antidiabetic activities of watermelon (*Citrullus lanatus*) juice on oxidative stress in alloxan-induced diabetic male Wistar albino rats. **Niger Med. J.**, v. 56, n. 4, p. 272–277, 2015.

OUSLIMANI, N. et al. Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. **Metabolism.**, v. 54, n. 6, p. 829–834, 2005.

- OZTURK, A. et al. Beneficial effects of aminoguanidine on skin flap survival in diabetic rats. **Exp. Diabetes Res.**, v. 2012, p. 1-8, 2012.
- OZYAZGAN, S. et al. Impaired relaxation in aorta from streptozotocin-diabetic rats: effect of aminoguanidine (AMNG) treatment. **Int. J. Exp. Diabetes Res.**, v. 1, n. 2, p. 145–53, 2000.
- PANIERI, E.; SANTORO, M. M. ROS signaling and redox biology in endothelial cells. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 72, n. 17, p. 3281–3303, 2015.
- PARK, D. W. et al. Activation of AMPK Enhances Neutrophil Chemotaxis and Bacterial Killing. **Mol. Med.**, v. 19, n. 1, p. 387–398, 2013.
- 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.
- PERNICOVA, I.; KORBONITS, M. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 10, n. 3, p. 143–156, 2014.
- PHILIS-TSIMIKAS, A. et al. Aminoguanidine has both pro-oxidant and antioxidant activity toward LDL. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 15, n. 3, p. 367–376, 1995.
- PIETARINEN-RUNTTI, P. et al. Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 278, n. 1, p. 118–125, 2000.
- QUINN, M. T.; AMMONS, M. C.; DELEO, F. R. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease : no longer just agents of death and destruction. **Clin. Sci. (Lond)**, v. 20, n. 111, p. 1–20, 2006.
- RADI, R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 101, n. 12, p. 4003–4008, 2004.
- RADI, R. et al. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 288, n. 2, p. 481–487, 1991.
- RAFIGHI, Z. et al. Association of dietary vitamin C and e intake and antioxidant enzymes in type 2 diabetes mellitus patients. **Glob. J. Health Sci.**, v. 5, n. 3, p. 183–

187, 2013.

ROBINSON DH, et al. Retroviral transformation of cerebral microvascula- ture endothelial cells: macrophage-like and microvascular endothelial cell properties. **Blood**; v. 77, p. 294–305, 1991.

RODIÑO-JANEIRO, B. K. et al. Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology. **Vasc. Health Risk Manag.**, v. 9, p. 401–428, 2013.

RODRIGUES, M. R. et al. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 292, n. 4, p. 869–873, 2002.

ROLLINS, B. J. Chemokines and atherosclerosis: what Adam Smith has to say about vascular disease. **J. Clin. Invest.**, v. 108, n. 9, p. 1269–1271, 2001.

ROOS, D.; van BRUGGEN, R.; MEISCHL, C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. **Microbes Infect.**, v. 5, p. 1307–1315, 2003.

SALPETER, S. R. et al. Meta-analysis: metformin treatment in persons at risk for diabetes mellitus. **Am. J. Med.**, v. 121, n. 2, p. 149–157, 2008.

SAMPAIO, S. C. et al. Crotalus durissus terrificus snake venom regulates macrophage metabolism and function effect of Crotalus durissus terrificus venom on rat. **J. Leukoc. Biol.** 2001, v. 70, n. 4, p. 551–558, 2001.

SANTILLO, M. et al. NOX signaling in molecular cardiovascular mechanisms involved in the blood pressure homeostasis. **Front Physiol.**, v. 6, p. 1–8, 2015.

SCHINDLER, H., et al. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. **J. Immunol.**, v. 166, n.5, p. 3075-3082, 2001.

SCHRÖDER, K. et al. Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. **Circ. Res.**, v. 110, n. 9, p. 1217–1225, 2012.

SCHÜRMAN, C. et al. The NADPH oxidase Nox4 has anti-atherosclerotic functions. **Eur. Heart J.**, v. 36, n. 48, p. 3447-3456, 2015.

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

SEDER, R. A., et al. Interleukin 12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** V. 90, n.21, p. 10188-10192, 1993.

SLIMAN, S. I. et al. Hyperglycemic oxoaldehyde, glyoxal, causes barrier dysfunction, cytoskeletal alterations, and inhibition of angiogenesis in vascular endothelial cells: aminoguanidine protection. **Mol. Cell Biochem.**, v. 333, n. 1-2, p. 9–26, 2010.

SINGH DK, WINOCOUR P, FARRINGTON K. Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire. **Nature reviews Endocrinology**, v. 7, n.3, p. 176–184, 2011.

SIOMBOING, X. et al. Investigation of the inhibitory effects of chelerythrine chloride on the translocation of the protein kinase C β I , β II , β z in human neutrophils. **Farmacol.**, v. 56, p. 859–865, 2001.

SCIARRETTA S., et al. Role of NADPH oxidase in the regulation of autophagy in cardiomyocytes. **Clinical Science**, v. 128, p. 387–403, 2015.

SKAMARAUSKAS, J. T.; MCKAY, A. G.; HUNT, J. V. Aminoguanidine and its pro-oxidant effects on an experimental model of protein glycation. **Free Radical Biology**, v. 21, n. 6, p. 801–812, 1996.

SOUZA PINTO, R. et al. Inhibition of macrophage oxidative stress prevents the reduction of ABCA-1 transporter induced by advanced glycated albumin. **Lipids**, v. 47, n. 5, p. 443–450, 2012.

STACEY, M. M.; VISSERS, M. C.; WINTERBOURN, C. C. Oxidation of 2-Cys Peroxiredoxins in Human Endothelial Cells by Hydrogen Peroxide, Hypochlorous Acid, and Chloramines. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 17, n. 3, p. 411–421, 2012.

STADLER, K. et al. Beneficial effects of aminoguanidine on the cardiovascular system of diabetic rats. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, v. 21, n. 2, p. 189–196, 2005.

STEFFEN, Y. et al. Cigarette smoke and LDL cooperate in reducing nitric oxide bioavailability in endothelial cells via effects on both eNOS and NADPH oxidase.

Nitric Oxide., v. 27, n. 3, p. 176–184, 2012.

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

SUBASINGHE, W.; SYED, I.; KOWLURU, A. 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.**, v. 300, n. 1, p. 12–20, 2011.

TAKAC, I.; SCHRÖDER, K.; BRANDES, R. P. The Nox family of NADPH oxidases: friend or foe of the vascular system? **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 14, n. 1, p. 70–78, 2012.

TAKEYA, R. et al. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. **J. Biol. Chem.**, v. 290, n. 10, p. 25234-25246, 2015.

TANIGUCHI, T. Regulation of cytokine gene expression. **Annual review of immunology**, v. 6, p. 439–464, 1988.

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

TENNENBERG, S. D.; FEY, D. E.; LIESER, M. J. Oxidative priming of neutrophils by interferon-gamma. **J. Leukoc. Biol.**, v. 53, n. 3, p. 301–308, 1993.

TERRI, N. E.; BLAINE, L. B. Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function. **Immunology**, v. 112, n. 1, p. 2-13, 2004.

TOUYZ, R. M.; YAO, G.; SCHIFFRIN, E. L. Role of the actin cytoskeleton in angiotensin II signaling in human vascular smooth muscle cells. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 83, n. 1, p. 91–97, 2005.

TOUYZ R M, BRIONES A M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. **Hypertension Research**, v. 34, p. 5–14, 2011.

TRUE, A. L.; RAHMAN, A.; MALIK, A. B. Activation of NF-kappaB induced by H(2)O(2) and TNF-alpha and its effects on ICAM-1 expression in endothelial cells.

Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., v. 279, n. 2, p. 302–311, 2000.

TURBAN, S. et al. Defining the Contribution of AMP-activated Protein Kinase (AMPK) and Protein Kinase C (PKC) in Regulation of Glucose Uptake by Metformin in Skeletal Muscle Cells. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 24, p. 20088–20099, 2012.

UENO, N. et al. The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 24, p. 23328–23339, 2005.

VERMA, S.; BHANOT, S.; MCNEILL, J. H. Metformin decreases plasma insulin levels and systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Physiol.**, v. 267, n. 4, pt 2, p. 1250–1253, 1994a.

VERMA, S.; BHANOT, S.; MCNEILL, J. H. Antihypertensive effects of metformin in fructose-fed hyperinsulinemic, hypertensive rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 271, n. 3, p. 1334–1337, 1994b.

VIEIRA, A. A., et al. Commissural NTS lesions enhance the pressor response to central cholinergic and adrenergic activation. **Neurosci. Lett.**, v. 521, n.1, p. 31-36, 2012.

VIOLLET, B. et al. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. **Clinical Science**, v. 122, n. 6, p. 253–270, 2011.

VLASSARA H. et al. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 11704-1178, 1994.

WARABI, E. et al. Shear stress stabilizes NF-E2-related factor 2 and induces antioxidant genes in endothelial cells: role of reactive oxygen/nitrogen species. **Free Radical Biology**, v. 42, n. 2, p. 260–269, 2007.

WENDEL, A. Glutathiona Peroxidase in Methods in Enzymology. **Academic Press.**, v. 77, p. 325-333, 1981.

WIDDER, J. D.; HARRISON, D. G. Can vitamin E prevent cardiovascular events and cancer? **Nat. Clin. Pract. Cardiovasc Med.**, v. 2, n. 10, p. 510–511, 2005.

WILCOX CS. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension? **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 289, n.4,p. 913–935, 2005.

