

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDIABÉTICO DA CURCUMINA E
AMINOGUANIDINA EM IOGURTE, ISOLADAS E CO-ADMINISTRADAS:
ALTERAÇÕES METABÓLICAS, ESTRESSE GLICO-OXIDATIVO E FUNÇÃO
NEUTROFÍLICA**

Tayra Ferreira Oliveira de Lima

Orientador: Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

Araraquara/SP

2019

Tayra Ferreira Oliveira de Lima

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDIABÉTICO DA CURCUMINA E
AMINOGUANIDINA EM IOGURTE, ISOLADAS E CO-ADMINISTRADAS:
ALTERAÇÕES METABÓLICAS, ESTRESSE GLICO-OXIDATIVO E FUNÇÃO
NEUTROFÍLICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia,
da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP,
como parte dos requisitos para obtenção do Título de
Doutor, área de pesquisa em bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

Araraquara/SP

2019

Lima, Tayra Ferreira Oliveira de.
L732a Avaliação do potencial antidiabético da curcumina e
aminoguanidina em iogurte, Isoladas e co-administradas: alterações
metabólicas, estresse glico-oxidativo e função neutrofílica / Tayra
Ferreira Oliveira de Lima. – Araraquara: [S.n.], 2019.
189 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de
Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de
Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.
Área de Pesquisa em Bioquímica.

Orientador: Iguatemy Lourenço Brunetti.

1. Curcumina. 2. Aminoguanidina. 3. Diabetes mellitus. 4. Estresse
glico-oxidativo. 5. Neutrófilos. I. Brunetti, Iguatemy Lourenço, orient. II.
Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7

Esta ficha não pode ser modificada

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por me guiar, iluminar e me dar forças.

À minha mãe e avó Eneas, meu alicerce, sem vocês nada seria possível. Agradeço pelo amor, confiança, motivação e ajuda no biotério. Obrigada pela compreensão ao serem privadas em muitos momentos da minha companhia e atenção. Obrigada por cuidarem tão bem de mim e pelo imenso apoio.

Ao meu irmão Tiago pelo carinho e incentivo de sempre.

Ao meu noivo Gabriel por ter caminhado ao meu lado, pelo seu amor, apoio, compreensão e por me fazer sempre acreditar que o melhor estava por vir. Obrigada por sempre estar disposto a vir ficar comigo e também pela ajuda no biotério.

Aos meus familiares e familiares do meu noivo por todo amor e motivação de sempre.

Às minhas amigas Bruna, Cristina, Jaqueline e Olívia, por todo carinho e incentivo nesses anos.

Ao meu orientador professor. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, pela oportunidade de realizar este trabalho, por todos os ensinamentos, dedicação, paciência e motivação. Agradeço imensamente pela sua orientação que me guiou ao longo desses anos e me tornou o que sou hoje. Obrigada por sempre estar disposto a me ensinar e ter contribuído grandemente para o meu crescimento profissional e pessoal.

À professora Dra. Amanda Martins Baviera pelos inúmeros ensinamentos, disponibilidade e motivação que também me guiaram ao longo desses anos. Muito obrigada por ter contribuído para minha formação.

Às minhas amigas do laboratório de Bioquímica e Enzimologia: Ingrid, Maiara, Mariana e Renata, sem vocês esses anos teriam sido mais difíceis. Obrigada pela amizade construída e por toda ajuda com o desenvolvimento desse trabalho. Sentirei muitas saudades, obrigada por tudo. Ainda, agradeço imensamente a Mariana e a Ingrid pelo companheirismo e disponibilidade para a execução dos experimentos; e a Renata pela companhia ao longo desses anos fora do ambiente de trabalho.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica e Enzimologia: Marcel, Maíra, Anderson, Monalisa, Carlos, Thaís, Juliana, Bruno, Camila, Ariane, Karen, Isabela, Giovanna e Victor, meus sinceros agradecimentos. Cada um de vocês, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho. Sentirei saudades da convivência, das risadas e parceria.

Ao técnico Renildo pela ajuda no biotério.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)- Finance Code 001, pelo apoio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo número 311126/2018-9, pelo apoio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica crônica, caracterizada principalmente por hiperglicemia. A hiperglicemia crônica é um dos principais fatores envolvidos na instalação do estresse glico-oxidativo, o qual está implicado no desenvolvimento das complicações micro e macrovasculares do DM, as quais resultam em morbidade e mortalidade significativas. Portanto, o tratamento da doença tem como principal objetivo a manutenção dos níveis glicêmicos próximos a normalidade e a atenuação do estresse glico-oxidativo. A curcumina, apresenta potencial efeito antidiabético e antioxidante. Já a aminoguanidina é um dos agentes mais utilizados para prevenir a formação de produtos finais da glicação avançada (AGE), *in vitro* e em modelos animais. Esse estudo investigou em ratos, o potencial antidiabético da curcumina e/ou aminoguanidina incorporadas no iogurte, avaliando parâmetros relacionados às alterações do controle glicêmico, estresse glico-oxidativo (plasma, fígado e rim) e parâmetros da função neutrofílica (exsudato peritoneal). Ratos Wistar, não diabéticos e diabéticos (estreptozotocínico) não tratados, receberam apenas iogurte e os diabéticos tratados receberam: insulina (4U/dia); 90 mg/kg de curcumina; 50 mg/kg de aminoguanidina; 90 mg/kg de curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina; 100 mg/kg de aminoguanidina; e 90 mg/kg de curcumina e 100 mg/kg de aminoguanidina; os tratamentos foram realizados durante 45 dias. Os parâmetros analisados foram: (i) fisiológicos: peso corporal; (ii) bioquímicos: glicemia, hemoglobina glicada (HbA1c), frutosamina, colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-não HDL, triacilgliceróis (TAG), alanina (ALT) e aspartato (AST) aminotransferases, fosfatase alcalina (ALP) e proteinúria; (iii) bioquímicos relacionados ao estresse glico-oxidativo e defesas antioxidantes: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteínas carboniladas (PCO), AGE fluorescentes, nitrato e nitrito total (NO_x), paraoxonase (PON1), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) e redutase (GSH-Rd), grupos tióis não proteicos e níveis proteicos de receptores de AGE (RAGE e AGE-R1), fator nuclear kappa B (NF-kB) e glioxalase 1 (GLO 1); e (iv) parâmetros relacionados à função neutrofílica: NADPH oxidase fagocítico (NOX2) e mieloperoxidase (MPO). Os animais diabéticos não tratados, apresentaram piora em todos os parâmetros analisados, assim como a instalação do estresse glico-oxidativo, contudo apresentaram um mecanismo compensatório ao estresse oxidativo com aumento nas atividades de GSH-Px e GSH-Rd. O tratamento com insulina foi eficaz na melhoria de todos os parâmetros analisados. O tratamento com curcumina promoveu melhoria nos biomarcadores fisio-metabólicos e do estresse glico-oxidativo e o tratamento com a aminoguanidina nos biomarcadores metabólicos, do estresse glico-oxidativo e da função neutrofílica. Os tratamentos com as associações também foram benéficos frente aos parâmetros alterados no DM experimental. Contudo, o tratamento que apresentou mais benefícios foi a associação curcumina com 50 mg/kg de aminoguanidina, pois foi promissor no controle glicêmico, na redução do estresse glico-oxidativo e na melhoria da função neutrofílica, apresentando respostas mais eficazes que os respectivos compostos administrados isoladamente. Desta forma, demonstrando potencial na atenuação e/ou prevenção das complicações do DM. Considerando os resultados na função neutrofílica e a semelhança estrutural entre aminoguanidina e metformina também avaliamos o tratamento com 250 mg/kg de metformina e sua associação com 90 mg/kg de curcumina, incorporadas no iogurte, durante 45 dias, entretanto, não foi observado melhorias significativas na função neutrofílica.

Palavras-chave: curcumina, aminoguanidina, diabetes mellitus, estresse glico-oxidativo, neutrófilos.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic syndrome characterized mainly by hyperglycemia. Chronic hyperglycemia is one of the main factors involved in the installation of glycoxidative stress, and it is implicated in the development of micro and macrovascular complications of DM, which result in significant morbidity and mortality. Therefore, the treatment of the disease has as main objective the maintenance of glycemic to levels near to normality and the attenuation of glycoxidative stress. Curcumin has potential antidiabetic and antioxidant effects. Aminoguanidine is one of the most used agents to prevent the formation of advanced glycation end products (AGE), *in vitro* and animal models. This study investigated in rats the antidiabetic potential of curcumin and/or aminoguanidine incorporated into yoghurt, evaluating parameters related to changes in glycemic control, glycoxidative stress (plasma, liver and Kidney) and parameters of neutrophil function (peritoneal exudate). Rats Wistar, non-diabetic and diabetic (streptozotocinic) untreated received alone yoghurt and treated-diabetic received: insulin (4U/day); 90 mg/kg curcumin; 50 mg/kg aminoguanidine; 90 mg/kg curcumin and 50 mg/kg aminoguanidine; 100 mg/kg aminoguanidine; and (vi) 90 mg/kg curcumin and 100 mg/kg aminoguanidine; the treatments were performed for 45 days. The parameters analyzed were: (i) physiological: body weight; (ii) biochemicals: glycemia, glycated hemoglobin (HbA1c), fructosamine, total cholesterol, HDL-cholesterol, non-HDL-cholesterol, triglycerides (TAG), alanine (ALT) and aspartate (AST) aminotransferases, alkaline phosphatase (ALP) and proteinuria; iii) biochemical related to glycoxidative stress and antioxidant defenses: thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein carbonyl groups (PCO), fluorescent AGE, total nitrate and nitrite (NOx), paraoxonase (PON1), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and reductase (GSH-Rd), non-protein thiol groups and protein levels of AGE (RAGE and AGE-R1) receptors, factor nuclear kappa B (NF-kB) and glyoxalase 1 (GLO 1); and (iv) parameters related to neutrophil function: phagocytic NADPH oxidase (NOX2) and myeloperoxidase (MPO). The untreated-diabetic animals showed worsening in all analyzed parameters, as well as the installation of glycoxidative stress, however it presented a compensatory mechanism against oxidative stress with increases in the activities of GSH-Px and GSH-Rd. The treatment with insulin was effective in improve all analyzed parameters. Treatment with curcumin promoted improvement in physio-metabolic biomarkers and glycoxidative stress, and treatment with aminoguanidine in metabolic biomarkers, glycoxidative stress and neutrophil function. The treatments with the associations were also beneficial for the altered parameters in experimental DM. However, the most beneficial treatment was the combination of curcumin with 50 mg/kg aminoguanidine; it was promising in glycemic control, reduction of glycoxidative stress and improvement of neutrophil function, presenting more effective responses than the respective compounds administered alone. Therefore, demonstrating potential attenuation and/or prevention of complications of DM. Considering the results on neutrophilic function and the structural similarity between aminoguanidine and metformin we also evaluated treatment with 250 mg/kg metformin and its association with 90 mg/kg curcumin, incorporated in yoghurt, for 45 days, however, no improvement was observed in neutrophil function.

Keywords: curcumin, aminoguanidine, diabetes mellitus, glycoxidative stress, neutrophils.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vias ativadas pela hiperglicemia e responsáveis por lesões celulares e teciduais...	21
Figura 2 – Espécies reativas geradas na hiperglicemia e enzimas antioxidantes.....	24
Figura 3 – Formação de AGE.....	25
Figura 4 – Sistema da glioxalase.....	28
Figura 5 – Formação de AGE e alguns alvos de intervenção na via da glicação.....	29
Figura 6 – Sistema NOX2 de neutrófilos, em repouso, “preparado” e ativado.....	31
Figura 7 – <i>Burst</i> oxidativo.....	31
Figura 8 – Sistema antimicrobiano mediado pela MPO.....	32
Figura 9 – Ciclos catalíticos da MPO.....	33
Figura 10 – Estruturas moleculares da curcumina em equilíbrio ceto-enólico.....	35
Figura 11 – Estrutura molecular da aminoguanidina.....	37
Figura 12 – Estrutura molecular da metformina.....	39
Figura 13 – Peso corporal de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina, durante 45 dias.....	54
Figura 14 – Glicemia de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina, durante 45 dias.....	55
Figura 15 – HbA1c e frutosamina, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.....	57
Figura 16 – Níveis de triacilgliceróis, colesterol total, colesterol-HDL e níveis estimados de colesterol-não HDL, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.....	58
Figura 17 – Atividade plasmática das enzimas hepáticas ALT, AST e ALP, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.....	60
Figura 18 – Proteinúria de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.....	61
Figura 19 – Níveis TBARS, PCO e AGE, após 45 dias, no plasma de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.....	62
Figura 20 - Nitrato + nitrito total (NOx), após 45 dias, no plasma de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.....	63
Figura 21 – Atividade de PON1, após 45 dias, no plasma de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina durante.....	64

Figura 22 – Níveis de TBARS, PCO e AGE fluorescentes, após 45 dias, no fígado de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.....	65
Figura 23 – Atividades das enzimas SOD e CAT, após 45 dias, no fígado de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.....	66
Figura 24 – Níveis de grupos tióis não proteicos e atividades das enzimas GSH-Rd e GSH-Px, após 45 dias, no fígado de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.....	67
Figura 25 - Níveis de TBARS, PCO e AGE fluorescentes, após 45 dias, no rim de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.	68
Figura 26 – Atividades das enzimas SOD e CAT, após 45 dias, no rim de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.....	69
Figura 27 – Níveis de grupos tióis não proteicos e atividades das enzimas GSH-Rd e GSH-Px, após 45 dias, no rim de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.....	71
Figura 28 – Níveis proteicos de RAGE, NF- κ B, AGE-R1 e GLO 1, após 45 dias, no fígado de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.....	72
Figura 29 – Níveis proteicos de NF- κ B, AGE-R1 e GLO 1, após 45 dias, no rim de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.....	73
Figura 30 – Número de neutrófilos migrados para a cavidade peritoneal, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.....	75
Figura 31 – Atividade de NOX2 de neutrófilos peritoneais, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.....	77
Figura 32 – Atividade de MPO de neutrófilos peritoneais, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.....	78
Figura 33 – Geração de ERO de neutrófilos peritoneais, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.....	79

Figura 34 – Glicemia e HbA1c, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou metformina.....	87
Figura 35 – Número de neutrófilos migrados, após 45 dias, para a cavidade peritoneal de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou metformina.....	88
Figura 36 – Atividade de NOX2 de neutrófilos peritoneais, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou metformina.....	89
Figura 37 – Atividade de MPO de neutrófilos peritoneais, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou metformina.....	90
Figura 38 – Geração de ERO de neutrófilos peritoneais, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou metformina.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos primários e secundários, diluições e condições de armazenamento.....49

Tabela 2 – Valores comparativos de biomarcadores analisados em plasma, fígado e rim, após 45 dias de tratamento de ratos diabéticos tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina em relação aos ratos diabéticos não tratados (vide legenda para interpretação da tabela).....80

LISTA DE ABREVIATURAS

4-HNE	4-Hidroxinonenal
ABCA1	Transportador A1 de cassetes de ligação ao ATP
ADA	Associação Americana de Diabetes
AGE	Produtos finais de glicação avançada
AGE-R	<i>AGE-receptors</i>
ALE	Produtos finais de lipoxidação avançada
AkT	Proteína quinase B
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
ALX	Aloxana
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinase dependente de AMP
Apo A1	Apolipoproteína A1
Apo B100	Apolipoproteína B1
AST	Aspartato aminotransferase
AUC	Área sob a curva
CAT	Catalase
CEL	Nε-(carboxietil) lisina
CETP	Proteína de transferência de colesterol
Cl ⁻	Cloreto
CML	Nε-(carboximetil) lisina
DAG	Diacilglicerol
DA-50	Ratos diabéticos tratados com 50 mg/kg de aminoguanidina em iogurte
DA-100	Ratos diabéticos tratados com 100 mg/kg de aminoguanidina em iogurte
DC	Ratos diabéticos tratados com 90 mg/kg de curcumina em iogurte
DCA-50	Ratos diabéticos tratados com 90 mg/kg de curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina em iogurte
DCA-100	Ratos diabéticos tratados com 90 mg/kg de curcumina e 100 mg/kg de aminoguanidina em iogurte
DCMET	Ratos diabéticos tratados com 90 mg/kg de curcumina e 250 mg/kg

	de metformina em iogurte
DINS	Ratos diabéticos tratados com 4U/dia de insulina
DIOG	Ratos diabéticos tratados com iogurte
DM	Diabetes mellitus
DMET	Ratos diabéticos tratados com 250 mg/kg de metformina em iogurte
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina
DTNB	5,5-Ditio-2-nitrobenzoico
EASD	Associação Europeia dos Estudos em Diabetes
EPM	Erro padrão da média
Egr-1	Proteína de resposta de crescimento inicial 1
ERNO	Espécies reativas de nitrogênio e oxigênio
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FADH2	Flavina adenina dinucleótido reduzida
fMLP	N-formil Metionil-Leucil-Fenilalanina
GADPH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLO 1	Glioxalase 1
GLO 2	Glioxalase 2
GLUT 2	Transportador de glicose do tipo 2
GLUT 4	Transportador de glicose do tipo 4
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GOLD	Dímero de lisina derivado de glioxal
GSH	Glutathione reduzida
GSH-Px	Glutathione peroxidase
GSH-Rd	Glutathione redutase
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA
HOCl	Ácido hipocloroso
IKK	Quinase IκB

eNOS	Oxido nítrico sintase endotelial
iNOS	Oxido nítrico sintase induzível
nNOS	Oxido nítrico sintase neuronal
JAK/STAT	Janus quinase/transdutor de sinal e ativador de transcrição
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LDL-R	Receptor de LDL
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
LPO	Lipoperoxidação ou peroxidação lipídica
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
MGG	May Grunwald e Giemsa
MOLD	Dímero de lisina derivado do metilglioxal
MPO	Mieloperoxidase
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium</i>
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NIOG	Ratos normais, não diabéticos, tratados com iogurte
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOx	Nitrato e nitrito total
NOX2	Sistema NADPH oxidase fagocítico
NRF 2	<i>Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2</i>
¹ O ₂	Oxigênio singlete
O ₂ ^{•-}	Radical anion superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
OONO ⁻	Peroxinitrito
PBS	Tampão fosfato de sódio
PBS-D	Tampão fosfato de sódio contendo CaCl ₂ , MgCl ₂ e glicose
PCO	Proteínas carboniladas
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase

PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PPAR γ	Proliferador de peroxissomo
PKC	Proteína quinase C
PON 1	Paraoxonase 1
RAGE	<i>Receptor for AGEs</i>
SIRT 1	Sirtuína
SOD	Superóxido dismutase
SR-BI	receptor da classe de eliminação B tipo 1 (SR-BI
STZ	Estreptozotocina
TAG	Triacilgliceróis
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TMB	3,3',5,5' tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
UKPDS	Estudos Clínicos Prospectivos em Diabetes do Reino Unido

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

Capítulo 1.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Justificativa.....	16
1.2 Revisão da literatura.....	18
1.2.1 Diabetes mellitus.....	18
1.2.2 Estresse glico-oxidativo no diabetes mellitus.....	20
1.2.3 Função neutrofílica no diabetes mellitus.....	29
1.2.4 Curcumina.....	34
1.2.5 Aminoguanidina	37
2 OBJETIVOS.....	40
2.1 Objetivo geral.....	40
2.2 Objetivos específicos.....	40
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 Animais.....	42
3.2 Indução do diabetes mellitus experimental.....	42
3.3 Tratamento dos animais diabéticos com curcumina e/ou aminoguanidina incorporadas em iogurte	42
3.4 Tratamento dos animais diabéticos com curcumina e/ou metformina incorporadas em iogurte	44
3.5 Determinações bioquímicas	44
3.6 Avaliação da peroxidação lipídica.....	44
3.7 Quantificação de grupos carbonílicos de proteínas.....	45
3.8 Quantificação de nitrato e nitrito (óxido nítrico).....	45
3.9 Atividade de paraoxonase 1.....	45
3.10 Determinação da concentração de grupos tióis não proteicos.....	46
3.11 Atividade de enzimas antioxidantes em fígado e rim	46
3.11.1 Preparo das amostras.....	47
3.11.2 Atividade da enzima superóxido dismutase.....	47
3.11.3 Atividade da enzima catalase.....	47
3.11.4 Atividade da enzima glutationala peroxidase.....	47
3.11.5 Atividade da enzima glutationala redutase.....	48
3.12 Estimativa dos produtos finais de glicação avançada.....	48
3.13 Dosagem de proteínas totais.....	48
3.14 Western Blot.....	48
3.15 Recrutamento dos neutrófilos.....	50
3.16 Avaliação de parâmetros da função neutrofílica.....	50
3.16.1 Avaliação da atividade de mieloperoxidase.....	50
3.16.2 Avaliação da atividade do sistema NADPH oxidase fagocítico.....	51
3.16.2.1 Quimiluminescência dependente de lucigenina.....	51
3.16.2.2 Ensaio de redução do citocromo C.....	51
3.16.3 Avaliação da produção de ERO proveniente do <i>burst</i> oxidativo	

	Quimiluminescência dependente de luminol.....	51
3.17	Análise dos resultados.....	52
4	RESULTADOS.....	53
4.1	Parâmetros fisiológicos e bioquímicos de animais não diabéticos e animais diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina em iogurte.....	53
4.2	Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo e potencial antioxidante no plasma de animais não diabéticos e animais diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina em iogurte.....	61
4.3	Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo e sistemas antioxidantes no fígado de animais não diabéticos e animais diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina em iogurte.....	64
4.4	Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo e sistemas antioxidantes no rim de animais não diabéticos e animais diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina em iogurte.....	68
4.5	Níveis proteicos de RAGE, NF- κ B, AGE-R1 e GLO 1 no fígado e rim de animais não diabéticos e animais diabéticos tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.....	71
4.6	Avaliação de parâmetros da função neutrofílica de animais não diabéticos e animais diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina em iogurte.....	74
4.7	Glicemia, HbA1c e parâmetros da função neutrofílica de animais não diabéticos e animais diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou metformina em iogurte.....	86
5	DISCUSSÃO.....	92
6	CONCLUSÃO.....	120
	REFERÊNCIAS.....	121
	APÊNDICE I: Cinética de emissão de luz nos ensaios de função neutrofílica..	146
	ANEXO I: CEUA/FCF/CAR: 25/2016.....	148
	Capítulo 2.....	149
	Artigo: Curcumin and aminoguanidine administered alone or in combination, improve metabolic control and oxidative status and increase glycation product detoxification in streptozotocin-diabetic rats.....	150

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica caracterizada principalmente por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014). A hiperglicemia crônica, a longo prazo, está associada ao desenvolvimento de complicações microvasculares, como a nefropatia, retinopatia e neuropatia, bem como das complicações macrovasculares, como as doenças cardiovasculares e acidente vascular cerebral. Tais complicações são as principais causas das elevadas taxas de morbidade e mortalidade em indivíduos diabéticos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

A exacerbação na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e produtos finais de glicação avançada (AGE), em grande parte devido à hiperglicemia crônica, causa o estresse glico-oxidativo em vários tecidos, e assim desempenha um papel relevante na patogênese das complicações diabéticas micro e macrovasculares (CHILELLI; BURLINA; LAPOLLA, 2013; ROCHETTE et al., 2014). Os AGE também podem ocasionar o fenômeno denominado “memória metabólica”: após exposição prolongada à hiperglicemia, o subsequente controle glicêmico efetivo não é suficiente para prevenir o desenvolvimento das complicações do DM; o fenômeno “memória metabólica” é explicado em parte pela manutenção da ligação do AGE ao seu receptor RAGE nos tecidos (YAMAGISHI; NAKAMURA; MATSUI, 2017).

De especial relevância no DM, podem ser citadas as alterações das funções neutrofílicas que resultam na atenuação da capacidade de defesa contra microrganismos invasores (ALBA-LOUREIRO et al., 2006; DAOUD et al., 2009). A hiperglicemia também pode aumentar a geração de ERO pelos neutrófilos, os quais geram danos nos tecidos (MARIN et al., 2011; RAYNER; LOVE; HAWKINS, 2014). Uma vez que os neutrófilos desempenham um papel importante na primeira defesa do organismo contra microrganismos invasores, esses fatores também podem contribuir para o estresse glico-oxidativo e lesão tecidual.

A saúde dos tecidos e dos organismos está intimamente relacionada com as interações altamente ordenadas entre respostas imunes e metabólicas. Falhas dessas interações estão subjacentes ao surgimento e complicações de muitas patologias, particularmente doenças crônicas não transmissíveis, como obesidade e diabetes (HOTAMISLIGIL, 2017).

A hiperglicemia é considerada um fator *pivotal* envolvido no estabelecimento das complicações do DM, portanto, o tratamento da doença tem como principal objetivo a manutenção dos níveis glicêmicos próximos à normalidade. No entanto, tendo em vista a perda progressiva do controle metabólico mesmo com a existência de diversas terapias (por exemplo, insulina, antidiabéticos orais, reeducação alimentar e prática de atividades físicas), ainda há evidências da necessidade na exploração de novas opções para o tratamento do DM (TURNER et al., 1999; DAVIES et al., 2013; KAUL; APOSTOLOPOULOU; RODEN, 2015).

Nosso laboratório tem se dedicado ao estudo do potencial antidiabético e antioxidante de fitoquímicos presentes em “alimentos funcionais” incorporados no iogurte, com destaque para a curcumina, administrada de forma isolada ou combinada com outros fitoquímicos ou com fármacos comerciais (GUTIERRES et al., 2012; ARCARO et al., 2014; ASSIS et al., 2017; GUTIERRES et al., 2019; ROXO et al., 2019). Gutierres et al. (2012) demonstraram que os tratamentos apenas com iogurte não alteraram os parâmetros fisiológicos e bioquímicos caracteristicamente alterados no modelo experimental de DM induzido por estreptozotocina (STZ). Desta forma, o iogurte pode ser considerado um veículo para fitoquímicos em estudos anteriores e atuais do laboratório, uma vez que, resolve o problema da baixa solubilidade em água para a curcumina e outros compostos insolúveis em meio aquoso. O iogurte é um dos alimentos lácteos mais consumidos em todo o mundo; o enriquecimento/fortificação do iogurte tem sido considerado uma opção prática como veículo de compostos bioativos de outros alimentos funcionais, de plantas medicinais e antioxidantes (GAHRUIE et al., 2015).

A combinação de compostos com diferentes mecanismos bioquímicos de ação sobre uma mesma resposta em sistemas biológicos pode promover efeitos combinados, aditivos ou sinérgicos, em relação à administração isolada. Além disso, é possível ampliar o espectro de ação combinando-se compostos bioativos que tenham atividades distintas nesses sistemas, e estas combinações podem ter relevância para condições fisiopatológicas caracterizadas por desordens multifatoriais, como é o caso do DM. A maioria de trabalhos tem investigado a combinação de fitoquímicos com fármacos comerciais (metformina, glibenclamida, gliptinas) já utilizados na terapia do DM (PRABHAKAR; KUMAR; DOBLE, 2014; SINGH et al., 2015; ROXO et al., 2019).

Neste contexto, torna-se importante uma estratégia terapêutica direcionada para modular o estresse glico-oxidativo, bem como, os parâmetros da função neutrófila, e que pode contribuir no auxílio da diminuição da morbidade e mortalidade do DM, o que aponta

para associação curcumina e um agente antiglicante visando os AGE, uma estratégia em potencial.

1.2 Revisão da literatura

1.2.1 Diabetes mellitus

A hiperglicemia no DM é resultante da deficiência na secreção de insulina pelas células beta pancreáticas e/ou de resistência à ação desse hormônio em tecidos alvo. Além da hiperglicemia, várias outras alterações são frequentemente observadas no DM, tais como dislipidemia, com elevados níveis circulantes de triacilgliceróis (TAG), ácidos graxos e lipoproteína de baixa densidade (LDL) e níveis diminuídos de lipoproteína de alta densidade (HDL); glicosúria; hipertensão arterial; dentre outras (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; ROCHETTE et al., 2014). Além disso, as manifestações clínicas da hiperglicemia incluem perda de peso, poliúria, polidipsia, polifagia e visão turva (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

O DM é uma síndrome comum na maioria dos países e continua a aumentar em número e significância, atualmente reconhecido como um problema de saúde pública mundial. Mais de 463 milhões de pessoas tinham DM em 2019 e as projeções desse número global aumenta para 578 milhões em 2030 e para 700 milhões em 2045 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019).

O DM é classificado principalmente em: i) DM tipo 1, que tem como característica a destruição das células beta do pâncreas, em geral mediada por autoimunidade, culminando em deficiência absoluta de insulina; ii) DM tipo 2, observa-se predominância de resistência insulínica com disfunção pancreática e deficiência relativa de insulina; iii) outros tipos específicos de DM, tais como defeito genético das células beta do pâncreas, endocrinopatias, dentre outras causas; e iv) DM gestacional, com intolerância à glicose que tem início na gravidez ou primeiramente detectada durante a gestação (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018).

No DM tipo 1 a hiperglicemia se desenvolve rapidamente, sem resistência prévia à insulina, e conforme aumenta a cronicidade da hiperglicemia, a resistência à insulina pode aumentar gradualmente. Já no DM tipo 2 a resistência à insulina está presente por vários anos antes que a hiperglicemia evidente se desenvolva e estabeleça. Na resistência à insulina ocorre

uma diminuição da sensibilidade às ações da insulina, nos principais tecidos-alvo envolvidos do metabolismo da glicose, como o músculo esquelético, tecido adiposo, fígado e pâncreas (LAAKSO; KUUSISTO, 2014). Vários mecanismos podem ocasionar a resistência à insulina ao interferirem com a cascata de sinalização desse hormônio, como exposição crônica aos elevados níveis de glicose, lipídeos, aminoácidos, o estresse oxidativo, a inflamação, entre outros (KAUL; APOSTOLOPOULOU; RODEN, 2015).

Assim o DM pode ser caracterizado por uma série de alterações metabólicas; a hiperglicemia crônica leva à alteração vascular difusa e disfunção de múltiplos órgãos, tecidos e células, especialmente os olhos, rins, nervos, coração, fígado e células endoteliais dos vasos sanguíneos. A longo prazo, indivíduos diabéticos estão sujeitos às complicações microvasculares, tais como i) nefropatia, levando a insuficiência renal; ii) retinopatia com potencial perda da visão; iii) neuropatia periférica com riscos de úlceras do pé, amputações e articulações de *Charcot*; iv) neuropatia autonômica causando alterações dos sistemas gastrointestinal, geniturinário, cardiovascular e genital. Também estão sujeitos às complicações macrovasculares, como aumento na incidência de doença aterosclerótica, cardiovascular, arterial periférica e cerebrovascular. Tais complicações são as principais causas das elevadas taxas de morbidade e mortalidade em indivíduos diabéticos (RAINS; JAIN, 2011; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; FORBES; FOTHERINGHAM, 2017).

Para induzir o DM experimental em animais são muito utilizados dois compostos diabetogênicos, a STZ e a aloxana (ALX). Ambos compostos possuem mecanismos idênticos de ação nas células beta pancreáticas, entretanto o potencial diabetogênico é alcançado por diferentes vias citotóxicas (RADENKOVIĆ; STOJANOVIĆ; PROSTRAN, 2016). A ALX entra nas células beta pancreáticas via transportador de glicose do tipo 2 (GLUT 2) e estabelece um ciclo redox com o produto de sua redução (ácido dialúrico), ocasionando a geração de radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), esses são dismutados a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e após reação de Fenton é gerado radical hidroxila ($OH^{\bullet}$). As ações das ERO juntamente com um aumento maciço na concentração de cálcio citosólico causa rápida destruição das células beta pancreáticas. A STZ também é captada pelas células beta pancreáticas via GLUT 2 e ocasiona a alquilação do DNA. Os danos ao DNA induzem a ativação de Poli ADP ribosilação, que é o efeito diabetogênico mais importante da STZ. Além disso, ocorre liberação tóxica de óxido nítrico (NO) e a formação de espécies reativas, como o $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $OH^{\bullet}$ e peroxinitrito ($OONO^{\bullet}$) que também participam dos danos ao DNA. Como resultado, as células beta pancreáticas são destruídas por necrose (SZKUDELSKI, 2001).

Tanto a ALX quanto a STZ podem ser utilizadas para a indução do DM tipo 1, no entanto, a STZ é usada com mais frequência para induzir o DM em ratos. Além disso, o DM induzido por STZ é um modelo mais estável de DM experimental e pode ser usado em experimentos de curto ou longo prazo (RADENKOVIĆ; STOJANOVIĆ; PROSTRAN, 2016). A administração de STZ ocasiona uma destruição maciça e importante das células beta pancreáticas, levando ao desenvolvimento de modelo de DM que mimetiza as alterações do DM tipo 1 (mais severo), em que a hiperglicemia é alta e consequentemente as complicações da doença aparecem rapidamente, tornando-se um modelo interessante para o estudo do potencial de compostos que previnem e/ou melhoram as complicações do DM relacionadas à hiperglicemia.

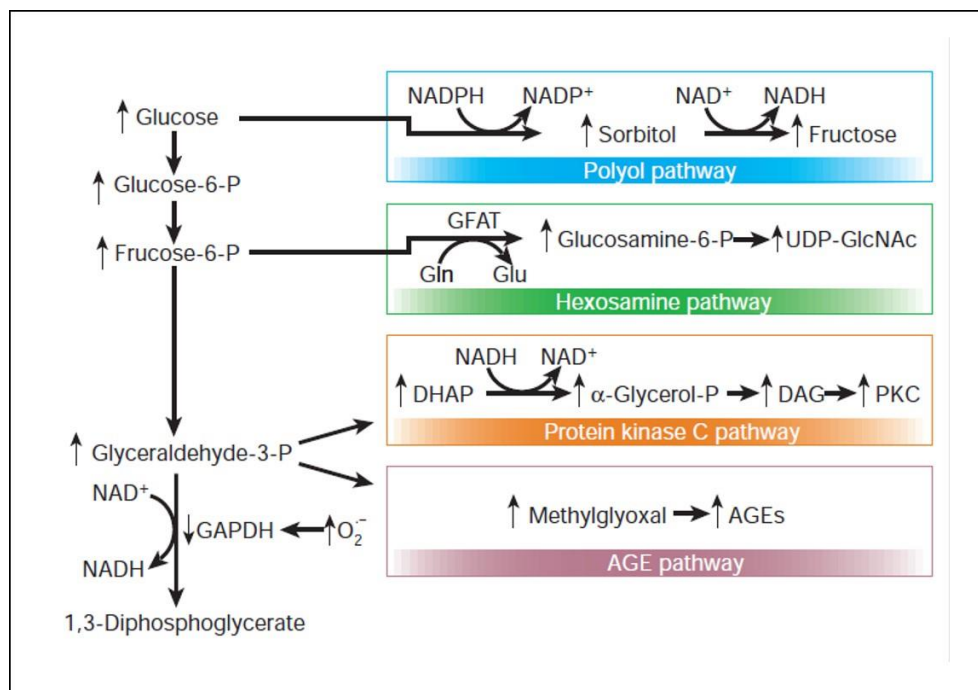
1.2.2 Estresse glico-oxidativo no diabetes mellitus

A hiperglicemia prolongada causa alteração da função e estrutura dos vasos sanguíneos e tecidos, via quatro mecanismos principais: i) aumento do fluxo de glicose e outros açúcares pela via do poliol; ii) aumento na formação de AGE; iii) ativação da proteína quinase C (PKC) via aumento na geração de diacilglicerol (DAG); e iv) hiperatividade da via hexosamina. Estes mecanismos parecem estar ligados por um fator comum, a produção aumentada de $O_2^{\bullet-}$ pela cadeia transportadora de elétron mitocondrial (BROWNLEE, 2001; GIACCO; BROWNLEE, 2010) (FIGURA 1). A hiperglicemia acarreta o aumento de doadores de elétrons, nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo reduzida (FADH₂) derivados do ciclo de Krebs que geram um alto potencial de membrana, por bombear prótons através da membrana interna mitocondrial. Esse processo inibe o transporte de elétrons no complexo III da cadeia transportadora de elétrons, aumentando a meia-vida dos radicais livres intermediários da ubiquinona (coenzima Q), que reduz o O_2 a $O_2^{\bullet-}$ (BROWNLEE, 2001).