WILLIAMS, H. C.; GRIENGLING, K. K. NADPH oxidase inhibitors: new antihypertensive agents? **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 50, n. 1, p. 9–16, 2007.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Redox Reactions and Microbial Killing in the Neutrophil Phagosome. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 00, n. 00, p. 01–19, 2012.

WOLFRAM KUHLMANN, C. R. et al. Lysophosphatidylcholine-induced modulation of Ca(2+)-activated K(+)channels contributes to ROS-dependent proliferation of cultured human endothelial cells. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 36, n. 5, p. 675–82, maio 2004.

WULFFELÉ, M. G. et al. The effect of metformin on blood pressure, plasma cholesterol and triglycerides in type 2 diabetes mellitus: a systematic review. **J. Intern. Med.**, v. 256, n. 1, p. 1–14, 2004.

XAVIER, C. P. M. **Síntese e Atividade Catalítica de Biguanidinas**. 1997. 79f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 1997.

ZACARELLI, M. A. Hipoclicemiantes orais. **Cir.Vasc. Ang.**, v. 3, n. 2, p. 9–14, 1987.

ZAKIKHANI, M. et al. Metformin and rapamycin have distinct effects on the AKT pathway and proliferation in breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 123, n. 1, p. 271–279, 2010.

ZHANG B, et al. Are free radicals responsible for endothelial cell killing of *Staphylococcus aureus*? **Immunol. Lett.**, v. 58, p.113–120, 1997.

ZIELONKA, J.; KALYANARAMAN, B. Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: Another inconvenient truth. **Free Radical Biology**, v. 48, n. 8, p. 983–1001, 2010.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER ÉTICO ANIMAL (CEUA).



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, 19 de dezembro de 2012.

Profª. Maria Rita Rodrigues

Prezada Professora;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 475/2012, intitulado “Aumento da atividade e da expressão do sistema NADPH oxidase de neutrófilos pela aminoguanidina: implicações fisiológicas” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e **aprovado** por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

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

ANEXO B – PARECER DE ÉTICA (CEP)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Elucidação da via de aumento da atividade de NOX2 pela Aminoguanidina e suas implicações na função microbicida de neutrófilos.

Pesquisador: Maria Rita Rodrigues

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 26830714.5.0000.5142

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 564.925

Data da Relatoria: 07/03/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa completo com título: Elucidação da via de aumento da atividade de NOX2 pela aminoguanidina e suas implicações na função microbicida de neutrófilos. Foram apresentados ainda folha de rosto, TCLE, ofício de aprovação pelo CEUA.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral deste estudo é elucidar o mecanismo pelo qual a aminoguanidina (AG) gera aumento da atividade sistema NADPH oxidase de neutrófilos de ratos. Verificar se o mesmo efeito ocorre em neutrófilos humanos e em células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs). Para compreender as consequências fisiológicas desse aumento de atividade do NOX2, utilizaremos um modelo de infecção por *C. albicans* em ratos avaliando a atividade microbicida de neutrófilos *In vivo* e um modelo *In vitro*, com neutrófilos humanos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sujeitos humanos: Risco mínimo: coleta de sangue venoso para obtenção de leucócitos. **Animais:** procedimentos aprovados por comitê de ética em experimentação animal

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente projeto está inserido na pesquisa básica com objetivo de elucidar vias metabólicas tendo como alvo a expressão e atividade da enzima NADPH oxidase (NOX2) em células tratadas

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Bairro: centro

CEP: 37.130-000

UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3200-1318

Fax: (35)3200-1318

E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



Continuação do Parecer: 504.625

com aminoguanidina. A pesquisa básica é essencial para a geração de conhecimentos que possam ser utilizados em pesquisas aplicadas e geração de novos produtos e procedimentos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Projeto de pesquisa completo, com objetivos, justificativa, referencial teórico e metodologia pertinentes.

TCLE adequado ao estudo.

Recomendações:

O relator sugere aprovação do projeto

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP acata o parecer do relator.

ALFENAS, 24 de Março de 2014

Assinador por:
Maria Betânia Tinti de Andrade
(Coordenador)

APENDICES

APENDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa: **“ELUCIDAÇÃO DA VIA DE AUMENTO DA ATIVIDADE DE NOX2 POR GUANIDINAS E SUAS IMPLICAÇÕES NA FUNÇÃO MICROBICIDA DE NEUTRÓFILOS”**.

O motivo que nos leva a pedir sua colaboração é para estudar a possibilidade de identificar novas maneiras de aumentar a fagocitose de neutrófilos, e dessa forma auxiliar a desenvolver medicamentos para pacientes que possuem o sistema imunológico debilitado.

Se você se dispuser a colaborar, será coletada uma amostra de seu sangue, através de punção sanguínea (com agulha e seringa), da veia do braço, para separarmos algumas células e estudarmos como os tratamentos com fármacos afetam a fagocitose. Este procedimento será realizado uma única vez no Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG, por um farmacêutico/bioquímico formado. Você poderá sentir algum desconforto como dor na picada da agulha, mas todos os cuidados serão tomados para que isso não ocorra.

Pedimos que nos informe se você tiver alterações imunológicas como alergia, infecções ou inflamações, e se está em uso de qualquer medicamento nos últimos 15 dias.

Você tem direito de saber o resultado de todos os testes realizados e ser esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar.

Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade. Para desistir do projeto, a qualquer momento, basta avisar a um dos pesquisadores cujos nomes e telefones estão no final deste documento.

Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados dos exames laboratoriais permanecerão confidenciais. Seu nome ou material que indique a sua participação não será liberado em nenhuma situação. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG, Prédio C, sala 203, e outra fornecida a você.

A participação deste estudo não acarretará custos a você e não haverá nenhuma compensação financeira.

Eu, _____

Fui informado (a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. A professora orientadora Maria Rita Rodrigues e a aluna Cláudia de Souza Ferreira, participantes desta pesquisa, garantiram que todos os meus dados serão confidenciais.

Em caso de dúvidas poderei chamar a professora orientadora, ou a aluna de doutorado em Ciências Fisiológicas pelos telefones: (35)3299-1221 ou (35)3299-1223, ou ao comitê de Ética em Pesquisa da

Universidade Federal de Alfenas, localizado na Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, prédio O, sala 409-B, telefone (35)3299-1318.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome do Voluntário

Assinatura do Voluntário e data

Nome do Pesquisador

Assinatura do Pesquisador e data

Profa. Rita Rodrigues
R. Gabriel Monteiro da Silva, 700 Predio C Sala 201
37130-000 Alfenas-MG
Telefone: (35) 3299-1221

Cláudia de Souza Ferreira
R. Gabriel Monteiro da Silva, 700 Predio C Sala 202
37130-000 Alfenas-MG
Telefone: (35) 3299-1223



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar



Immunopharmacology and inflammation

Aminoguanidine treatment increased NOX2 response in diabetic rats: Improved phagocytosis and killing of *Candida albicans* by neutrophils



Cláudia de Souza Ferreira^a, Paula Commune Pennacchi^a, Tomaz Henrique Araújo^b,
Noemi Nosomi Taniwaki^c, Fernanda Borges de Araújo Paula^a,
Stella Maris da Silveira Duarte^a, Maria Rita Rodrigues^{a,*}

^a Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNIFAL-MG, Alfenas, MG, Brazil

^b Departamento de Histologia, Instituto de Ciências Biomédicas, UNIFAL MG, Alfenas, MG, Brazil

^c Setor de Virologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2015

Received in revised form

22 December 2015

Accepted 23 December 2015

Available online 24 December 2015

Keywords:

Reactive Oxygen Species

Neutrophils

Aminoguanidine

Diabetes

Glycation of proteins

Candida albicans

Main chemical compounds studied in this article:

Aminoguanidine bicarbonate (PubChem CID 164944)

ABSTRACT

In this study, we show that aminoguanidine (AMG), an inhibitor of protein glycation, increases the NOX2 (phagocyte NADPH oxidase) response and microbicidal activity by neutrophils, regardless of diabetic status. The non-enzymatic glycation of proteins, yielding irreversible advanced glycation end products (AGEs), is involved in the development of diabetes complications, including alterations of signaling pathways and the generation of reactive oxygen species by phagocytes. The phagocytes produce ROS (reactive oxygen species) through activation of the NOX2 complex, which generates superoxide. The purpose of this study was to evaluate the effect of hyperglycemia and the glycation of proteins on the NOX2 activity of neutrophils and its implications for cellular physiology, with a focus on the microbicidal activity of these cells. We treated diabetic rats with AMG and evaluated neutrophil ROS generation and *Candida albicans* killing ability. We observed a large increase in the microbicidal activity of peritoneal neutrophils from AMG-treated rats. The increase was independent of diabetic status and myeloperoxidase activity. Collectively, our results suggest that AMG has an immunomodulator role that triggers an increase in the microbicidal response of neutrophils mainly related to reactive oxygen species production by NOX2.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chronic hyperglycemia feature of diabetes mellitus, promotes the generation of advanced glycation end products (AGEs), that are directly linking them to long-term diabetic complications (Giacco and Brownlee, 2010; Vlassara and Uribarri, 2014). The AGEs are a variety of substances formed from a slow and complex process of interactions between reducing sugars or oxidized lipids and proteins, nucleic acids or aminophospholipids and can injure cells by different mechanisms, such as crosslinking with macromolecules, interaction with specific cellular receptors and intracellular glycation (Giacco and Brownlee, 2010; Nagai et al., 2014).