A ativação da via do poliol ocasiona a maior conversão de glicose à sorbitol, com consumo da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) e o sorbitol é convertido à frutose com geração de NADH. Isso tem como consequência uma menor disponibilidade da NADPH, molécula necessária para a regeneração da forma reduzida da glutatona (GSH, L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina), culminando na diminuição drástica deste antioxidante endógeno e aumentando assim o estresse oxidativo induzido por hiperglicemia. No estresse oxidativo celular o $O_2^{\bullet-}$ (em especial gerado na mitocôndria) inibe parcialmente a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), a qual também pode

ser inibida pelo aumento da relação $\text{NADH}:\text{NAD}^+$ (supracitado), a inibição dessa enzima ocasiona o aumento do seu substrato gliceraldeído 3-fosfato, esse composto pode levar a formação de metilglioxal (precursor de AGE) e/ou o aumento de DAG e este promove a ativação da PKC, que culmina no aumento da expressão de fatores pró-trombóticos e pró-inflamatórios. Por fim, o aumento na formação de AGE, além de causar danos teciduais diretos, também pode estimular o aumento na formação das ERO (FIGURA 1) (BROWNLEE, 2001; MADONNA; DE CATERINA, 2011; ROCHETTE et al., 2014).

Figura 1 – Vias ativadas pela hiperglicemia e responsáveis por lesões celulares e teciduais.



O excesso na produção de $\text{O}_2^{\cdot -}$ mitocondrial, devido a hiperglicemia, inibe parcialmente a enzima glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), desviando assim os metabólitos da glicólise para as vias de super-utilização da glicose. Desta forma, ocorre: i) aumento do fluxo da glicose pela via do poliol que consome NADPH e esgota a GSH ; ii) aumento do fluxo de frutose-6-fosfato para difosfato de uridina N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) que aumenta a modificação de proteínas; iii) aumento do fluxo de di-hidroxiacetona (DHAP) para DAG, um ativador de PKC; e iv) aumento de fosfatos trioses para metilglioxal, precursor de AGE. Fonte: BROWNLEE, 2001.

A exacerbação na geração de ERO, principalmente pela mitocôndria, em grande parte devido à hiperglicemia crônica, causa o estresse oxidativo em vários tecidos, e assim desempenha um papel relevante na patogênese das complicações diabéticas micro e macrovasculares. O estresse oxidativo é geralmente definido como um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes (RAINS; JAIN, 2011; ROCHETTE et al., 2014); tem

sido demonstrado que a diminuição nas defesas antioxidantes também desempenha papel importante na gênese do estresse oxidativo no DM (MADONNA; DE CATERINA, 2011).

Em sistemas biológicos, as ERO, em quantidades adequadas, estão envolvidas em diversos processos de sinalização celular e na defesa constitutiva em determinadas células do sistema imune, porém seu excesso ocasiona alterações em carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (ROCHETTE et al., 2014). O principal alvo do estresse oxidativo depende do tipo de célula, da natureza das espécies oxidantes geradas, do local da geração (intra ou extracelular), da proximidade do oxidante ao substrato oxidável celular específico e a gravidade do estresse (DALLE-DONNE et al., 2003; DALLE-DONNE et al., 2006).

Os lipídeos são particularmente vulneráveis à oxidação por ERO, e isto pode resultar na lipoperoxidação (LPO), que contribui para o desenvolvimento das complicações do DM (DAVÌ et al., 2005). A LPO é um processo em que ERO atacam lipídeos contendo ligações duplas carbono-carbono, especialmente ácido graxos poli-insaturados, resultando em uma variedade de produtos. Os principais produtos primários da LPO são os hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e alguns dos produtos secundários são o malondialdeído (MDA), mais mutagênico, e o 4-hidroxinonenal (4-HNE), mais tóxico (MARNETT, 1999; AYALA et al., 2014). As células respondem à LPO de acordo com as condições metabólicas específicas e capacidade de reparo, podendo assim promover a sobrevivência ou induzir a morte celular. Sob condições fisiológicas ou baixas taxas de LPO, as células estimulam sua manutenção e sobrevivência por meio de defesas antioxidantes, porém sob altas taxas de LPO as células não conseguem reparar os danos e ocorre a indução da apoptose ou necrose (AYALA et al., 2014).

As proteínas são os principais alvos de ERO e/ou de subprodutos secundários do estresse glico-oxidativo e dão origem as proteínas carboniladas (PCO; aldeídos e cetonas). A geração de PCO é um marcador geral de dano oxidativo às proteínas e reflete dano celular induzido por múltiplas formas de ERO (DALLE-DONNE et al., 2006; SUZUKI et al., 2010). As PCO podem ser formadas por i) oxidação direta de cadeias laterais de aminoácidos (lisina, arginina, prolina e treonina); ii) clivagem oxidativa de proteínas; iii) por produtos originados na LPO e iv) por açúcares redutores ou seus produtos de oxidação, via glico-oxidação (DALLE-DONNE et al., 2006).

Além das ERO, pode ocorrer também a superprodução de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ERON), a qual também pode acarretar em prejuízos na homeostase do organismo. O NO, uma ERO, é uma espécie radicalar reguladora com extensos efeitos metabólicos, vasculares e celulares. O NO é gerado por uma família de enzimas chamadas

óxido nítrico sintase (NOS) e suas isoformas são: neuronal (nNOS), induzível (iNOS) e endotelial (eNOS). Baixos níveis de NO são benéficos para diversas funções fisiológicas e celulares, entretanto, altos níveis podem causar danos, como por exemplo podem reagir com o $O_2^{\bullet-}$ e gerar o $OONO^{\bullet-}$, que se liga as proteínas e altera suas funções (KOMERS; ANDERSON, 2003; PITOCCO et al., 2010; SOSKIC et al., 2011).

A prevalência dos organismos aeróbicos na obtenção de energia pelo metabolismo oxidativo ocasiona a produção de ERO, o que o levou ao desenvolvimento de mecanismos de defesa na forma de agentes antioxidantes. Tem-se como conceito que o antioxidante é capaz de diminuir a velocidade, impedir ou eliminar os danos oxidativos em moléculas alvo. No DM, além do aumento na produção de ERO, também ocorre uma diminuição na atividade de algumas enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT), atribuída às alterações dessas proteínas pelas ERO ou eventos glicativos (SINDHU et al. 2014; RAJENDRAN et. al., 2014; ARCARO et al. 2014).

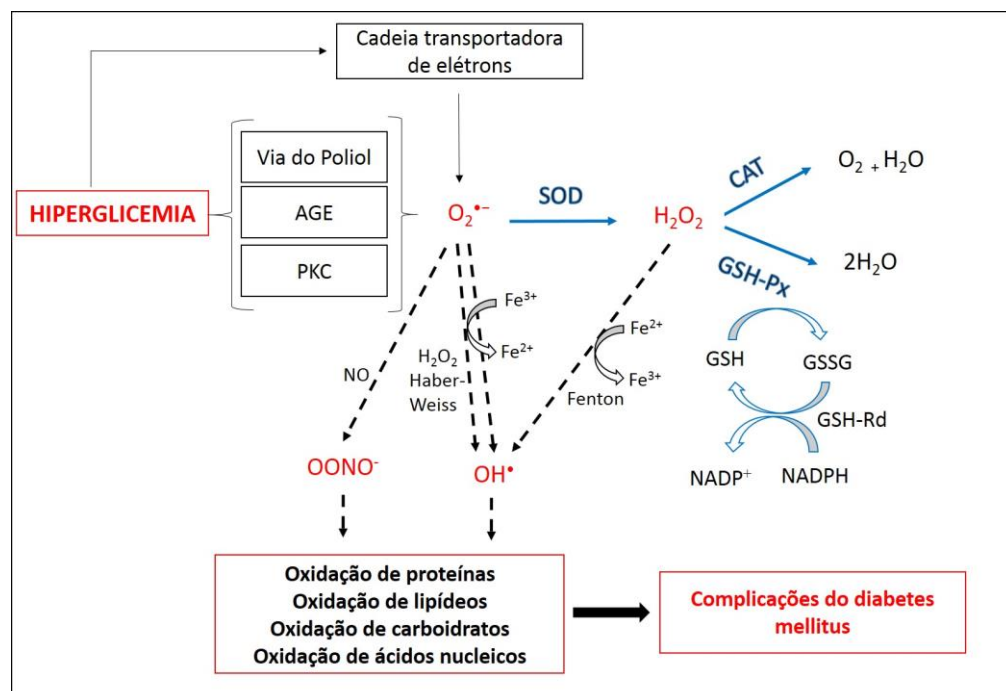
As enzimas antioxidantes geralmente convertem ERO em moléculas de O_2 relativamente não reativas e/ou formam H_2O . Durante o processo de geração de ERO, o $O_2^{\bullet-}$ é o principal intermediário reativo de O_2 , que é rapidamente dismutado a H_2O_2 espontaneamente e/ou por ação catalítica da SOD. O H_2O_2 sofre ação da CAT e/ou da GSH-Px originando H_2O . O $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 , podem originar outras ERO muito reativas, como $OH^{\bullet}$ pela reação de Fenton e/ou Haber-Weiss; $OONO^{\bullet-}$ pela reação com o NO (FIGURA 2) (JHA et al., 2016). Portanto, as ações antioxidantes são de extrema importância para o controle do estresse glico-oxidativo.

A paraoxonase-1 (PON1) é uma esterase associada à HDL, que apresenta atividade antioxidante por ser capaz de hidrolisar peróxidos lipídicos. A atividade primária da PON1 é de lactonase; ácidos graxos poli-insaturados oxidados formam estruturas químicas *lactona-like*, portanto, podem servir como substratos para a PON1 (CHISTIAKOV et al., 2017). O estresse oxidativo no DM é amplamente aceito como um componente importante na produção de LDL oxidada (LDL-ox), que é crucial para o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (LEVITAN et al., 2010), a PON1 possui a capacidade de hidrolisar peróxidos lipídicos da LDL-ox, demonstrando ser uma enzima fisiologicamente importante; outra função protetora da PON1 é hidrolisar a homocisteína tiolactona e conseqüentemente prevenir a modificação proteica (CHISTIAKOV et al., 2017; SHUNMOOGAM; NAIDOO; CHILTON, 2018).

Mazur (1946) e Aldridge (1953) desempenharam um papel fundamental na identificação e classificação da PON1, inicialmente ela foi identificada como A-esterase, mas depois se tornou conhecida como paraoxonase devido à sua capacidade de desintoxicar o

composto organofosforado paraoxon, que é um metabólito tóxico do Paration (pesticida agrícola). A PON1 pertence a uma família de três paraoxonases séricas (PON1, PON2 e PON3) e apenas a PON1 possui a capacidade de hidrolisar organofosfatos. A PON1 e PON3 são sintetizadas principalmente no fígado e encontradas principalmente no plasma associadas à HDL (CHISTIakov et al., 2017). As paraoxonases possuem diversas atividades e substratos, como i) atividade de paraoxonase, substratos: organofosforados (paraoxon); ii) atividade de lactonase, substratos: ésteres carboxílicos cíclicos (lactonas); iii) atividade de tiolactonase, substrato: homocisteína tiolactona; iv) atividade de arilesterase, substratos: ésteres aromáticos (acetato de fenila) e v) atividade de peroxidase, substratos: ERO ($O_2^{\cdot-}$ e peróxidos) (LEVY; REICHERT; BYDLOWSKI, 2019). Atualmente, a PON1 é considerada a paraoxonase mais importante, pois possui a capacidade de hidrolisar vários intermediários oxidados e a homocisteína tiolactona, desta forma, protegendo contra o estresse oxidativo e distúrbios inflamatórios, como a aterosclerose (CHISTIakov et al., 2017; SHUNMOOGAM; NAIDOO; CHILTON, 2018).

Figura 2 – Espécies reativas geradas na hiperglicemia e enzimas antioxidantes.

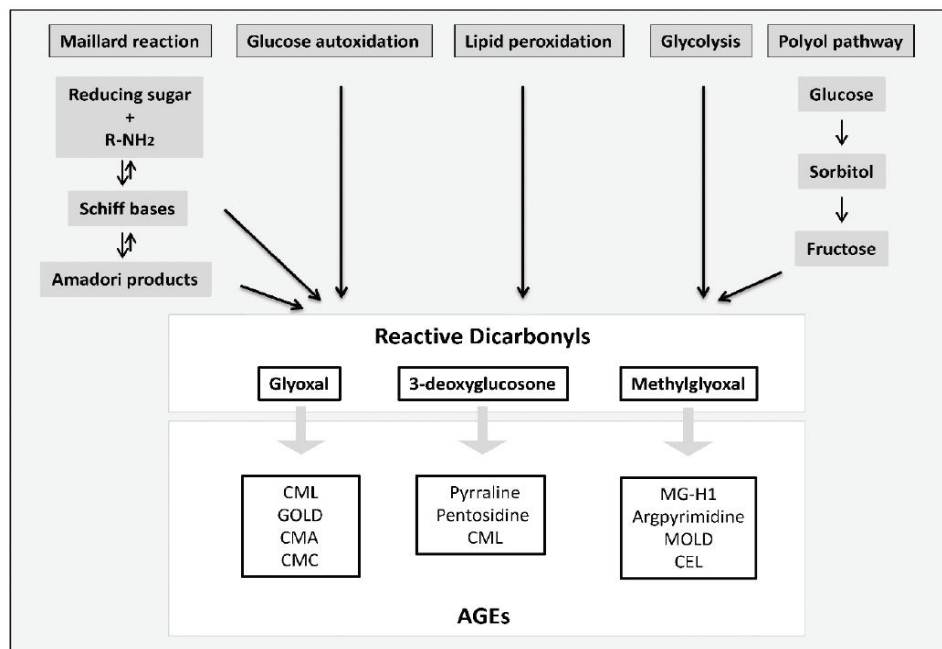


Linha preta pontilhada = espécies reativas responsáveis pela instalação e/ou progressão das complicações do diabetes mellitus. Linha azul contínua = sistema antioxidante. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GSH-Px: glutathione peroxidase; GSH-Rd: glutathione redutase; GSH: glutathione reduzida; GSSG: glutathione oxidada. Fonte: Do autor, 2019.

A produção de AGE em excesso é um mecanismo importante envolvido na fisiopatologia de complicações crônicas do DM. Os AGE são formados principalmente pela

glicação não enzimática de proteínas, ou reação de Maillard, que se inicia com a reação de açúcares redutores (como glicose e frutose) e o grupo amino de proteínas (como lisina e arginina), originando uma base de Schiff instável. A base de Schiff sofre rearranjos intramoleculares e origina os produtos de Amadori (exemplos bem conhecidos de produtos de Amadori são a hemoglobina glicada (HbA1c) e a frutosamina). Uma parte desses produtos de Amadori pode sofrer reações oxidativas e não oxidativas e formar compostos irreversíveis, denominados AGE, que modificam proteínas e levam a lesões tissulares (RAINS; JAIN, 2011; OTT et al., 2014). Os produtos de Amadori podem ser convertidos em AGE diretamente ou sofrerem auto-oxidação e formarem os reativos intermediários dicarbonílicos, como metilglioxal, glioxal e 3-desoxiglicossone. Estes, por sua vez, completam os “ataques” às proteínas e nas quais, seguidos de rearranjos moleculares, também originam AGE (RAINS; JAIN, 2011; EMEL'YANOV, 2017). Nesses processos de formação de AGE os intermediários dicarbonílicos também podem ser formados pela auto-oxidação da glicose e como resultado da LPO e do estresse oxidativo (FIGURA 3) (ENGELIN; STEHOUWER; SCHALKWIJK, 2013; OTT et al., 2014).

Figura 3 – Formação de AGE.



A formação de AGE ocorre por diversos mecanismos, como pela reação de Maillard (reação entre açúcares redutores e grupo amino livre de proteínas), por meio da autooxidação da glicose, lipoperoxidação, intermediários da glicólise e da via dos polióis. Esses processos podem gerar reativos intermediários dicarbonílicos, como glioxal, 3-desoxiglicossone e metilglioxal, que levam a formação dos AGE. CML: Nε-(carboximetil) lisina; GOLD: dímero de lisina derivado de glioxal; CMA: Nω-(carboximetil) arginina; CMC: Nε-(carboximetil) cisteína; MG-H1: hidroimizalona derivado do metilglioxal; MOLD: dímero de lisina derivado do metilglioxal; CEL: Nε-(carboxietil) lisina. Fonte: NOWOTNY et al., 2015.

De acordo com a sua origem, os AGE podem ser divididos em dois grupos: (i) produtos finais de glicação avançada derivados de reações proteína-carbonila (AGE), que surgem da glicação não enzimática, auto-oxidação da glicose ou da via do sorbitol ou (ii) produtos finais de lipoxidação avançada (ALE), que são gerados por compostos reativos dicarbonílicos resultantes da LPO; frequentemente, ambos são denominados sob o termo AGE (OTT et al., 2014). Os AGE compreendem um grande número de estruturas químicas heterogêneas, alguns exemplos conhecidos são: Nε-(carboximetil) lisina (CML), pentosidina, argipirimidina, pirrolina, imidazolona, dímero de lisina derivado de glioxal (GOLD), dímero de lisina derivado do metilglioxal (MOLD), Nε-(carboxietil) lisina (CEL), frutose-lisina, entre outros (NOWOTNY et al., 2015; PASUPULATI et al., 2016).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar o envolvimento de AGE no estabelecimento das complicações diabéticas, tais como: acarretar a perda da função proteica, o que pode incluir a rigidez vascular; e interagir com os receptores de AGE (RAGE) (ENGELN; STEHOUWER; SCHALKWIJK, 2013).

Os AGE são capazes de interagirem com uma variedade de receptores de superfície celular, ocasionando ativação celular de eventos pró-oxidantes e pró-inflamatórios ou promovendo sua endocitose e degradação (OTT et al., 2014; PASUPULATI et al., 2016).

O receptor RAGE é um membro da superfamília de imunoglobulinas e está implicado no desenvolvimento da inflamação e estresse oxidativo (PASUPULATI et al. 2016). Esse receptor é encontrado em uma variedade de células, tais como células endoteliais, neuronais, fibroblastos, macrófagos, entre outras; no rim, os RAGE são encontrados em células epiteliais tubulares, glomerulares e mesangiais. Em condições fisiológicas normais, a expressão dos RAGE é baixa, mas pode ser regulada em resposta ao estresse e/ou inflamação (OTT et al., 2014; PASUPULATI et al., 2016).

A interação AGE-RAGE regula diversos eventos via ativação de várias cascatas de sinalização, resultando na disfunção celular. A interação AGE-RAGE ativa a NADPH oxidase, a qual leva ao aumento na geração de ERO. O aumento na geração de ERO ativa o fator nuclear kappa B (NF-κB), que induz a transcrição de genes inflamatórios da parede vascular (BASTA; SCHMIDT; DE CATERINA, 2004). A PKC também pode ativar a NADPH oxidase, favorecendo assim a exacerbação do estresse oxidativo (RAINS; JAIN, 2011). A ativação de RAGE também induz a apoptose celular por aumento na expressão de p53-Bax e promovendo a ativação da cascata de caspases dependente de cálcio (TANGVARASITTICHA, 2015).

A interação entre ligante e RAGE induz vários tipos de cascatas de sinalização, dependendo do tipo de célula e da condição fisiopatológica; dentre os componentes que participam da cascata de transdução de sinal dos RAGE podem ser citados os membros das seguintes famílias: proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), janus quinase/transdutor de sinal e ativador de transcrição (JAK/STAT), NF- κ B, quinase regulada por sinal extracelular (ERK), PKC e proteína de resposta de crescimento inicial 1 (Egr-1). Estas vias de sinalização associadas ao receptor RAGE culminam em estímulos para a transcrição de genes pró-inflamatórios e causam alterações fenotípicas celulares, incluindo estímulo à migração, invasão, proliferação e apoptose (OTT et al., 2014). O receptor RAGE quando ativado também estimula a cascata sinalizatória fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) – proteína quinase B (Akt) – quinase I κ B (IKK), com ativação de NF- κ B e sua translocação para o núcleo. O NF- κ B, além de mediar a inflamação, também aumenta a expressão de RAGE e inibe a expressão de glioxalase I (GLO 1) (OTT et al., 2014; PASUPULATI et al., 2016; EMEL'YANOV, 2017).

O organismo possui sistemas endógenos para a detoxificação dos AGE e assim diminuir seus efeitos deletérios. Além do RAGE, existe a família de receptores de produtos finais de glicação avançada (AGE-R). O complexo AGE-R consiste em três receptores distintos: AGE-R1/OST-48, AGE-R2/80K-H e AGE-R3/galectin-3, e está envolvido na sinalização de AGE e na endocitose de proteínas modificadas. O receptor AGE-R1/OST-48 é encontrado nas células mesangiais, endoteliais, neuronais, fibroblastos, macrófagos, entre outras. No rim, sua expressão está diminuída em patologias, incluindo o DM. Este receptor, quando ativado, aumenta a velocidade de remoção dos AGE, uma vez que promove a endocitose e degradação de proteínas modificadas, e também possui um papel protetor contra agressões mediadas pelo estresse glico-oxidativo, e assim previne lesões celulares e teciduais (OTT et al., 2014; PASUPULATI et al., 2016). A captação de AGE por seus receptores e receptores *scavenger* promovem a endocitose e dentro dos endossomas recém-formados, os AGE são dissociados do receptor, devido ao maior pH no interior dos endossomas. Após a separação, o receptor pode ser reciclado e transferido de volta para a superfície das células. Os endossomas com AGE fundem-se com os lisossomas, seguindo para o processamento de AGE por proteases lisossomais. Pequenos peptídeos modificados por AGE são liberados das células, por mecanismos desconhecidos, e em seguida transportados para filtração pelos rins, assim prejuízos na função renal resultam em acúmulos de AGE (PASUPULATI et al., 2016).

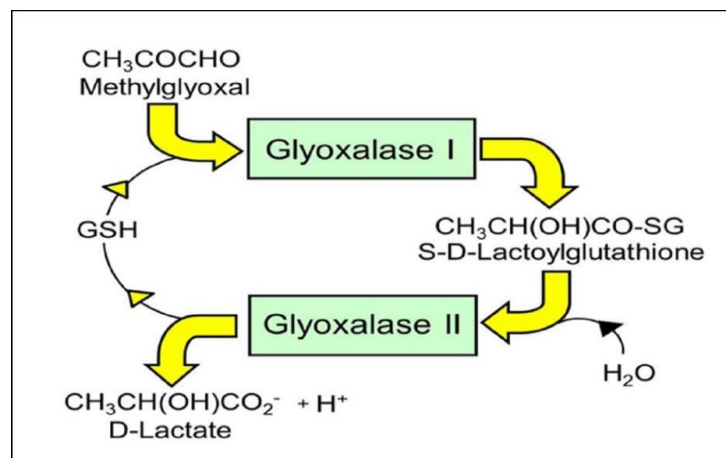
No DM os mecanismos de detoxificação dependentes de receptores de AGE encontram-se prejudicados, em especial com redução na atividade de AGE-R1, o que

contribui para o acúmulo de AGE e, portanto, para lesão tecidual (PINKAS; ASCHNER, 2016).

O receptor AGE-R1 se opõe ou intercepta os efeitos pró-inflamatórios dos receptores RAGE. O AGE-R1 inibe a atividade da NADPH oxidase e diminui geração de estresse oxidativo, bem como a sinalização mediada pelas ERO. Tem sido sugerido que AGE-R1 facilita a captação de AGE e impede a ativação da sinalização pró-inflamatória do eixo AGE-RAGE (ABATE et al., 2015). O mecanismo proposto para AGE-R1 na inibição da sinalização da inflamação e estresse oxidativo, se deve ao exercer suas funções através de sirtuína 1 (SIRT 1), na qual inibe NF- κ B por desacetilação, resultando em menor inflamação e estresse oxidativo; a transcrição de genes relacionados ao estresse oxidativo e à inflamação é inibida por AGE-R1 e SIRT 1 (POULSEN et al., 2013). Os efeitos protetores do AGE-R1 podem se originar de sua longa cauda extracelular com alta aderência a AGE, que interfere competitivamente com as interações AGE-RAGE (VLASSARA; STRIKER, 2011).

Outro sistema de detoxificação de AGE é o sistema da glioalase. Esse sistema consiste de duas enzimas, GLO 1 e glioalase 2 (GLO 2), que catalisam reações sucessivas e dependentes de GSH. Estas enzimas catalisam a conversão de compostos carbonílicos, como o metilglioal, em ácido láctico. A GLO 1 catalisa a isomerização do hemitioacetil (formado não enzimaticamente a partir do metilglioal e GSH para S-D-lactoilglutathione, e a GLO 2 catalisa a hidrólise de S-D-lactoilglutathione em D lactato, regenerando GSH utilizada na reação catalisada por GLO 1 (FIGURA 4) (RABBANI; THORNALLEY, 2019).

Figura 4 – Sistema da glioalase.

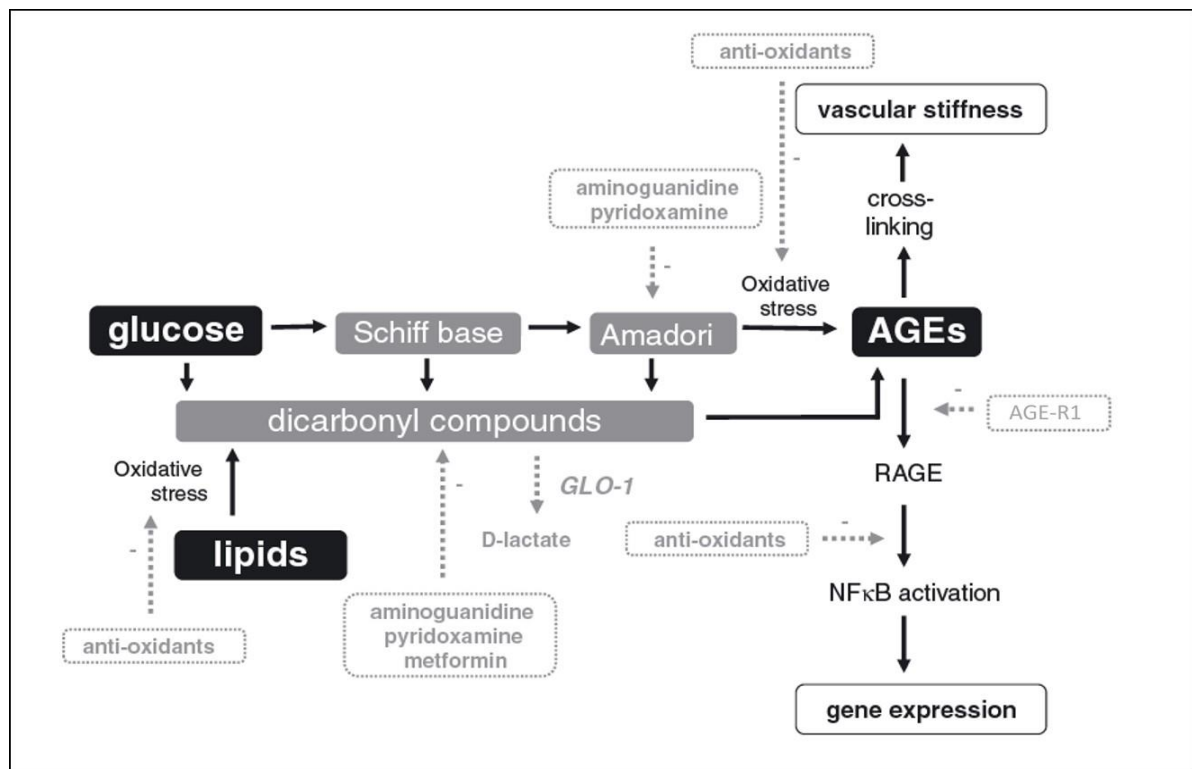


Metabolismo do metilglioal pelo sistema da glioalase.
Fonte: RABBANI; THORNALLEY, 2019.

A expressão elevada de glioxalase reduz a formação intracelular de AGE, que por sua vez reduz o estresse oxidativo e apoptose celular. A indução de mecanismos de detoxificação de AGE, incluindo o sistema da glioxalase e o receptor AGE-R1, conferem proteção contra a glicação, impedindo o acúmulo de intermediários altamente reativos (HOLLENBACH, 2017). No entanto, o aumento do estresse glico-oxidativo pode ocasionar a saturação do sistema da glioxalase e ele não ser capaz de diminuir as concentrações de metilglioxal (XUE et al., 2012).

Na Figura 5 está representado resumidamente a geração de AGE e suas ações, assim como, alguns alvos de intervenção na via de glicação.

Figura 5 – Formação de AGE e alguns alvos de intervenção na via da glicação.



As diversas vias de formação de AGE e suas conseqüências deletérias estão mostradas de cinza e preto (linhas contínuas). Vias de detoxificação, como GLO 1 e AGE-R1, assim como potenciais locais de intervenção, tanto na formação quanto nas ações dos AGE, estão indicados com linhas pontilhadas. Fonte: ENGELEN; STEHOUWER; SCHALKWIJK, 2013, com modificações.

1.2.3 Função neutrofílica no diabetes mellitus

Os neutrófilos representam a primeira linha de defesa do organismo contra microrganismos invasores, células infectadas com vírus e células tumorais (AMULIC et al., 2012). O reconhecimento de componentes microbianos por neutrófilos desencadeia a

fagocitose, ativação do sistema NADPH oxidase fagocítico (NOX2), geração de ERO e liberação de proteínas granulares, tais como mieloperoxidase (MPO) e elastase. Essas ERO e enzimas agem como agentes microbicidas e participam dos processos inflamatórios (AMULIC et al., 2012; KABEYA et al., 2013).

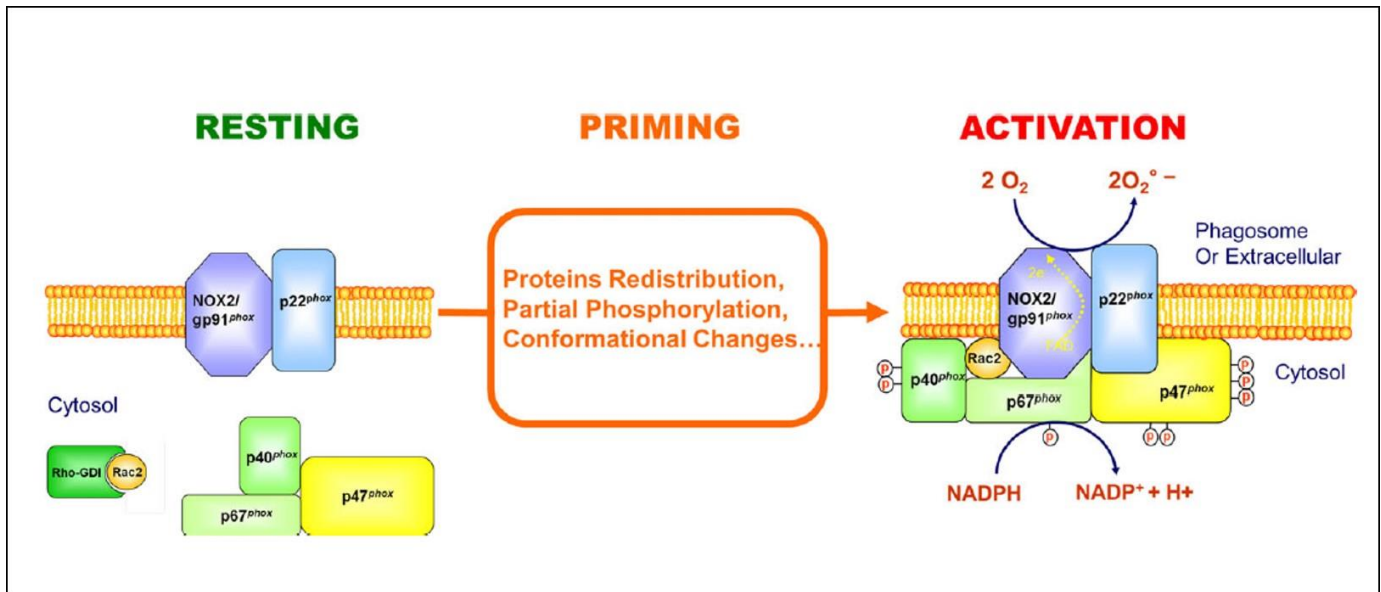
A geração de ERO pelos fagócitos foi referida primeiro como “explosão respiratória” (*burst* respiratório) ou “explosão oxidativa” (*burst* oxidativo) devido ao aumento rápido e insensível ao cianeto no consumo de O_2 , aumento no consumo de glicose e liberação imediata de ERO (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998; EL-BENNA et al., 2016). O sistema enzimático responsável pela geração de $O_2^{\cdot -}$ é o sistema NADPH oxidase fagocítico, um membro da família NOX, também conhecido como NOX2. O sistema NOX2 é composto por seis proteínas, duas proteínas transmembranas (p22phox e gp91phox) que formam o flavocitocromo b558 e quatro proteínas solúveis (p47phox, p67phox e p40phox) e as pequenas proteínas G (Rac1 / 2). Os componentes de membrana e citosólico da NOX2 estão dissociados na célula em repouso, mas se unem na membrana após a ativação (BABIOR, 1999; EL-BENNA et al., 2016).

Vários agentes não são capazes de ativar a NOX2 *per se*, mas potencializam a ativação induzida por um estímulo secundário, desta forma, indicando a presença de estados intermediários de ativação da NOX2 e não apenas o estado de repouso ou ativado (FIGURA 6). Essa etapa intermediária de “reforço” foi referida como estado “preparado” (*priming*) (HALLETT; LLOYDS, 1995; EL-BENNA; DANG; GOUGEROT-POCIDALO, 2008). O estado *priming* prepara a NOX2 para uma ativação mais forte, é um estado “pronto para ir”, em que ocorre o aumento na produção de ERO mais rapidamente e excessivamente após estímulo subsequente, como quimioatraentes e patógenos. O *priming* da NOX2 contribui para uma eliminação rápida e eficiente dos patógenos, entretanto, também pode promover a geração de grande quantidade de ERO tóxica por hiperativação da NOX2, o que pode causar danos aos tecidos e participar da inflamação. Portanto, o *priming* e ativação da NOX2 devem ser rigorosamente reguladas (EL-BENNA et al., 2016).

No DM ocorre o *priming* da NOX2 nos neutrófilos, o que pode ser devido a própria hiperglicemia (LAWSON et al., 2002), AGE (WONG et al., 2002) ou hiperlipidemia (MAZOR et al., 2008), aumentando o estresse oxidativo que é, em parte, responsável pelas complicações diabéticas (OMORI et al., 2008). Além disso, citocinas pró-inflamatórias também estão envolvidas no *priming* de neutrófilos, como fator de necrose tumoral α (TNF α) e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (EL-BENNA et al., 2016).

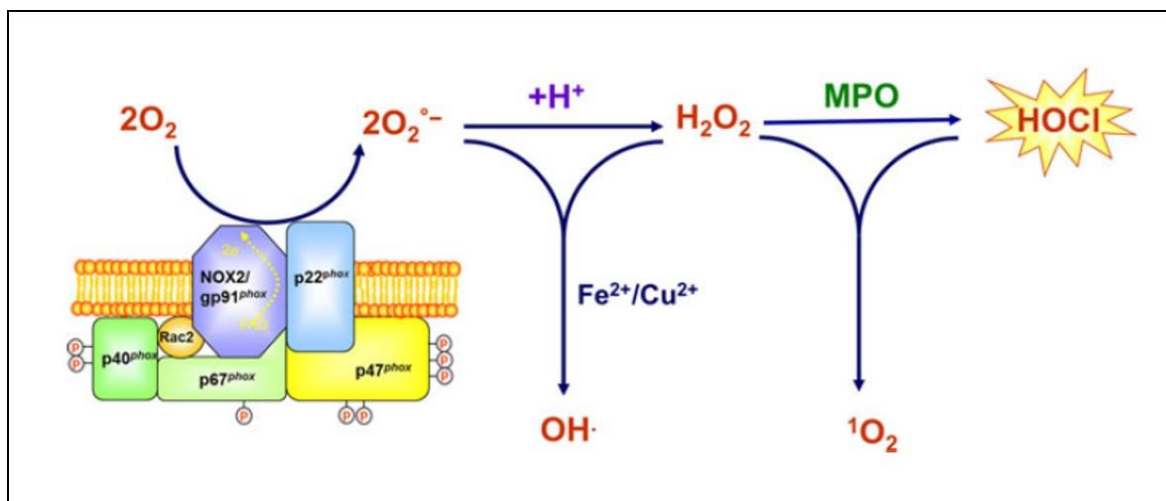
A ativação de NOX2 gera $O_2^{\bullet-}$ e esse radical tem pouca atividade microbicida, entretanto, origina ERO mais potentes, como o H_2O_2 , ácido hipocloroso ($HOCl$), $OH^{\bullet}$ e oxigênio singlete (1O_2), que podem ser devastadoras para microrganismos invasores (FIGURA 7) (BOGDAN et al., 2000; BABIOR, 2002; BEDARD; KRAUSE, 2007).

Figura 6 – Sistema NOX2 de neutrófilos, em repouso, “preparado” e ativado.



No estado em repouso (*resting*), os componentes da NOX2 estão dissociados entre membrana (gp91^{phox} e p22^{phox}) e o citosol (p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox}, Rac2). O “preparo” (*priming*) induz várias alterações, como translocação dos componentes citosólicos, fosforilação parcial da p47^{phox} e alterações conformacionais. A ativação (*activation*) induz a rápida montagem do complexo, com geração de $O_2^{\bullet-}$. Phox: oxidase fagocítica. Fonte: EL-BENNA et al., 2016.

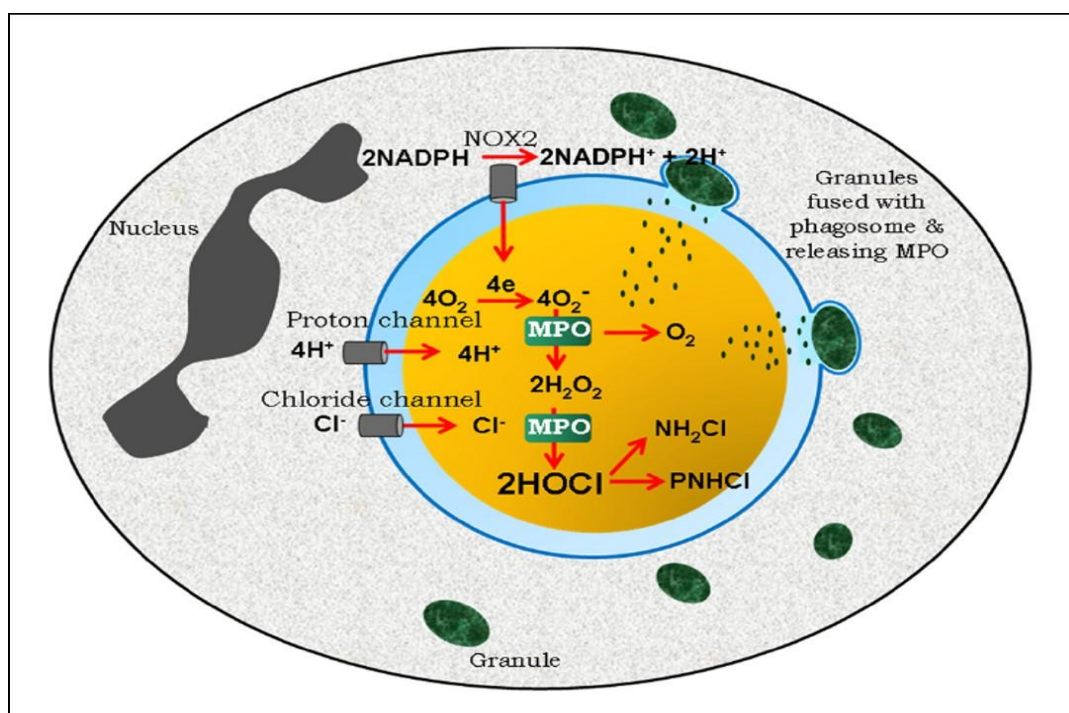
Figura 7 – *Burst* oxidativo.



A NOX2 ativada utiliza o NADPH citosólico para transferir elétrons via FAD para o O_2 e gerar $O_2^{\bullet-}$. O $O_2^{\bullet-}$ pode reagir com prótons e gerar H_2O_2 , o qual é utilizado pela MPO para produzir $HOCl/OCl^-$. O $O_2^{\bullet-}$ pode reagir com H_2O_2 e gerar $OH^{\bullet}$, essa reação pode ocorrer na presença de H_2O_2 e metais tais como Fe^{2+} ou Cu^{2+} . A reação do H_2O_2 com hipoclorito (OCl^-) pode originar o 1O_2 . Fonte: EL-BENNA et al., 2016.

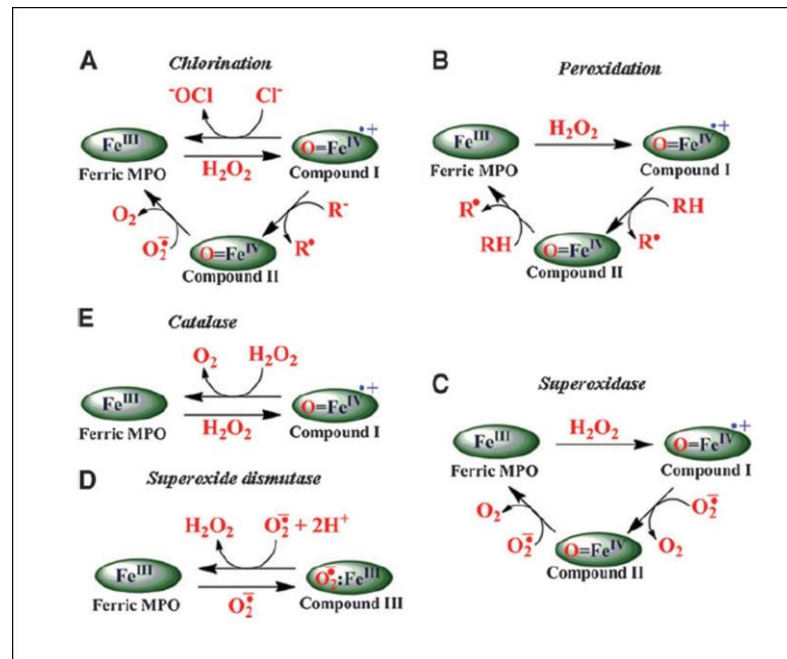
O HOCl/OCl^- tem sido usualmente descrito como a espécie reativa responsável pela morte celular bacteriana mediada pelos neutrófilos (RAYNER; LOVE; HAWKINS, 2014). A dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$, espontaneamente ou pela catálise da SOD e/ou MPO (via MPO III), forma o H_2O_2 . A MPO na presença de H_2O_2 catalisa a oxidação do cloreto (Cl^-) e gera HOCl/OCl^- , o qual interage com microrganismos ou com as proteínas dos neutrófilos para produzir cloraminas citotóxicas (FIGURAS 7 e 8) (KLEBANOFF et al., 2013). A MPO é liberada nos compartimentos fagossomais e no meio extracelular por polimorfonucleares como neutrófilos, monócitos e alguns tipos de macrófagos teciduais (RAYNER; LOVE; HAWKINS, 2014). Além da atividade clorinante (geração de HOCl/OCl^-) a MPO catalisa outras reações utilizando como substratos H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ e compostos orgânicos (FIGURA 9) (WINTERBOURN; KETTLE, 2013).

Figura 8 – Sistema antimicrobiano mediado pela MPO.



A ativação da NOX2 transfere elétrons do NADPH citoplasmático (cinza) ao oxigênio molecular dissolvido no fagossomo (azul). Um canal de prótons permite simultaneamente a transferência de H^+ para equilibrar a carga e fornecer prótons para as reações seguintes. Os grânulos (verde) contendo MPO fundem com o fagossomo e liberam seus conteúdos. A MPO reage com o $\text{O}_2^{\cdot-}$, gerado pela NOX2, causando sua dismutação e formando H_2O_2 . O cloreto está disponível para o fagossomo devido a uma combinação de pinocitose durante a fagocitose e o transporte por meio de um ou mais canais de cloro. A MPO então catalisa a oxidação para formar HOCl/OCl^- , o qual reage com a bactéria (amarelo) ou com as proteínas de neutrófilos para produzir cloraminas citotóxicas. Fonte: KLEBANOFF et al., 2013.

Figura 9 – Ciclos catalíticos da MPO.



(A) Atividade de cloração (B) Atividade de peroxidação (C) Atividade de superóxido dismutase (D) Atividade de superóxido dismutase (E) Atividade de catalase. Fonte: WINTERBOURN; KETTLE, 2013.

No DM existem relatos conflitantes sobre a produção de ERO por neutrófilos, pois alguns estudos demonstram que a geração de ERO é prejudicada e/ou diminuída, resultando na atenuação da defesa do hospedeiro (ALBA-LOUREIRO et al., 2006; DAOUD et al., 2009; FERREIRA et al., 2012). Mas, outros estudos mostram que a hiperglicemia ocasiona o aumento da geração de ERO pelos neutrófilos, contribuindo para o estresse oxidativo e não necessariamente no *killing* de microrganismos (MARIN et al., 2011; RAYNER; LOVE; HAWKINS, 2014).

A infecção em indivíduos diabéticos é uma importante causa de morbidade e mortalidade. No DM, existem alterações das funções neutrofílicas que contribuem para a elevada incidência e gravidade de infecções (ALBA-LOUREIRO et al., 2006; HOTAMISLIGIL, 2006). As investigações clínicas em pacientes diabéticos e estudos em modelos experimentais com ratos e camundongos diabéticos demonstraram prejuízos consistentes na quimiotaxia de neutrófilos, atividade fagocítica e microbicida (ALBA-LOUREIRO et al., 2007; FERREIRA et al., 2012). Ferreira et al. (2012) evidenciaram que em ratos diabéticos as funções fagocíticas (candidida) de neutrófilos estão prejudicadas devido à hiperglicemia, com diminuição na atividade de MPO, e, portanto, com prejuízos na sua função microbicida. Além disso, os AGE podem levar a uma estimulação prolongada dos neutrófilos, reduzindo sua capacidade de responder a estímulos fisiológicos (COLLISON et

al., 2002). E ainda, os neutrófilos podem ser aprisionados na matriz glicada dos tecidos, no processo de glicação proteica, resultado em uma diminuição da capacidade de quimiotaxia (HU et al., 2015).

Embora não exista dúvida de que o HOCl/OCl⁻ produzido pela MPO é essencial para a morte microbiana e inativação viral, esta espécie reativa também tem sido implicada na mediação de danos oxidativos dos tecidos e na disfunção celular (RAYNER; LOVE; HAWKINS, 2014). Os oxidantes gerados pela MPO são capazes de promover disfunção endotelial ocasionando vários danos vasculares, portanto, elevados níveis de MPO e HOCl/OCl⁻ podem ser indicativos de aumento no risco de distúrbios cardiovasculares (PODREZ; ABU-SOUD; HAZEN, 2000; BRENNAN; HAZEN, 2003; STOCKER et al., 2017). Estudos demonstraram que os níveis plasmáticos de MPO estão associados à incidência de doença arterial coronariana em pacientes diabéticos e a hiperglicemia pode intensificar essa associação (WIERSMA et al., 2008; SONG et al., 2015).

Além disso, a hiperglicemia pode ocasionar a ativação dos neutrófilos pelo estímulo constante da PKC, resultando em um aumento da atividade de NOX2 e consequentemente maior produção de O₂^{•-}, que são liberados nos fagossomos e também no meio extracelular (KARIMA et al., 2005; YANO et al. 2012). A quantidade e a funcionalidade dos neutrófilos não é apenas destrutiva para os microrganismos invasores, mas também as células do hospedeiro. Assim, a migração dos neutrófilos deve ser rigorosamente controlada, embora alguns danos aos tecidos do hospedeiro sejam inevitáveis durante a infecção, os neutrófilos devem ser removidos antes que tenham efeitos sérios e prejudiciais nos tecidos inflamados (AMULIC et al., 2012).

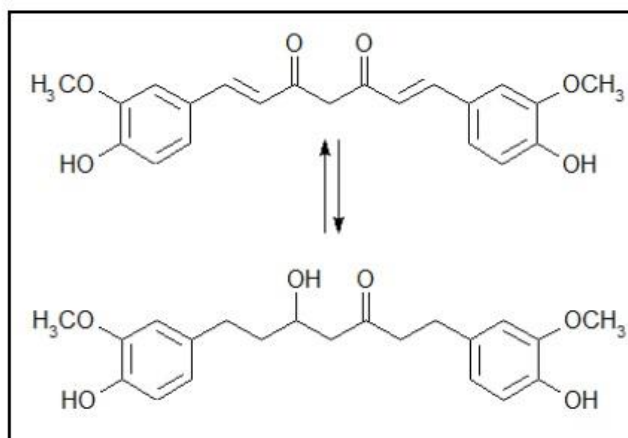
Diante do exposto, torna-se importante uma estratégia terapêutica direcionada para modular o estresse glico-oxidativo, bem como, os parâmetros da função neutrófilica, e que pode contribuir no auxílio da diminuição da morbidade e mortalidade do DM, o que aponta para associação da curcumina e um agente antiglicante uma estratégia em potencial.

1.2.4 Curcumina

A curcumina é um pigmento amarelo natural isolado do rizoma comestível do açafrão-da-terra (*Curcuma longa* L.), é um polifenol e o principal curcuminóide pertencente à cúrcuma. Quimicamente a curcumina é uma diferuloilmetano (1,7-bis (4-hidroxi-3-methoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona)) (FIGURA 10), possui dois anéis aromáticos ligados por dois grupos carbonilas, conferindo características lipofílicas a molécula e

consequentemente baixa solubidade em água (GOWTHAMARAJAN et al., 2015; GHOSH; BANERJEE; SIL, 2015).

Figura 10 - Estruturas moleculares da curcumina em equilíbrio ceto-enólico



Fonte: ZHANG et al., 2013

Devido as suas inúmeras propriedades benéficas, tais como antioxidante, antidiabética, anticancerígena, anti-inflamatória e antibacteriana, ela tem sido estudada como uma opção promissora para o tratamento de diversas doenças (AGGARWAL; SUNG, 2008; GUTIERRES et al., 2012; LI et al., 2013; LIU et al., 2015; ASSIS et al., 2017). O desenvolvimento de terapias que empregam produtos naturais para prevenir ou melhorar complicações relacionadas às doenças tem recebido destaque, uma vez que esses produtos são amplamente consumidos pela população e em geral não apresentam efeitos adversos.

Em relação ao DM, o efeito da curcumina sobre a glicemia foi relatado pela primeira vez em 1972 (SRINIVASAN, 1972) e desde então seus efeitos e/ou mecanismos de ação têm sido amplamente estudados na fisiopatologia do DM, com diversos benefícios demonstrados na redução da hiperlipidemia, resistência à insulina, estresse glico-oxidativo, entre outros, e desta forma surge como uma opção promissora para prevenir as complicações da doença (ZHANG et al., 2013; MOHAMMED; ISLAM, 2018). A curcumina é capaz de reduzir a hiperglicemia por diversos mecanismos: aumento da secreção de insulina via estimulação direta da atividade elétrica das células beta pancreáticas (BEST; ELLIOT; BROWN, 2007) e via aumento da expressão e atividade da heme oxigenase 1 em ilhotas de Langerhans (ABDEL-AZIZ et al., 2010); aumento na ativação (fosforilação em serina-473) da Akt, um intermediário da sinalização da insulina, aumento na translocação dos transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT 4) e diminuição da intolerância à glicose em músculos esqueléticos (GUTIERRES et al., 2015); aumento da captação de glicose pela musculatura esquelética, via

ativação das vias proteína quinase dependente adenosina monofosfato (AMPK) e MAPK p38 (KIM et al., 2010); inibição da produção hepática de glicose via gliconeogênese (FUJIWARA et al., 2008); e aumento na sensibilidade periférica ao hormônio (SHAO et al., 2012).

Apesar das várias atividades atribuídas a curcumina, quando administrada por via oral, ela apresenta baixa absorção, distribuição tecidual limitada, meia-vida curta e rápida velocidade de biotransformação no fígado e intestino, seguida de rápida excreção, sendo um fator limitante para aprovação clínica (PAN et al., 1999; VAREED; KAKARALA; RUFFIN, 2008; GHOSH; BANERJEE; SIL, 2015). Portanto, a baixa biodisponibilidade da curcumina é um dos principais obstáculos em alcançar níveis circulantes adequados às suas ações farmacodinâmicas, e consequentemente, atingir eficácia terapêutica. Em função disso, várias estratégias têm sido empregadas, como o uso de nanopartículas (SHAIK et al., 2009), lipossomas (CHEN C. et al., 2009), micelas (LETCHFORD; LIGGINS; BURT, 2007), complexos de fosfolípidos (MAITI et al., 2007) e associação com adjuvantes que possuem atividade de *bioenhancer*, tal como a piperina (SHOBA et al., 1998; MOORTHY; KATHIRESAN, 2013).

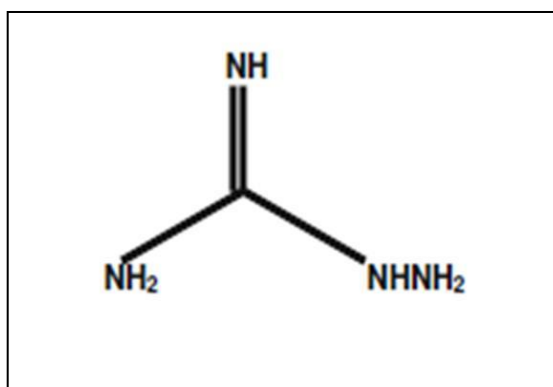
Trabalhos do laboratório tem demonstrado a associação do potencial antidiabético da curcumina e a possibilidade do uso do iogurte como veículo para a administração de fitoterápicos. Gutierrez et al. (2012) demonstraram que o tratamento de ratos diabéticos durante 31 dias com iogurte enriquecido com 90 mg/kg de curcumina foi capaz de promover redução na ingestão alimentar, ingestão hídrica e no volume urinário, redução da hiperglicemia, hipertrigliceridemia e das atividades das enzimas aspartato (AST) e alanina (ALT) aminotransferases, redução de glicosúria, ureia urinária e proteinúria, e aumento no conteúdo de glicogênio hepático. Um dos mecanismos pelos quais a curcumina possui efeito antihiperglicêmico parece estar relacionado ao aumento na captação de glicose, uma vez que ratos diabéticos tratados com curcumina em iogurte e submetidos à sobrecarga oral de glicose apresentaram maior eficiência na redução da hiperglicemia e aumento na translocação de GLUT 4 para a membrana plasmática da musculatura esquelética, associado ao aumento na ativação (fosforilação em serina-473) de Akt (GUTIERRES et al., 2015). O tratamento de ratos diabéticos com iogurte enriquecido com 90 mg/kg de curcumina durante 45 ou 50 dias também diminuiu o estresse oxidativo hepático, com redução nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, marcador de LPO) e de PCO e aumento nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px no fígado, em relação aos ratos diabéticos tratados somente com iogurte (ARCARO et al., 2014; ASSIS et al., 2017).

Também tem sido demonstrado que a curcumina tem a capacidade de diminuir o estresse glico-oxidativo por influenciar nas etapas de formação de AGE (sequestro de metilglioxal e eliminação de ERO), em modelos *in vivo* e *in vitro*, e também nos eventos desencadeados pelos AGE, tais como a regulação diferencial da expressão gênica de dois receptores de AGE, sendo o receptor RAGE inibido e o receptor AGE-R1 estimulado, em células estreladas hepáticas (TANG; CHEN, 2014; ALIZADEH; KHEIROURI, 2019). Tem sido também observada a prevenção do acúmulo de AGE no colágeno (WU et al., 2011; HU et al., 2012) e no coração (YU et al., 2012) de ratos diabéticos tratados com curcumina.

1.2.5 Aminoguanidina

Em modelos *in vivo* (LUO; FAN; XU, 2012; LV et al., 2018) e *in vitro* (JOGLEKAR; PANASKAR; ARVINDEKAR, 2014; LIU et al., 2018), um dos agentes mais eficientes utilizados para prevenir a formação dos AGE é a aminoguanidina (ou Pimagedina). A aminoguanidina possui dois grupos principais: o grupo hidrazina nucleofílico e o grupo guanidina (FIGURA 11), que conferem alta reatividade a molécula, e reduz a formação dos AGE, principalmente direcionada a compostos α,β -dicarbonilas (THORNALLEY, 2003; BORG; FORBES, 2016).

Figura 11 - Estrutura molecular da aminoguanidina



Fonte: SLIMAN et al., 2010.

A aminoguanidina inibe a formação de AGE principalmente por capturar compostos reativos intermediários dicarbonílicos, tais como metilglioxal, glioxal e 3-desoxiglicosona (FIGURA 5) (GIARDINO et al., 1998; THORNALLEY, 2003; ENGELN; STEHOUWER; SCHALKWIJK, 2013), no entanto, esse efeito *in vivo* pode ser limitado, devido a sua rápida eliminação renal (THORNALLEY, 2003). Outra atividade conhecida da aminoguanidina é a

sua capacidade de inibir a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (THORNALLEY, 2003; SONG et al., 2017).

Brownlee et al. (1986) demonstraram pela primeira vez o efeito preventivo da aminoguanidina na formação dos AGE em animais diabéticos, uma vez que atenuou a geração de AGE fluorescentes e a formação de ligações cruzadas das proteínas do tecido conjuntivo da parede arterial. Após esse relato, a aminoguanidina tem sido utilizada para prevenir a formação de AGE *in vivo* e *in vitro* e demonstra sua importância e envolvimento dos AGE em muitas doenças (THORNALLEY, 2003; EMEL'YANOV, 2017).

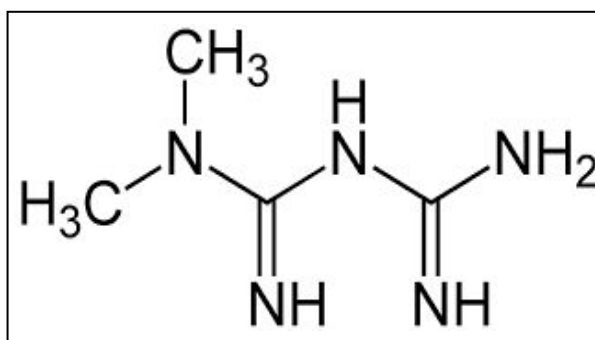
A administração de aminoguanidina limita as alterações estruturais e prejuízos funcionais nos tecidos (GOH; COOPER, 2008). Em sentido oposto aos estudos que mostraram efeito nefrotóxico da aminoguanidina (PHILIS-TSIMIKAS et al., 1995; SKAMURAUSKAS; MCKAY; HUNT, 1996), Soulis et al. (1997) demonstraram que ela foi capaz de impedir a formação de AGE fluorescentes no rim e o desenvolvimento de albuminúria em ratos diabéticos; Ferreira et al. (2016) mostraram que o tratamento de ratos diabéticos com aminoguanidina reduziu os danos renais, eles observaram redução nos níveis séricos de ureia e efeito protetor da aminoguanidina no dano glomerular, inflamação e espessamento da membrana basal (avaliado por análise histológica qualitativa); e ainda, Lv et al. (2018) demonstraram que o tratamento de ratos diabéticos com aminoguanidina e/ou *Panax notoginseng* reduziu as alterações patológicas renais observadas no grupo de animais diabéticos não tratados, bem como o volume glomerular, creatinina sérica e proteína urinária de 24 horas. Além disso, a aminoguanidina é capaz de atenuar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (THOMAS et al., 2005) e retinopatia (LUO; FAN; XU, 2012). Nico et al. (2013) observaram que a aminoguanidina não é hepatotóxica, quando utilizada em dose de 1 mg/mL para o tratamento de complicações decorrentes do DM, e confirmou que a associação da aminoguanidina com a prática de exercício físico moderado ameniza os danos causados pelo DM, mesmo sem a utilização de insulina.

A aminoguanidina também pode atuar como antioxidante, eliminando radicais OH^{*}, inibindo a LPO e aumentando a atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GSH-Px) (SLIMAN et al., 2010; KARLI et al., 2012; ORMAN et al., 2015). Contudo, a aminoguanidina foi capaz de aumentar o *pool* de ERO e a capacidade microbicida de neutrófilos de ratos diabéticos e não diabéticos (FERREIRA et al., 2016).

A aminoguanidina é um potente inibidor da formação de AGE e é o mais frequentemente utilizado em experimentos como agente antiglicante padrão, no entanto, existem outros compostos, que também possuem a capacidade de inibir a formação de AGE,

como a metformina, vitaminas B e seus derivados sintéticos, compostos polifenóis vegetais (resveratrol, curcumina, ácido gálico, etc), entre outros (ENGELN; STEHOUWER; SCHALKWIJK, 2013; EMEL'YANOV, 2017). A metformina (dimetilbiguanida) (FIGURA 12) é um derivado da guanidina e devido sua semelhança estrutural com a aminoguanidina, foi proposto que a metformina detoxifica os intermediários dicarbonílos de maneira semelhante à aminoguanidina, consequentemente impedindo a formação de AGE (BONNEFONT-ROUSSELOT et al.; 2003; ENGELN; STEHOUWER; SCHALKWIJK, 2013).

Figura 12 - Estrutura molecular da metformina.



Fonte: BEISSWEIGER et al., 2003.

Dentre as alternativas para terapia combinada aplicáveis ao DM e como exposto acima a curcumina e a aminoguanidina (ou metformina) são interessantes nessa prospecção.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento de ratos diabéticos com curcumina e/ou aminoguanidina incorporadas no iogurte e as alterações em biomarcadores metabólicos, do estresse glicoxidativo e na modulação de parâmetros da função neutrofílica.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos antidiabético e antioxidante da curcumina e/ou aminoguanidina;
- Avaliar os níveis de biomarcadores no sangue relacionados ao metabolismo de carboidratos e lipídeos (glicose, HbA1c, frutossamina, TAG, colesterol total, colesterol-HDL e colesterol-não HDL) e da integridade hepática (ALT, AST e ALP);
- Avaliar os níveis de proteína na urina (proteinúria);
- Avaliar os níveis de TBARS no plasma e homogenatos de fígado e rim;
- Avaliar os níveis de PCO no plasma e homogenatos de fígado e rim;
- Avaliar os níveis de AGE fluorescentes no plasma e homogenatos de fígado e rim;
- Avaliar a atividade de PON1 no plasma;
- Avaliar os níveis de grupos tióis não proteicos nos homogenatos de fígado e rim;
- Avaliar as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GSH-Px e glutathiona redutase (GSH-Rd) nos homogenatos de fígado e rim;
- Avaliar os níveis proteicos de RAGE, NF- κ B e dos detoxificadores de AGE: AGE-R1 e GLO 1 no fígado e rim;
- Avaliar as atividades de NOX2 e MPO em neutrófilos de exsudato peritoneal.

Os resultados relevantes alcançados com a associação de curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina na função neutrofílica, eliciu o interesse na investigação do tratamento com a metformina e sua associação com a curcumina em parâmetros da função neutrofílica, uma vez que, a metformina (dimetilbiguanida) e a aminoguanidina (guanidina) possuem semelhança estrutural, e a metformina é um fármaco muito utilizado no tratamento do DM. Além disso, em trabalho do laboratório, Roxo et al. (2019) desmonstraram a importância da associação curcumina e metformina na recuperação de alterações de biomarcadores

plasmáticos observadas no modelo de DM estreptozotocínico. Portanto, ainda tivemos como objetivos específicos:

- Avaliar os efeitos dos tratamentos com curcumina e/ou metformina na função neutrofílica;
- Avaliar os níveis de biomarcadores no sangue relacionados ao metabolismo de carboidrato (glicose e HbA1c);
- Avaliar as atividades de NOX2 e MPO em neutrófilos de exsudato peritoneal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar, com peso de 150 ± 10 g, provenientes do Biotério Central do Câmpus de Botucatu, UNESP. Os animais permaneceram no Biotério do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP e foram mantidos em caixas de polietileno em ambiente com temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade ($55 \pm 5\%$) controladas, com ciclo de luz (12 horas). Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP, Câmpus de Araraquara/SP (CEUA/FCF/CAr nº 25/2016, Anexo I).

3.2 Indução do diabetes mellitus experimental

Os animais foram submetidos a jejum de 12 horas para indução do DM. O DM foi induzido com a administração intravenosa (jugular) de 40 mg de STZ/kg peso corporal, solubilizada em tampão citrato (10 mmol/L, pH 4,5). Para realizar a administração de STZ na veia jugular, os animais foram anestesiados com isoflurano (anestésico volátil). Em paralelo aos animais diabéticos, foi conduzido um grupo de animais normais, não diabéticos, que foram submetidos aos mesmos procedimentos, porém, recebendo somente tampão citrato.

Três dias após a administração de STZ, os animais foram pareados utilizando-se a glicemia e o peso corporal, cujos valores médios apresentaram a melhor semelhança possível.

3.3 Tratamento dos animais diabéticos com curcumina e/ou aminoguanidina incorporadas em iogurte

A dose de curcumina (76%, Sigma Aldrich - C1386) utilizada no tratamento foi de 90 mg/kg, a mesma que promoveu respostas efetivas em relação às atividades antidiabética e antioxidante em ratos (GUTIERRES et al., 2012; ARCARO et al., 2014; GUTIERRES et al., 2015; ASSIS et al., 2017). Analogamente, a dose de aminoguanidina (97%, Sigma Aldrich - 109266) foi de 50 ou 100 mg/kg (CHANG et al., 2006; FERREIRA et al., 2012; VADLA; VELLAICHAMY, 2013). Ambos os compostos foram administrados em iogurte, isolados ou combinados.

Os grupos de animais conduzidos nos experimentos foram:

- ✓ Não diabético, tratado com iogurte (NIOG);
- ✓ Diabético tratado com iogurte (DIOG);
- ✓ Diabético tratado com 4 U/dia de insulina (DINS);
- ✓ Diabético tratado com 90 mg/kg de curcumina em iogurte (DC);
- ✓ Diabético tratado com 50 mg/kg de aminoguanidina em iogurte (DA-50);
- ✓ Diabético tratado com 100 mg/kg de aminoguanidina em iogurte (DA-100);
- ✓ Diabético tratado com 90 mg/kg de curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina em iogurte (DCA-50);
- ✓ Diabético tratado com 90 mg/kg de curcumina e 100 mg/kg de aminoguanidina em iogurte (DCA-100).

Os grupos receberam duas vezes ao dia, via gavagem, 0,5 mL de iogurte natural Nestle®, sozinho e com o(s) respectivo(s) composto(s) incorporado(s), nos períodos matutino (8:00 h) e vespertino (17:00 h), durante todo período experimental (45 dias) (ARCARO et al., 2014).

Animais que receberam curcumina foram tratados com iogurte enriquecido com 45 mg/kg de curcumina, duas vezes ao dia. Animais tratados com aminoguanidina também receberam o composto duas vezes ao dia, 25 mg/kg (dose de 50 mg/kg) e 50 mg/kg (dose de 100 mg/kg).

A insulina (4U/animal, Humolin®) foi preparada em solução de NaCl 0,85% e administrada por via subcutânea, em duas doses diárias de 2U/animal, perfazendo 4 U/dia/animal.

O peso corporal foi avaliado semanalmente e a glicemia a cada 15 dias. Após 40 dias de tratamento os animais foram transferidos para gaiolas metabólicas individuais, onde permaneceram durante três dias para adaptação, recebendo água e ração “*ad libitum*” e no 43º dia foi realizada a coleta de urina (24h); para tal procedimento, foi colocado frasco coletor limpo, seco e contendo tolueno. Posteriormente foi realizada a determinação do volume urinário e quantificação de proteína na urina.

Ao final dos 45 dias de tratamento os animais foram eutanasiados por decapitação para a retirada do sangue e obtenção do plasma para monitoramento dos parâmetros bioquímicos, biomarcadores de lesão glico-oxidativa e enzima antioxidante. Também foram removidos fígado e rins para o monitoramento dos biomarcadores de lesão glico-oxidativa,

defesas antioxidantes, componentes relacionados a sinalização dos AGE e detoxificadores de AGE. A função neutrofílica foi investigada em neutrófilos do exsudato peritoneal.

3.4 Tratamento dos animais diabéticos com curcumina e/ou metformina incorporadas em iogurte

Os tratamentos foram realizados conforme já descritos no item 3.3. A dose de curcumina também foi de 90 mg/kg e a de metformina (99,56%, Gemini Indústria de Insumos Farmacêuticos Ltda, Brasil) foi de 250 mg/kg (ROXO et al., 2019).

Os grupos de animais conduzidos nos experimentos foram:

- ✓ Não diabético, tratado com iogurte (NIOG);
- ✓ Diabético tratado com iogurte (DIOG);
- ✓ Diabético tratado com 4 U/dia de insulina (DINS);
- ✓ Diabético tratado com 90 mg/kg de curcumina em iogurte (DC);
- ✓ Diabético tratado com 250 mg/kg de metformina em iogurte (DMET);
- ✓ Diabético tratado com 90 mg/kg de curcumina e 250 mg/kg de metformina em iogurte (DCMET).

Assim como já descrito (item 3.3), os animais tratados com metformina também receberam o composto duas vezes ao dia, 125 mg/kg em cada vez.

A glicemia foi avaliada no dia 0 (pareamento) e no dia 45 (final do período experimental). Ao final dos 45 dias de tratamentos, após a eutanásia, foi monitorado a HbA1c e a função neutrofílica.

3.5 Determinações bioquímicas

As concentrações plasmáticas de glicose, TAG, colesterol total, colesterol-HDL, ALT, AST e ALP foram realizadas utilizando kits comerciais da Vitros Chemistry Products (Ortho Clinical Diagnostics), e a frutossamina e a proteína urinária (proteinúria) por kits comerciais da Labtest.

Os níveis de HbA1c em sangue total foram determinados por HPLC no experimento curcumina e/ou aminoguanidina pelo equipamento da Bio-Rad e no experimento curcumina e/ou metformina pelo equipamento Premier Hb9210.

Os níveis de colesterol-não HDL foram estimados utilizando a fórmula:

$$\text{Colesterol-não HDL} = \text{Colesterol total} - \text{colesterol-HDL}.$$

3.6 Avaliação da peroxidação lipídica

Amostras de fígado e rim (0,25 g) foram homogeneizadas em 1 mL de cloreto de potássio 1,15%. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g por 10 min a 4°C e os sobrenadantes utilizados para as análises. As amostras (plasma, sobrenadantes de fígado e rim) foram desproteinizadas com ácido perclórico 10%, de acordo com Pilz et al. (2000). Produtos finais de peroxidação lipídica, incluindo MDA, foram determinados usando a reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (KOHN; LIVERSEDGE, 1944). Os níveis de TBARS foram medidos espectrofotometricamente a 535 nm (fígado e rim) ou fluorimetricamente (plasma) nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 510 nm e 553 nm, respectivamente. Foi constituída uma curva analítica e o 1,1'3,3'-tetrametoxipropano foi utilizado como padrão. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ (plasma) e em nmol/g de tecido (fígado e rim).

3.7 Quantificação de grupos carbonilas de proteínas

Os níveis PCO no plasma, fígado e rim foram determinados de acordo com o método descrito por Levine et al. (1994). As amostras de fígado e rim (0,2 g) foram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 6,7. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g por 10 min a 4°C e os sobrenadantes utilizados para as análises. Os grupos carbonilas presentes nas proteínas reagem com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) formando 2,4-dinitrofenilhidrazona, que absorve luz em 370 nm. A concentração de PCO foi obtida utilizando o coeficiente de extinção molar da hidrazona ($22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (LEVINE et al. 1994) e expressa em nmol de PCO/mg de proteína.