Abbreviations: AGEs, Advanced glycation end products; AMG, Aminoguanidine; DM, Diabetes mellitus; HbA1c, glycated hemoglobin; HOCl, hypochlorous acid; NO, Nitric oxide; iNOS, Nitric oxide synthase; NOX2, phagocyte NADPH oxidase system; ROS, Reactive oxygen species; ONOO⁻, peroxynitrite; PKC, protein kinase C; MPO, myeloperoxidase

* Corresponding author.

E-mail address: mritar11@yahoo.com.br (M.R. Rodrigues).

Aminoguanidine (AMG), one of the agents commonly used to prevent the formation of AGEs in animal models, is an effective agent for reducing AGE formation and lowering the severity of diabetes-associated structural and functional alterations (Goh and Cooper, 2008; Manikandan et al., 2009; Sliman et al., 2010). The mechanism by which AMG inhibits the formation of AGEs involves capturing dicarbonyl compounds, reactive intermediates formed by oxidation of the enediol rearrangements of Amadori products (Thornalley, 2003). In addition to its inhibitory action on AGE formation, AMG acts as a competitive and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase (iNOS) (Ara et al., 2006). This action of AMG is known to be associated with a reduction of peroxynitrite (ONOO⁻), which has deleterious roles in inflammation, lipid peroxidation, protein nitrosylation and DNA fragmentation (Chowdhury et al., 2009; Stadler et al., 2005).

In addition to increased non-enzymatic formation of AGE, some authors suggest that changes induced by hyperglycemia are linked to increased aldose reductase activity that leads to changes resulting from increased sorbitol, alterations of free radicals and the

oxidation state and activation of protein kinase C (PKC) (Giacco and Brownlee, 2010). The generation of reactive oxygen species seems to be a common point among these metabolic pathways.

Neutrophils produce reactive oxygen molecules through activation of the NOX2 by PKC that generates superoxide through a process called an oxidative “burst”. Superoxide and its reactive derivatives, including peroxide and hydroxyl radicals, are collectively termed reactive oxygen species (ROS). The NOX2 plays a key role in phagocytic cells such as neutrophils during organism defense against microbial pathogens (Babior, 1999; Bedard and Krause, 2007; Shen, 2010). Recently, we reported that neutrophil MPO activity is decreased in diabetic rats, compromising the ability of these cells to defend against the yeast *Candida albicans* (de Souza Ferreira et al., 2012).

The aim of this study was to investigate the effect of hyperglycemia and AGEs on the NOX2 of neutrophils, as these factors appear to be major contributors to morbidity in diabetes mellitus. To do so, we treated diabetic rats with AMG and evaluated the ability of neutrophils to generate ROS and kill *C. albicans*. Interestingly, we observed a large increase in the microbicidal activity of AMG-treated rat peritoneal neutrophils. Our results suggesting that administration of AMG improves NOX2 activity, thereby increasing the defense ability of neutrophils. The increase was independent of diabetic status, protein glycation or MPO expression and activity.

2. Material and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (280 ± 50 g) were obtained from the Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Animals were maintained at 23 ± 2 °C and were allowed access to food and water *ad libitum*. The rats were allocated to one of four groups: control (glycemia below 150 mg/dl) or diabetic (glycemia over 250 mg/dl), treated or not with AMG (100 mg/day) (aminoguanidine was purchased from Sigma Chemical Co-St. Louis-USA). The groups were used as described below: Control: non-diabetic rats treated with water; Control+AMG: non-diabetics rats treated with AMG; Diabetic: diabetic rats treated with water; Diabetic+AMG: diabetic rats treated with AMG. The animals were killed by deepening anesthesia following the administration of 40 mg/kg sodium pentobarbital intraperitoneally. All *in vivo* experiments followed the guidelines of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) and were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of UNIFAL-MG (protocol number 475/2012).

2.2. Treatments

Diabetic and non-diabetics (control group) rats were treated with AMG (100 mg/kg, p.o.) or water for 50 consecutive days, starting seven days after diabetes induction (Gogasyavuz et al., 2002; Oguz et al., 2013; Vlassara et al., 1994).

2.3. Diabetes induction

Alloxan monohydrate (2% solution) was administered intraperitoneally (150 mg/kg) diluted with saline (0.9% NaCl), into 12-h-fasted rats supplied with water, *ad libitum* (Szkudelski, 2001). Animals injected with vehicle and submitted to similar experimental conditions were used as controls (non-diabetics). In this study, diabetic rats were defined as those with glycemia over 250 mg/dl after seven days of Alloxan injection. Blood glucose was monitored using test strips with blood taken from the tail.

2.4. Neutrophil recruitment and cell preparation

The animals were killed after 50 days of the treatment with AMG or water. Rat neutrophils were obtained by intraperitoneal lavage with 20 ml of phosphate-buffered saline (PBS) 4 h after an intraperitoneal injection of 2 ml of a 12% (w/v) sterile sodium caseinate solution (Sigma) in saline. After a gentle massage of the abdomen, the cell suspension was collected by aspiration with a syringe containing a 40×12 mm needle. The cell suspension was centrifuged at 4 °C (500 g for 10 min). The number of viable cells (>98% neutrophils) was determined in a Neubauer chamber (Knittel Glaser, Braunschweig, Germany) under an optical microscope by Trypan blue exclusion. The differential cell count was performed after fixation and May–Grunwald–Giemsa staining.

2.5. Sample collection

Blood samples for biochemical tests were collected from the cardiac puncture using 5 ml disposable syringes and 25 mm \times 7 mm disposable hypodermic needles. Samples were stored in tubes without anticoagulant and centrifuged for 10 min, and then the serum was stored at -20 °C for subsequent biochemical analysis. Whole blood was collected with EDTA anticoagulant for the measurement of Hemoglobin A1c (HbA1c).

2.6. Clinical chemistry parameters

Serum glucose, urea and creatinine were determined by using an automated analyzer (HumaStar 80-In vitro Diagnostic Ltda) according to the manufacturers' instructions. Standard controls were run before each determination, and the values obtained for the different biochemical parameters were all tests were carried out in duplicate. The HbA1c was measured in whole blood by ion exchange chromatography using commercial kit.

2.6.1. AGEs Spectrofluorometric measure

AGEs were quantified by measuring fluorescence as described by Zilin et al. (2001). Briefly, serum samples (70 μ l) were mixed with 1.6 ml of TCA (0.15 mol/l) in microcentrifuge tubes, and 330 μ l of chloroform was added. The tubes were shaken vigorously to complete the precipitation of proteins and to extract lipids to organic phase and then centrifuged (10 min, 13,000 g). Measurements were performed in aqueous layer at room temperature in a 1 cm cuvette pathlength. The spectrofluorometer was adjusted at wavelengths of 350 nm (excitation) and 440 nm (emission) with a gap width of 5 nm. The results were expressed as arbitrary unit divided by the concentration of specific proteins in the serum (AU/mg protein) (Alhamdani et al., 2007).

2.7. Protein determination

The protein content of the cell homogenates was measured by the method of Bradford, using BSA as standard (Bradford, 1976). The protein of the serum was measured by the method of Biuret (Layne, 1957).

2.8. NOX2 activity (Cit C reduction)

The production of superoxide anions by NOX2 in neutrophils was monitored by reduction of cytochrome C. The test was conducted in a plastic bucket containing 2×10^6 neutrophils/ml, 100 μ mol/l of cytochrome C and 20 μ g/ml of catalase in PBS containing 10 mmol/L glucose, pH 7.4. The buckets were kept at 37 °C for 10 min in a spectrophotometer to balance the system. Superoxide production was initiated by the addition of PMA (12-myristate 13-acetate phorbol) (100 ng/ml). After the addition of PMA,

the reaction was monitored by spectrophotometry for 3 min at a wavelength of 550 nm (Jones and Hancock, 1994).

2.9. Chemiluminescence amplified by luminol

For this assay, neutrophils were activated with PMA (53 ng/test) in a reaction mixture containing 1 mmol/l of luminol and 1×10^6 neutrophils/ml. The intensity of chemiluminescence was followed in a Geomax luminometer TM 20/20, and the final volumes were 0.3 ml. The chemiluminescence is expressed as relative light units per second (RLU/s). The reaction was performed in PBS, pH 7.4, and followed for 30 min. All measurements were made at 37 °C (Jones and Hancock, 1994). As controls, the reactions were carried out without cells, without luminol or without PMA.

2.10. Myeloperoxidase activity

Peritoneal neutrophils (1×10^6 cell/ml) were incubated with 12 mmol/l of taurine in 10 mmol/l of phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mmol/l of NaCl, 10 mmol/l of KCl, 0.5 mmol/l of $MgCl_2$, 1 mmol/l of $CaCl_2$ and 1 mg/ml of glucose. After 30 min. of preincubation at 37 °C, the cells were stimulated with 100 ng/ml of PMA. After 30 min, the reactions were stopped by adding 20 mg/ml of catalase and placing the tubes in melting ice for 5 min. Cells were pelleted by centrifugation (10 min at 12,000 g, 4 °C). The concentration of accumulated taurine chloramine present in the supernatants was quantified by measuring the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) to 5,5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), as shown by a decrease in TNB absorbance at 412 nm, as previously described (Rodrigues et al., 2002; Weiss et al., 1982).

2.11. Yeast preparation

C. albicans yeast (ATCC 5372) was opsonized with 10% (v/v) rat homologous serum in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.2, containing 0.15 M NaCl (PBS) for 30 min at 37 °C with orbital shaking at 150 g. Viability was determined by exclusion of methylene blue 0.05% (99.9%), and the number of *C. albicans* fungi was determined in a Neubauer's chamber.

2.12. Phagocytosis of *C. albicans* and candidacidal activity

Neutrophils (2×10^6) were incubated in sterile plastic tubes (to avoid cell adherence) at 37 °C with opsonized *C. albicans* (2×10^7) at a 1:10 ratio at 37 °C in 1 ml of PBS containing glucose in a rotatory system (10 g). After 30, 60, 90 and 120 min of incubation, an aliquot of 50 ml of this suspension were adhered to cover slip glass by cytocentrifugation (Sorocito FANEM). After centrifugation, cover slips were stained with Wright's and May-Giemsa stains (Sampaio et al., 2001). No hypha formation was observed inside the neutrophils by this time. Neutrophils with one or more attached yeasts were scored as phagocytic cells. However, this method did not distinguish between engulfed yeast and those which were attached to the cell surface (Souza et al., 2001). The percentage of phagocytic cells and the number of yeast cells attached per 100 randomly chosen neutrophils were counted by examining at least 200 neutrophils per preparation. For candidacidal activity determination, cell viability of attached cells was assessed by the dye exclusion test.

2.13. Fluorescence immunodetection

Peritoneal neutrophils (1×10^6 cells) from adult rats adhered on silanized slides were fixed with 4% paraformaldehyde and then treated with ammonium chloride (50 mmol) (Merck). Non-specific binding was prevented by incubating the cells in PBS with 0.25%

gelatin for 40 min, followed by incubation with PBS with 0.25% gelatin and 0.1% saponin (Sigma-Aldrich) for 30 min. The slides were incubated for 1 h at room temperature with anti-mouse MPO polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) or anti-rat p67^{phox} or p47^{phox} polyclonal antibody (Millipore) diluted in PBS supplemented with 0.25% of gelatin+0.1% of saponin. After rinsing with PBS supplemented with 0.25% of gelatin+0.1% of saponin for 3 × 5 min, the sections were incubated for 1 h at room temperature with FITC-conjugated rabbit anti-goat antibody (Abcam Inc.). The cell nuclei were stained with DAPI (Molecular Probes) during this last incubation. The slides were mounted in glycerol supplemented with 0.1% paraphenyldiamine (Sigma-Aldrich), which is an anti-fading reagent. Microscopy was performed on a Bio-Rad 1024 confocal coupled with a Zeiss Axiovert 100 microscope.

2.14. Histological analysis

Renal cortices were fixed in 10% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Light microscopy was performed on 3- μ m thick sections of tissue stained with hematoxylin-eosin to assess glomerulosclerosis. Glomerulosclerosis was defined as glomeruli with sclerosis or mesangial expansion with tuft adherence. Glomerular sections were assessed by qualitative analysis, 10–20 glomeruli were analyzed per slide (Fernandes et al., 2014).

2.15. Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm S.D. Differences between groups were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison tests; $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Aminoguanidine reduces glycated hemoglobin and AGEs

To investigate the effect of hyperglycemia and AGEs on the NOX2 of neutrophils, we treated diabetic rats with AMG and then evaluated neutrophil ROS generation and microbicidal activity. We first evaluated the glycemic profile of animals injected with alloxan to confirm hyperglycemia, and then started treatment with AMG to inhibit the formation of AGEs. After eight weeks of alloxan injection, the animals showed fasting blood glucose concentrations that were considerably higher in diabetic rats (Table 1). Similar elevated levels of plasma glucose and glycated hemoglobin (HbA1c) were present throughout the experiment (Table 1).

Detection of HbA1c is very useful for assessing the glycemic profile in diabetics, as it evaluates the actual status of glycemia over the past weeks. In addition to the glycation of hemoglobin, we also measured the formation of AGEs. Circulating levels of

Table 1

Fasting blood glucose (mg/dl) in the serum of rats; blood HbA1c level (%) and fluorescent AGEs in the serum of rats.

	Fasting blood glucose (mg/dl)	Hb A1c (%)	Fluorescent AGEs (AU/mg protein)
Control	125.4 \pm 17.5 ^a	2.0 \pm 0.5 ^a	0.159 \pm 0.05 ^a
Control+AMG	119.4 \pm 24.6 ^a	1.5 \pm 0.5 ^a	0.194 \pm 0.033 ^a
Diabetic	630.6 \pm 26 ^b	9.4 \pm 0.5 ^b	0.372 \pm 0.056 ^b
Diabetic+AMG	564.1 \pm 32.2 ^b	8.2 \pm 0.5 ^c	0.239 \pm 0.046 ^c

AMG: aminoguanidine; Groups: Control, Control+AMG, Diabetic and Diabetic+AMG ($n=8$ for group). The mean \pm standard deviation of four independent experiments performed in triplicate. Different subscribed letters in the same column indicate significance at $P < 0.05$.

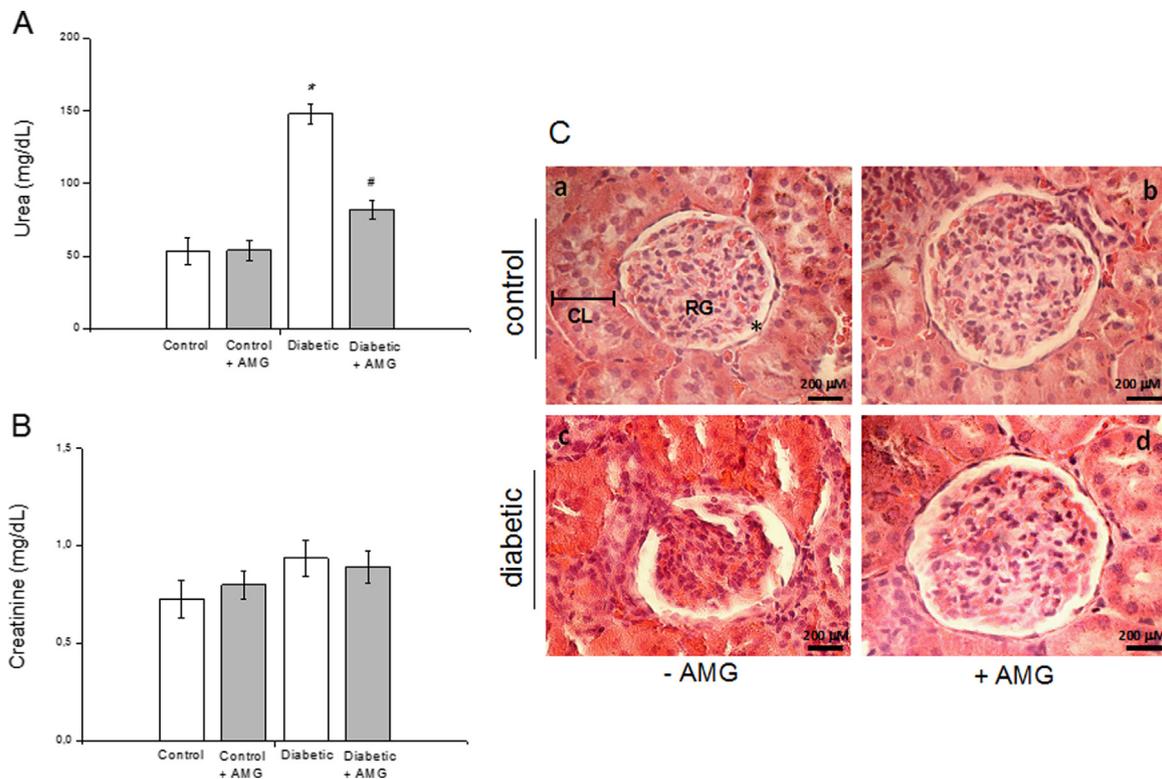


Fig. 1. Renal function parameters. Urea (A) and creatinine (B) levels in rats were measured using a commercial kit. Groups: Control, Control+AMG, Diabetes and Diabetic+AMG ($n=8$ for group). The bar graphs are expressed as mean \pm standard deviation of four independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$ Control vs. Diabetic # $P < 0.05$ Diabetic vs. Diabetic+AMG. (C) Representative images of kidney sections subjected to H&E staining. Control (a): the cortical labyrinth with region of renal corpuscle in the center. Bowman's capsule is delimiting capsular space. Control+AMG (b): the cortical labyrinth region with a renal corpuscle, Bowman's capsule of the parietal leaflet of and capsular space without apparent histological changes. Glomerulus presented no changes in volume in the cell arrangement and glomerular capillaries. Diabetes (c): labyrinth portion of cortical renal corpuscle in the center. Capsular space is increased. Glomerulus presents visceral brochure of the thicker Bowman's capsule. The kidney glomerulus is more condensed, with the typical inflammatory process arrangement. The capsular space exhibited changes with the deposition of substances. Diabetes AMG+(d): labyrinth portion of cortical renal corpuscle in the center. No apparent histological changes. ($n=5$ for group). * Capsular space; CL: cortical labyrinth; RG: renal glomerulus.

fluorescent AGEs were significantly increased by diabetes. Our results demonstrate that treatment with AMG prevented the formation of AGEs, as expected (Table 1).