3.8 Quantificação de nitrato e nitrito (óxido nítrico)

A estimativa de níveis plasmáticos de NO foi realizada por método indireto, uma vez que o NO apresenta meia-vida muito curta na presença de O_2 e outras moléculas *scavenger*. Portanto, a quantificação dos seus produtos finais estáveis das vias de oxidação, nitrato e nitrito são frequentemente avaliadas como um índice de produção sistêmica de NO. Além

disso, o nitrato é mais abundante que o nitrito nos fluidos corporais (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001; GIUSTARINI et al., 2008).

A utilização do reagente de Griess é o método mais comum utilizado para a determinação do nitrito, que consiste, na reação direta e específica do nitrito com a sulfanilamida em condições ácidas e é revelado após a diazotização com o N-(1-naftil) etilenodiamina (NED). O nitrato também pode ser medido por esse método, contudo é necessário sua redução à nitrito, por redução metálica ou enzimática (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001; GIUSTARINI et al., 2008).

Desta forma os níveis plasmáticos de nitrato e nitrito total (NO_x) foram determinados de acordo com o método descrito por Miranda; Espey; Wink (2001), com modificações. O plasma foi desproteinizado pela adição de 70 mM de acetato de zinco, posteriormente foi centrifugado a 10.000 g por 15 min a 4°. Os sobrenadantes foram incubados com 17 mM de cloreto de vanádio III (VCl₃) e o reagente de Griess (0,33% de sulfanilamida em 0,8% de HCl e 0,017 mM de NED), à 37°C durante 30 min. Os tubos foram centrifugados à 10.000 g por 2 min a temperatura ambiente. Os níveis de NO_x foram medidos no sobrenadante espectrofotometricamente a 540 nm. Foi constituída uma curva analítica e o nitrato foi utilizado como padrão. Os resultados foram expressos em µmol/L.

3.9 Atividade de paraoxonase 1

A atividade de PON1 foi determinada no plasma via hidrólise de paraoxon e liberação de *p*-nitrofenol, de acordo com Costa et al. (1990) e modificações segundo Assis et al. (2017). A mistura de ensaio consistiu de plasma em tampão Tris-HCl (15 mM), pH 8,5, contendo 0,15 mM de CaCl₂, 0,3 M de NaCl e 1,2 mM de paraoxon. O ensaio foi realizado a 37°C e iniciado pela adição de paraoxon. A atividade foi monitorada pela variação da absorbância/min a 405 nm por 5 min. Os resultados foram calculados assumindo o coeficiente de extinção molar de *p*-nitrofenol (18.000 M⁻¹.cm⁻¹) (RICHTER; JARVIK; FURLONG, 2008). A atividade da PON1 foi expressa em unidades/litro (unidade = µmol paraoxon hidrolisado/min).

3.10 Determinação da concentração de grupos tióis não proteicos

A concentração de grupos tióis não proteicos é uma medida indireta dos níveis de GSH, e foi determinada de acordo com Sedlak; Lindsay (1968), em função da redução do ácido 5,5-ditio-2-nitrobenzoico (DTNB), monitorado espectrofotometricamente em 412 nm.

Os resultados foram expressos em mmol de grupos tióis não proteicos/mg de tecido (fígado e rim).

3.11 Atividade de enzimas antioxidantes em fígado e rim

3.11.1 Preparo das amostras

Amostras de fígado e rim (0,1 g) foram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato de sódio (10 mM), pH 7,4. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g por 10 min a 4°C e os sobrenadantes utilizados para as análises das atividades de SOD, CAT, GSH-Px e GSH-Rd.

3.11.2 Atividade da superóxido dismutase

A atividade de SOD foi determinada de acordo com Beauchamp e Fridovich (1971), cuja oxidação da xantina gera o $O_2^{\cdot-}$ pela ação catalítica da xantina oxidase, o qual reduz o *nitroblue tetrazolium* (NBT) a uma formazana. Na presença de SOD ocorre inibição da redução do NBT, monitorada em 550 nm. Os resultados foram expressos como U/mg de proteína. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução do NBT em 50 %.

3.11.3 Atividade da catalase

A atividade de CAT foi avaliada pelo consumo do H_2O_2 monitorado em 230 nm (BEERS; SIZER, 1952). Os resultados foram expressos como mmol de H_2O_2 consumido/min/mg de proteína.

3.11.4 Atividade da glutathiona peroxidase

Determinou-se a atividade da GSH-Px de acordo com o método descrito por Rush; Scandiford (2003). A GSH-Px catalisa a oxidação de GSH na presença de H_2O_2 . Na presença de glutathiona redutase (GSH-Rd), a glutathiona oxidada (GSSG) é reduzida à GSH com oxidação concomitante do NADPH à $NADP^+$. A oxidação do NADPH é monitorada pela

diminuição da absorbância em 340 nm. Os resultados foram expressos em mmol de NADPH consumido/min/mg de proteína.

3.11.5 Atividade da glutathione redutase

A atividade da GSH-Rd foi avaliada de acordo com Carlberg; Mannervik (1985) via mensuração da velocidade de oxidação do NADPH com a concomitante redução da GSSG a 25°C, monitorada espectrofotometricamente a 340 nm. Os resultados foram expressos em mmol de NADPH consumido/min/mg de proteína.

3.12 Estimativa dos produtos finais de glicação avançada

Os AGE totais foram estimados por fluorimetria conforme descrito por Zilin et al. (2001) e Pokupec et al. (2003), com modificações. Os homogenatos de fígado e rim foram preparados conforme item 3.11.1. No plasma e nos sobrenadantes dos homogenatos de fígado foram adicionados 1,21 M (plasma) e 2,42 M (fígado) de clorofórmio, 0,12 M de ácido tricloroacético e 0,1 M de NaOH; os tubos foram homogeneizados em vórtex e mantidos a 8-10°C durante 30 minutos e posteriormente centrifugados à 10.000 g durante 10 minutos a 10°C. Nos sobrenadantes dos homogenatos de rim foi adicionado 0,1 M de NaOH; os tubos foram homogeneizados em vórtex e centrifugados à 10.000 g durante 10 minutos a 10°C. Em seguida as amostras foram monitoradas em espectrofluorímetro (comprimentos de onda de excitação 370 nm e de emissão 440 nm). Os resultados foram expressos em Unidades Arbitrárias de fluorescência/mg de proteína (UA/mg proteína).

3.13 Dosagem de proteínas totais

As proteínas foram quantificadas no plasma e nos sobrenadantes dos homogenatos dos tecidos (fígado e rim) de acordo com o método de Lowry et al. (1951).

3.14 Western Blot

O fígado e rim foram homogeneizados (Polytron Omni TH01, Kennesaw, GA) em tampão gelado contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 24,1 mM de deoxicolato de sódio, 0,01% de SDS, 10 mM de pirofosfato

de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10,3 mM de ortovanadato de sódio, 1,5 μ M de aprotinina, 1 mM de fluoreto de fenilmetanossulfonil (PMSF) e 2,1 μ M de leupeptina. Os homogenatos foram centrifugados a 11.900 g a 4°C durante 30 minutos, e os sobrenadantes foram utilizados para a determinação dos níveis de proteína (LOWRY et al., 1951). Tampão de amostra (62,5 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 10% de glicerol, 2% de SDS, 33,3 mM de DTT e 0,01% de azul de bromofenol) foi adicionado aos sobrenadantes.

Amostras contendo de 30 - 50 μ g de proteína foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida/bisacrilamida de 10% a 12% (tempo de corrida de 30 minutos no gel de empilhamento, 60V e 1:30 horas no gel de separação, 120V em temperatura ambiente). Em seguida, as proteínas foram eletrotransferidas do gel para membranas de nitrocelulose (tempo de transferência de 3 horas, 0,35mA a 4°C). As membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos primários específicos descritos na Tabela 1. A ligação dos anticorpos primários foi detectada por anticorpos secundários conjugados com HRP peroxidase (Cell Signaling) (TABELA 1) e visualizada com substrato quimiluminescente (1,1 mM de sal sódico de luminol, 1,98 mM de ácido 4-iodofenilborônico e 5,3 mM de H₂O₂, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,6). As bandas quimiluminescentes foram capturadas pelo C-Digit Blot Scanner (LI-COR, Lincoln, NE) e as intensidades das bandas foram analisadas utilizando o LI-COR Image Studio 4.0.

Tabela 1 - Anticorpos primários e secundários, diluições e condições de armazenamento.

ANTICORPOS PRIMÁRIOS	Empresa	Código	Diluição	Condições de armazenamento
AGE-R1 (DDOST)	Abcam	ab151978	1:500	-20°C
GLO 1	Abcam	ab137098	1:1000	-20°C
NF- κ B	Abcam	ab16502	1:500	-20°C
RAGE	Abcam	ab3611	1:500	-20°C
Anti- β -actina (controle interno)	Cell Signaling	#5057	1:500	-20°C
ANTICORPOS SECUNDÁRIOS				
Anti-rabbit conjugado-HRP	Cell Signaling	#7074	1:1000	-20°C
Anti-mouse conjugado-HRP	Sigma-Aldrich	A5441	1:2000	-20°C

3.15 Recrutamento dos neutrófilos

O recrutamento dos neutrófilos foi realizado pela administração intraperitoneal prévia de 2 mL de caseinato de sódio 8% (diluído em NaCl 0,85%) e, após um período de 4 horas (pico de migração de neutrófilos para o peritônio), os animais foram eutanasiados e realizada a lavagem peritoneal com PBS estéril (tampão fosfato, 10 mM, pH 7,4, contendo 137 mM de NaCl e 2,7 mM de KCl); a suspensão foi submetida à hemólise com água gelada, para a eliminação dos eritrócitos, e a isotonicidade restabelecida com PBS estéril (FERREIRA et al., 2012; FERREIRA et al., 2016; com modificações). Após a lavagem, as células foram ressuspensas em PBS-D, pH 7,4 (tampão fosfato, contendo 137 mM NaCl, 2,7 mM de KCl, 1 mM de CaCl_2 , 0,5 mM de MgCl_2 e 1 mg/mL de glicose) e foram contadas em câmara de Neubauer utilizando líquido de Turk. A viabilidade celular foi avaliada com Azul de Tripán e para avaliação da morfologia celular as lâminas foram coradas pelo método MGG (May Grunwald e Giemsa) modificado por Rosenfeld (ROSENFELD, 1947). As células foram mantidas em banho de gelo até a realização dos ensaios.

3.16 Avaliação de parâmetros da função neutrofílica

3.16.1 Avaliação da atividade de mieloperoxidase

A formação de HOCl/OCl^- reflete a atividade de MPO e foi acompanhada por espectrofotometria baseada na formação de taurina cloramina resultante da reação de HOCl/OCl^- com taurina (KETTLE; WINTERBOURN, 1994). Neutrófilos ($2,0 \times 10^6$ células/mL) foram pré-incubados a 37°C durante 10 minutos em 10 mM de PBS-D, pH 7,4 contendo 10 mM de taurina. Em seguida, os neutrófilos foram estimulados pela adição de 0,1 μM de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) e incubados a 37°C durante 30 minutos; os neutrófilos também foram incubados na ausência de PMA. A reação foi interrompida pela adição de catalase (20 $\mu\text{g/mL}$) e centrifugada a 3800 g durante 5 minutos. A concentração de taurina cloramina presente no sobrenadante foi estimada pela oxidação do 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) a 630 nm (WOLF et al., 2017). Os resultados foram expressos em concentração de HOCl/OCl^- produzido, calculada a partir de uma curva padrão gerada com HOCl/OCl^- puro e submetido ao mesmo procedimento.

3.16.2 Avaliação da atividade do sistema NADPH oxidase fagocítico

A produção de $O_2^{\bullet-}$ pelo sistema NOX2 foi monitorada por quimiluminescência dependente de nitrato de bis-*N*-metil acridina (lucigenina) (JONES; HANCOCK, 1994) e pelo ensaio de redução do citocromo C (PUNCHARD, 1996).

3.16.2.1 Quimiluminescência dependente de lucigenina

As reações foram realizadas com neutrófilos ($3,0 \times 10^6$ células/mL) em 10 mM de PBS-D, pH 7,4 e 10 μ M de lucigenina. As reações foram iniciadas na ausência ou presença de 0,1 μ M de PMA e monitoradas por 60 minutos em luminômetro (Synergy 2, BioTeK) (JONES; HANCOCK, 1994). Os resultados foram expressos como emissão de luz integrada.

3.16.2.2 Ensaio de redução do citocromo C

O ensaio foi realizado com $2,0 \times 10^6$ células/mL, 10 μ M de citocromo C e 20 μ g/mL de catalase em 10 mM de PBS-D, pH 7,4. As reações foram mantidas a 37°C durante 10 minutos. A produção de $O_2^{\bullet-}$ foi iniciada pela adição de 0,1 μ M de PMA. Após a adição do estímulo a reação foi monitorada em espectrofotômetro, pela variação da absorbância/min a 550 nm durante 10 minutos (PUNCHARD, 1996). Os resultados foram expressos em μ moles de citocromo C reduzido, utilizando seu coeficiente de extinção molar ($29.500 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (VAN GELDER; SLATER, 1962).

3.16.3 Avaliação da produção de ERO proveniente do *burst* oxidativo. Quimiluminescência dependente de luminol.

A produção de ERO proveniente do *burst* oxidativo foi avaliada pelo monitoramento da intensidade de quimiluminescência resultante da oxidação do 5-amino-2,3-dihidro-1,4-phthalazinediona (luminol). As reações foram realizadas com neutrófilos ($2,0 \times 10^6$ células/mL) em 10 mM de PBS-D, pH 7,4 e 50 μ M de luminol. As reações foram iniciadas na ausência ou presença de 0,1 μ M de PMA e monitoradas por 50 minutos em luminômetro (Synergy 2, BioTeK) (JONES; HANCOCK, 1994). Os resultados foram expressos como emissão de luz integrada.

3.17 Análise dos resultados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados via avaliação da variância One way (ANOVA) seguida da análise de diferença pelo teste Student-Newman-Keuls, para comparações intergrupos. O teste t-Student's foi utilizado para comparações intragrupo nos parâmetros relativos ao dia 0. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,05$. As análises supracitadas, foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism® 6.0.

Nesse trabalho, para as diferenças significativas entre os grupos foram consideradas:

- i) Efeito combinado: percentual médio do tratamento da co-administração **menor** que a soma dos percentuais médios dos respectivos compostos administrados isoladamente;
- ii) Efeito aditivo: percentual médio do tratamento da co-administração **igual** a soma dos percentuais médios dos respectivos compostos administrados isoladamente;
- iii) Efeito sinérgico: percentual médio do tratamento da co-administração **maior** que a soma dos percentuais médios dos respectivos compostos administrados isoladamente.

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros fisiológicos e bioquímicos de animais não diabéticos e animais diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina

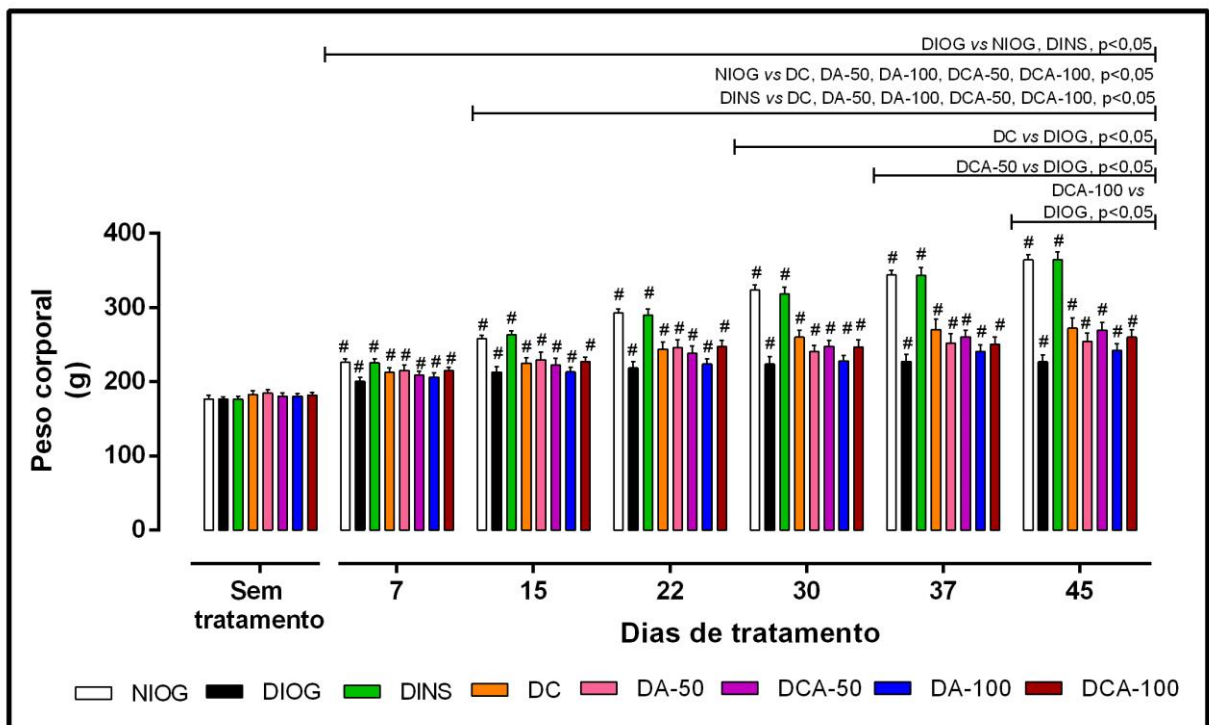
A evolução do peso corporal pode ser observada na Figura 13. O grupo DIOG apresentou menor peso corporal quando comparado ao grupo NIOG, a partir do 7º dia de tratamento. Os animais diabéticos tratados com curcumina e/ou aminoguanidina (DC, DA-50, DA-100, DCA-50 e DCA-100) também apresentaram menor peso corporal em relação ao grupo NIOG, a partir do 15º dia de tratamento.

A partir do 15º dia de tratamento, também foi possível observar que o grupo DINS apresentou maior peso corporal em relação aos demais animais diabéticos (grupos DIOG, DC, DA-50, DA-100, DCA-50 e DCA-100), alcançando valores de peso corporal semelhantes aos animais não diabéticos (NIOG).

O grupo DC apresentou maior valor médio de peso corporal em relação aos animais diabéticos que receberam iogurte (DIOG), a partir 30º dia de tratamento; no 30º, 37º e 45º dia de tratamento apresentou aumento de 16, 19 e 20%, respectivamente, enquanto que os grupos DA-50 e DA-100 não apresentaram diferenças no peso corporal em relação ao grupo DIOG. O grupo DCA-50 apresentou maior peso corporal a partir do 37º dia de tratamento, quando comparado ao grupo DIOG; no 37º e 45º dia de tratamento apresentou um aumento de 15 e 19%, respectivamente, enquanto que o grupo DCA-100 apresentou maior peso corporal com aumento de 15% ao final do período experimental (45º dia).

Os tratamentos com as diferentes doses de aminoguanidina administradas isoladamente não foram capazes de evitar a perda de peso corporal característico nos animais diabéticos. O tratamento com aminoguanidina combinada a curcumina mostrou uma resposta que prevalece o efeito da curcumina em relação aos benefícios observados na recuperação de ganho de peso corporal em animais diabéticos.

Figura 13 - Peso corporal de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina, durante 45 dias.



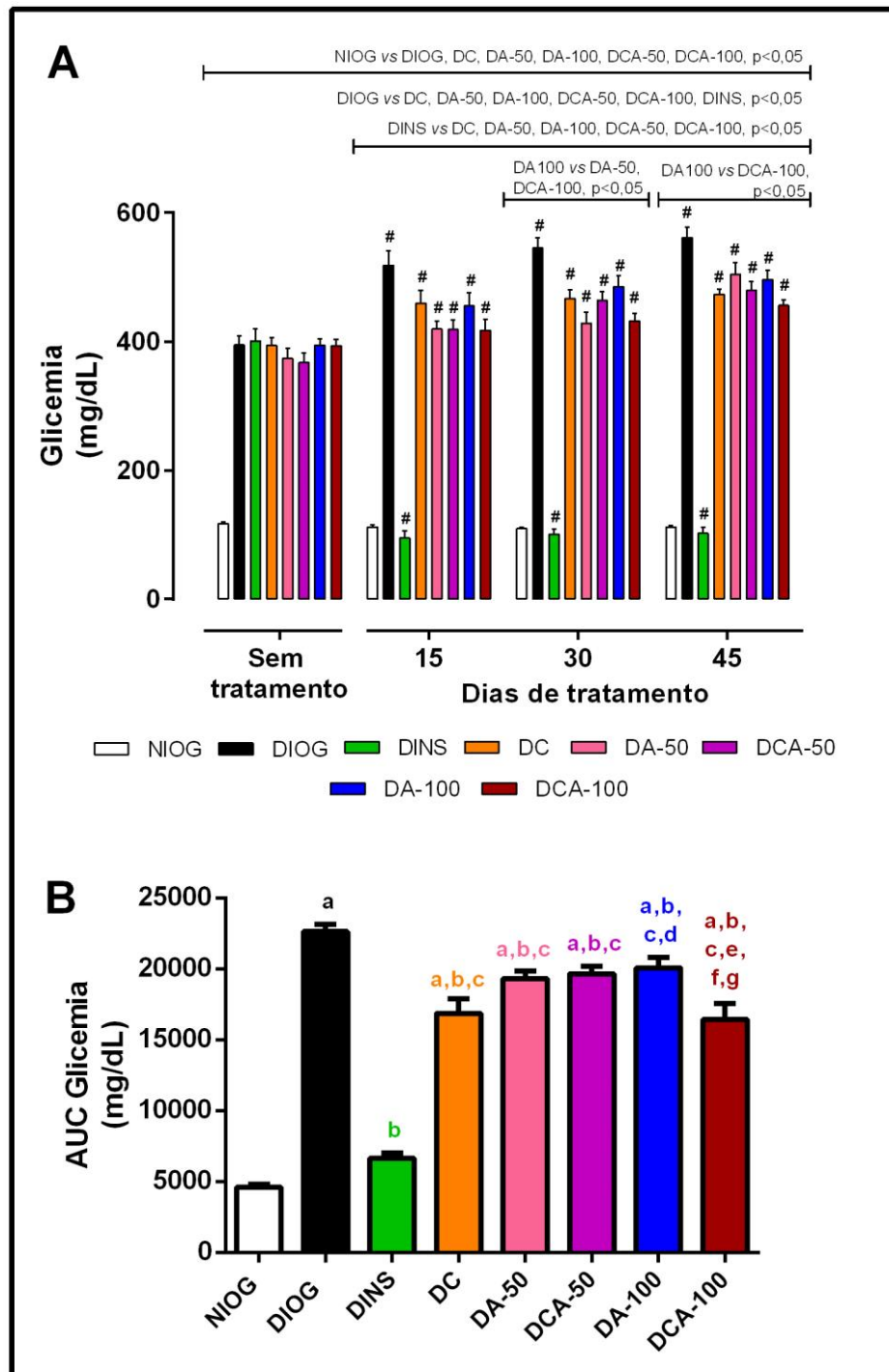
Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. #, diferenças com o dia 0.

Na Figura 14 estão apresentados os valores referentes às alterações temporais na glicemia (14A), assim como a área sob a curva (AUC) da glicemia (14B).

Animais diabéticos pertencentes a todos os grupos estudados apresentaram valores de glicemia de aproximadamente 400 mg/dL no pareamento (tempo 0, sem tratamento), o que nos permite validar a instalação do DM experimental. Podemos observar que a glicemia dos animais do grupo NIOG manteve-se em valores dentro da normalidade, desde o pareamento até o final do período experimental.

No decorrer do período experimental, o grupo DIOG apresentou níveis glicêmicos progressivamente maiores, alcançando ao final do experimento valores médios de 561 mg/dL, culminando assim em um maior valor de AUC da glicemia, o que sugere a maior vulnerabilidade destes animais às complicações do DM relacionadas ao estresse glicoxidativo. Os ratos diabéticos que receberam insulina (DINS) apresentaram uma redução significativa da glicemia, bem como menor AUC da glicemia, alcançando valores médios de glicemia e de AUC da glicemia semelhantes aos encontrados em animais não diabéticos (NIOG).

Figura 14 - Glicemia de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina, durante 45 dias.



(A) Glicemia e (B) Área sob a curva (AUC). Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferença com DA-50; f, diferença com DCA-50; g, diferença com DA-100. #, diferenças com o dia 0.

Os animais diabéticos tratados com curcumina e/ou aminoguanidina em iogurte apresentaram uma melhora nos níveis glicêmicos quando comparados aos animais do grupo DIOG, a partir do 15º dia de tratamento até o final do período experimental (45º dia). Também foi possível observar valores maiores da AUC da glicemia dos animais tratados com curcumina e/ou aminoguanidina, quando comparados aos grupos NIOG e DINS, porém menores em relação aos valores do grupo DIOG.

Animais DCA-50 não apresentaram diferenças significativas nos níveis glicêmicos quando comparados aos animais tratados apenas com curcumina ou 50 mg/kg de aminoguanidina, perfil também observado na AUC da glicemia.

O grupo DCA-100 apresentou menores níveis de glicemia do que o grupo DA-100, a partir do 30º dia de tratamento até o final do período experimental (45º dia). Em relação a AUC da glicemia, o grupo DCA-100 também apresentou valores menores quando comparados ao grupo DA-100, dessa forma, foi possível observar que a associação de curcumina e 100 mg/kg de aminoguanidina foi mais eficaz para o controle glicêmico do que 100 mg/kg de aminoguanidina administrada isoladamente, demonstrando novamente o efeito da curcumina nessa associação.

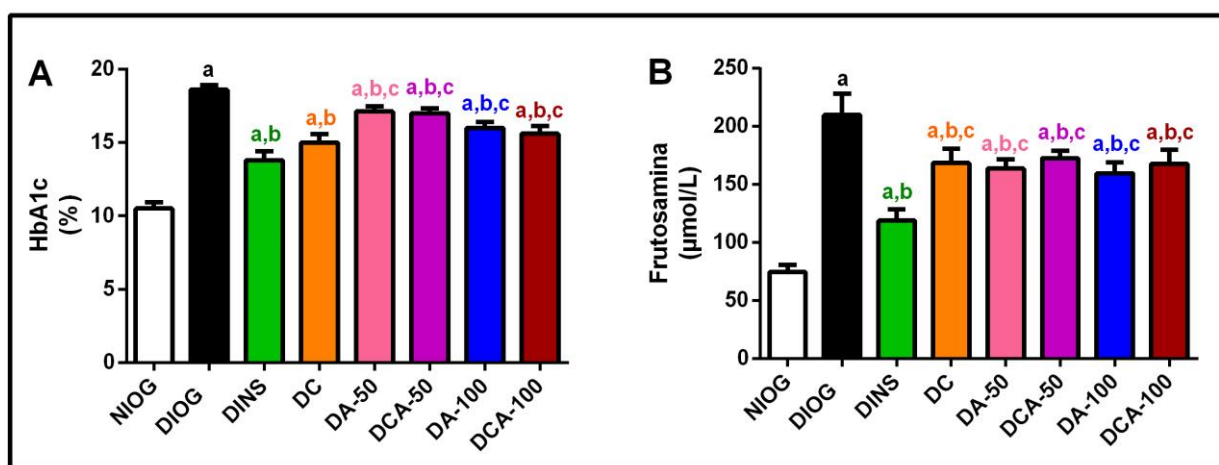
Além do monitoramento da glicemia, uma abordagem prática para avaliar o controle glicêmico é analisar a glicação das proteínas pela dosagem de proteínas glicadas, incluindo HbA1c e frutossamina (FIGURA 15).

Todos os grupos de animais diabéticos apresentaram níveis de HbA1c maiores quando comparados ao grupo NIOG (FIGURA 15A). O grupo DIOG apresentou os maiores níveis de HbA1c, comprovando a cronicidade da hiperglicemia nesses animais. Todos os grupos que receberam tratamentos (DINS, DC, DA-50, DA-100, DCA-50 e DCA-100) apresentaram níveis de HbA1c menores em relação ao grupo DIOG (FIGURA 15A), portanto, refletindo os benefícios destes tratamentos na redução da glicemia e assim foram eficazes na redução desse importante biomarcador no DM. O grupo DINS apresentou níveis de HbA1c reduzidos em 26% quando comparado ao grupo DIOG. Entre os demais tratamentos, a curcumina administrada isoladamente no iogurte (DC) foi o tratamento que mais atenuou a formação de HbA1c (19%), alcançando valores próximos aos do grupo DINS. Os grupos DA-50 e DA-100 apresentaram uma redução na formação de HbA1c de 9% e 14%, respectivamente, e os grupos DCA-50 e DCA-100 mostraram uma redução de 9% e 16%, respectivamente, em relação ao grupo DIOG, não existindo diferenças entre esses grupos tratados.

Assim como para o perfil de alterações em HbA1c, todos os grupos de animais diabéticos apresentaram maiores níveis de frutossamina em relação ao grupo NIOG (FIGURA

15B). Todos os grupos tratados (DINS, DC, DA-50, DA-100, DCA-50 e DCA-100) apresentaram níveis menores de frutossamina quando comparados ao grupo DIOG (FIGURA 15B). O grupo DINS apresentou níveis reduzidos de frutossamina em 43%, quando comparado aos animais diabéticos DIOG. Os demais grupos de animais diabéticos que receberam tratamento não apresentaram diferenças entre eles, mostrando uma redução média de 21% nos níveis de frutossamina.

Figura 15 – HbA1c e frutossamina, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.



(A) Hemoglobina glicada (HbA1c) e (B) Frutossamina. Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS.

Os valores plasmáticos de TAG, colesterol total, colesterol-HDL e níveis estimados de colesterol-não HDL podem ser observados na Figura 16.

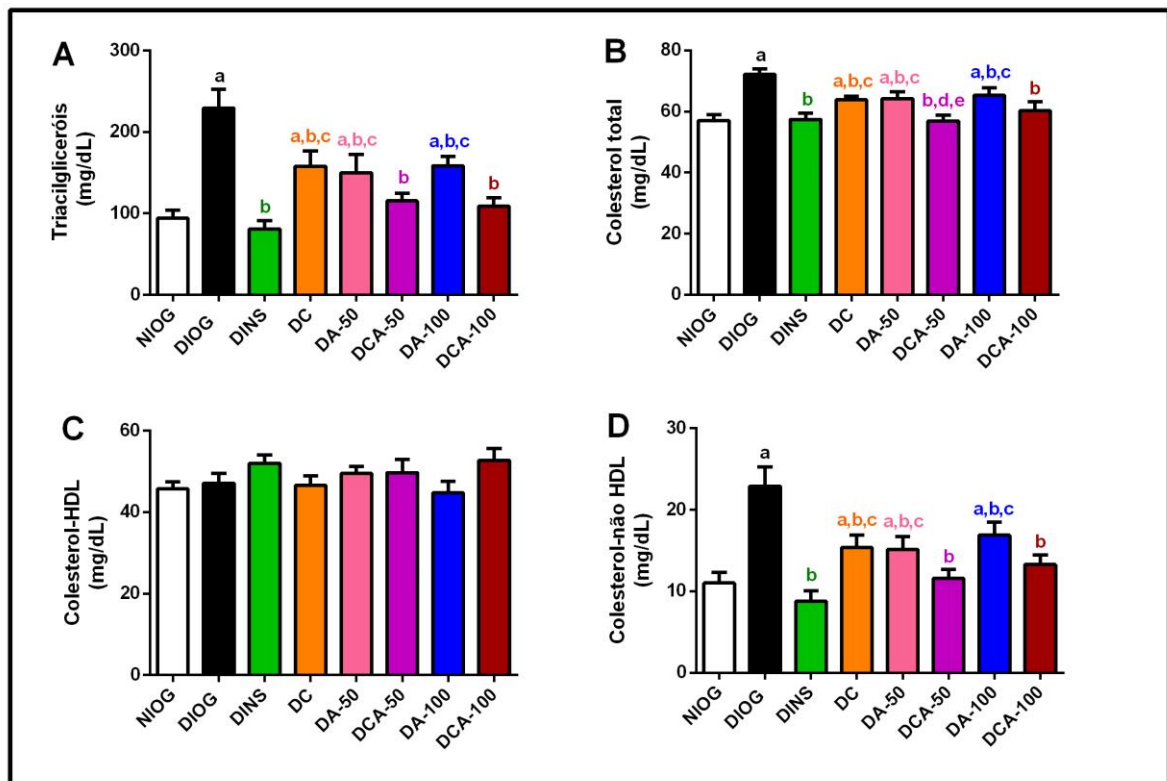
Animais do grupo DIOG apresentaram valores aumentados de TAG (FIGURA 16A), colesterol total (FIGURA 16B) e colesterol-não HDL (FIGURA 16D) em relação aos animais do grupo NIOG. O grupo DINS apresentou redução de 65%, 20% e 62% nos níveis de TAG, colesterol total e colesterol-não HDL, respectivamente, alcançando valores semelhantes aos do grupo NIOG. Os animais diabéticos tratados com curcumina e/ou aminoguanidina em iogurte também apresentaram reduções nos níveis desses três biomarcadores do metabolismo lipídico.

Os grupos DC, DA-50 e DA-100 apresentaram reduções nos níveis de TAG em 31%, 35% e 31%, respectivamente, em relação ao grupo DIOG; enquanto que os grupos DCA-50 e DCA-100 mostram reduções de 50% e 52%, respectivamente (FIGURA 16A). Embora os tratamentos com as associações não apresentaram diferenças com os tratamentos isolados,

destaca-se que as terapias combinadas promoveram efeitos melhores do que os compostos administrados isoladamente, uma vez que, permitiram o alcance de valores próximos aos dos grupos DINS e NIOG.

Em relação aos níveis de colesterol total, os grupos DC, DA-50 e DA-100 mostraram reduções de 11%, 11% e 10%, respectivamente, e os grupos DCA-50 e DCA-100 de 21% e 16%, respectivamente, quando comparados ao grupo DIOG (FIGURA 16B). Como pode ser observado, a associação de curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina em iogurte (DCA-50) foi mais eficaz na redução dos níveis de colesterol total em relação aos tratamentos isolados, demonstrando um efeito combinado. O tratamento com a associação de curcumina e 100 mg/kg de aminoguanidina (DCA-100) também foi melhor na redução dos níveis de colesterol total em relação aos respectivos tratamentos isolados, uma vez que apresentou valores próximos aos dos animais DINS e NIOG.

Figura 16 – Níveis de triacilgliceróis, colesterol total, colesterol-HDL e níveis estimados de colesterol-não HDL, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.



(A) Triacilgliceróis (B) Colesterol total (C) Colesterol-HDL (C) Colesterol-não HDL. Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG.