3.2. Aminoguanidine reduces kidney damage caused by diabetes

The kidney is the main target of AGE-mediated damage, as it represents the major site for clearance of these products. Additionally, nephrotoxic properties have been attributed to aminoguanidine. Thus, the renal profile was assessed via determination of serum urea and creatinine levels. The serum urea and creatinine levels in animals injected with alloxan were higher compared to control animals (Fig. 1A and B), demonstrating a renal disorder in diabetic animals. The AMG treatment was effective at lowering serum urea levels, but had no effect on creatinine. This result may indicate that AMG is promising for reducing HbA1C, AGEs and urea over a 50-day treatment period, but a longer treatment period may be required for creatinine levels to be affected. Additionally, we performed a qualitative histological analysis of the kidney using light microscopy in tissue stained with hematoxylin-eosin to assess the morphology of glomeruli (Fig. 1C). Glomerulosclerosis was defined as glomeruli with sclerosis or mesangial expansion with tuft adherence. As observed in Fig. 1Ca (control) and b (control treated with AMG), there was normal glomeruli, with no evidence of damage. Fig. 1Cc (diabetic) shows an extensive glomerular damage, inflammation and thickening of the basement membrane. In Fig. 1Cd (diabetic treated with AMG), we can see that AMG protected the glomerulus from damage caused by diabetes.

3.3. Aminoguanidine increases ROS production by peritoneal neutrophils

The effect of hyperglycemia and AGEs on NOX2 activity was evaluated by superoxide anion production via Cit C reduction. Extracellular ROS production was also detected using chemiluminescence produced when superoxide anions oxidize luminol. Surprisingly, the AMG-treated group showed a markedly increased production of superoxide (Fig. 2A) and other ROS by peritoneal neutrophils (Fig. 2B) compared to groups (control and diabetic) treated with water only. The cytosolic expression of two subunits of NOX2, the p47^{phox} and p67^{phox}, were evaluated by fluorescence immunodetection (Fig. 2C). As shown in Fig. 2C (a and c) and D (e and g), the control and diabetic groups have no difference in the expression of the two subunits. However, when the groups are treated with AMG (2C (b and d) and D (f and h)), there is a significant increase in the markup.

3.4. Aminoguanidine has no effect on MPO activity and expression of peritoneal neutrophils

In a previous study, we demonstrated that hyperglycemia increases the expression of MPO in neutrophils, but the enzyme's activity is reduced, impairing neutrophil microbicidal activity. Here, we evaluated the MPO activity by indirect measurement of HOCl using a TNB oxidation assay. The diabetic peritoneal neutrophils showed significantly decreased HOCl generation compared with the controls; however, the AMG had no effect on MPO activity (Fig. 3A). We also evaluated the effect of AMG on MPO

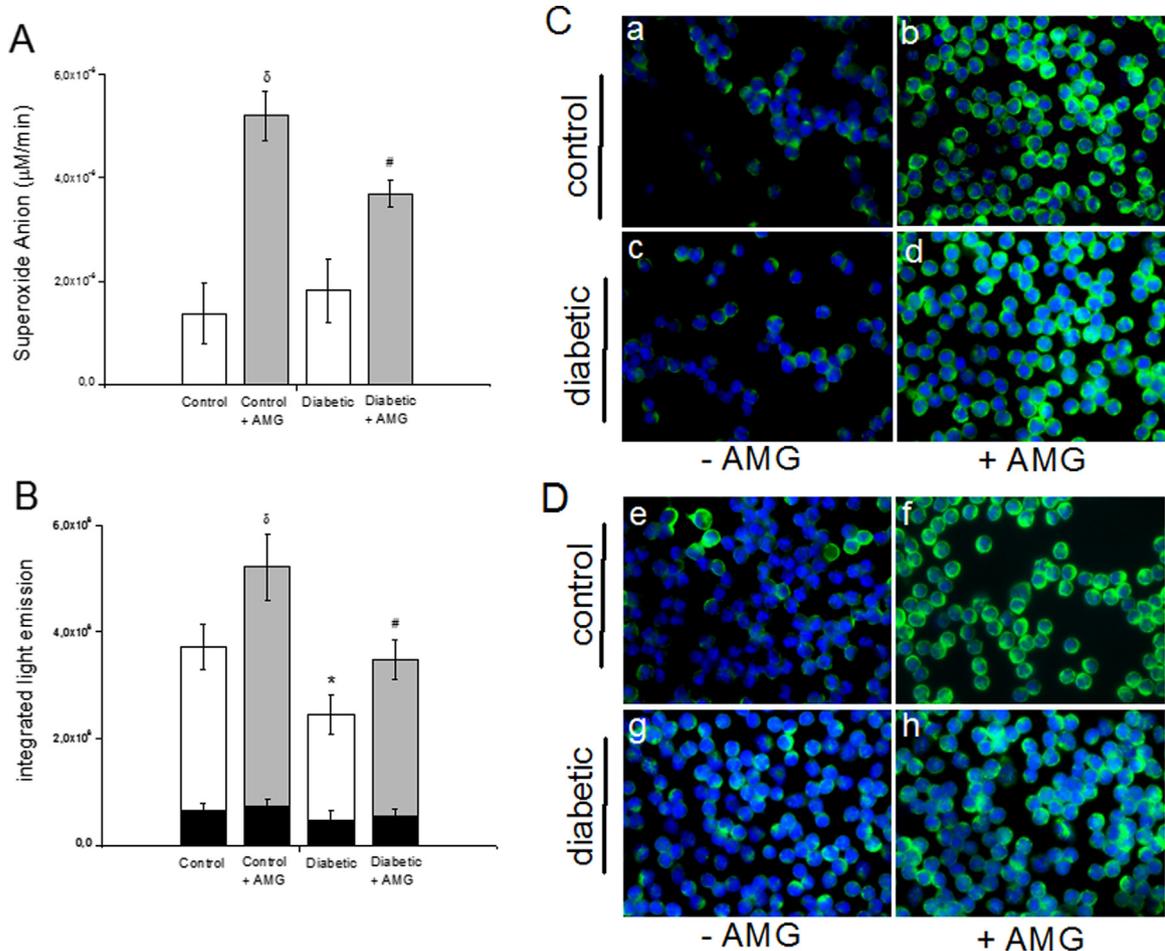


Fig. 2. (A) Superoxide anions production by the peritoneal neutrophils of rats. Peritoneal neutrophils (1×10^6 cells/assay) were incubated with cytochrome C (100 $\mu\text{M}/\text{l}$) and catalase (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and stimulated with PMA (100 ng/ml). $^{\delta}P < 0.05$ Control vs. Control+AMG; $\#P < 0.05$ Diabetic vs. Diabetic+AMG. (B) Evaluation of ROS pool by chemiluminescence obtained when peritoneal neutrophils (1×10^6 cells/assay) were incubated with luminol (1 mmol/l) and PMA (53 ng/assay). Values of mean \pm standard deviation of the integrated area of light emission obtained from peritoneal neutrophils of rats. $^{\delta}P < 0.05$ Control vs. Control+AMG; $^*P < 0.05$ Control vs. Diabetic; $\#P < 0.05$ Diabetic vs. Diabetic+AMG. (C) Immunodetection of p47^{phox} in the peritoneum neutrophils of rats. Each figure represents 10 different fields. A primary anti-p47^{phox} antibody with a FITC-labeled secondary antibody, which fluoresces at 518 nm (green), was used. The nucleus was labeled with DAPI (blue). 100 \times magnification in immersion. a. Control, b. Control+AMG, c. Diabetic and d. Diabetic+AMG ($n=5$ for group). (D) Immunodetection of p67^{phox} in neutrophils in the peritoneum of rats. Each figure represents 10 different fields. A primary anti-p67^{phox} antibody with a FITC-labeled secondary antibody, which fluoresces at 518 nm (green), was used. The nucleus was labeled with DAPI (blue). 100 \times magnification in immersion. e. Control, f. Control+AMG, g. Diabetic and h. Diabetic+AMG ($n=5$ for group).

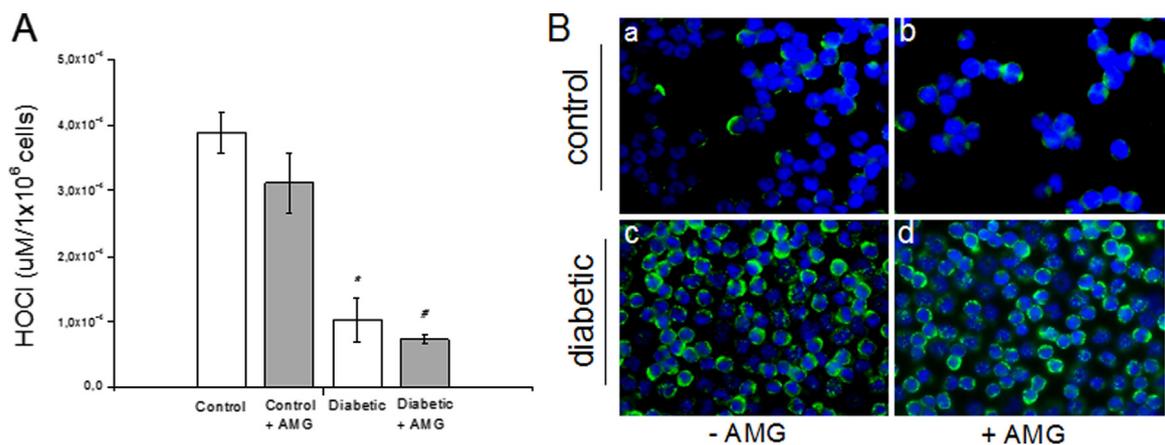


Fig. 3. (A) Effect of hyperglycemia on the HOCl production of peritoneal neutrophils (1×10^6 cells/ml). Cells were stimulated with PMA (100 ng/ml) and the formation of taurine-chloramine was measured via the oxidation of TNB. Groups: Control, Control+AMG, Diabetes and Diabetic+AMG ($n=8$ for group). The bar graphs are expressed as mean \pm standard deviation of four independent experiments performed in triplicate $^*P < 0.05$ Control vs. Diabetic; $\#P < 0.05$ Diabetic vs. Diabetic+AMG. (B) Immunodetection of MPO in peritoneum neutrophils of rats. Each figure represents 10 different fields. A primary anti-MPO antibody with a FITC-labeled secondary antibody, which fluoresces at 518 nm (green), was used. The nucleus was labeled with DAPI (blue). 100 \times magnification in immersion. a. Control, b. Control+AMG, c. Diabetic and d. Diabetic+AMG ($n=5$ for group).

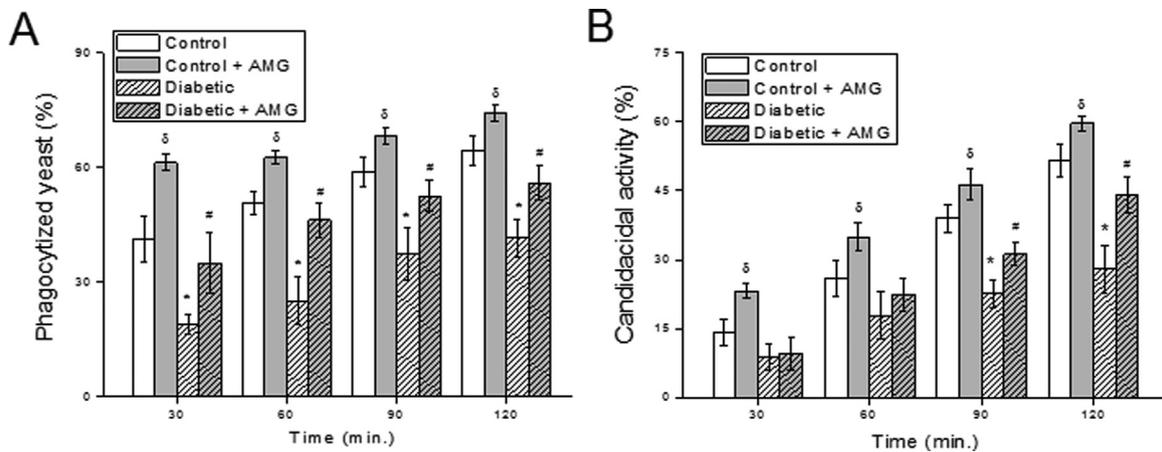


Fig. 4. (A) Phagocytic ability of *C. albicans* via the peritoneal neutrophils of rats. Neutrophils were incubated with opsonized yeast *C. albicans* at 30, 60, 90 and 120 min and the percentage of neutrophils that phagocytized one or more yeast *C. albicans* (% phagocytosis) was evaluated. (B) The ability of the peritoneal neutrophils of rats to “kill” *C. albicans*. Neutrophils were incubated with opsonized yeast *C. albicans* at 30, 60, 90 and 120 min, which were assessed on their feasibility (killing ability %). The data represent two experiments done in duplicate. Groups: Control, Control+AMG, Diabetic and Diabetic+AMG ($n=5$ for group). [§] $P < 0.05$ Control vs. Control+AMG; ^{*} $P < 0.05$ Control vs. Diabetic; [#] $P < 0.05$ Diabetic vs. Diabetic+AMG.

expression in neutrophils using fluorescence immunodetection and found that diabetic animals' neutrophils have a considerably increased expression of MPO compared to control animals' neutrophils (Fig. 3B a and c). In addition, it was found that AMG has no influence on MPO expression (Fig. 3B b and d).

3.5. Aminoguanidine increases the phagocytosis activity and killing by neutrophils activated by *C. albicans*

Phagocytosis and the subsequent killing of pathogens by phagocytes represent one of the most important early host defenses against disease. The NOX2 system is pivotal to the microbicidal function of phagocytes. These cells kill *Candida* essentially via oxygen-dependent mechanisms (Wagner et al., 1986; Thompson and Wilton, 1992). We thus investigated the effect of this increased superoxide generation by neutrophils in their phagocytosis of and ability to kill *C. albicans*. For this purpose, neutrophils were incubated with *C. albicans* at a 1:10 ratio. Phagocytosis and intracellular killing activity were evaluated at intervals of 30, 60, 90 and 120 min Fig. 4A shows that hyperglycemia and protein glycation in diabetic rat neutrophils impairs their ability to phagocytosis *C. albicans* yeasts compared to the control at all times evaluated. When protein glycation was inhibited by AMG, neutrophil phagocytosis capacity increased significantly. Interestingly, this occurred in the neutrophils of both diabetic and control animals. The *in vitro* microbicidal activity of AMG-treated rat neutrophils against *C. albicans* was increased. In the peritoneal neutrophils of the control animals, there was a significant increase in fungal killing ability at all time intervals measured. In neutrophils from the diabetic animals, AMG treatment also increased killing ability, but this was only observed at 90 and 120 min, demonstrating a greater delay in the response of these cells to treatment (Fig. 4B).

4. Discussion

In the present study, we examined how hyperglycemia and AGEs affect neutrophil NOX2 activity, particularly in microbicidal function. Our data showed that hyperglycemia was maintained throughout the eight weeks of the experiment and this period was sufficient for the occurrence of protein glycation (Table 1). Protein glycation was also confirmed via the measurement of fluorescent AGEs in the serum of animals. Table 1 shows increased levels of

AGEs in diabetic animals compared to the non-diabetic group (control). Our results demonstrate the efficacy of AMG treatment for preventing protein glycation. Administration of AMG to diabetic rats led to partial inhibition of increased HbA1c and AGEs levels (Table 1). Previous studies have reported that the administration of AMG reduces AGEs in diabetic rats and limits structural and functional changes in tissues (Carvalho et al., 2011; Goh and Cooper, 2008; Ozturk et al., 2012; Stadler et al., 2005).

Kidney injury is a chronic microvascular complication that occurs very frequently in diabetic patients and in drug-induced animal models of diabetes. The serum urea and creatinine levels in diabetic animals were higher than in control animals, showing renal impairment (Fig. 1A and B). AMG treatment was effective in lowering serum urea levels, but had no effect on creatinine. It is known that in cases of renal injury, higher urea levels readily present themselves, while creatinine levels rise more gradually, as damage occurs more slowly than with urea.

Nephrotoxic properties have been attributed to AMG in previous clinical trials, as well such as flu-like symptoms, hepatic abnormalities, gastrointestinal disturbances and anemia. However, the toxicity was observed only at very high doses (ACTION I and ACTION II) (Bolton et al., 2004; Freedman et al., 1999). In this study, the treatment period and dose in our experimental model produced no observable structural changes in the AMG-treated diabetic group compared with the control group.

Consistent with this result, other experimental studies have also demonstrated a protective effect of AMG treatment in diabetic nephropathy (Abdel-Rahman and Bolton, 2002; Brownlee, 2005; Polat et al., 2006; Giacco and Brownlee, 2010; Betz and Conway, 2014). In one recent study, AMG significantly attenuated methotrexate-hepatotoxicity and nephrotoxicity (Hafez et al., 2015). Besides caused decreased mean arterial pressure of spontaneous hypertensive rats treated with salt ((Huang et al., 2013).

The expansion of the glomerular mesangial matrix and basement membrane thickening of the glomerular capillaries are early and classic manifestations of diabetic nephropathy (Schrijvers et al., 2004). Here, we observed significant glomerular damage in untreated diabetic animals when compared with untreated control animals (Fig. 1C a and c). AMG visibly reduced the damage caused by chronic hyperglycemia, while in the control animals treated with AMG, there were no structural changes (Fig. 1C c and d). Glycation of proteins has been identified as one of the main mechanisms responsible for glomerular lesions observed in diabetic nephropathy (Beisswenger et al., 2013).

ROS production has been proposed as the main cause of diabetic complications, including diabetic nephropathy (Allen et al., 2003; Huang et al., 2007). After AMG decreased the formation of AGEs and the damage caused by diabetic nephropathy, we evaluated the effect of protein glycation on the release of ROS by neutrophils.

Intriguingly, we found an increase in the production of ROS by neutrophils of animals treated with AMG. Neutrophils produce ROS through activation of NOX2 via PKC, thereby generating superoxide. The AMG-treated group showed markedly increased superoxide production (Fig. 2A) compared to the groups treated with water only. This AMG-associated increase was observed in both diabetic and non-diabetic groups.

Potent ROS, such as peroxide, hydroxyl radicals, peroxynitrite and HOCl, are generated from superoxide anions (Imlay, 2013). Thus, we also evaluated ROS production (assaying for luminol oxidation by superoxide) and found that hyperglycemia decreases the production of the ROS pool by peritoneal neutrophils (Fig. 2B). Conversely, we observed an increase in the ROS pool in the AMG-treated groups (Fig. 2B).

Neutrophils have numerous azurophilic granules that are rich in MPO, a heme-containing enzyme that kills bacteria and fungi with HOCl. Thus, it is expected that under normal conditions, this enzyme will contribute to the pool of ROS produced by neutrophils. In this study, the diabetic peritoneal neutrophils showed a significant decrease in HOCl generation compared with the controls; however, AMG had no effect on MPO expression and activity (Fig. 3A and B). Apparently, reduced production of HOCl (Fig. 3A) contributes to the reduction of neutrophil-produced ROS in diabetic animals (Fig. 2B).