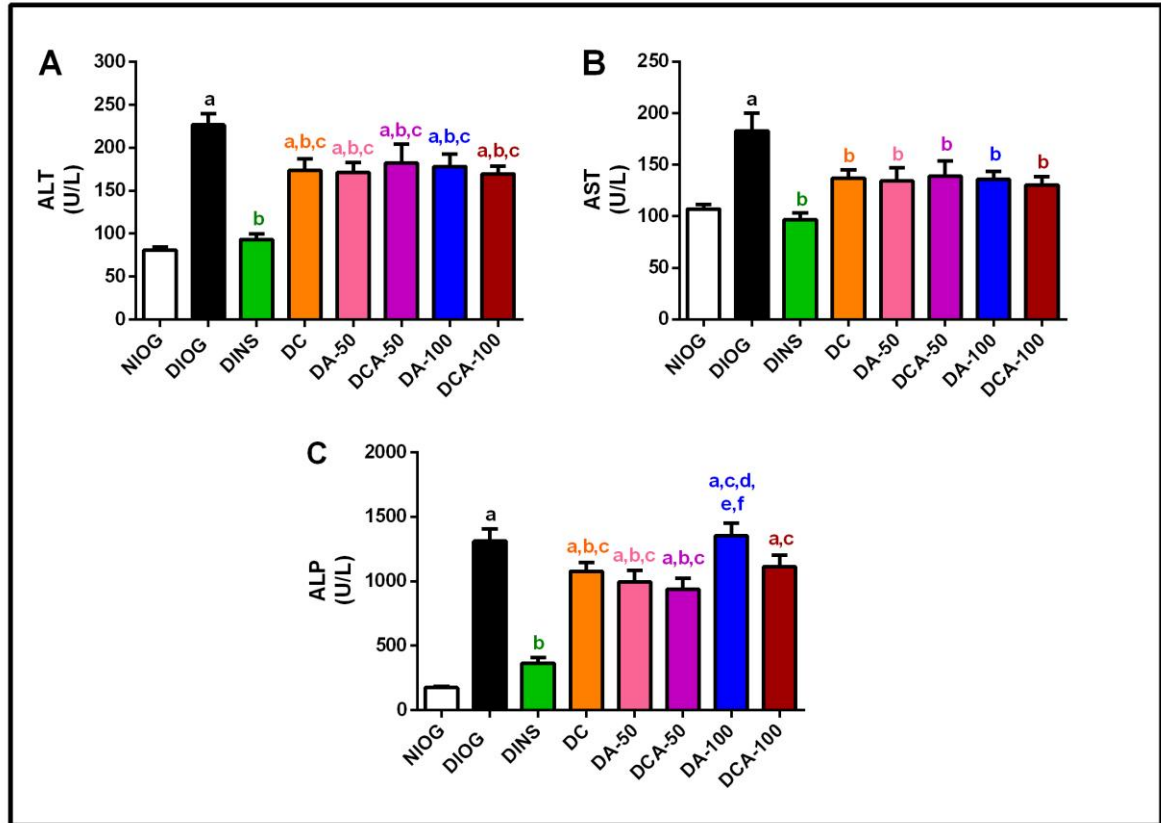
Os grupos DC, DA-50 e DA-100 apresentaram uma redução média de 31% nos níveis de colesterol-não HDL, em relação ao grupo DIOG. Já os grupos DCA-50 e DCA-100 mostraram reduções de 49% e 42%, respectivamente (FIGURA 16D). Assim como observado nos níveis de TAG, os tratamentos com as associações promoveram melhores efeitos do que os respectivos tratamentos administrados isoladamente, uma vez que, não apresentaram diferenças com os grupos DINS e NIOG.

Os animais não diabéticos e animais diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina em iogurte não apresentaram diferenças entre si em relação aos níveis plasmáticos de colesterol-HDL (FIGURA 16C).

As atividades das enzimas hepáticas ALT, AST e ALP podem ser observadas na Figura 17. Os animais diabéticos DIOG apresentaram aumentos significativos nos níveis plasmáticos das enzimas hepáticas ALT, AST e ALP, em relação ao grupo de animais não diabéticos (NIOG) (FIGURAS 17A, 17B e 17C, respectivamente). O tratamento de ratos diabéticos com insulina (DINS) promoveu diminuição de 59%, 47% e 72% nos níveis de ALT, AST e ALP, respectivamente, alcançando valores próximos ao do grupo NIOG. Os animais diabéticos tratados com curcumina e/ou aminoguanidina em iogurte apresentaram níveis plasmáticos menores das enzimas ALT (FIGURA 17A) e AST (FIGURA 17B) quando comparados ao grupo DIOG, não existindo diferenças entre os tratamentos, com redução média de 23% e 26%, respectivamente.

Em relação aos níveis plasmáticos de ALP, os grupos DC e DA-50 apresentaram níveis menores da enzima em 18% e 24%, respectivamente, em relação ao grupo DIOG (FIGURA 17C). Já o grupo DA-100 não demonstrou diferença nos níveis de ALP quando comparado ao grupo DIOG (FIGURA 17C). Animais do grupo DCA-50 apresentaram níveis plasmáticos menores da enzima supracitada em 29%, quando comparados ao grupo DIOG, não existindo diferenças com os tratamentos isolados correspondentes (FIGURA 17C). O grupo DCA-100 não apresentou redução nos níveis plasmáticos de ALP em relação ao grupo DIOG, mas mostrou que ocorre uma tendência de melhoria nos níveis dessa enzima, que pode ser devido ao efeito da curcumina, uma vez que 100 mg/kg de aminoguanidina não foi capaz de preservar os níveis dessa enzima (FIGURA 17C).

Figura 17 – Atividade plasmática das enzimas hepáticas ALT, AST e ALP, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.



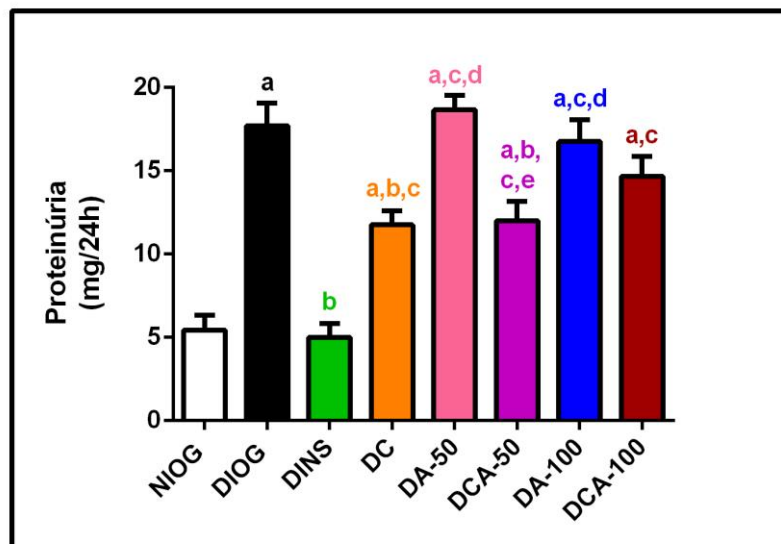
(A) Alanina aminotransferase (ALT) (B) Aspartato aminotransferase (AST) e (C) Fosfatase alcalina (ALP). Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DA-50; f, diferenças com DCA-50.

A proteinúria pode ser observada na Figura 18. O grupo DIOG apresentou maiores níveis de proteinúria quando comparado ao grupo NIOG. Também foi possível observar que o grupo DINS apresentou menor proteinúria em 72% quando comparado aos animais DIOG, alcançando valores semelhantes aos animais não diabéticos (NIOG).

Dentre os tratamentos administrados isoladamente, apenas o tratamento com curcumina foi capaz de prevenir a proteinúria quando comparado ao grupo DIOG, demonstrando uma redução de 33% nos níveis de proteinúria.

O grupo DCA-50 apresentou menor proteinúria quando comparado ao grupo DIOG em 32%, portanto nessa associação foi possível observar o efeito benéfico da curcumina. Já o grupo DCA-100 demonstrou uma tendência de melhoria nos níveis de proteinúria, mas não houve diferença estatística em relação ao grupo DIOG, mostrando que essa associação, nesse parâmetro, não foi capaz de preservar o efeito da curcumina em 45 dias de experimento.

Figura 18 – Proteinúria de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.



Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DA-50. As amostras foram obtidas no 43º dia de tratamento.

4.2 Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo e potencial antioxidante no plasma de animais não diabéticos e animais diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina

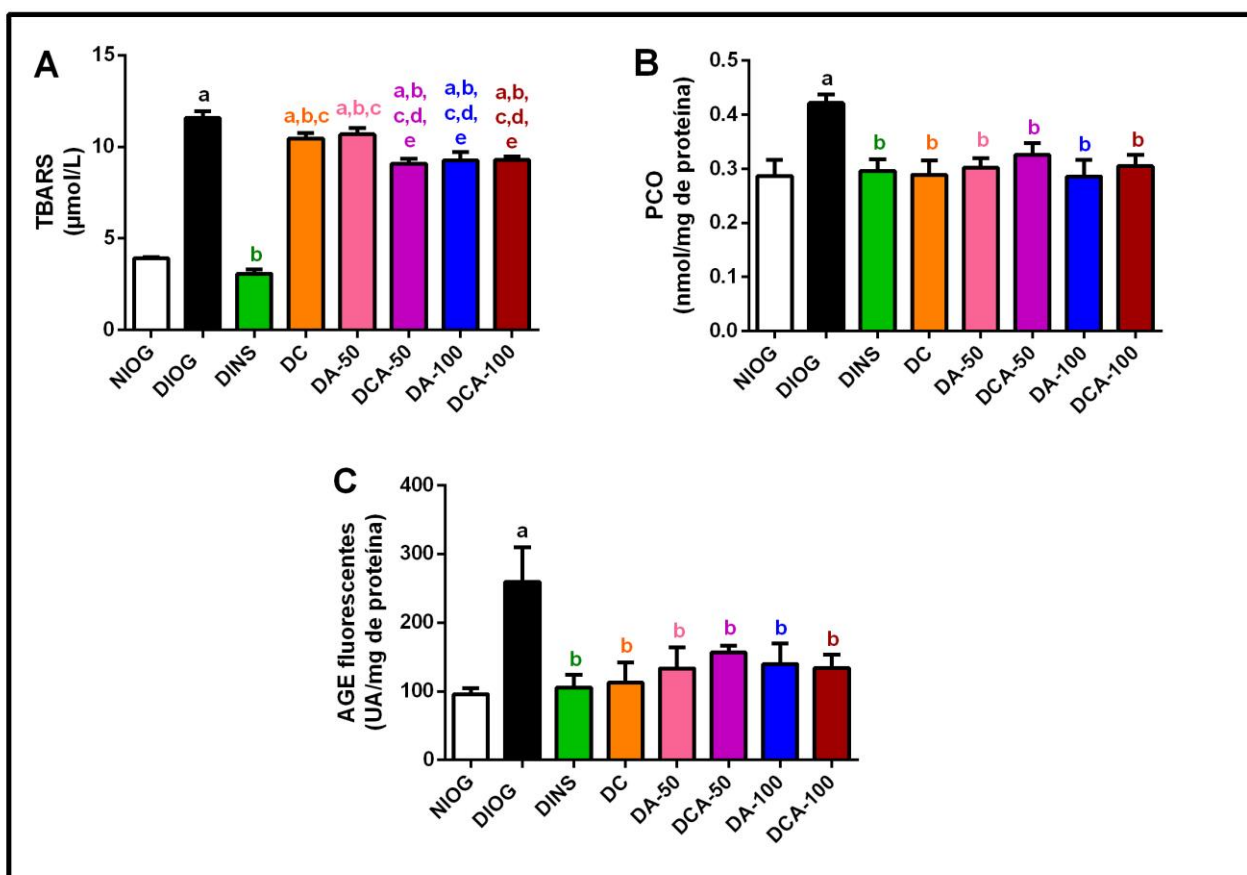
Na Figura 19 estão apresentados os níveis plasmáticos de TBARS, PCO e AGE fluorescentes. O grupo DIOG apresentou níveis plasmáticos aumentados de TBARS (FIGURA 19A), PCO (FIGURA 19B) e AGE (FIGURA 19C) quando comparado ao grupo NIOG. O grupo DINS apresentou redução de TBARS, PCO e AGE fluorescentes de 73%, 30% e 60%, respectivamente, em relação ao grupo DIOG. Os tratamentos com curcumina e/ou aminoguanidina em iogurte promoveram reduções nos níveis de TBARS (FIGURA 19A), PCO (FIGURA 19B) e AGE fluorescentes (FIGURA 19C) quando comparados ao grupo DIOG. Em relação aos níveis plasmáticos de PCO e AGE fluorescentes, os grupos DC, DA-50, DA-100, DCA-50 e DCA-100 apresentaram reduções significativas atingindo valores próximos aos dos animais tratados com insulina (DINS).

Os grupos DC, DA-50 e DA-100 apresentaram reduções nos níveis de TBARS no plasma em 10%, 8% e 20%, respectivamente, em relação ao grupo DIOG (FIGURA 19A). O

tratamento com 100 mg/kg de aminoguanidina foi melhor na redução dos níveis de TBARS do que os tratamentos com 50 mg/kg de aminoguanidina ou curcumina.

Os grupos DCA-50 e DCA-100 apresentaram valores de TBARS reduzidos em 21% e 20%, respectivamente, quando comparados ao grupo DIOG. Como pode ser observado, a associação de curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina em iogurte (DCA-50) foi mais eficaz na redução dos níveis de TBARS em relação aos resultados alcançados com os tratamentos com os respectivos compostos administrados isoladamente, demonstrando um efeito sinérgico. O tratamento com a associação de curcumina e 100 mg/kg de aminoguanidina em iogurte (DCA-100) também foi melhor na redução dos níveis de TBARS, mas somente em relação ao tratamento com a curcumina administrada isoladamente, portanto, prevalecendo o efeito da aminoguanidina.

Figura 19 – Níveis TBARS, PCO e AGE, após 45 dias, no plasma de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.

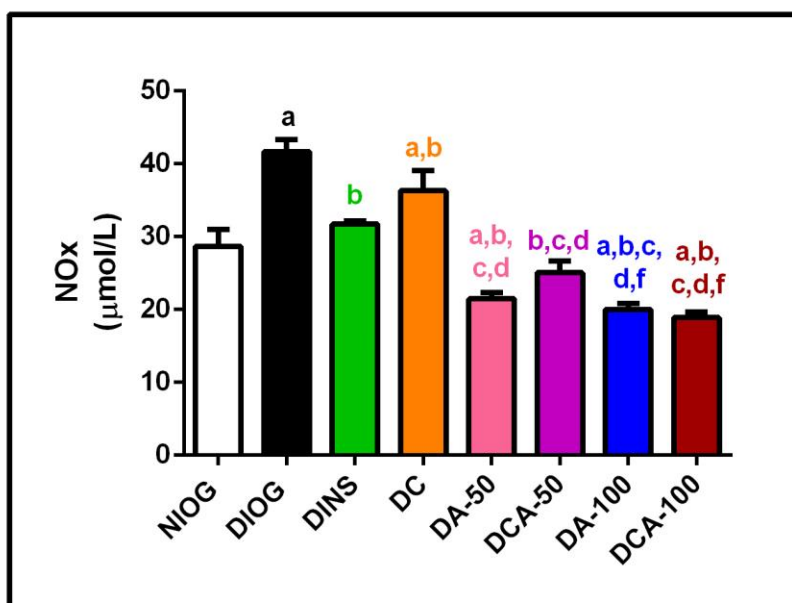


(A) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (B) Proteínas carboniladas (PCO) e (C) Produtos finais de glicação avançada (AGE) fluorescentes. Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DA-50.

Os níveis plasmáticos de NOx (produtos estáveis do NO) podem ser observados na Figura 20. O grupo DIOG apresentou maiores níveis plasmáticos de NOx em relação ao grupo NIOG. O grupo DINS mostrou uma redução de 23% nos níveis desse biomarcador quando comparado ao grupo DIOG, atingindo valores semelhantes ao do grupo NIOG. Os tratamentos com curcumina e/ou aminoguanidina promoveram reduções nos níveis de NOx em relação ao grupo DIOG. Os grupos DC, DA-50 e DA-100 apresentaram uma redução de 13%, 48% e 52%, respectivamente, quando comparado ao grupo DIOG. Como pode ser observado o tratamento com curcumina administrada isoladamente reduziu os níveis de NOx de maneira menos eficaz; já os tratamentos com as duas doses de aminoguanidina apresentaram maiores reduções nos níveis desse biomarcador em relação ao grupo DIOG, DINS e NIOG.

Animais DCA-50 e DCA-100 apresentaram reduções de 41 e 55%, respectivamente, nos níveis de NOx. O tratamento com a associação de curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina foi capaz de manter os níveis plasmáticos de NOx em valores próximos ao do grupo NIOG, representando os efeitos tanto da curcumina quanto da aminoguanidina. O tratamento com a associação utilizando 100 mg/kg de aminoguanidina reduziu os níveis também em relação ao grupo NIOG, prevalecendo o efeito da aminoguanidina.

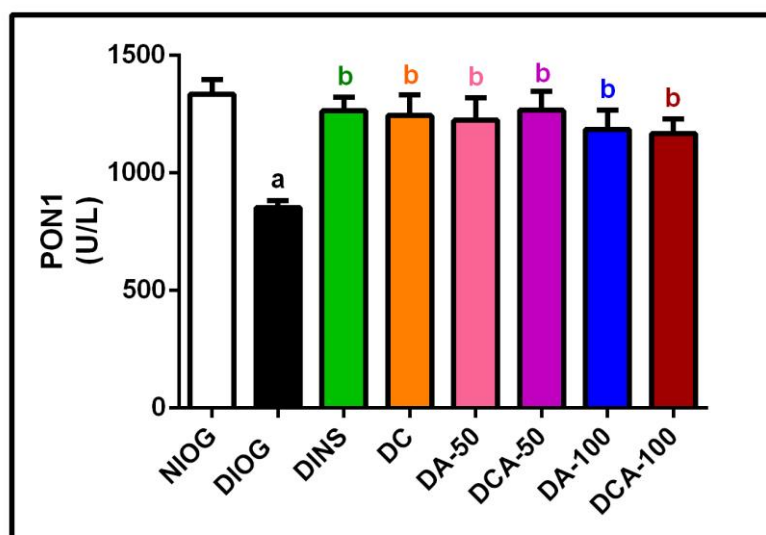
Figura 20 – Nitrato e nitrito total (NOx), após 45 dias, no plasma de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.



Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; f, diferenças com DCA-50.

Na Figura 21 está apresentada a atividade plasmática da enzima PON1. O grupo DIOG apresentou menor atividade da PON1 em relação ao grupo NIOG. O grupo DINS apresentou maior atividade da PON1 em 48%, em relação ao grupo DIOG, alcançando valores semelhantes aqueles do grupo NIOG. Os grupos DC, DA-50, DA-100, DCA-50 e DCA-100 também apresentaram maiores atividade da PON1, quando comparados ao grupo DIOG, não existindo diferenças significativas entre eles e atingindo valores semelhantes aos observados nos grupos DINS e NIOG.

Figura 21 – Atividade de PON1, após 45 dias, no plasma de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.



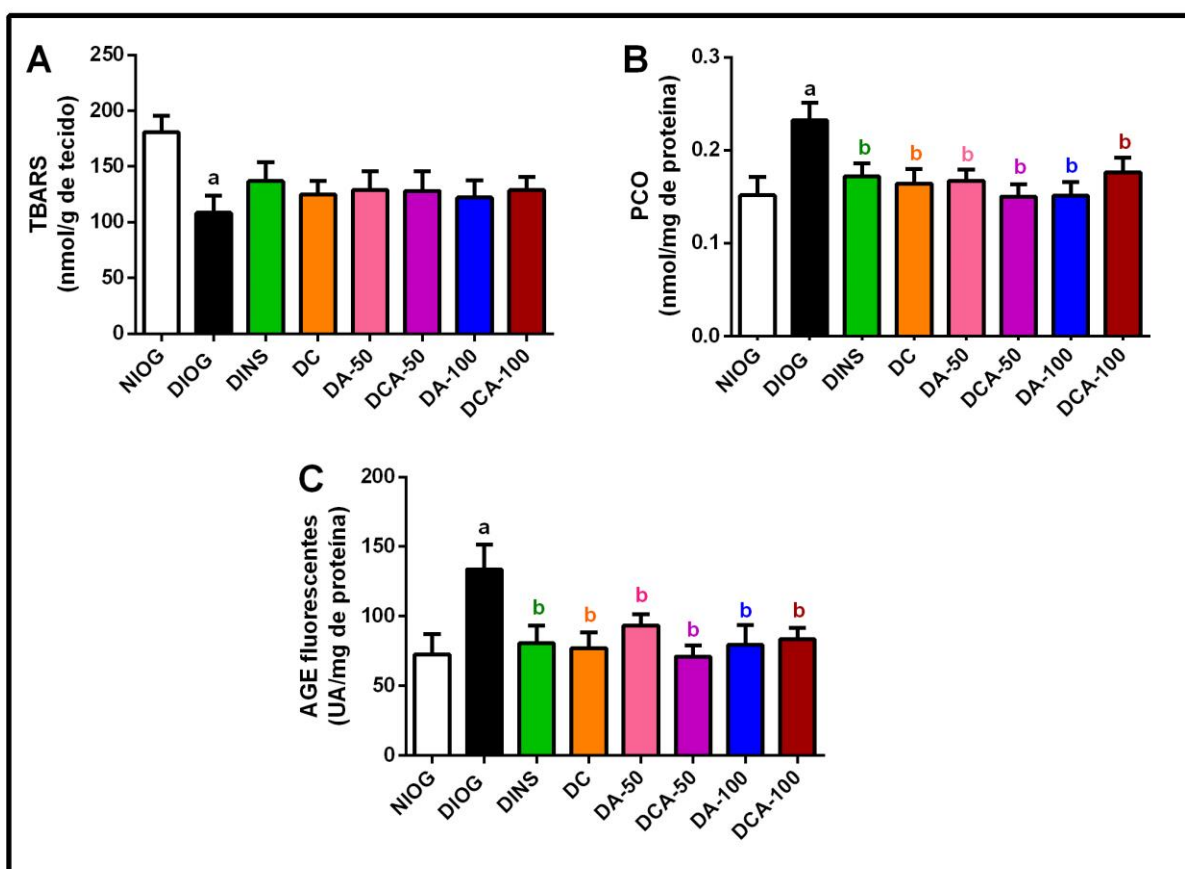
Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG.

4.3 Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo e sistemas antioxidantes no fígado de animais não diabéticos e animais diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina

Na Figura 22 estão apresentados os níveis, no fígado, de TBARS, PCO e AGE fluorescentes. Inesperadamente, observou-se que animais diabéticos DIOG apresentaram uma diminuição de 40% nos níveis de TBARS no fígado, quando comparados ao grupo NIOG. Os demais grupos de animais diabéticos (DINS, DC, DA-50, DA-100, DCA-50 e DCA-100) não apresentaram diferenças nos níveis de TBARS em relação ao grupo DIOG ou NIOG, mas demonstraram tendência em valores mais semelhantes ao grupo DIOG (FIGURA 22A).

O grupo DIOG apresentou níveis aumentados de PCO (FIGURA 22B) e AGE fluorescentes (FIGURA 22C) no fígado, quando comparado ao grupo NIOG. O grupo DINS apresentou valores reduzidos de PCO e AGE fluorescentes em 26% e 40%, respectivamente, em relação ao grupo DIOG, alcançando valores próximos aos do grupo NIOG. Os tratamentos com curcumina e/ou aminoguanidina também promoveram reduções nos níveis de PCO e AGE fluorescentes quando comparados ao grupo DIOG, alcançando valores próximos aos do grupo DINS e NIOG.

Figura 22 – Níveis de TBARS, PCO e AGE fluorescentes, após 45 dias, no fígado de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.

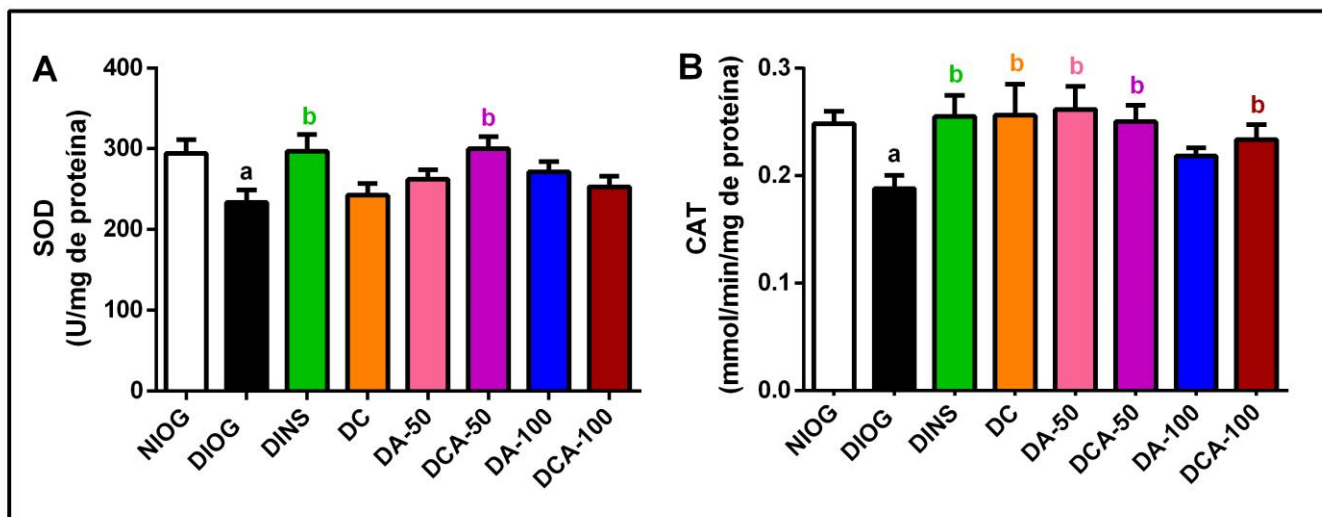


(A) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (B) Proteínas carboniladas (PCO) e (C) Produtos finais de glicação avançada (AGE) fluorescentes. Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG.

As atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT no fígado podem ser observadas na Figura 23. O grupo DIOG apresentou reduções nas atividades das enzimas antioxidantes SOD (FIGURA 23A) e CAT (FIGURA 23B) em comparação ao grupo NIOG. O tratamento de ratos diabéticos com insulina (DINS) preservou as atividades das enzimas antioxidantes

SOD e CAT, promovendo aumento de 27% e 36%, respectivamente, em relação ao grupo DIOG, atingindo valores próximos aos animais não diabéticos (NIOG).

Figura 23 – Atividades das enzimas SOD e CAT, após 45 dias, no fígado de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.



(A) Superóxido dismutase (SOD) e (B) Catalase (CAT). Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG.

Como pode ser observado, apenas o tratamento com a associação de curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina em iogurte (DCA-50) foi capaz de preservar a atividade da enzima SOD, demonstrando um aumento de 28%, em relação ao grupo DIOG; desta forma, podemos sugerir que essa associação apresentou um efeito sinérgico, uma vez que os respectivos compostos administrados isoladamente não foram capazes de manter a atividade da SOD (FIGURA 23A).

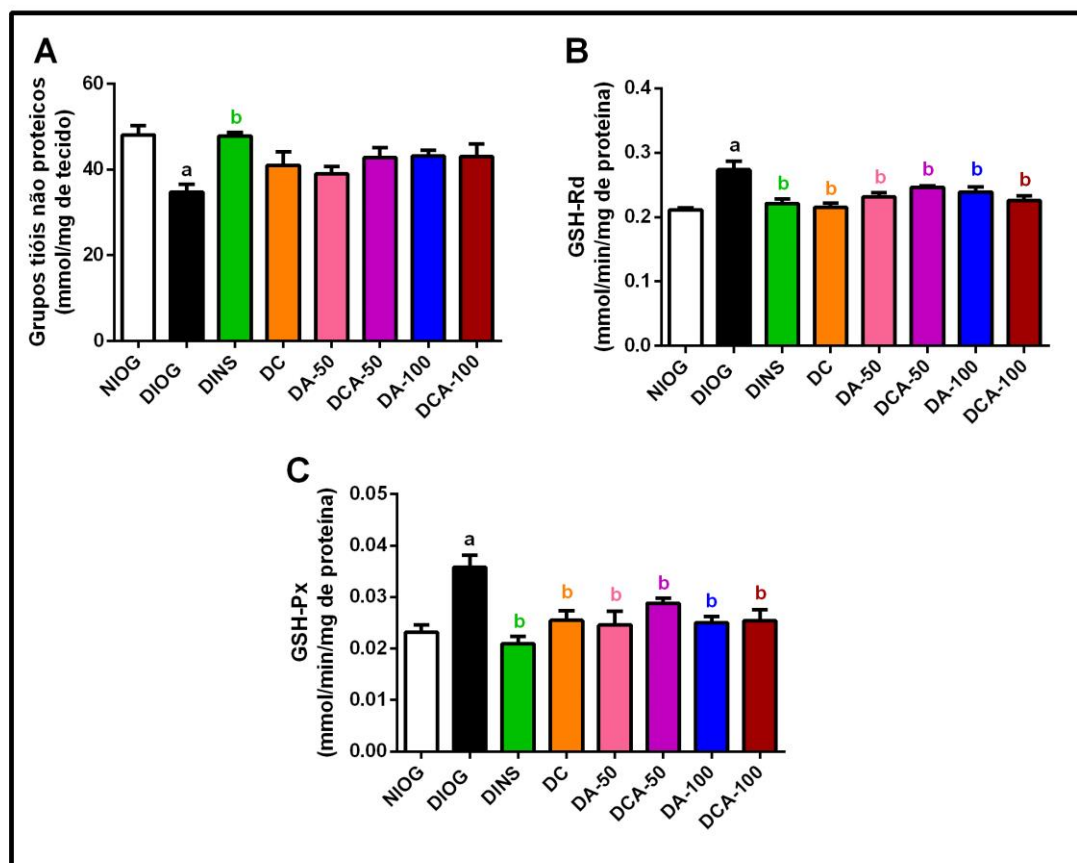
Os grupos DC e DA-50 apresentaram maior atividade da enzima antioxidante CAT em 36% e 39%, respectivamente, quando comparados aos animais diabéticos DIOG, não existindo diferenças entre eles. Enquanto que o grupo DA-100 não apresentou diferenças na atividade de CAT em relação ao grupo DIOG (FIGURA 23B).

O grupo DCA-50 também apresentou aumento na atividade da CAT em 33%, em relação ao grupo DIOG, não apresentando diferenças com os tratamentos isolados. Já o grupo DCA-100 mostrou maior atividade da enzima CAT em 24%, quando comparado ao grupo DIOG, demonstrando que a associação de curcumina e 100 mg/kg de aminoguanidina foi melhor na prevenção da atividade da CAT do que o tratamento com 100 mg/kg de aminoguanidina administrada isoladamente, prevalecendo a resposta da curcumina (FIGURA 23B).

Na Figura 24 estão apresentados os níveis, no fígado, de grupos tióis não proteicos e às atividades das enzimas glutathiona redutase (GSH-Rd) e glutathiona peroxidase (GSH-Px).

O grupo DIOG apresentou menores níveis hepáticos de grupos tióis não proteicos (FIGURA 24A) quando comparado ao grupo NIOG. O tratamento de ratos diabéticos com insulina (DINS) promoveu aumento nos níveis de grupos tióis não proteicos, em relação ao grupo DIOG. Os tratamentos com curcumina e/ou aminoguanidina não apresentaram diferenças estatísticas, mas demonstraram uma tendência de aumento nos níveis de grupos tióis não proteicos quando comparados ao grupo DIOG.

Figura 24 – Níveis de grupos tióis não proteicos e atividades das enzimas GSH-Rd e GSH-Px, após 45 dias, no fígado de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.



(A) Grupos tióis não proteicos (B) Glutathiona redutase (GSH-Rd) e (C) Glutathiona peroxidase (GSH-Px). Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG.

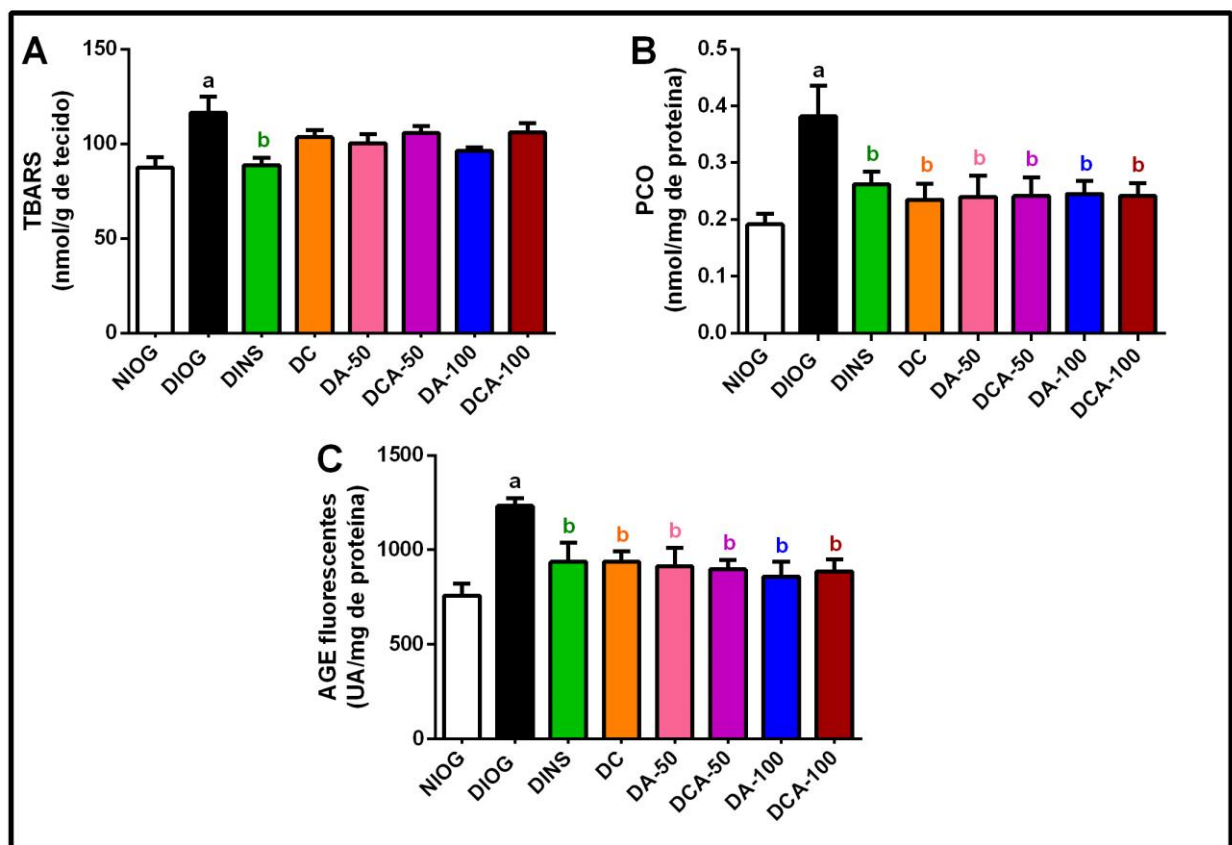
O grupo DIOG apresentou maior atividade das enzimas GSH-Rd (FIGURA 24B) e GSH-Px (FIGURA 24C), quando comparado ao grupo NIOG. Animais do grupo DINS apresentaram reduções nas atividades das enzimas GSH-Rd e GSH-Px, em relação ao grupo DIOG, permitindo o alcance de valores semelhantes aos observados no grupo NIOG; assim

como observado no tratamento com insulina, os tratamentos com curcumina e/ou aminoguanidina também promoveram reduções nas atividades das enzimas GSH-Rd e GSH-Px quando comparados ao grupo DIOG.

4.4 Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo e sistemas antioxidantes no rim de animais não diabéticos e animais diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina

Na Figura 25 estão apresentados os níveis, no rim, de TBARS, PCO e AGE fluorescentes.

Figura 25 – Níveis de TBARS, PCO e AGE fluorescentes, após 45 dias, no rim de ratos normais e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.

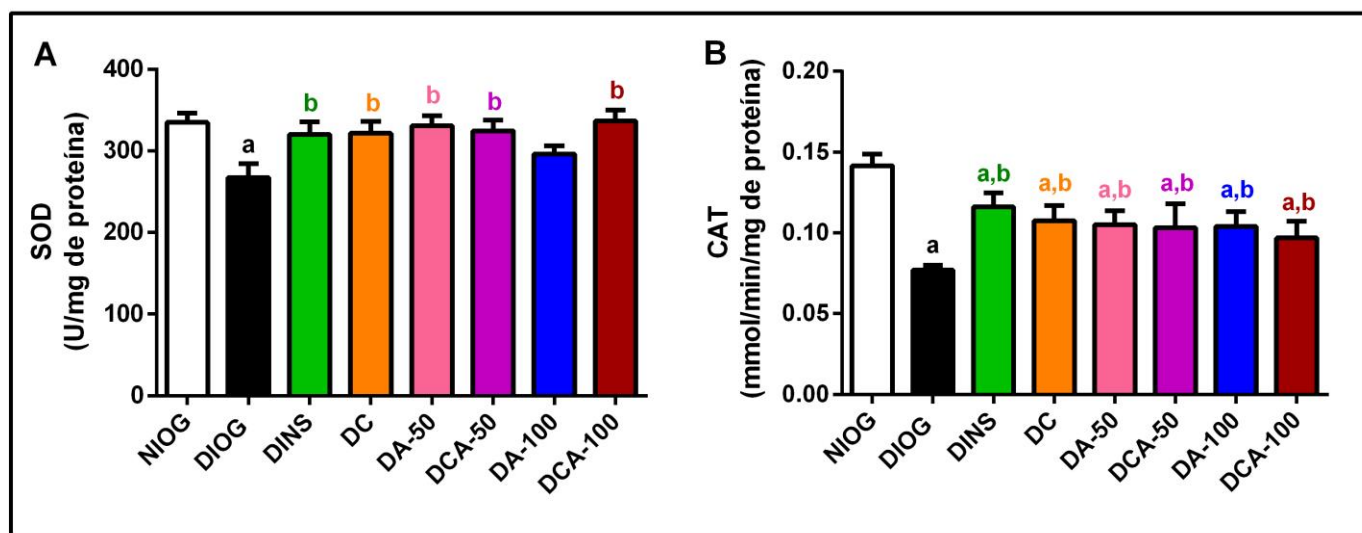


(A) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (B) Proteínas carboniladas (PCO) e (C) Produtos finais de glicação avançada (AGE). Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG.