Recently, our laboratory reported that hyperglycemia increases the expression of MPO in neutrophils, although the activity of this enzyme is diminished (de Souza Ferreira et al., 2012). In this study, we show that AMG had no effect on MPO expression and activity. Although AMG treatment increased the pool of ROS, the HOCl did not contribute to the increase.

When evaluating the ROS pool, our measurements include HOCl produced by MPO-dependent activity, which is decreased in diabetic animals and is not affected by AMG treatment (Fig. 3A). Furthermore, addition of superoxide dismutase (SOD) to the reaction strongly reduced chemiluminescence (data not shown), reinforcing the hypothesis that a major ROS formed in our system is the superoxide anion. In other words, AMG acts mainly on the NOX2 system, most likely by up-regulation of the expression of its components. Thus, we evaluated the expression of p47^{phox} (Fig. 2C) and p67^{phox} (Fig. 2D), cytosolic subunits of NOX2. Our results demonstrate that there was no difference between the control and diabetic subjects, showing that hyperglycemia and protein glycation do not affect the expression of p47^{phox} subunits (Fig. 2C a and c) and p67^{phox} (Fig. 2D e and g). However, AMG clearly increases the markup of these subunits (Fig. 2C (b and d) and 2D (f and h)). Collectively, these data suggest that AMG treatment increases the production of ROS, mainly through increased superoxide production by NOX2.

The importance of neutrophil NOX2 in defending an organism against pathogens is well recognized (Bedard and Krause, 2007; Shen, 2010). Moreover, the presence of AGEs causes neutrophils to become less responsive to stimuli (Roos et al., 2003). Thus, we evaluated the effect of AMG on *C. albicans* phagocytosis and killing by neutrophils. The yeast *C. albicans* is an opportunistic pathogen, especially for diabetics and immunocompromised patients (Dantas et al., 2015; Gazendam et al., 2014; Kabeya et al., 2013; Morran et al., 2015). Additionally, defense against microbial pathogens is dependent on oxidative metabolism (Dantas et al., 2015; Roos et al., 2003).

As shown in Fig. 4A, hyperglycemia and protein glycation

decreases the phagocytic ability of neutrophils against *C. albicans* yeast in diabetic rats at all evaluation times. The *in vitro* phagocytic and microbicidal activity of neutrophils against *C. albicans* was increased in AMG-treated rats (Fig. 4A and B). In peritoneal neutrophils of control animals, there was a significant AMG-associated increase in fungal killing at all evaluation times. Though this response to AMG occurred in the neutrophils of both diabetic and control animals, the neutrophils from diabetic animals were less responsive to AMG than were the control neutrophils (Fig. 4B).

Although alteration of neutrophil function in diabetic animals may be caused by several mechanisms, the results presented here suggest that protein glycation might play an important role in the impairment of microbicidal ability by affecting the generation of ROS via NOX2. The demonstrated effect of AMG on neutrophils is significant, as it has been reported that neutrophils are the major cellular component of the immune response against *C. albicans* (Netea et al., 1999). Similarly, other studies have demonstrated inhibition of *C. albicans* growth *in vitro* by neutrophils, in addition increased susceptibility to candidiasis in granulocytopenic humans and mice (Morran et al., 2015; Netea et al., 1999).

When colonizing and invading tissues, *C. albicans* is exposed to ROS and RNIs (reactive nitrogen intermediates). These reactive species are essential for the antimicrobial activity of phagocytic cells (Aratani et al., 2002, 1999). AMG acts as an inhibitor for iNOS, causing a decrease in RNI levels (Ara et al., 2006; Bogdan et al., 2000; Sliman et al., 2010). It was previously reported that AMG reduces the formation of the potent oxidant peroxynitrite, which is produced by the reaction of nitric oxide with superoxide anions (Abraham et al., 2009; Radi, 2004; Radi et al., 1991). Here, in contrast, we observed that AMG caused an increase in superoxide production by NOX2. This increased NOX2 activity may be a compensatory mechanism for iNOS inhibition and the consequent decrease in RNI production.

Our data suggest that AMG is also able to stimulate the anticandidal properties of neutrophils in a way that is associated with increased superoxide production. The increase of superoxide production elicited by AMG is very interesting, as several functions have been proposed for the superoxide anions produced by NOX2 complexes, in addition to their microbicidal activity. Such functions include roles in apoptosis, senescence, cell proliferation, oxygen sensing, and signal transduction (Bedard and Krause, 2007; Kruger et al., 2015; Ushio-Fukai, 2006).

5. Conclusion

In summary, our results suggest that AMG, used to inhibit the formation of AGEs, increased the activity and expression of NOX2, and directly contributing to increased microbicidal activity by peritoneal neutrophils. Interestingly, this phenomenon was independent of hyperglycemia, as increased ROS production and microbicidal activity by neutrophils occurred both in the diabetic and the control animals. Another important finding in this study was that the increased microbicidal capacity of neutrophils was not dependent on MPO, as AMG had no effect on the production of HOCl.

This is particularly interesting because the neutrophil function is impaired in diabetes and other diseases associated with AGE accumulation, as well as other conditions related to neutropenia and neutrophil dysfunction, usually resulting in recurrent bacterial and fungal infections. This finding may open new possibilities for drug candidates for the treatment of these dysfunctions.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors are grateful to FAPEMIG (Minas Gerais, Brazil) for financial support (APQ-3503-4.04/07) and CAPES (Brasília, Brazil) and UNIFAL/MG (Minas Gerais, Brazil) for research fellowships.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.12.044>.

References

- Abdel-Rahman, E., Bolton, W.K., 2002. Pimagedine: a novel therapy for diabetic nephropathy. *Expert Opin. Investig. Drugs* 11, 565–574. <http://dx.doi.org/10.1517/13543784.11.4.565>.
- Abraham, P., Rabi, S., Selvakumar, D., 2009. Protective effect of aminoguanidine against oxidative stress and bladder injury in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rat. *Cell. Biochem. Funct.* 27, 56–62. <http://dx.doi.org/10.1002/cbf.1534>.
- Alhamdani, M.-S.S., Al-Azzawie, H.F., Abbas, F.K.H., 2007. Decreased formation of advanced glycation end-products in peritoneal fluid by carnosine and related peptides. *Perit. Dial. Int.* 27, 86–89.
- Allen, D.A., Harwood, S., Varagunam, M., Raftery, M.J., Yaqoob, M.M., 2003. High glucose-induced oxidative stress causes apoptosis in proximal tubular epithelial cells and is mediated by multiple caspases. *FASEB J.* 17, 908–910. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.02-0130fje>.
- Ara, C., Karabulut, A.B., Kirimlioglu, H., Yilmaz, M., Kirimlioglu, V., Yilmaz, S., 2006. Protective effect of aminoguanidine against oxidative stress in an experimental peritoneal adhesion model in rats. *Cell. Biochem. Funct.* 24, 443–448. <http://dx.doi.org/10.1002/cbf.1245>.
- Aratani, Y., Koyama, H., Nyui, S., Suzuki, K., Kura, F., Maeda, N., 1999. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect. Immun.* 67, 1828–1836.
- Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M.C., Maeda, N., Koyama, H., 2002. Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* 40, 557–563.
- Babior, B.M., 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood* 93, 1464–1476.
- Bedard, K., Krause, K., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 245–313. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>.
- Beisswenger, P.J., Howell, S.K., Russell, G.B., Miller, M.E., Rich, S.S., Mauer, M., 2013. Early progression of diabetic nephropathy correlates with methylglyoxal-derived advanced glycation end products. *Diabetes Care* 36, 3234–3239. <http://dx.doi.org/10.2337/dc12-2689>.
- Betz, B., Conway, B.R., 2014. Recent advances in animal models of diabetic nephropathy. *Nephron. Exp. Nephrol.* 126, 191–195. <http://dx.doi.org/10.1159/000363300>.
- Bogdan, C., Rölinghoff, M., Diefenbach, A., 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 64–76.
- Bolton, W.K., Cattran, D.C., Williams, M.E., Adler, S.G., Appel, G.B., Cartwright, K., Foiles, P.G., Freedman, B.I., Raskin, P., Ratner, R.E., Spinowitz, B.S., Whittier, F.C., Wuertth, J.P., 2004. Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am. J. Nephrol.* 24, 32–40. <http://dx.doi.org/10.1159/000075627>.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brownlee, M., 2005. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615–1625.
- Carvalho, V.F., Florim, L.T., De, E., Torres, R.C., Batista, M.M., Amendoeira, F.C., Cordeiro, R.S.B., Martins, M. A, e Silva, P.M.R., 2011. Inhibition of advanced glycation end products by aminoguanidine restores mast cell numbers and reactivity in alloxan-diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 669, 143–148. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.08.004>.
- Chowdhury, P., Soulsby, M.E., Scott, J.L., 2009. Effects of aminoguanidine on tissue oxidative stress induced by hindlimb unloading in rats. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 39, 64–70.
- Dantas, A., da, S., Day, A., Ikeh, M., Kos, I., Achan, B., Quinn, J., 2015. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules* 5, 142–165. <http://dx.doi.org/10.3390/biom5010142>.
- de Souza Ferreira, C., Araújo, T.H., Ângelo, M.L., Pennacchi, P.C., Okada, S.S., de Araújo Paula, F.B., Migliorini, S., Rodrigues, M.R., 2012. Neutrophil dysfunction induced by hyperglycemia: modulation of myeloperoxidase activity. *Cell Biochem. Funct.* 30 (7), 604–610. <http://dx.doi.org/10.1002/cbf.2840>.
- Fernandes, M.B., Caldas, H.C., Toloni, L.D., Baptista, M.A.S.F., Fernandes, I.M.M., Abbud-Filho, M., 2014. Supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids and experimental tacrolimus-induced nephrotoxicity. *Exp. Clin. Transplant.* 12, 522–527.
- Freedman, B.I., Wuertth, J.P., Cartwright, K., Bain, R.P., Dippe, S., Hershon, K., Mooradian, A.D., Spinowitz, B.S., 1999. Design and baseline characteristics for the aminoguanidine clinical trial in overt type 2 diabetic nephropathy (ACTION II). *Control. Clin. Trials* 20, 493–510. [http://dx.doi.org/10.1016/S0197-2456\(99\)00024-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0197-2456(99)00024-0).
- Gazendam, R.P., van Hamme, J.L., Tool, A.T.J., van Houdt, M., Verkuijlen, P.J.J.H., Herbst, M., Liese, J.G., van de Veerdonk, F.L., Roos, D., van den Berg, T.K., Kuijpers, T.W., 2014. Two independent killing mechanisms of *Candida albicans* by human neutrophils: evidence from innate immunity defects. *Blood* 124, 590–597. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-01-551473>.
- Giacco, F., Brownlee, M., 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* 107, 1058–1070. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>.
- Gogasyavuz, D., Küçükaya, B., Ersoz, H.O., Yalçın, A.S., Emerk, K., Akalin, S., 2002. Effects of aminoguanidine on lipid and protein oxidation in diabetic rat kidneys. *Int. J. Exp. Diabetes Res.* 3, 145–151.
- Goh, S.-Y., Cooper, M.E., 2008. Clinical review: the role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 1143–1152. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2007-1817>.
- Hafez, H.M., Ibrahim, M.A., Ibrahim, S.A., Amin, E.F., Goma, W., Abdelrahman, A.M., 2015. Potential protective effect of etanercept and aminoguanidine in methotrexate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Eur. J. Pharmacol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.08.047>.
- Huang, C.F., Hsu, C.N., Chien, S.J., Lin, Y.J., Huang, L.T., Tain, Y.L., 2013. Aminoguanidine attenuates hypertension, whereas 7-nitroindazole exacerbates kidney damage in spontaneously hypertensive rats: the role of nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.* 699, 233–240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.11.034>.
- Huang, J.-S., Chuang, L.-Y., Guh, J.-Y., Huang, Y.-J., Hsu, M.-S., 2007. Antioxidants attenuate high glucose-induced hypertrophic growth in renal tubular epithelial cells. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 293, F1072–F1082. <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00020.2007>.
- Imlay, J.A., 2013. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 443–454. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3032>.
- Jones, O.T., Hancock, J.T., 1994. Assays of plasma membrane NADPH oxidase. *Methods Enzymol.* 233, 222–229.
- Kabeya, L.M., Fuzissaki, C.N., Taleb-Contini, S.H., da C. Ferreira, A.M., Naal, Z., Santos, E.O.L., Figueiredo-Rinhel, A.S.G., Azzolini, A.E.C.S., Vermelho, R.B., Malvezi, A., Amaral, A.T., Lopes, J.L.C., Lucisano-Valim, Y.M., 2013. 7-Hydroxycoumarin modulates the oxidative metabolism, degranulation and microbial killing of human neutrophils. *Chem. Biol. Interact.* 206, 63–75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2013.08.010>.
- Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A.N.R., Rieber, N., Radsak, M., von Bernuth, H., Benarafa, C., Roos, D., Skokowa, J., Hartl, D., 2015. Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. *Plos. Pathog.* 11, e1004651. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004651>.
- Layne, E., 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol.* 3, 447–454. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(57\)03413-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(57)03413-8).
- Manikandan, R., Thiagarajan, R., Beulaja, S., Chindhu, S., Mariammal, K., Sudhandiran, G., Arumugam, M., 2009. Anti-cataractogenic effect of curcumin and aminoguanidine against selenium-induced oxidative stress in the eye lens of Wistar rat pups: an in vitro study using isolated lens. *Chem. Biol. Interact.* 181, 202–209. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2009.05.011>.
- Morran, M.P., Vonberg, A., Khadra, A., Pietropaolo, M., 2015. Immunogenetics of type 1 diabetes mellitus. *Mol. Asp. Med.* 42, 42–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2014.12.004>.
- Nagai, R., Shirakawa, J.-I., Fujiwara, Y., Ohno, R.-I., Moroishi, N., Sakata, N., Nagai, M., 2014. Detection of AGEs as markers for carbohydrate metabolism and protein denaturation. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 55, 1–6. <http://dx.doi.org/10.3164/jcbn.13-112>.
- Netea, M.G., van Tits, L.J., Curfs, J.H., Amiot, F., Meis, J.F., van der Meer, J.W., Kullberg, B.J., 1999. Increased susceptibility of TNF-alpha lymphotoxin-alpha double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida albicans*. *J. Immunol.* 163, 1498–1505.
- Oguz, F., Ciftci, O., Aydın, M., Timurkaan, N., Beytur, A., Altıntaş, R., Parlakpinar, H., 2013. Aminoguanidine prevents testicular damage-induced-2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in male rats. *Andrologia* 45, 225–231. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0272.2012.01334.x>.
- Ozturk, A., Firat, C., Parlakpinar, H., Bay-Karabulut, A., Kirimlioglu, H., Gurlek, A., 2012. Beneficial effects of aminoguanidine on skin flap survival in diabetic rats. *Exp. Diabetes Res.* 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/721256>.
- Polat, A., Parlakpinar, H., Tasdemir, S., Colak, C., Vardi, N., Ucar, M., Emre, M.H., Acet, A., 2006. Protective role of aminoguanidine on gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Acta Histochem* 108 (5), 365–371 [Epub 2006 Sep 26].
- Radi, R., 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 4003–4008. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0307446101>.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A., 1991. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 288, 481–487.
- Rodrigues, M.R., Rodriguez, D., Russo, M., Campa, A., 2002. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 869–873. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2002.6724>.
- Roos, D., Bruggen, R. Van, Meischl, C., 2003. Oxidative killing of microbes by

- neutrophils. *Microbe Infect.* 5, 1307–1315. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.009>.
- Sampaio, S.C., Borelli, P., Curi, R., Cury, Y., 2001. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function effect of *Crotalus durissus terrificus* venom on rat. *J. Leukoc. Biol.* 70, 551–558.
- Schrijvers, B.F., Vriese, A.N.S.D.E., Flyvbjerg, A., 2004. From hyperglycemia to diabetic kidney disease : the role of metabolic , hemodynamic , intracellular factors and growth factors/cytokines. *Endocr. Rev.* 25, 971–1010. <http://dx.doi.org/10.1210/er.2003-0018>.
- Shen, G.X., 2010. Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 88, 241–248. <http://dx.doi.org/10.1139/Y10-018>.
- Sliman, S.M., Eubank, T.D., Kotha, S.R., Kuppusamy, M.L., Sherwani, S.I., Butler, E.S.O., Kuppusamy, P., Roy, S., Marsh, C.B., Stern, D.M., Parinandi, N.L., 2010. Hyperglycemic oxoaldehyde, glyoxal, causes barrier dysfunction, cytoskeletal alterations, and inhibition of angiogenesis in vascular endothelial cells: aminoguanidine protection. *Mol. Cell. Biochem.* 333, 9–26. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-009-0199-x>.
- Souza, I.P., Kang, H.C., Nardinelli, L., Borelli, P., 2001. Desnutrição protéica : efeito sobre o espraçamento, fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoneais. *J. Pharm. Sci.*, 37.
- Stadler, K., Jenei, V., Somogyi, A., Jakus, J., 2005. Beneficial effects of aminoguanidine on the cardiovascular system of diabetic rats. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 21, 189–196. <http://dx.doi.org/10.1002/dmrr.501>.
- Szkudeiski, T., 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50, 537–546.
- Thompson, H.L., Wilton, J.M., 1992. Interaction and intracellular killing of *Candida albicans* blastospores by human polymorphonuclear leucocytes, monocytes and monocyte-derived macrophages in aerobic and anaerobic conditions. *Clin. Exp. Immunol.* 87, 316–321.
- Thornalley, P.J., 2003. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch. Biochem. Biophys.* 419, 31–40.
- Ushio-Fukai, M., 2006. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci. STKE* 2006, re8. <http://dx.doi.org/10.1126/stke.3492006re8>.
- Vlassara, H., Striker, L.J., Teichberg, S., Fuh, H., Li, Y.M., Steffes, S.M., 1994. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. S. A.* 91, 11704–11708 (accessed 30.11.15) (<http://www.pnas.org/content/91/24/11704.full.pdf>).
- Vlassara, H., Uribarri, J., 2014. Advanced glycation end products (AGE) and Diabetes: cause, effect, or both? *Curr. Diabetes Rep.* 14, 453–470. <http://dx.doi.org/10.1007/s11892-013-0453-1>.
- Wagner, D.K., Collins-Lech, C., Sohnle, P.G., 1986. Inhibition of neutrophil killing of *Candida albicans* pseudohyphae by substances which quench hypochlorous acid and chloramines. *Infect. Immun.* 51, 731–735.
- Weiss, S.J., Klein, R., Slivka, A., Wei, M., 1982. Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. *J. Clin. Investig.* 70, 598–607.
- Zilin, S., Naifeng, L., Bicheng, L., Jiping, W., 2001. The determination of AGE-peptides by flow injection assay, a practical marker of diabetic nephropathy. *Clin. Chim. Acta* 313, 69–75. [http://dx.doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00651-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00651-9).