O grupo DIOG apresentou níveis aumentados de TBARS (FIGURA 25A), PCO (FIGURA 25B) e AGE fluorescentes (FIGURA 25C) no rim, quando comparado ao grupo NIOG. O grupo DINS apresentou valores reduzidos de TBARS, PCO e AGE fluorescentes, em 25%, 31% e 24%, respectivamente, em relação ao grupo DIOG. Os tratamentos com curcumina e/ou aminoguanidina não promoveram reduções nos níveis de TBARS, mas reduziram os níveis de PCO e AGE em relação ao grupo DIOG, alcançando valores próximos aos do grupo DINS.

As atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT no rim podem ser observadas na Figura 26. O grupo DIOG apresentou reduções nas atividades das enzimas antioxidantes SOD (FIGURA 26A) e CAT (FIGURA 26B), em relação ao grupo NIOG. O tratamento de animais diabéticos com insulina preservou a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, promovendo aumentos de 19% e 51%, respectivamente, em relação ao grupo DIOG. Os grupos DC e DA-50 apresentaram maior atividade da SOD em 20% e 24%, respectivamente, em relação ao grupo DIOG (FIGURA 26A). Enquanto que o grupo DA-100 não apresentou diferença na atividade de SOD em relação ao grupo DIOG.

Figura 26 – Atividades das enzimas SOD e CAT, após 45 dias, no rim de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.



(A) Superóxido dismutase (SOD) e (B) Catalase (CAT). Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG.

Os grupos DCA-50 e DCA-100 mostraram aumento na atividade da SOD em 21% e 26% quando comparados ao grupo DIOG (FIGURA 26A). Desta forma, observa-se que a associação DCA-50 não apresentou diferença em relação aos tratamentos com os compostos administrados isoladamente (DC ou DA-50). Já a associação de curcumina e 100 mg/kg de

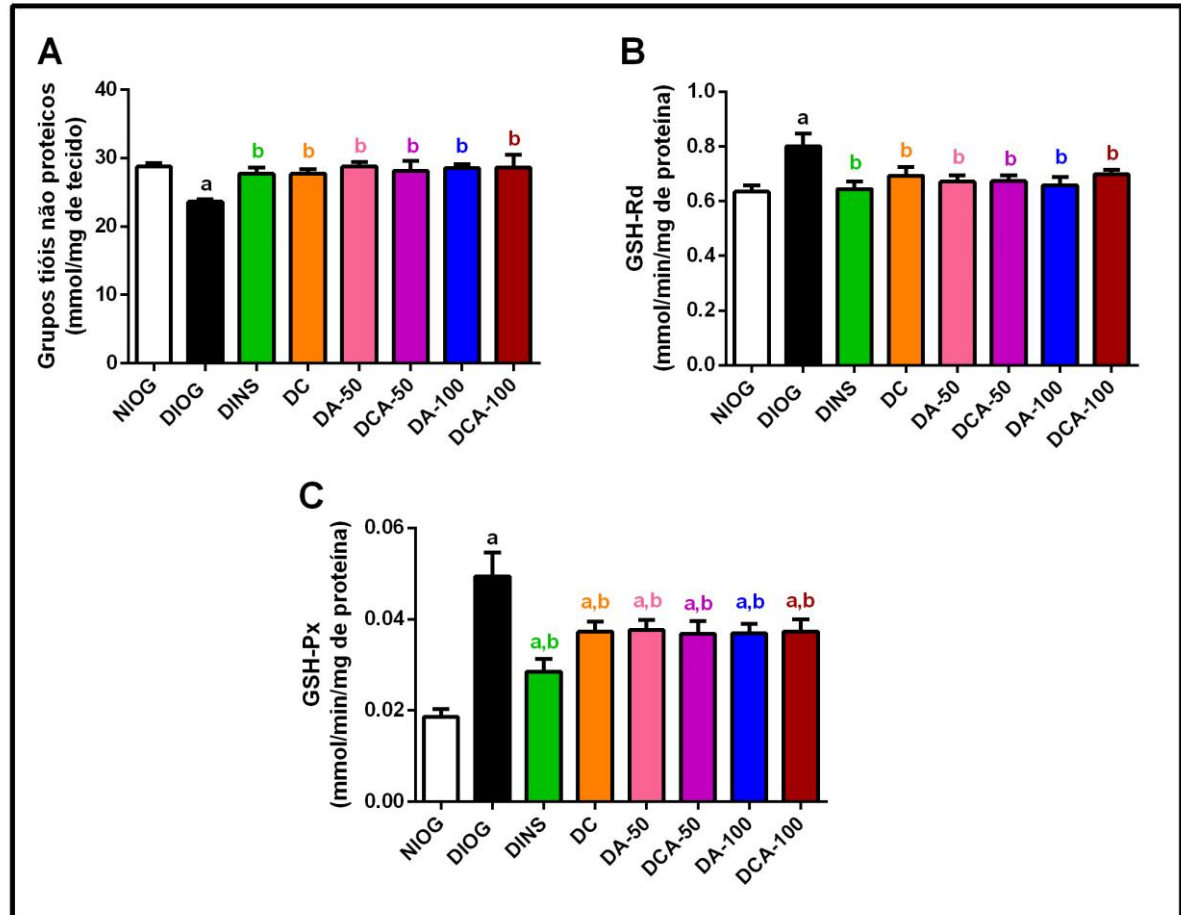
aminoguanidina (DCA-100) em iogurte foi mais eficaz na manutenção da atividade da SOD em relação a 100 mg/kg de aminoguanidina isolada, prevalecendo assim a resposta da curcumina.

Em relação a atividade da enzima CAT, os tratamentos com curcumina e/ou aminoguanidina em iogurte preservaram a sua atividade no rim, não existindo diferenças entre eles e alcançando valores semelhantes aos do grupo DINS (FIGURA 26B).

Na Figura 27 estão apresentados os níveis renais de tióis não proteicos e as atividades das enzimas GSH-Rd e GSH-Px. O grupo DIOG apresentou diminuição nos níveis de grupos tióis não proteicos (FIGURA 27A) quando comparado ao grupo NIOG. O tratamento de ratos diabéticos com insulina (DINS) promoveu aumento nos níveis de grupos tióis não proteicos, em relação ao grupo DIOG, apresentando valores semelhantes aos encontrados no grupo NIOG. Os tratamentos com curcumina e/ou aminoguanidina também promoveram aumento nos níveis de grupos tióis não proteicos quando comparados ao grupo DIOG, permitindo o alcance de valores semelhantes aos observados no grupo DINS e NIOG.

Assim como observado no fígado, os animais DIOG demonstraram aumento nas atividades das enzimas GSH-Rd (FIGURA 27B) e GSH-Px (FIGURA 27C), quando comparados aos valores observados em animais NIOG. O grupo DINS apresentou reduções nas atividades das enzimas GSH-Rd e GSH-Px, em relação ao grupo DIOG, demonstrando respostas semelhantes aos do grupo NIOG. Também como observado no tratamento com insulina, os tratamentos com curcumina e/ou aminoguanidina também promoveram reduções nas atividades das enzimas GSH-Rd e GSH-Px quando comparados ao grupo DIOG.

Figura 27 – Níveis de grupos tióis não proteicos e atividades das enzimas GSH-Rd e GSH-Px, após 45 dias, no rim de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.



(A) Grupos tióis não proteicos (B) Glutationa redutase (GSH-Rd) e (C) Glutationa peroxidase (GSH-Px). Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG.

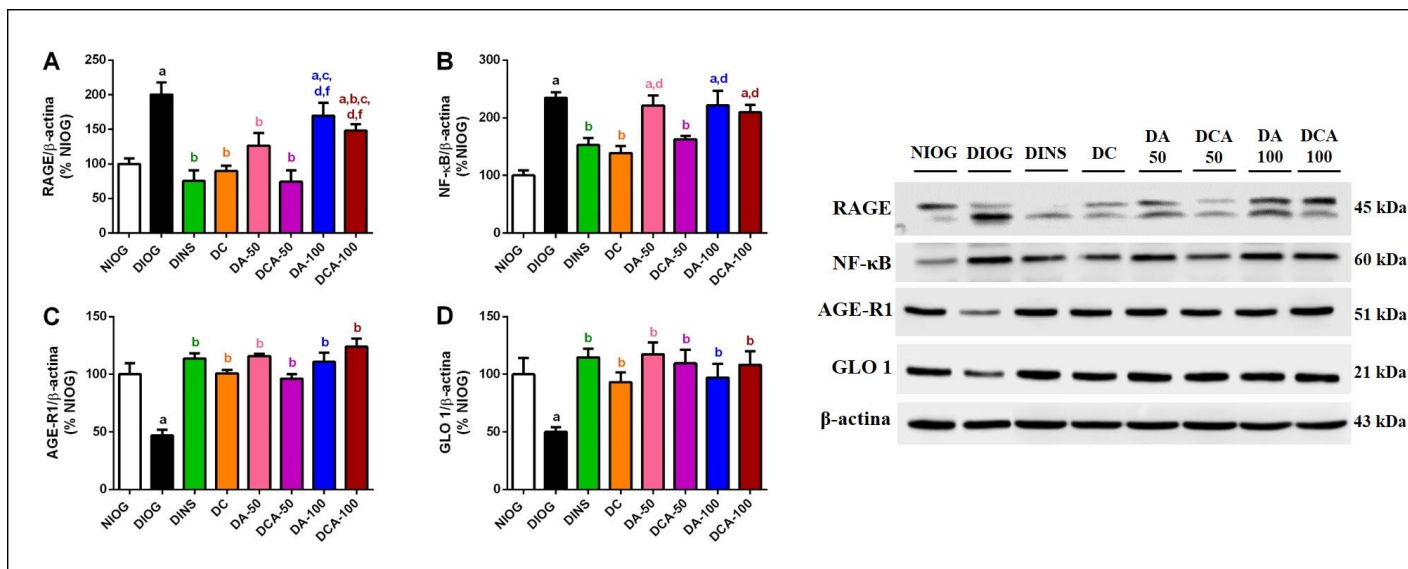
4.5 Níveis proteicos de RAGE, NF- κ B, AGE-R1 e GLO 1 no fígado e rim de animais não diabéticos e animais diabéticos tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina

Os níveis proteicos de RAGE (fígado), NF- κ B (fígado e rim), AGE-R1 (fígado e rim) e GLO 1 (fígado e rim) podem ser observadas na Figura 28 (fígado) e na Figura 29 (rim).

Animais do grupo DIOG apresentaram maiores níveis de RAGE no fígado (FIGURA 28A) e NF- κ B no fígado (FIGURA 28B) e rim (FIGURA 29A), quando comparados aos animais não diabéticos NIOG. Os resultados de RAGE no rim não estão apresentados, pois não foi possível obter resultados e imagens satisfatórias.

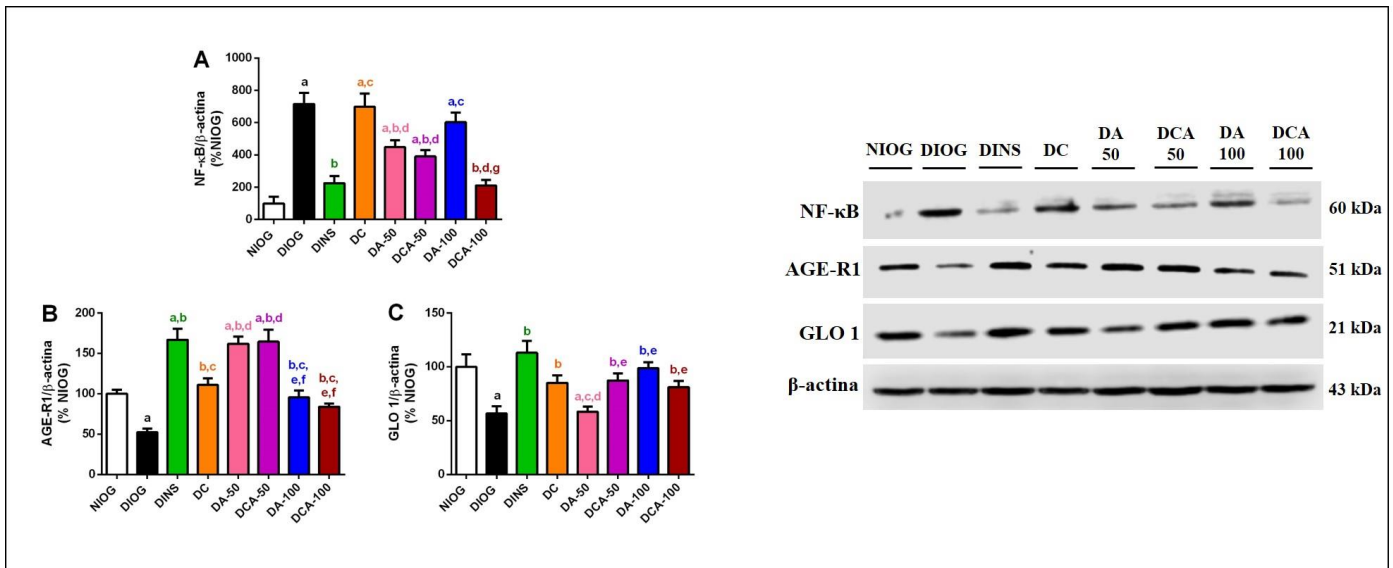
O grupo DINS apresentou menores níveis de RAGE no fígado em 62% e menores níveis de NF- κ B em 35% e 68% no fígado e no rim, respectivamente. Dentre os tratamentos com os compostos administrados isoladamente, os tratamentos com a curcumina ou 50 mg/kg de aminoguanidina reduziram os níveis de RAGE no fígado em 55% e 37%, respectivamente, em relação aos animais DIOG (FIGURA 28A); e apenas o tratamento com a curcumina foi capaz de diminuir os níveis de NF- κ B no fígado (redução de 41%, FIGURA 28B). Entretanto, em relação aos níveis de NF- κ B no rim, apenas 50 mg/kg de aminoguanidina foi capaz de reduzir os níveis desse biomarcador em comparação ao grupo DIOG (redução de 37%, FIGURA 29A). O tratamento com 100 mg/kg de aminoguanidina não foi capaz de reduzir os níveis proteicos de RAGE (fígado, FIGURA 28A) e NF- κ B (fígado e rim, FIGURAS 28B e 29A, respectivamente).

Figura 28 – Níveis proteicos de RAGE, NF- κ B, AGE-R1 e GLO 1, após 45 dias, no fígado de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.



(A) RAGE (B) NF- κ B (C) AGE-R1 e (D) GLO 1. Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, n = 6. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DA-50; f, diferenças com DCA-50.

Figura 29 – Níveis proteicos de NF- κ B, AGE-R1 e GLO 1, após 45 dias, no rim de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.



(A) NF- κ B (B) AGE-R1 e (C) GLO 1. Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 6$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DA-50; f, diferenças com DCA-50; g, diferenças com DA-100.

O tratamento com a associação curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina reduziu os níveis de RAGE no fígado (63%, FIGURA 28A) e NF- κ B no fígado (31%, FIGURA 28B) e rim (45%, FIGURA 29A). Animais DCA-50 não apresentaram diferenças nos níveis de RAGE em relação aos animais que receberam os tratamentos isolados correspondentes (DC e DA-50). Já em relação aos níveis de NF- κ B, o tratamento com essa associação demonstrou prevalecer a resposta do composto isolado de melhor efeito, ou seja, semelhante a curcumina no fígado e semelhante a aminoguanidina no rim.

Animais DCA-100 apresentaram menores níveis de RAGE no fígado (26%, FIGURA 28A) e NF- κ B no rim (70%, FIGURA 29A), em relação aos animais DIOG. O tratamento com a associação curcumina e 100 mg/kg de aminoguanidina foi melhor na redução dos níveis de RAGE do que o tratamento com 100 mg/kg de aminoguanidina, contudo menos eficaz que o tratamento isolado com curcumina. Entretanto, essa associação não foi capaz de prevenir o aumento nos níveis de NF- κ B no fígado, portanto, prevalecendo o efeito de 100 mg/kg de aminoguanidina com a perda do efeito da curcumina nesse biomarcador (FIGURA 28B). Curiosamente, em relação aos níveis proteicos de NF- κ B no rim a associação de curcumina e 100 mg/kg de aminoguanidina apresentou melhor efeito que os respectivos compostos administrados isoladamente, mostrando um efeito sinérgico (FIGURA 29A).

Animais DIOG apresentaram reduções nos níveis de AGE-R1 e GLO 1 no fígado (FIGURAS 28C e D, respectivamente) e no rim (FIGURAS 29B e C, respectivamente), quando comparados aos animais não diabéticos NIOG. O grupo DINS apresentou um aumento de 2,4 e 3,2 vezes nos níveis de AGE-R1 no fígado e rim, respectivamente, e um aumento de 2,3 (fígado) e 2,0 (rim) vezes nos níveis de GLO 1, quando comparados ao grupo DIOG.

Os tratamentos de ratos diabéticos com curcumina e/ou aminoguanidina aumentaram os níveis de AGE-R1 e GLO 1 no fígado (FIGURAS 28C e D), atingindo valores semelhantes aos dos grupos DINS e NIOG.

Já no rim, os grupos DC, DA-50 e DA-100 apresentaram um aumento de 2,1; 3,1 e 1,8 vezes, respectivamente, nos níveis de AGE-R1 em relação ao grupo DIOG (FIGURA 29B). Entre os tratamentos administrados isoladamente a dose de 50 mg/kg de aminoguanidina foi a mais eficaz no aumento dos níveis de AGE-R1. Entretanto, em relação aos níveis de GLO 1, animais DA-50 não apresentaram diferenças em relação aos animais DIOG. Já os grupos DC e DA-100 apresentaram um aumento de 1,5 e 1,7 vezes, respectivamente, nos níveis de GLO 1 quando comparados ao grupo DIOG (FIGURA 29C).

Novamente, o tratamento com a associação curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina demonstrou prevalecer a resposta do composto isolado de melhor efeito, ou seja, no rim, foi capaz de aumentar os níveis de AGE-R1 (3,2) semelhante a 50 mg/kg de aminoguanidina (FIGURA 29B) e aumentar os níveis de GLO 1 (1,5) semelhante a curcumina (FIGURA 29C).

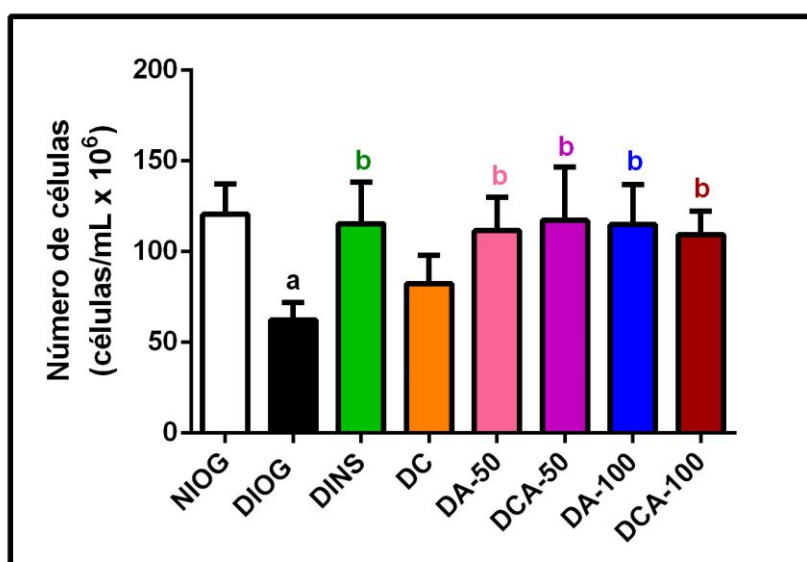
O tratamento com a associação curcumina e 100 mg/kg de aminoguanidina foi capaz de aumentar os níveis de AGE-R1 (FIGURA 29B) e GLO 1 (FIGURA 29C) no rim, em relação ao grupo DIOG, não existindo diferenças entre os compostos isolados.

4.6 Avaliação de parâmetros da função neutrofílica de animais não diabéticos e animais diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina

A Figura 30 apresenta o número de neutrófilos migrados para a cavidade peritoneal dos ratos. O grupo DIOG apresentou menor quantidade de células recrutadas para a cavidade peritoneal em 49% quando comparado ao grupo NIOG. O grupo DINS mostrou um aumento na quantidade de células em 85% quando comparado ao grupo DIOG, alcançando valores semelhantes ao do grupo NIOG.

Os grupos DA-50 e DA-100 apresentaram maiores quantidades de células em 81% e 85%, respectivamente, em relação ao grupo DIOG, enquanto que o grupo DC não apresentou diferenças em relação ao grupo DIOG. Os grupos DCA-50 e DCA-100 também mostraram um aumento na quantidade de células em 89% e 76%, respectivamente, quando comparados ao grupo DIOG. A associação entre ambas as doses de aminoguanidina e curcumina em iogurte foram melhores do que a curcumina administrada isoladamente no recrutamento de células para a cavidade peritoneal, prevalecendo o efeito da aminoguanidina.

Figura 30 – Número de neutrófilos migrados para a cavidade peritoneal, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.



Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG.

A atividade de NOX2 de neutrófilos peritoneais, monitorada por quimiluminescência dependente de lucigenina sem ou com estímulo (PMA) e por redução do citocromo C (com estímulo) pode ser observada na Figura 31.

O grupo DIOG apresentou maior emissão de luz, sem ou com estímulo (PMA), em aproximadamente 2 vezes a mais que o grupo NIOG (FIGURAS 31A e 32B, respectivamente). O grupo NIOG mostrou um aumento de 15 vezes na emissão de luz após estímulo com PMA e o grupo DIOG apresentou um aumento de 12 vezes após o estímulo. Animais DIOG também mostraram um aumento de 1,5 vezes no ensaio de redução do

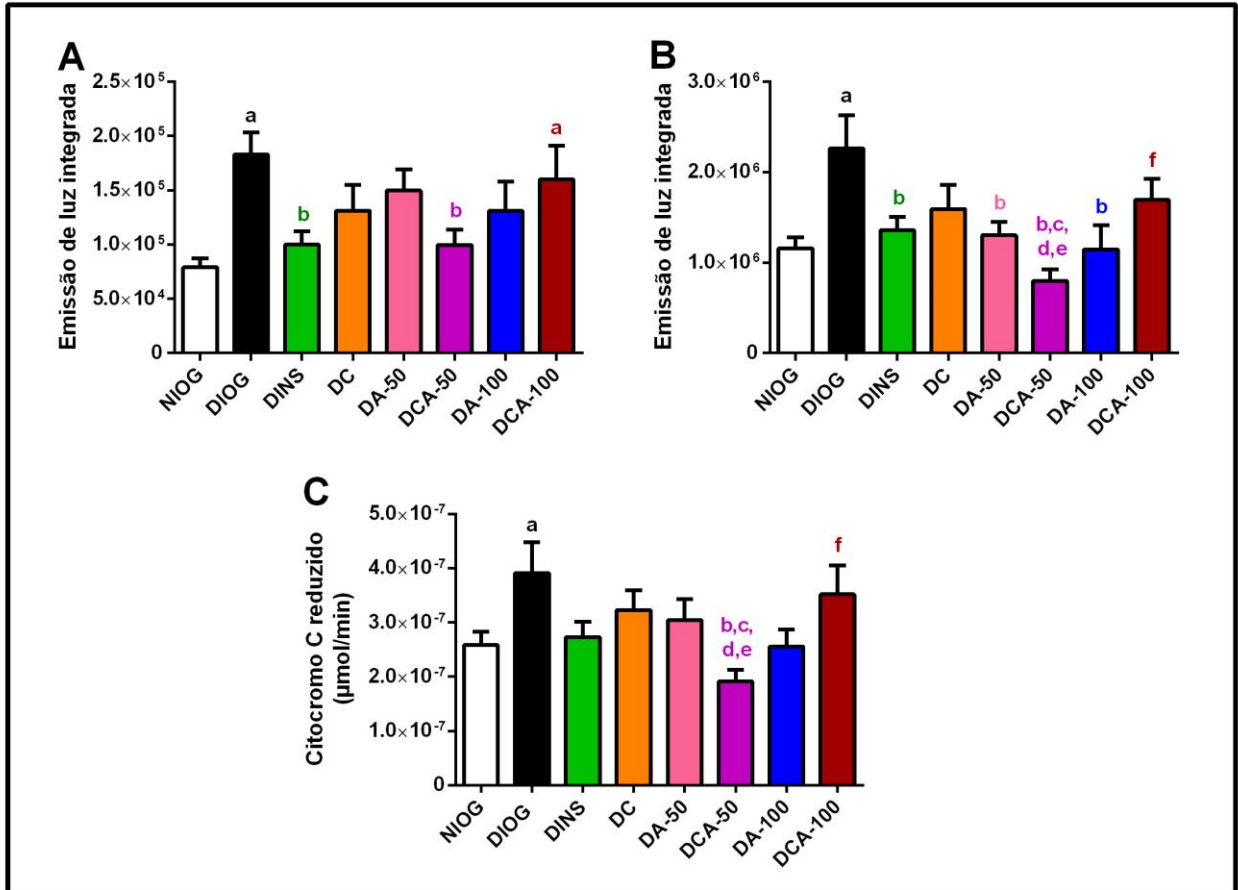
citocromo C, em relação ao grupo NIOG (FIGURA 31C). Esses dados em conjunto, demonstram que animais diabéticos DIOG apresentaram maior produção de $O_2^{\bullet-}$. O grupo DINS mostrou uma redução na emissão de luz em 45% (sem estímulo, FIGURA 31A) e em 39% (com estímulo, FIGURA 31B), em relação ao grupo DIOG, mas não apresentou diferença significativa no ensaio de redução do citocromo C (FIGURA 31C).

No ensaio de quimiluminescência dependente de lucigenina sem estímulo, apenas o tratamento com a associação curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina foi capaz de prevenir o aumento da produção de $O_2^{\bullet-}$, quando comparado ao grupo DIOG, apresentando valores semelhantes aos do grupo DINS (FIGURA 31A). Os demais grupos não apresentaram diferenças estatísticas, contudo, apresentaram perfis semelhantes aos respectivos grupos após o estímulo com PMA (FIGURA 31B).

No ensaio de quimiluminescência dependente de lucigenina com estímulo, os grupos DA-50 e DA-100 mostraram menor produção de $O_2^{\bullet-}$ em 43% e 52%, respectivamente, em relação ao grupo DIOG. Enquanto que o grupo DC não apresentou diferença em relação ao grupo DIOG (FIGURA 31B). O grupo DCA-50 também apresentou menor geração de $O_2^{\bullet-}$, em 65%, quando comparado ao grupo DIOG. A associação de curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina e em iogurte foi melhor do que os respectivos compostos isolados, mostrando um efeito combinado. O grupo DCA-100 não apresentou redução na produção de $O_2^{\bullet-}$ quando comparado ao grupo DIOG, portanto, nessa associação prevaleceu o efeito da curcumina (FIGURA 31B).

No ensaio de redução do citocromo C, entre os animais diabéticos, apenas o grupo DCA-50 apresentou menor redução do citocromo C em 51% quando comparado ao grupo DIOG (FIGURA 31C). Novamente, a associação de curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina em iogurte foi mais eficaz do que os respectivos compostos isolados, demonstrando um efeito combinado. Apesar dos demais grupos de animais diabéticos tratados não apresentarem diferenças significativas quando comparados ao grupo DIOG, eles apresentaram o mesmo comportamento observado no ensaio de quimiluminescência dependente de lucigenina com estímulo (FIGURA 31B). A diferença da sensibilidade das duas sondas utilizadas pode ser a responsável por tal efeito, uma vez que apenas os grupos que apresentaram maiores diferenças na emissão de luz, permaneceram com as diferenças no ensaio de redução do citocromo C.

Figura 31 – Atividade de NOX2 de neutrófilos peritoneais, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.



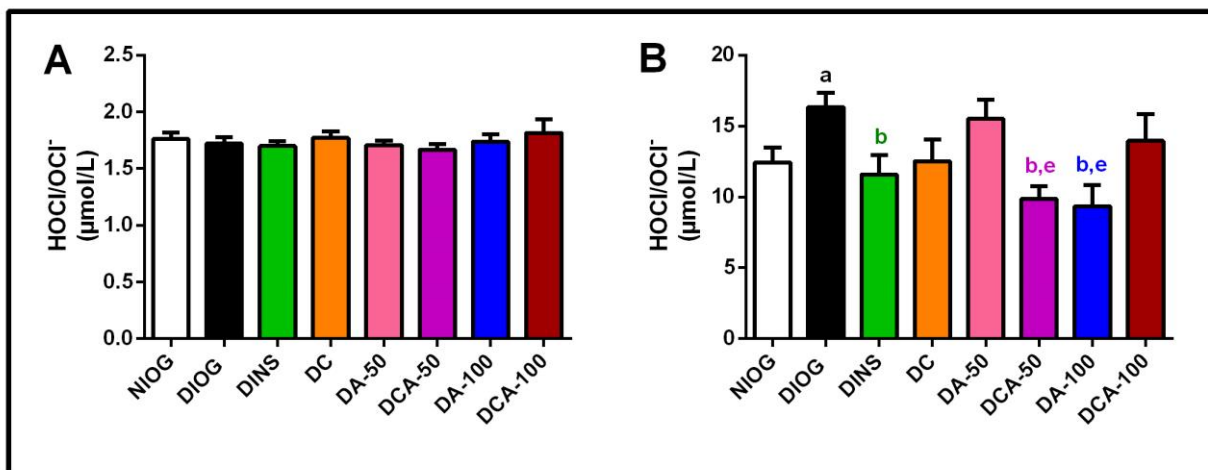
Quimiluminescência dependente de lucigenina **(A)** sem estímulo (sem PMA) **(B)** com estímulo (com PMA) e **(C)** Ensaio de redução do citocromo C, com estímulo (PMA). Os valores foram expressos como média ± EPM, n = 10. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DA-50; f, diferenças com DCA-50.

A atividade de MPO, sem ou com estímulo (PMA), de neutrófilos peritoneais pode ser observada na Figura 32. Como pode ser observado no ensaio de atividade de MPO sem estímulo (PMA) não foram encontradas diferenças entre os grupos analisados nesse trabalho (FIGURA 32A).

Já no ensaio de atividade de MPO utilizando PMA como estímulo (FIGURA 32B), o grupo DIOG apresentou maior quantidade de HOCl/OCl^- em 31% quando comparado ao grupo NIOG. O grupo DINS mostrou uma redução nos níveis de HOCl/OCl^- em 29% quando comparado ao grupo DIOG, alcançando valores semelhantes ao do grupo NIOG. Entre os tratamentos com os compostos administrados isoladamente, apenas o tratamento com 100 mg/kg de aminoguanidina (DA-100) promoveu redução nos níveis de HOCl/OCl^- (43%), em

relação ao grupo DIOG. O grupo DCA-50 mostrou redução nos níveis de HOCl/OCl⁻ de 39%, em relação ao grupo DIOG, portanto a associação de curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina em iogurte foi mais eficaz na redução dos níveis de HOCl/OCl⁻ do que os respectivos compostos isolados, demonstrando um efeito sinérgico. O grupo DCA-100 não apresentou diferença em relação ao grupo DIOG, portanto, novamente nessa associação prevaleceu o efeito da curcumina.

Figura 32 – Atividade de MPO de neutrófilos peritoneais, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.



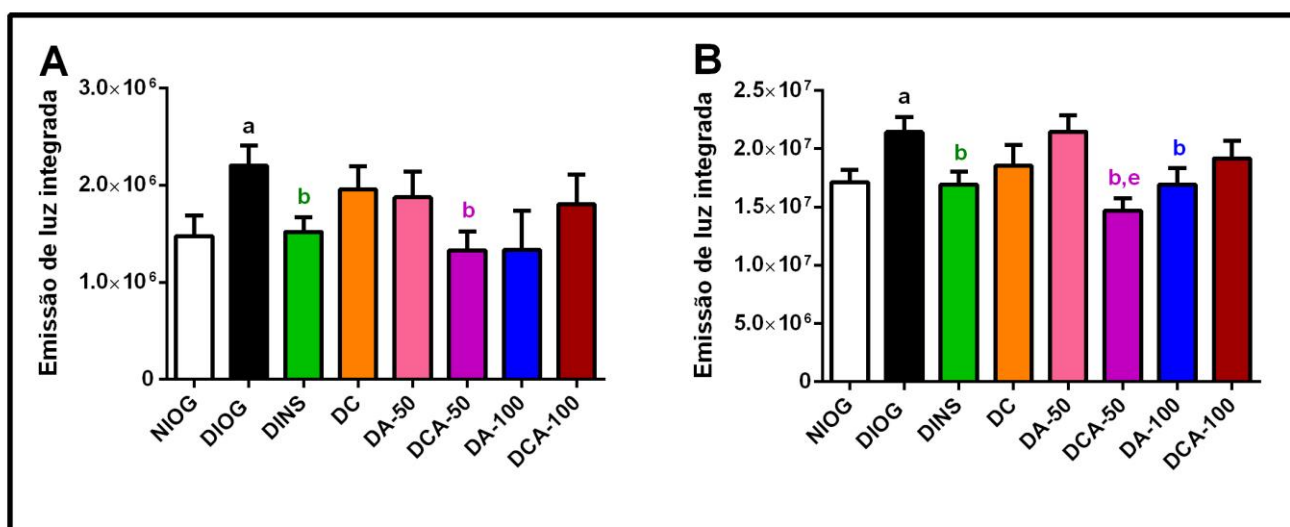
Atividade de mieloperoxidase (MPO) **(A)** sem estímulo (sem PMA) e **(B)** com estímulo (com PMA). Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; e, diferenças com DA-50.

A Figura 33 apresenta o *pool* de ERO de neutrófilos peritoneais, sem ou com estímulo (PMA), monitorado pelo ensaio de quimiluminescência dependente de luminol. O grupo DIOG apresentou maior emissão de luz em 47% sem estímulo (FIGURA 33A) e em 24% após estímulo (PMA) (FIGURA 33B), quando comparado ao grupo NIOG. Animais não diabéticos mostraram um aumento de 11 vezes na emissão de luz após estímulo com PMA e animais diabéticos DIOG apresentaram um aumento de 10 vezes após o estímulo. Esses dados em conjunto, demonstram que animais diabéticos DIOG apresentaram maior produção de ERO. O grupo DINS mostrou uma redução na geração de ERO de 32% (sem estímulo, FIGURA 33A) e em 19% (com estímulo, FIGURA 33B), em relação ao grupo DIOG, alcançando valores semelhantes ao do grupo NIOG.

No ensaio de quimiluminescência dependente de luminol sem estímulo, assim como o ensaio realizado com lucigenina sem estímulo, apenas o tratamento com a associação

curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina foi capaz de prevenir o aumento da produção de ERO, quando comparado ao grupo DIOG, apresentando valores semelhantes aos do grupo DINS (FIGURA 33A). Os demais grupos não apresentaram diferenças estatísticas, contudo, apresentaram perfis semelhantes aos respectivos grupos após estímulo com PMA (FIGURA 33B).

Figura 33 – Geração de ERO de neutrófilos peritoneais, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.



Geração de ERO (**A**) sem estímulo (sem PMA) e (**B**) com estímulo (com PMA). Os valores foram expressos como média ± EPM, n = 10. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; e, diferenças com DA-50.

Assim como na atividade de MPO (com estímulo) (FIGURA 32B), entre os tratamentos com os compostos administrados isoladamente, apenas o tratamento com 100 mg/kg de aminoguanidina (DA-100) promoveu redução na produção de ERO em 19%, quando comparado ao grupo DIOG (FIGURA 33B). O tratamento de ratos diabéticos com a associação de curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina em iogurte (DCA-50) promoveu redução na geração de ERO em 29%, em relação ao grupo DIOG, mostrando ser mais eficaz que os respectivos compostos isolados, demonstrando um efeito sinérgico. O grupo DCA-100 não apresentou redução nos níveis de ERO quando comparado ao grupo DIOG, portanto, nessa associação prevaleceu o efeito da curcumina (FIGURA 33B).

As cinéticas de emissão de luz nos ensaios de quimiluminescência dependente de lucigenina ou luminol em neutrófilos peritoneais estão apresentadas no Apêndice I.

Os resultados encontrados no presente estudo estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores comparativos de biomarcadores analisados em plasma, fígado e rim, após 45 dias de tratamento de ratos diabéticos tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina em relação aos ratos diabéticos não tratados (vide legenda para interpretação da tabela).

Biomarcadores	GRUPOS					
	DINS	DC	DA-50	DCA-50	DA-100	DCA-100
Peso corporal (%)	↑ 60	↑ 20	Sem efeito	↑ 19	Sem efeito	↑ 15
Glicemia (%)	↓ 82	↓ 16	↓ 10	↓ 14	↓ 12	↓ 10
HbA1c (%)	↓ 26	↓ 19	↓ 9	↓ 9	↓ 14	↓ 16
Frutosamina (%)	↓ 43	↓ 20	↓ 22	↓ 18	↓ 24	↓ 20
TAG (%)	↓ 65	↓ 31	↓ 35	↓ 50	↓ 31	↓ 52
Colesterol total (%)	↓ 20	↓ 11	↓ 11	↓ 21	↓ 10	↓ 16
Colesterol-não HDL (%)	↓ 62	↓ 33	↓ 34	↓ 49	↓ 26	↓ 42
ALT (%)	↓ 59	↓ 23	↓ 25	↓ 20	↓ 21	↓ 25

AST (%)	↓ 47	↓ 25	↓ 27	↓ 24	↓ 26	↓ 28
ALP (%)	↓ 72	↓ 18	↓ 24	↓ 29	Sem efeito	Sem efeito (perda do efeito curcumina)
Proteinúria (%)	↓ 72	↓ 33	Sem efeito	↓ 32	Sem efeito	Sem efeito (perda do efeito curcumina)
ESTRESSE GLICO-OXIDATIVO PLASMA						
TBARS (%)	↓ 73	↓ 10	↓ 8	↓ 21	↓ 20	↓ 20
PCO (%)	↓ 30	↓ 31	↓ 28	↓ 23	↓ 32	↓ 28
AGE fluorescentes (%)	↓ 60	↓ 57	↓ 48	↓ 40	↓ 47	↓ 48
NOx (%)	↓ 23	↓ 13	↓ 48	↓ 41	↓ 52	↓ 55
PON1 (%)	↑ 48	↑ 46	↑ 43	↑ 49	↑ 39	↑ 37
ESTRESSE GLICO-OXIDATIVO FÍGADO						
TBARS (%)	Sem efeito	Sem efeito	Sem efeito	Sem efeito	Sem efeito	Sem efeito

PCO (%)	↓ 26	↓ 29	↓ 28	↓ 35	↓ 35	↓ 24
AGE fluorescentes (%)	↓ 40	↓ 42	↓ 30	↓ 47	↓ 41	↓ 38
SOD (%)	↑ 27	Sem efeito	Sem efeito	↑ 28	Sem efeito	Sem efeito
CAT (%)	↑ 36	↑ 36	↑ 39	↑ 33	Sem efeito	↑ 24
GSH-Px (%)	↓ 42	↓ 31	↓ 31	↓ 19	↓ 31	↓ 31
GSH-Rd (%)	↓ 19	↓ 21	↓ 15	↓ 10	↓ 12	↓ 17
Grupos tióis não proteicos (%)	↑ 38	Sem efeito	Sem efeito	Sem efeito	Sem efeito	Sem efeito
ESTRESSE GLICO-OXIDATIVO RIM						
PCO (%)	↓ 31	↓ 38	↓ 37	↓ 37	↓ 36	↓ 37
AGE fluorescentes (%)	↓ 24	↓ 24	↓ 26	↓ 28	↓ 30	↓ 28
SOD (%)	↑ 21	↑ 20	↑ 24	↑ 21	Sem efeito	↑ 26

CAT (%)	↑ 51	↑ 40	↑ 36	↑ 34	↑ 35	↑ 26
GSH-Px (%)	↓ 41	↓ 24	↓ 22	↓ 24	↓ 24	↓ 24
GSH-Rd (%)	↓ 20	↓ 14	↓ 16	↓ 16	↓ 18	↓ 13
Grupos tióis não proteicos (%)	↑ 17	↑ 17	↑ 22	↑ 19	↑ 21	↑ 22
SINALIZAÇÃO DE AGE						
RAGE – FÍGADO (%)	↓ 62	↓ 55	↓ 37	↓ 63	Sem efeito	↓ 26
NF-kB – FÍGADO (%)	↓ 35	↓ 41	Sem efeito	↓ 31	Sem efeito	Sem efeito (perda do efeito curcumina)
NF-kB – RIM (%)	↓ 68	Sem efeito	↓ 37	↓ 45	Sem efeito	↓ 70
DETOXIFICADORES DE AGE						
AGE-R1 - FÍGADO (número de vezes)	↑ 2,4	↑ 2,1	↑ 2,5	↑ 2,0	↑ 2,4	↑ 2,6
GLO 1 – FÍGADO (número de vezes)	↑ 2,3	↑ 1,9	↑ 2,3	↑ 2,2	↑ 1,9	↑ 2,2

AGE-R1 – RIM (número de vezes)	↑ 3,2	↑ 2,1	↑ 3,1	↑ 3,2	↑ 1,8	↑ 1,6
GLO 1 – RIM (número de vezes)	↑ 2,0	↑ 1,5	Sem efeito	↑ 1,5	↑ 1,7	↑ 1,4
FUNÇÃO NEUTROFÍLICA						
Número de células migradas para cavidade peritoneal (%)	↑ 85	Sem efeito	↑ 81	↑ 89	↑ 85	↑ 76
Emissão de luz integrada (basal) (%) - QLuc	↓ 45	Sem efeito	Sem efeito	↓ 45	Sem efeito	Sem efeito
Emissão de luz integrada (com PMA) (%) - QLuc	↓ 39	Sem efeito	↓ 43	↓ 65	↓ 52	Sem efeito (perda do efeito aminoguanidina)
Citocromo C reduzido (%)	Sem efeito	Sem efeito	Sem efeito	↓ 51	Sem efeito	Sem efeito
HOCl/OCl⁻ (%) - atividade de MPO com PMA	↓ 29	Sem efeito	Sem efeito	↓ 39	↓ 43	Sem efeito (perda do efeito aminoguanidina)
Emissão de luz integrada (basal) (%) - QLuc	↓ 32	Sem efeito	Sem efeito	↓ 41	Sem efeito	Sem efeito

Emissão de luz integrada (com PMA) (%) - QLlum	↓ 19	Sem efeito	Sem efeito	↓ 29	↓ 19	Sem efeito (perda do efeito aminoguanidina)
---	------	------------	------------	-------------	------	---

Os valores foram expressos em percentual em relação ao grupo DIOG, exceto nos parâmetros AGE-R1 e GLO 1 (fígado e rim) em que os valores foram expressos em número de vezes em relação ao grupo DIOG.

Biomarcadores em negrito = indicam que o(s) tratamento(s) com a(s) associação(ões) foi(aram) melhor(es) que os respectivos compostos administrados isoladamente.

Setas = indicam aumento ou redução em relação ao grupo DIOG.

Números em negrito e preto = indicam que o tratamento com a associação foi melhor do que um dos respectivos compostos administrados isoladamente.

Números em negrito e vermelho = indicam que o tratamento com a associação foi melhor do que ambos compostos administrados isoladamente.

HbA1c = hemoglobina glicada; TAG = triacilgliceróis; ALT = alanina aminotransferase; AST = aspartato aminotransferase; ALP = fosfatase alcalina; TBARS = substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; PCO = proteínas carboniladas; AGE = produtos finais de glicação avançada; NOx = nitrato e nitrito total; PON1 = paraoxonase 1; SOD = superóxido dismutase; CAT = catalase; RAGE e AGE- R1 = receptores de AGE; NF-kB = fator nuclear kappa B; GLO 1 = glioxalase 1; QLluc = quimiluminescência dependente de lucigenina; QLlum = quimiluminescência dependente de luminol; MPO = mieloperoxidase; basal = reação na ausência de PMA; com PMA = reação na presença de PMA.

4.7 Glicemia, HbA1c e parâmetros da função neutrofílica de animais não diabéticos e animais diabéticos tratados com insulina, curcumina e/ou metformina

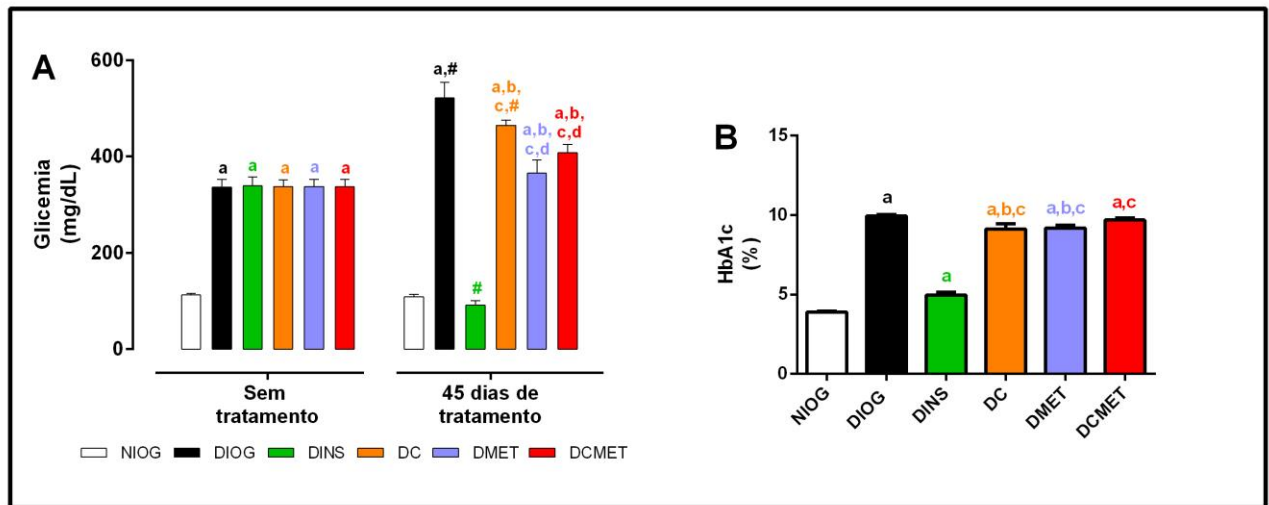
Para o monitoramento da instalação do DM experimental, assim como o controle glicêmico avaliamos a glicemia e a HbA1c (FIGURAS 34A e 34B, respectivamente). Animais diabéticos pertencentes a todos os grupos estudados apresentaram valores de glicemia de aproximadamente 340 mg/dL no pareamento (tempo 0, sem tratamento) (FIGURA 34A) e animais não diabéticos mostraram níveis glicêmicos dentro da normalidade até o final do período experimental.

No decorrer do período experimental, o grupo DIOG apresentou níveis glicêmicos progressivamente maiores, alcançando ao final do experimento valores médios de 522 mg/dL. Os ratos diabéticos que receberam insulina (DINS) apresentaram uma redução significativa da glicemia, alcançando valores médios semelhantes aos encontrados em animais não diabéticos (NIOG). Os animais diabéticos tratados com curcumina e/ou 250 mg/kg de metformina em iogurte apresentaram uma melhora nos níveis glicêmicos quando comparados aos animais do grupo DIOG. Os grupos DC, DMET e DCMET apresentaram uma redução de 11, 30 e 22%, respectivamente, em relação ao grupo DIOG. Animais DMET e DCMET apresentaram menores valores de glicemia quando comparados aos animais DC.

Em relação aos níveis de HbA1c (FIGURA 34B), todos os grupos de animais diabéticos apresentaram níveis maiores quando comparados ao grupo NIOG. O grupo DINS apresentou menores níveis de HbA1c em 50%, em relação ao grupo DIOG. Os tratamentos com curcumina ou metformina administrados isoladamente reduziram os níveis de HbA1c em 9 e 8%, respectivamente, quando comparados ao grupo DIOG. Já o tratamento com a associação de curcumina e metformina não apresentou diferença em relação ao grupo DIOG.

As diferenças nos valores de HbA1c entre o primeiro experimento (curcumina e/ou aminoguanidina) e o segundo experimento (curcumina e/ou metformina) é devido a troca de equipamento, uma vez que, o primeiro foi realizado por HPLC pelo equipamento da Bio-Rad e o segundo pelo equipamento Premier Hb9210.

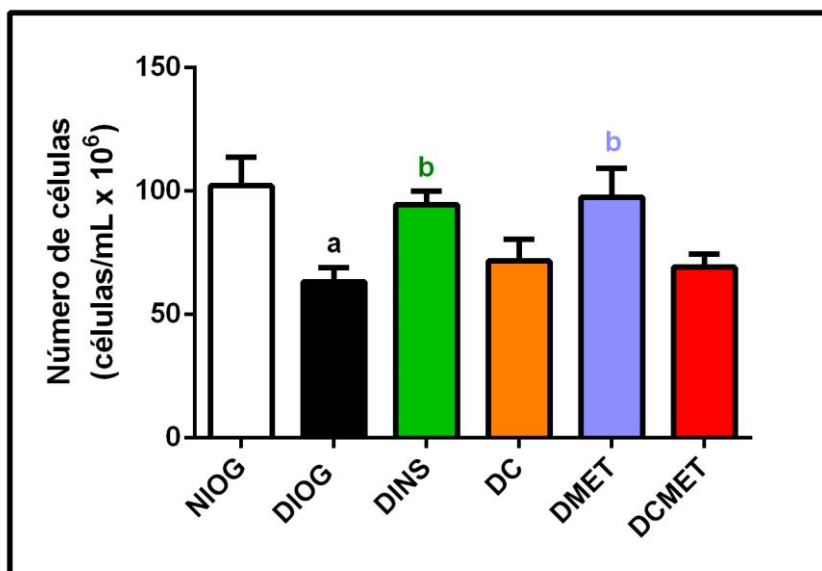
Figura 34 – Glicemia e HbA1c, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou metformina.



(A) Glicemia e (B) Hemoglobina glicada (HbA1c). Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC. #, diferenças com o dia 0.

A Figura 35 apresenta o número de neutrófilos migrados para a cavidade peritoneal dos ratos. O grupo DIOG apresentou menor quantidade de células recrutadas para a cavidade peritoneal em 38% quando comparado ao grupo NIOG. O grupo DINS mostrou um aumento na quantidade de células em 49% em relação ao grupo DIOG, alcançando valores semelhantes ao do grupo NIOG. O tratamento com metformina isolada aumentou a quantidade de células em 56%, quando comparado aos animais DIOG. Já os grupos DC e DCMET não apresentaram diferenças em relação ao grupo DIOG. Desta forma, na associação de curcumina e metformina prevaleceu o efeito da curcumina.

Figura 35 – Número de neutrófilos migrados para a cavidade peritoneal, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou metformina.



Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, n = 10. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG.

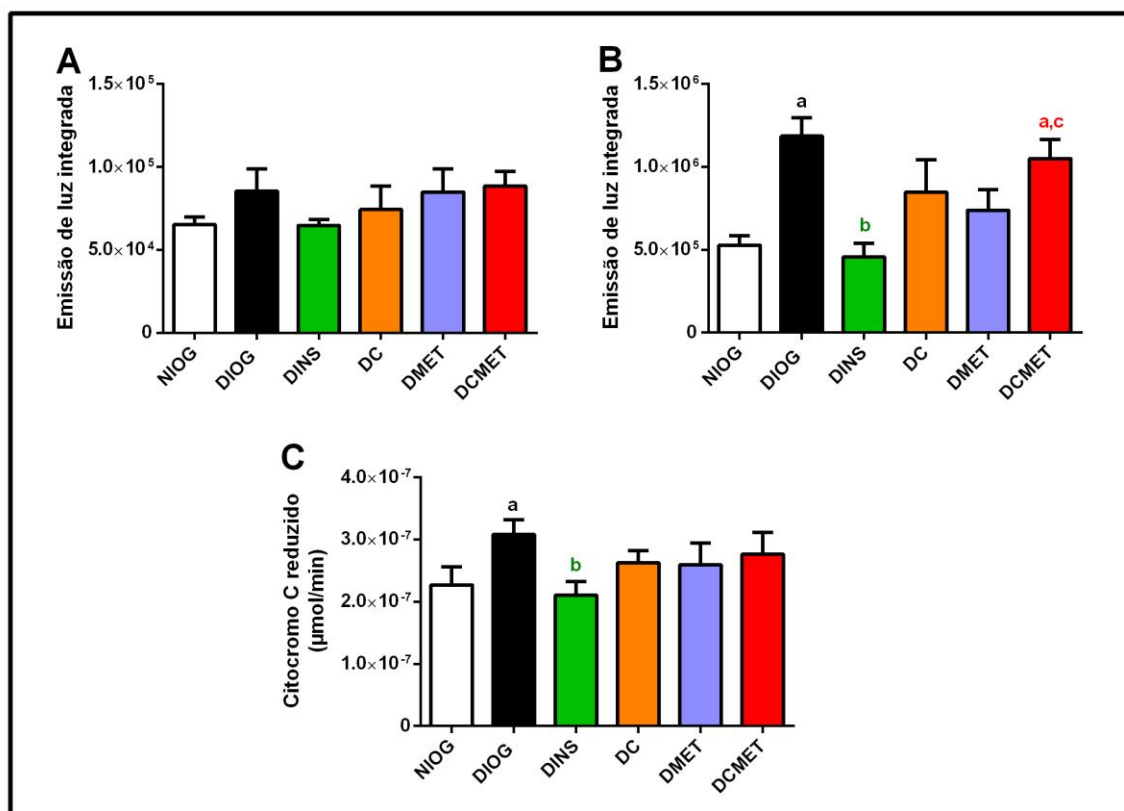
A atividade de NOX2 de neutrófilos peritoneais monitorada por quimiluminescência dependente de lucigenina sem ou com estímulo (PMA) e por redução do citocromo C (com estímulo) pode ser observada na Figura 36.

No ensaio de quimiluminescência dependente de lucigenina sem estímulo (sem PMA) (FIGURA 36A), não houve diferenças estatísticas nos grupos estudados, contudo, parece existir uma tendência de menor emissão de luz nos grupos NIOG e DINS. Já no mesmo ensaio utilizando estímulo (PMA), o grupo DIOG apresentou maior emissão de luz em aproximadamente 2 vezes a mais que o grupo NIOG (FIGURAS 36B). O grupo NIOG mostrou um aumento de 8 vezes na emissão de luz após estímulo com PMA e o grupo DIOG apresentou um aumento de 14 vezes após o estímulo. Animais DIOG também mostraram um aumento de 1,4 vezes no ensaio de redução do citocromo C, em relação ao grupo NIOG (FIGURA 36C). O grupo DINS mostrou uma redução na emissão de luz (com estímulo, FIGURA 36B) em 62% e no ensaio de redução do citocromo C em 32% (FIGURA 36C), em relação ao grupo DIOG.

Os tratamentos isolados com curcumina ou metformina não apresentaram diferenças estatísticas em relação aos grupos DIOG, NIOG e DINS nos níveis de $O_2^{\bullet-}$ (Figura 36). Já o

tratamento com a associação curcumina e metformina apresentou aumento na emissão de luz, na presença de estímulo (PMA) em relação aos grupos NIOG e DINS (FIGURA 36 B).

Figura 36 – Atividade de NOX2 de neutrófilos peritoneais, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou metformina.



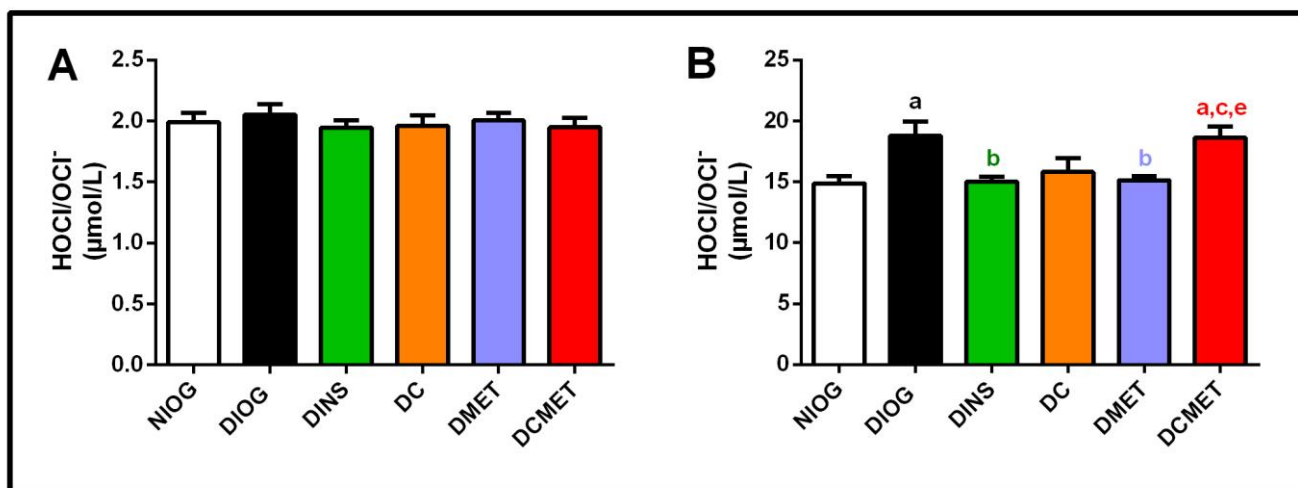
Quimiluminescência dependente de lucigenina **(A)** sem estímulo (sem PMA) **(B)** com estímulo (com PMA) e **(C)** Ensaio de redução do citocromo C, com estímulo (PMA). Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS.

A atividade de MPO, sem ou com estímulo (PMA), de neutrófilos peritoneais pode ser observada na Figura 37. Como pode ser observado no ensaio de atividade de MPO sem estímulo (PMA) não foram encontradas diferenças entre os grupos estudados nesse trabalho (FIGURA 37A).

No ensaio de atividade de MPO utilizando PMA como estímulo (FIGURA 37B), o grupo DIOG apresentou maior quantidade de HOCl/OCl^- em 26% quando comparado ao grupo NIOG. O grupo DINS mostrou uma redução nos níveis de HOCl/OCl^- em 20% quando comparado ao grupo DIOG, alcançando valores semelhantes ao do grupo NIOG. Entre os tratamentos com os compostos administrados isoladamente, apenas o tratamento com

metformina (DMET) promoveu redução nos níveis de HOCl/OCl^- (20%), em relação ao grupo DIOG. O grupo DCMET não apresentou diferença em relação ao grupo DIOG e ainda, mostrou maior geração de HOCl/OCl^- quando comparado ao grupo DMET, NIOG e DINS.

Figura 37 – Atividade de MPO de neutrófilos peritoneais, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou metformina.



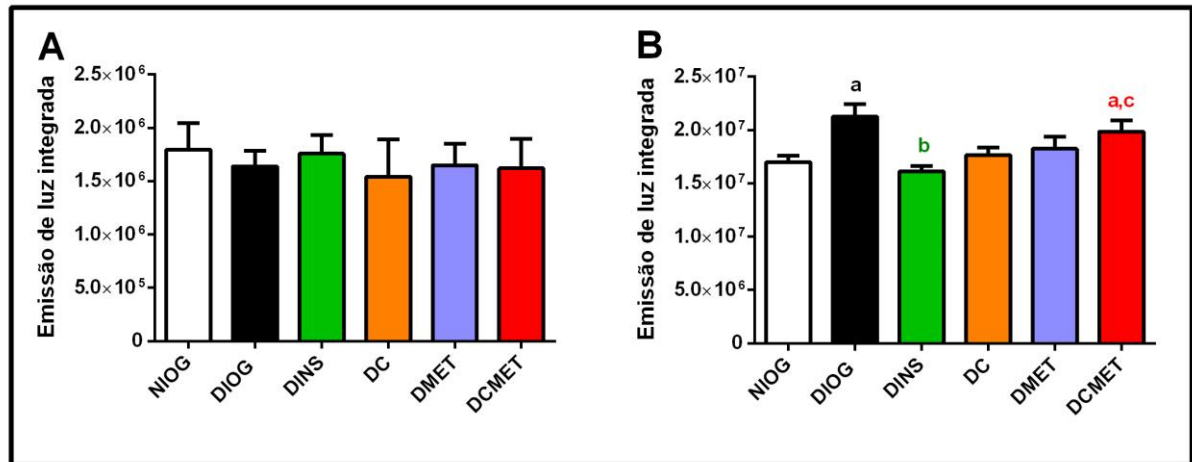
Atividade de mieloperoxidase (MPO) **(A)** sem estímulo (sem PMA) e **(B)** com estímulo (com PMA). Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM, $n = 10$. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; e, diferenças com DMET.

A Figura 38 apresenta o *pool* de ERO de neutrófilos peritoneais, sem ou com estímulo (PMA), monitorado pelo ensaio de quimiluminescência dependente de luminol.

Assim como no ensaio de quimiluminescência dependente de lucigenina sem estímulo (FIGURA 36A), no ensaio dependente de luminol sem estímulo também não houve diferenças estatísticas nos grupos estudados (FIGURA 38A).

No ensaio de quimiluminescência dependente de luminol com estímulo, o grupo DIOG apresentou maior emissão de luz em 24% em relação ao grupo NIOG (FIGURA 38B). O grupo DINS mostrou uma redução na geração de ERO de 24% em relação ao grupo DIOG, alcançando valores semelhantes ao do grupo NIOG. Os tratamentos com curcumina ou aminoguanidina não apresentaram diferenças estatísticas em relação aos grupos DIOG, NIOG e DINS. Já o tratamento com a associação apresentou aumento na emissão de luz em relação aos grupos NIOG e DINS (FIGURA 38B). Novamente, esses resultados se assemelham aos encontrados no ensaio de quimiluminescência dependente de lucigenina (FIGURA 36B).

Figura 38 – Geração de ERO de neutrófilos peritoneais, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou metformina.



Geração de ERO **(A)** sem estímulo (sem PMA) e **(B)** com estímulo (com PMA). Os valores foram expressos como média ± EPM, n = 10. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS.

5 DISCUSSÃO

O modelo experimental utilizado nesse estudo mimetiza as alterações do DM tipo 1, que é caracterizado por alta hiperglicemia e consequentemente o rápido aparecimento das complicações da doença. O menor peso corporal nos animais diabéticos DIOG certamente ocorreu devido à drástica redução nos níveis circulantes de insulina, uma vez que a administração de STZ promove significativa destruição das células beta pancreáticas produtoras de insulina. Consequentemente, ocorrem prejuízos nas respostas anabólicas teciduais dependentes deste hormônio; sabe-se que a insulina aumenta a velocidade de processos bioquímicos responsáveis pela síntese de glicogênio, proteínas e lipídeos, bem como estimula o armazenamento de TAG nos tecidos adiposos. Além disso, com a drástica redução nos níveis de insulina, diversos outros eventos são observados: não ocorre inibição da lipase hormônio sensível, responsável pela lipólise dos TAG e assim há diminuição das massas de tecidos adiposos; ocorre inibição da captação de glicose pelos tecidos adiposos, reduzindo assim a disponibilidade de substrato para a síntese de TAG; ocorre aumento na velocidade de degradação proteica juntamente com diminuição da síntese proteica, culminando em perda ou menor ganho de massa muscular (FELIG; BERGMAN, 1995; STUMP; NAIR, 2010). Portanto, todos os fatores acima descritos combinados culminam em menor ganho de peso corporal nos animais diabéticos DIOG, quando comparados aos animais não diabéticos (NIOG) ou diabéticos tratados com insulina (DINS) (FIGURA 13). Nossos resultados também mostraram que o tratamento de ratos diabéticos com curcumina promoveu aumento no peso corporal, enquanto que o tratamento com aminoguanidina não apresentou melhoria. Desta forma, os tratamentos com as associações curcumina e aminoguanidina (50 ou 100 mg/kg) promoveram benefícios no ganho de peso corporal, devido ao efeito benéfico da curcumina (FIGURA 13).

O maior ganho de peso corporal nos animais diabéticos tratados com curcumina corrobora os dados encontrados por Gutierrez et al. (2012), Arcaro et al. (2014) e Assis et al. (2017), os quais demonstraram que o tratamento de ratos diabéticos com 90 mg/kg de curcumina em iogurte foi capaz de promover um significativo ganho de peso corporal. O efeito da curcumina em promover maior ganho de peso corporal pode estar correlacionado com os mesmos mecanismos responsáveis pelo seu efeito anti-hiperglicemiante, como aumento da secreção da insulina e sensibilidade periférica à insulina, bem como aumento da captação de glicose pela musculatura esquelética, os quais favorecem processos anabólicos (BEST; ELLIOTT; BROWN, 2007; NA et al., 2011; XAVIER et al., 2012).

Corroborando nossos achados, Gül et al. (2008) e Luo; Fan; Xu (2012) também demonstraram que a aminoguanidina não promoveu benefícios no ganho de peso corporal em animais diabéticos, uma vez que o tratamento de ratos diabéticos com aminoguanidina, seja na dose de 1 g/L (administrada com água disponível aos animais) ou na dose de 50 mg/kg/dia (via intraperitoneal), respectivamente, não foram capazes de promover estímulo ao ganho de peso corporal.

A drástica redução nos níveis de insulina ocasiona diversas alterações que levam a hiperglicemia, tais como (i) redução na velocidade de captação de glicose pelos tecidos que possuem maiores quantidades do transportador de glicose GLUT 4 (em especial músculos esqueléticos, tecidos adiposos); (ii) diminuição nas velocidades de glicogênese e lipogênese; (iii) aumento na produção hepática de glicose, em especial devido ao aumento nas velocidades dos processos de glicogenólise e gliconeogênese (NIEDOWICZ; DALEKE, 2005). Portanto, esses mecanismos justificam o aumento da glicemia observado no grupo DIOG, quando comparado aos animais não diabéticos (NIOG) e os animais tratados com insulina (DINS) (FIGURA 14).

O efeito da curcumina em reduzir os níveis glicêmicos encontrado nesse trabalho, também foi demonstrado em outros estudos, em que ratos diabéticos foram tratados com curcumina: (i) 80 mg/kg em suspensão aquosa, administrada por via oral (intubação gástrica), durante 21 dias (ARUN; NALINI, 2002); (ii) 90 mg/kg incorporada ao iogurte, administrada por via oral (gavagem) durante 31 dias (GUTIERRES et al., 2012), 45 dias (ARCARO et al., 2014) e 50 dias (ASSIS et al. 2017); e (iii) 100 mg/kg em óleo de oliva, administrada por via oral, durante 56 dias (GHOSH et al., 2015). Diversos mecanismos têm sido descritos para explicarem a capacidade da curcumina em promover redução da glicemia, tais como (i) aumento da secreção de insulina via estimulação direta da atividade elétrica das células beta pancreáticas; (ii) aumento da sensibilidade periférica à insulina; (iii) aumento da expressão e translocação do GLUT 4 e, conseqüentemente, da captação de glicose, pela musculatura esquelética; (iv) inibição da gliconeogênese hepática, entre outros (BEST; ELLIOTT; BROWN, 2007; FUJIWARA et al., 2008; XAVIER et al., 2012; GUTIERRES et al., 2015; MOHAMMED; ISLAM, 2018).

A redução nos níveis glicêmicos de ratos diabéticos tratados com aminoguanidina corrobora outros estudos, os quais utilizaram aminoguanidina: (i) 1g/L em água disponível aos animais, durante 70 dias (TASLIDERE et al., 2014; ORMAN et al., 2015) ou durante 56 dias (GÜL et al., 2008); e (ii) 100 mg/kg em solução aquosa, administrada por via oral (gavagem), durante 56 dias (LV et al., 2018).

Está bem descrito na literatura que a hiperglicemia crônica promove a glicação de proteínas gerando os AGE, bem como, postula-se que os mesmos têm ações diretas e indiretas importantes que contribuem para o desenvolvimento de resistência à insulina no DM tipo 1. A interação de AGE com seu receptor RAGE ativam vias de sinalização que provocam o estresse oxidativo e a inflamação, os quais estão diretamente associados à resistência à insulina (UNOKI; YAMAGISHI, 2008; KAUL; APOSTOLOPOULOU; RODEN, 2015).

O metilgloxal, um dos produtos intermediários da geração de AGE, pode ocasionar modificações estruturais na insulina, por meio de sua ligação aos resíduos de arginina presentes no hormônio, assim a cadeia polipeptídica da insulina modificada, isto é, mais pesada que a da insulina livre, por um adicional de 126 Da, que é suficiente para tornar a insulina menos eficaz em relação a sua capacidade de ligar ao seu receptor, culminando em menor estímulo à captação e utilização da glicose. Além disso, outros mediadores da via de sinalização da insulina também podem ser afetados, uma vez que a fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) e a atividade de PI3K são suprimidos pelo metilgloxal de uma maneira dose dependente (SHAMSALDEEN et al., 2016). Também, existe uma hipótese que o metilgloxal pode bloquear a interação de AMP na quinase dependente de AMP (AMPK), pois o sítio alostérico da AMPK possui um domínio com três resíduos de arginina, estes podem ser muito vulneráveis à glicação ou outras modificações pós-traducionais, principalmente pelo metilgloxal. Desta forma, o bloqueio da AMPK pelo metilgloxal prejudica os mecanismos desencadeados pela interação AMP-AMPK, e consequentemente favorece a gliconeogênese e a lipogênese, que são características de resistência à insulina e do DM (GUGLIUCCI, 2009; GUGLIUCCI, 2016). Portanto, o efeito da aminoguanidina na redução dos níveis glicêmicos pode ser devido a sua capacidade anti-glicação ou inibidora dos efeitos dependentes das modificações proteicas desencadeadas pelo metilgloxal, e com isso ser capaz de reduzir a resistência à insulina e/ou impedir o bloqueio da AMPK.

Desta forma, tanto a curcumina quanto a aminoguanidina podem ter contribuído para a redução dos níveis glicêmicos observados nos grupos DCA-50 e DCA-100, entretanto em animais DCA-100 uma maior contribuição da curcumina na redução dos níveis glicêmicos pode ter ocorrido, uma vez que os valores glicêmicos encontrados no grupo DCA-100 se assemelham mais aos valores encontrados no grupo DC.

A HbA1c e a frutamina são exemplos conhecidos de produtos de Amadori (cetoaminas estáveis). A formação destes dois biomarcadores ocorre de forma irreversível e está diretamente relacionada à concentração de glicose sanguínea (TAHARA; SHIMA, 1995; WELSH et al., 2016). Os produtos de Amadori, produtos intermediários de glicação, podem

sofrer reações adicionais, como desidratação, fragmentação, oxidação e ciclização e originarem os AGE (URIBARRI, 2017).

A formação de HbA1c ocorre devido à reação não enzimática entre a glicose e a hemoglobina de forma progressiva, no eritrócito, uma vez que a HbA1c se acumula no seu interior e portanto vai apresentar uma meia-vida dependentes dos mesmos (PETERSON et al., 1998), ou seja, a HbA1c reflete a exposição às concentrações de glicose durante um período aproximado de 2 a 3 meses, e tem sido o biomarcador padrão usado clinicamente para monitorar o controle glicêmico e também no apoio diagnóstico de DM (SELVIN et al., 2015; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

A formação de frutossamina ocorre devido à reação não enzimática entre a glicose e proteínas plasmáticas circulantes, principalmente a albumina, mas também ocorre com as globulinas e outras proteínas, e reflete o controle glicêmico nas últimas 2 a 4 semanas, consequência do *turnover* dessas proteínas plasmáticas (ARMBRUSTER, 1987; SELVIN et al., 2015). Portanto, a concentração de frutossamina no plasma (ou soro) reflete o grau do controle glicêmico e é útil para monitorar a eficácia do tratamento do DM de uma maneira semelhante à HbA1c, no entanto, a frutossamina responde mais rapidamente às mudanças na terapia do que a HbA1c (ARMBRUSTER, 1987; DORCELY et al., 2017).

Nossos resultados mostraram que a glicemia não controlada dos animais diabéticos DIOG também foi capaz de promover o aumento nos níveis de HbA1c e frutossamina (FIGURA 15), além disso o grupo DIOG também apresentou maiores níveis plasmáticos de AGE fluorescentes (FIGURA 19C), demonstrando a progressão da glicação nesses animais. O grupo DINS apresentou níveis reduzidos de glicemia alcançando valores semelhantes ao do grupo NIOG, entretanto, a redução nos níveis de HbA1c e frutossamina não apresentaram o mesmo perfil da glicemia, sugerindo que os ratos diabéticos tratados com insulina podem ter apresentado episódios de hiperglicemia, além de terem sido expostos a eventos de glicação proteica antes do início do tratamento; contudo, o grupo DINS apresentou menores níveis plasmáticos de AGE fluorescentes, atingindo valores semelhantes aos observados no grupo NIOG, demonstrando que o tratamento com insulina foi capaz de prevenir os eventos de glicação avançada.

Os tratamentos com curcumina e/ou aminoguanidina reduziram os níveis glicêmicos, HbA1c, frutossamina, assim como os níveis plasmáticos de AGE fluorescentes. Desta forma, os tratamentos com curcumina e/ou aminoguanidina demonstraram ser eficazes no controle glicêmico e na prevenção da glicação inicial e avançada.

A redução nos níveis de HbA1c e frutossamina em ratos diabéticos tratados com curcumina também é encontrada em trabalhos da literatura (ARUN; NALINI, 2002; MOHAMED et al., 2009; HUSSEIN; ABU-ZINADAH, 2010; RASHID; SIL et al.; 2015) e estudos também demonstram que o tratamento de ratos diabéticos com a aminoguanidina reduz os níveis de HbA1c e frutossamina (GONZALEZ; GUTIERREZ; COTERA, 2014; JOGLEKAR; PANASKAR; ARVINDEKAR, 2014; HAFIZUR; MOMIN; FATIMA, 2017).

A deficiência na secreção de insulina e/ou estados hiperglicêmicos crônicos também podem ocasionar dislipidemia em indivíduos com DM tipo 1 ou tipo 2, caracterizada pelo aumento nos níveis plasmáticos de TAG, colesterol total, colesterol-LDL e baixa concentração plasmática de colesterol-HDL, os quais, em conjunto com a hiperglicemia, desempenham um papel importante no desenvolvimento de doenças vasculares oclusivas, predispondo assim os indivíduos diabéticos a um maior risco para aterosclerose, uma das principais complicações a longo prazo do DM (GOLDBERG, 2001; WU; PARHOFER, 2014).

O efeito hipolipêmico da curcumina observado nesse trabalho (FIGURA 16), também é demonstrado em outros estudos, os quais mostram que ela é capaz de reduzir os níveis séricos de TAG, colesterol total, colesterol-LDL, ácidos graxos livres, e aumentar os níveis de colesterol-HDL (FAN et al., 2006; JANG et al., 2008; GUTIERRES et al., 2012; NAJAFIAN, 2014; CHANDRAKALA; TEKULAPALLY, 2014; ASSIS et al., 2017); portanto, nossos dados corroboram com os encontrados da literatura.

A curcumina possui diversos mecanismos descritos na literatura responsáveis pelo seu efeito hipolipêmico, incluindo: (i) ativação de AMPK e consequente estímulo à oxidação de ácidos graxos, inibição da síntese de colesterol e da lipogênese; (ii) inibição da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase), enzima-chave na via da síntese do colesterol; (iii) indução da expressão do transportador A1 de cassetes de ligação ao ATP (ABCA1), apolipoproteína A1 (Apo A1) e do receptor da classe de eliminação B tipo 1 (SR-BI), proteínas que estão envolvidas no transporte reverso do colesterol mediado pela HDL; e (iv) inibição da expressão de apolipoproteína B1 (Apo B100) e indução da expressão do receptor de LDL (LDL-R), resultando em uma redução no colesterol-LDL plasmático (PANAHI et al., 2018).

Nesse estudo, também foi possível observar que o tratamento com aminoguanidina reduziu os níveis de TAG, colesterol total e colesterol-não HDL (FIGURA 16), corroborando os dados demonstrado por Bucala et al. (1994) e Degenhardt et al. (2002). Há poucos relatos na literatura sobre o efeito da aminoguanidina nos biomarcadores de dislipidemia, entretanto,

estudos demonstram que substâncias que previnem a glicação e/ou a formação de AGE podem ser úteis na promoção de melhorias nas desordens do metabolismo lipídico (PANAGIOTOPOULOS et al., 1998; MACHADO et al., 2006). A hiperglicemia no DM favorece a glicação de lipoproteínas circulantes, a qual ocasiona alterações na atividade de algumas moléculas, tais como ABCA1, proteína de transferência de colesterol (CETP), lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) e lipase lipoprotéica, e desta forma estas alterações podem contribuir para o estabelecimento de distúrbios do metabolismo lipídico (PASSARELLI et al., 2005; MACHADO et al., 2006).

Nossos resultados mostraram que o tratamento de ratos diabéticos com as associações curcumina e aminoguanidina (50 ou 100 mg/kg) foram mais eficazes que os respectivos compostos isolados na redução da hiperlipidemia. Especialmente a associação curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina que apresentou efeito combinado na redução dos níveis de colesterol total.

A ausência de diferença estatística nos níveis de colesterol-HDL entre os grupos conduzidos nesse trabalho corrobora com os resultados de Arcaro et al. (2014), que após 45 dias de tratamento, também não encontraram qualquer alteração nas concentrações plasmáticas de colesterol-HDL em animais diabéticos submetidos aos tratamentos com insulina, curcumina e/ou piperina em relação aos animais diabéticos DIOG. No entanto, Assis et al. (2017) observaram reduções nos níveis de colesterol-HDL nos animais diabéticos DIOG em relação aos animais não diabéticos (NIOG), essa diferença pode ser explicada principalmente pelo fato de as análises realizadas por Assis et al. (2017) terem sido conduzidas em plasma de animais jejuados, e no presente estudo, assim como no estudo de Arcaro et al. (2014), as coletas de sangue para obtenção do plasma foram feitas em animais alimentados. Assis et al. (2017) também demonstraram que animais diabéticos tratados com a curcumina em iogurte não apresentaram diferenças nos níveis de colesterol-HDL em relação aos ratos diabéticos tratados apenas com iogurte (ou animais DIOG).

A hiperglicemia crônica também contribui para a instalação do estresse glico-oxidativo em muitos tecidos (fígado, rim, retina, nervos periféricos, endotélio vascular) devido uma produção exacerbada de ERO, principalmente pela cadeia transportadora de elétron mitocondrial (BROWNLEE, 2005). De acordo com os resultados apresentados, o estresse glico-oxidativo em ratos diabéticos não tratados foi instalado, uma vez que houve aumento nos níveis de biomarcadores plasmáticos de LPO (TBARS), oxidação de proteínas (PCO), glicação avançada (AGE) e produtos estáveis do NO (NOx total), assim como diminuição na atividade da enzima antioxidante PON1. O tratamento de ratos diabéticos com

insulina foi capaz de inibir esse processo; nota-se que animais DINS apresentaram níveis de marcadores do estresse glico-oxidativo e potencial antioxidante semelhantes aqueles do grupo NIOG. É conhecido que o controle da glicemia com tratamento insulínico em ratos diabéticos (indução por STZ) previne o aumento da LPO, PCO e AGE (JAIN et al., 1990; CHEN X. et al., 2009; ARCARO et al. 2014; ASSIS et al. 2017; GUTIERRES et al., 2019).

O efeito da curcumina na redução dos biomarcadores plasmáticos de lesão glico-oxidativa encontrado nesse estudo (FIGURA 19), corrobora estudo prévios do laboratório (ASSIS et al., 2017; ROXO et al., 2019). A capacidade da curcumina em reduzir os níveis glicêmicos deve ser responsável, pelo menos em parte, pela diminuição nos biomarcadores do estresse glico-oxidativo. A curcumina também possui a capacidade de sequestrar ERO (AK; GÜLÇİN, 2008; BARZEGAR; MOOSAVI-MOVAHEDI, 2011) e de inibir LPO (MEGHANA; SANJEEV; RAMESH, 2007), o que pode também corroborar as reduções observadas nos marcadores de lesão glico-oxidativa *in vivo*. Além disso, há outros mecanismos pelos quais a curcumina pode inibir a formação de AGE e consequentemente o estresse glico-oxidativo, tais como (i) sequestrar o metilglioxal; (ii) induzir a expressão de AGE-R1 e inibir a expressão de RAGE (ALIZADEH; KHEIROURI et al., 2019).

Nossos resultados mostraram que o tratamento com a aminoguanidina também foi eficaz na redução dos biomarcadores plasmáticos de lesão glico-oxidativa, corroborando outros trabalhos (IHM et al., 1999; BHAT et al., 2016). A aminoguanidina é um potente inibidor de geração de AGE, portanto, contribui para a redução na formação de ERO e consequentemente redução da LPO e oxidação de proteínas.

Os tratamentos com as associações curcumina e aminoguanidina 50 ou 100 mg/kg, apresentaram grande potencial contra o estresse glico-oxidativo, demonstrando reduções nos níveis plasmáticos de TBARS, PCO e AGE fluorescentes. Nos níveis de TBARS, animais DCA-100 apresentaram maior redução, assim como animais DA-100, mostrando o benefício da aminoguanidina nessa associação, uma vez que, no ganho de peso corporal e nos níveis glicêmicos a maior contribuição do efeito encontrado foi devido ao efeito da curcumina.

Já o tratamento com a associação curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina foi mais eficaz (efeito sinérgico) na redução dos níveis plasmáticos de TBARS em relação aos tratamentos isolados com curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina, mostrando o grande benefício alcançado com essa associação, uma vez que, a LPO é um importante biomarcador do estresse oxidativo e está amplamente envolvida com a progressão das complicações do DM (DAVÌ et al., 2005; ULLAH; KHAN; KHAN, 2016).

A instalação do estresse glico-oxidativo observada nos animais DIOG, deve incluir também o aumento plasmático de NOx (nitrato e nitrito total) observada nesse trabalho. Dentre as isoformas das NOS, a nNOS e eNOS são enzimas constitutivas, com distribuição limitada em tecidos, já iNOS é uma enzima induzível, expressa em todas as células nucleadas que geram grandes quantidades de NO em resposta a estímulos imunológicos (citocinas pró-inflamatórias) e não imunológicos, como hiperglicemia, obesidade, altos níveis de ácidos graxos livres e estresse oxidativo (KOMERS; ANDERSON, 2003; SOSKIC et al., 2011). A ordem de classificação de atividade das isoformas das NOS por unidade de tempo é nNOS > iNOS > eNOS, no entanto, a iNOS gera 100 a 1000 vezes mais NO do que a eNOS, pois é expressa em respostas a estímulos imunológicos e sua atividade persiste por muitas horas (MORRIS; BILLIAR, 1994; SOSKIC et al., 2011). Desta forma, preconiza-se, que os níveis plasmáticos de NOx observados nesse trabalho, podem ser decorrentes da maior atividade/expressão da iNOS.

No DM, a função cardiovascular prejudicada é parcialmente atribuída a superexpressão patológica da iNOS nos tecidos cardiovasculares (NAGAREDDY et al., 2009; FARIA; PERSAUD, 2017). A iNOS também é uma importante fonte de ERO no rim diabético (GAO; HU; LI et al., 2017). Além disso, Fujimoto et al. (2005) demonstraram que a deficiência de iNOS no músculo esquelético de ratos preveniu a resistência insulínica causada por uma dieta rica em gordura. O NO gerado pela iNOS está envolvido em diversos efeitos fisiológicos, entretanto, disfunção na sua atividade/expressão pode estar envolvida na fisiopatologia de diversas doenças, portanto, a iNOS deve ser rigorosamente controlada (PAUTZ et al., 2010).

Nossos resultados mostraram que, o tratamento com curcumina isolada diminuiu os níveis de NOx (vs DIOG), corroborando com outros trabalhos. A curcumina possui a capacidade de inibir a iNOS protegendo as biomoléculas dos danos oxidativos, esse efeito é mediado em parte pela inibição do NF-kB e com isso a redução da expressão de mediadores pró-inflamatórios (ZHANG et al., 2013; JEENGER et al., 2015).

Já os tratamentos com ambas as doses aminoguanidina apresentaram alta redução nos níveis de NOx (vs DIOG) e também apresentaram menores níveis em relação aos grupos NIOG e DINS. Essa resposta encontrada é devido a capacidade da aminoguanidina em inibir a iNOS por competição com o substrato (L-arginina), uma vez que, possui semelhança estrutural com o mesmo (CORBETTA, J. A.; MCDANIEL, 1996; THORNALLEY, 2003). Desta forma, os efeitos benéficos da aminoguanidina além de estarem relacionados a inibição da formação de AGE, também podem ser devido a inibição da iNOS. O efeito da

aminoguanidina da inibição de iNOS também tem sido estudado em modelos de DM, demonstrando atenuação/prevenção das complicações da doença como em problemas cardiovasculares, retinopatia e neuropatia (DU et al., 2002; DUDHGAONKAR et al.; 2007; SONG et al., 2017; CARR et al., 2018).

Dentre os tratamentos, o tratamento com curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina foi o que apresentou o efeito mais satisfatório, pois foi capaz de reduzir os níveis de NO_x em valores semelhantes aos dos grupos NIOG e DINS. Considerando que, tanto a superprodução ou deficiência de NO podem resultar em prejuízos da homeostase do organismo (PITOCCO et al., 2010).

A PON1 é a principal enzima responsável pelas propriedades antioxidantes da HDL, pois possui a capacidade de prevenir a oxidação da LDL e de membranas celulares, portanto, contribui para a prevenção do estresse oxidativo (WATSON et al., 1995; SHUNMOOGAM; NAIDOO; CHILTON, 2018). No DM, a atividade de PON1 está diminuída, o que favorece o desenvolvimento das complicações desta síndrome, principalmente as vasculares (JENKINS; KLEIN; ZHENG, 2000; MACKNESS; DURRINGTON; MACKNESS, 2002; YU et al., 2017). Kordonouri, James e Bennetts (2001) demonstraram uma relação inversa entre a glicemia e a atividade sérica de PON1 em jovens com DM tipo 1. Além disso, outros estudos relataram que a baixa atividade de PON1 está relacionada com a glicação não enzimática em sua estrutura (HEDRICK et al., 2000; FERRETTI et al., 2001; YU et al., 2017). Mastorikou et al. (2008) demonstraram que a glicação de PON1 inibiu sua atividade e consequentemente prejudicou sua capacidade de metabolizar os hidroperóxidos lipídicos de membrana. A PON1 possui resíduos livres de cisteína, que podem ser potencialmente alvos de ataques de espécies reativas, ocasionando alteração da atividade enzimática (MACKNESS et al., 1996; HARISA, 2010). Portanto, a baixa atividade de PON1 em animais diabéticos DIOG pode ser devido à instalação do estresse glico-oxidativo, corroborado, principalmente, pelos níveis aumentados de TBARS e AGE. Nossos resultados mostraram que, o tratamento com curcumina e/ou aminoguanidina além de reduzirem os níveis dos biomarcadores do estresse glico-oxidativo (FIGURA 19), também apresentaram maior atividade da enzima antioxidante PON1 (FIGURA 21), demonstrando novamente o potencial desses compostos em atuarem no combate ao estresse glico-oxidativo *in vivo*. Estudos também mostraram que o tratamento de ratos diabéticos (induzido por STZ) com a curcumina em iogurte (ASSIS et al., 2017, ROXO et al., 2019) ou o tratamento de ratos com colite ulcerativa (induzida por ácido acético) com aminoguanidina (HARISA, 2000) preservaram a atividade da PON1.

Nossos resultados também mostraram, a instalação do estresse glico-oxidativo no fígado e rim de animais DIOG, podendo ser observada pelo aumento nos níveis de PCO (fígado e rim), AGE fluorescentes (fígado e rim), TBARS (rim) e níveis proteicos de RAGE (fígado), assim como a redução nas atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT (fígado e rim), diminuição nos níveis de grupos tióis não proteicos e no sistema de detoxificação dos AGEs com redução nos níveis proteicos de AGE-R1 e GLO 1 (fígado e rim). O grupo DIOG também apresentou aumento nos níveis plasmáticos das enzimas hepáticas ALT, AST e ALP (FIGURA 17), portanto, esses dados em conjunto indicam a presença de lesão hepática nesse grupo de ratos diabéticos não tratados, sugerindo que a instalação do estresse glico-oxidativo pode ter sido responsável por danificar a integridade dos hepatócitos, uma vez que, o aumento das enzimas ALT, AST e ALT no plasma de ratos diabéticos possui correlação positiva com o aumento da liberação dessas enzimas por tecidos danificados pelo estresse oxidativo que ocorre no DM (MORI et al., 2003; KORUK et al., 2004). Além da lesão hepática, o grupo DIOG também demonstrou a presença de dano renal, uma vez que apresentou aumento nos níveis de proteinúria (FIGURA 18). A proteinúria é um importante biomarcador de lesão renal no diabetes, pois permite o acompanhamento da evolução da lesão renal em decorrência da falta de tratamento da hiperglicemia (BABU; SRINIVASAN, 1999; KARALLIEDDE; GNUDI, 2008). Todas essas alterações observadas no grupo DIOG foram revertidas pelo tratamento com insulina.

Ao avaliarmos os níveis de grupos tióis não proteicos nos tecidos (fígado e rim), podemos sugerir que estes refletem diretamente os níveis de GSH (antioxidante não enzimático) existentes nesses tecidos, uma vez que, a GSH está presente na maioria das células e é o tiol mais abundante no meio intracelular. Sua potente capacidade antioxidante é proveniente do grupamento tiol presente na cisteína (MEISTER; ANDERSON, 1983; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Ainda, a molécula de GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, além de diminuir a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia, atua no transporte e é reservatório de cisteína, participa da detoxificação de agentes químicos e na eliminação de peróxidos, como os produtos da LPO (DENEKE; FANBURG, 1989; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Diferente dos resultados encontrados no plasma, os menores níveis de TBARS em fígado de animais DIOG (vs NIOG), sugerem a relação com as respostas observadas com os componentes do sistema da glutathiona. A enzima GSH-Px é capaz de exercer sua atividade mesmo com baixas concentrações de GSH, um de seus co-substratos. Além disso, existem afinidades diferenciais de certas isoformas de GSH-Px por diversos peróxidos, dentre eles, os

peróxidos lipídicos, formando como principais produtos água e álcoois (ESWORTHY et al., 1993). Com a instalação do estresse glico-oxidativo no DM, ocasionado principalmente pela hiperglicemia, há um aumento na produção de peróxidos lipídicos que combinado com a diminuição nos níveis de NADPH e na regeneração de GSH (devido ao aumento no fluxo da glicose pela via dos polióis), pode haver estímulo aos mecanismos compensatórios que culminam em maior atividade de GSH-Px, pois esta enzima tem como substratos os peróxidos lipídicos (BROWNLEE et al., 2001; JAGDALE et al., 2016). Tal mecanismo compensatório pode ser evidenciado em nosso estudo, uma vez que o grupo DIOG apresentou maior atividade de GSH-Px no fígado, em comparação aos animais não diabéticos.

Um dos principais grupos de proteínas solúveis no fígado envolvidos na detoxificação de produtos da LPO é a glutathione S-transferase (GST), a qual pertence a uma família de insoenzimas. A GST catalisa a conjugação de produtos da LPO com a molécula GSH, aumentando a hidrossolubilidade e facilitando sua excreção. A ação detoxificante dessa enzima é importante na proteção contra o estresse oxidativo (KAUSHIK; KAUR, 2003; TORRES; SOARES; PEREIRA, 2006). Algumas isoenzimas da GST estão envolvidas na conjugação do HNE (produto da LPO) ao GSH, atuando como uma fonte importante de eliminação deste composto altamente reativo (SCHAUR et al., 2015).

Portanto, é possível conceber que os peróxidos lipídicos, incluindo TBARS, estejam sendo produzidos de forma exacerbada devido ao estresse oxidativo no DM, porém estão sendo eliminados de forma mais eficiente ainda pela atividade aumentada de GSH-Px e também poderiam estar sendo eliminados pela atividade da GST. Os menores níveis de grupos tiois não proteicos, os quais incluem GSH, em fígado de animais DIOG sugerem maiores taxas de oxidação deste metabólito, provavelmente pela atividade aumentada da GSH-Px e possivelmente da GST.

Ao contrário dos nossos achados, em estudo recente de nosso laboratório Guttierres et al. (2019) demonstraram que ratos diabéticos DIOG (indução via administração de STZ), após 35 dias de experimento, apresentaram diminuição na atividade de GSH-Px, no fígado, em comparação aos animais não diabéticos NIOG. A diferença encontrada no presente trabalho em relação ao trabalho de Guttierres et al. (2019) referente a atividade de GSH-Px pode ser devido às diferenças nos valores de glicemia dos animais diabéticos, e portanto, diferenças na severidade do modelo experimental. No estudo de Guttierres et al. (2019), no dia 0, o grupo DIOG apresentou valores médios de glicemia de aproximadamente 525 mg/dL e, no dia 35, aproximadamente 650 mg/dL. No presente estudo, o grupo DIOG apresentou valores médios de glicemia menores, tanto no início (aproximadamente 400 mg/dL) quanto ao final

(aproximadamente 560 mg/dL) dos 45 dias de experimento. Desta forma, considerando estas diferenças nos níveis glicêmicos, mesmo utilizando o mesmo modelo experimental de DM, os maiores valores de glicemia dos ratos DIOG no estudo de Gutierres et al. (2019) podem ser os responsáveis pela maior promoção de estresse glico-oxidativo, superando os mecanismos de compensação antioxidante.

Assim como no fígado, animais DIOG (vs NIOG) apresentaram aumento nas atividades das enzimas GSH-Px e GSH-Rd no rim. No entanto, ao contrário do observado no fígado, animais DIOG mostraram aumento nos níveis de TBARS no rim. Pode-se sugerir que a resposta encontrada pode ser devido a menor atividade da enzima GST no rim, quando comparada ao fígado e desta forma, ocorre uma menor eliminação dos produtos da LPO (KAUSHIK; KAUR, 2003).

As alterações prejudiciais nos biomarcadores do estresse glico-oxidativo, defesas antioxidantes e sistemas de detoxificação observadas no grupo DIOG, no fígado e rim são de grande importância para o desenvolvimento de complicações diabéticas. O fígado é um importante órgão participante do controle do metabolismo energético e de processos de biotransformação de xenobióticos, esse órgão tem alta susceptibilidade ao estresse glico-oxidativo, e na combinação desse estresse com uma resposta inflamatória intensa contribuem para o início e progressão da lesão hepática, a qual é caracterizada pelo aumento da liberação das enzimas hepáticas como ALT, AST, ALP e γ -glutamil transpeptidase (GGT); acúmulo de MDA, PCO e AGE; diminuição das atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px, e diminuição de GSH (antioxidante não enzimático); infiltração de leucócitos e aumento da produção de citocinas; entre outros (WELT et al., 2004; NANNIPIERI et al., 2005; MOHAMED et al., 2016; LI et al., 2015). O aumento na geração de AGE contribui para o estímulo das vias inflamatórias, prejuízos na sinalização da insulina e disfunção do metabolismo hepático (KAUL; APOSTOLOPOULOU; RODEN, 2015). Concomitante ao rim, o fígado exerce um papel importante na eliminação dos AGE, portanto em condições de danos hepáticos crônicos ocorre o acúmulo de AGE plasmático (SEBEKOVÁ et al., 2002 e ZUWALA-JAGIELLO et al., 2009).

Outra importante complicação no DM é a doença renal diabética, a qual é uma das complicações prevalentes do DM tipo 1 e 2, e é a principal causa de insuficiência renal crônica e doença renal terminal (KOYE et al., 2017). A hiperglicemia crônica leva à ativação de vários processos patológicos, que afetam numerosas células dos rins, tais como células endoteliais glomerulares, musculares lisas, mesangiais, podócitos e células dos ductos tubulares e coletores (FORBES; COOPER, 2013). O aparecimento de proteinúria é um dos

primeiros sinais de lesão renal no DM, uma vez que somente moléculas de baixo peso molecular aparecem comumente na urina. A nefropatia diabética é consequência da falta de regulação do metabolismo da glicose, sendo a hiperglicemia responsável pelo aumento na glicação de proteínas, promovendo assim alterações hemodinâmicas no tecido renal (BABU; SRINIVASAN, 1999; KARALLIEDDE; GNUDI, 2008). O estresse glico-oxidativo desempenha um papel importante na iniciação e progressão da nefropatia diabética, a qual é caracterizada por anormalidades funcionais e estruturais (FORBES; COUGHLAN; COOPER, 2008). O aumento das ERO juntamente com deficiências nos sistemas antioxidantes causam danos significativos nos tecidos, incluindo os rins, promovendo LPO, danos ao DNA, modificação de proteínas, entre outros, além de contribuírem para o estabelecimento de inflamação e fibrose renal. Entre os muitos sistemas responsáveis pela geração das ERO nos rins, a NADPH oxidase é um dos contribuintes mais importantes (JHA et al., 2016). Além disso, a geração de AGE *per se* e a sua interação com o receptor RAGE desencadeiam mecanismos celulares e moleculares que promovem eventos patológicos durante a nefropatia diabética, tais como: alteração da homeostase da função renal; espessamento da membrana basal e mesangial; indução da inflamação, fibrose, podocitopatia e mesangiopatia; entre outros (PASUPULATI; CHITRA; REDDY, 2016). Ainda, prejuízos na função renal também podem acumular AGE e estes exercerem seus efeitos deletérios (AGE circulantes podem ser eliminados pelos rins) (URIBARRI, 2017).

Desta forma, o tratamento de ratos diabéticos com compostos capazes de controlarem a hiperglicemia, assim como reduzirem o estresse glico-oxidativo, podem contribuir para evitar as anormalidades estruturais e funcionais no fígado e rim, consequentemente prevenindo o aparecimento de doenças nesses órgãos. Nossos resultados mostraram, que os tratamentos de ratos diabéticos com curcumina e/ou aminoguanidina apresentaram potente efeito protetor contra o estresse glico-oxidativo hepático e renal.

Os tratamentos com curcumina e/ou aminoguanidina demonstraram não causarem hepatotoxicidade e também protegeram o fígado das agressões observadas no DM, uma vez que, apresentaram menores níveis plasmáticos das enzimas hepáticas ALT e AST (vs DIOG) (FIGURAS 15A e 15B). Os resultados desse estudo corroboram os dados já relatados na literatura, em que o tratamento de animais diabéticos com curcumina promoveu redução nos níveis das enzimas hepáticas ALT, AST e ALP (MOHAMED et al., 2009; HUSSEIN; ABU-ZINADAH, 2010; ARCARO et al., 2014; GHOSH et al., 2015; ASSIS et al., 2017). Raza et al. (2003) também demonstraram que a aminoguanidina diminuiu os níveis plasmáticos de ALT e AST em ratos, com hepatotoxicidade instalada por azatioprina e não pelo DM.

Diferente dos tratamentos com curcumina e/ou 50 mg/kg de aminoguanidina, os tratamentos com 100 mg/kg de aminoguanidina isolada e sua associação com a curcumina não reduziram os níveis plasmáticos da enzima hepática ALP. Contudo, Ahmed et al. (2011) demonstraram o efeito protetor de 100 mg/kg de aminoguanidina (via oral) na fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono (CCL4), o tratamento com aminoguanidina apresentou redução dos níveis plasmáticos de ALT, AST e ALP, em relação ao grupo CCL4 sem tratamento.

Os tratamentos com curcumina e/ou aminoguanidina também não causaram alterações dos biomarcadores de lesão renal, entretanto, entre os compostos administrados isoladamente apenas a curcumina foi capaz de prevenir suas alterações funcionais, uma vez que, apresentou níveis de proteinúria menores do que animais DIOG (FIGURA 18). O efeito protetor da curcumina sobre a função renal corrobora outros trabalhos (MORSY et al., 2013; GUTIERRES et. al., 2019). Diferente dos nossos resultados, outros trabalhos demonstraram que a aminoguanidina pode prevenir a proteinúria (ITAKURA et al., 1991; LV et al., 2018). Dentre os tratamentos com associações, somente a associação curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina foi capaz de prevenir as lesões renais, demonstrando o efeito benéfico da curcumina nessa associação.

O tratamento com a curcumina administrada isoladamente (vs DIOG) também foi capaz de aumentar as atividades das enzimas antioxidantes SOD (rim), CAT (fígado e rim), e manter as respostas da GSH-Rd (fígado e rim) e GSH-Px (fígado) semelhantes ao do tratamento com insulina. Além disso, o tratamento com a curcumina também aumentou os níveis de grupos tióis não proteicos (rim) e os níveis proteicos de AGE-R1 e GLO 1 no fígado e rim.

O tratamento de animais diabéticos com 50 mg/kg de aminoguanidina promoveu os mesmos efeitos da curcumina. Porém, não foi capaz de preservar os níveis de GLO 1 no rim, contudo foi melhor que a curcumina na manutenção dos níveis de AGE-R1 no rim. Já o tratamento com 100 mg/kg de aminoguanidina foi o que apresentou menos benefícios, uma vez que, não foi capaz de preservar as atividades das enzimas antioxidantes CAT no fígado e SOD no rim. Além disso, o tratamento com 100 mg/kg de aminoguanidina preservou os níveis de AGE-R1 no rim semelhante ao tratamento com curcumina, porém, pior que o tratamento com aminoguanidina na menor dose (50 mg/kg). Contudo, animais DA-100 também apresentaram preservação nos níveis de GLO 1 no rim semelhante aos animais DC, mas aqui, melhor que 50 mg/kg de aminoguanidina.

A associação de curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina apresentou novamente maior benefício em relação aos respectivos compostos administrados isoladamente (efeito sinérgico), uma vez que, foi o único tratamento capaz de preservar a atividade da enzima antioxidante SOD no fígado. A SOD é uma importante enzima antioxidante, pois é a primeira linha de defesa contra lesão celular mediada por ERO (ULLAH; KHAN; KHAN, 2016).

Além disso, também foi possível observar que animais DCA-50 apresentaram manutenção dos melhores efeitos dos tratamentos com os compostos isolados, uma vez que, o grupo DCA-50 demonstrou maiores níveis de AGE-R1 no rim assim como o grupo DA-50, e maiores níveis de GLO 1 no rim como o grupo DC. Desta forma, a associação de curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina também apresentou um efeito combinado de biomarcadores.

No tratamento com a associação curcumina e 100 mg/kg de aminoguanidina foi possível observar o efeito benéfico da curcumina na manutenção dos níveis das enzimas antioxidantes CAT no fígado e SOD no rim.

Em relação aos biomarcadores do estresse glico-oxidativo o tratamento com a curcumina administrada isoladamente (vs DIOG) reduziu os níveis de PCO e AGE fluorescentes no fígado e rim e os níveis proteicos de RAGE e NF- κ B no fígado.

O tratamento de animais diabéticos com 50 mg/kg de aminoguanidina também promoveu os diversos efeitos benéficos da curcumina. Exceto que não foi capaz de prevenir o aumento nos níveis de NF- κ B no fígado, mesmo apresentando níveis reduzidos de RAGE (fígado), contudo, foi melhor que a curcumina na redução dos níveis de NF- κ B no rim. Já o tratamento com 100 mg/kg de aminoguanidina foi capaz de reduzir os níveis de PCO e AGE fluorescentes, entretanto, não apresentou redução nos níveis de RAGE no fígado e NF- κ B no fígado e rim.

Desta forma, entre os tratamentos administrados isoladamente a dose de 100 mg/kg de aminoguanidina foi a que apresentou menos benefícios em relação a dose de 50 mg/kg de aminoguanidina e a curcumina. Contudo, quando 100 mg/kg de aminoguanidina foi administrada juntamente com curcumina (DCA-100) foi possível observar reduções nos níveis de NF- κ B no rim melhor que os respectivos compostos administrados isoladamente, apresentando um efeito sinérgico. Além disso, essa associação também apresentou menores níveis de RAGE no fígado (vs DIOG), assim como a curcumina administrada isoladamente, mas ainda não foi capaz de reduzir os níveis de NF- κ B no fígado, prevalencendo o efeito da aminoguanidina (100 mg/kg).

O tratamento com a associação curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina apresentou novamente mais benefícios que os compostos administrados isoladamente, pois nessa

associação prevaleceu sempre o melhor efeito de cada composto administrado, ou seja, foi possível observar reduções nos níveis de NF- κ B no fígado semelhante ao tratamento com a curcumina e no rim semelhante ao tratamento com 50 mg/kg de aminoguanidina.

O potencial da curcumina em reduzir o estresse glico-oxidativo, encontrado nesse estudo, corroboram os achados da literatura. Assis et al. (2017) mostraram que o tratamento de ratos diabéticos com curcumina em iogurte atenuou o estresse oxidativo no fígado, apresentando níveis reduzidos de PCO e aumento nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px. Ghosh et al. (2015) relataram que a curcumina protege o fígado de ratos diabéticos por neutralizar ERO e inibir a ativação de vias (p53 e MAPKs) de respostas ao estresse ocasionado pela hiperglicemia. Estudos também demonstraram que o tratamento de ratos diabéticos com curcumina reduz os danos renais, com diminuição nos níveis de TBARS e aumento das atividades das enzimas SOD e CAT (SHARMA; KULKARNI; CHOPRA, 2006; HUSSEIN; ABU-ZINADAH, 2010; NASRI; ABEDI-GHESHLAGHI; RAFIEIAN-KOPAEI, 2016).

Hafez et al. (2015) também desmonstraram a capacidade da aminoguanidina em reduzir o estresse oxidativo no fígado, com redução de TBARS e aumento nas atividades das enzimas SOD e CAT, mas este estudo foi realizado utilizando o metotrexato como indutor do estresse e não o modelo de DM. Temelli et al. (2015) desmonstraram a capacidade da aminoguanidina em reduzir o estresse oxidativo no rim, com redução de TBARS e aumento das atividades das enzimas SOD, CAT e GSH-Px, contudo esse estudo foi realizado utilizando radioterapia como indutor do estresse oxidativo; Abraham e Rabi (2011) mostraram que a aminoguanidina atenuou o dano renal, em ratos, induzido por ciclofosfamida, por prevenir a LPO, oxidação de proteínas, depleção da GSH e também por prevenir a perda das atividades das enzimas antioxidantes incluindo a GSH-Px, CAT e GST, e ainda diminuir a atividade da MPO nos rins; e Soulis-Liparota et al. (1991) demonstraram que o tratamento de ratos diabéticos com aminoguanidina atenuou o aumento de albuminúria, a expansão mesangial e os níveis de AGE fluorescentes no rim. Desta forma, os resultados encontrados no presente estudo corroboram os achados da literatura.

O excesso na formação de AGE leva ao aumento na expressão do seu receptor RAGE e a interação AGE-RAGE é capaz de causar estresse oxidativo e ativar o NF- κ B, levando a inflamação. Além disso, o aumento de RAGE aumenta a síntese de ERO, levando ao aumento do estresse oxidativo que aumenta a regulação do RAGE, levando um ciclo de *feedback* positivo (OTT et al.; 2014). Tan et al. (2010) relataram que uma terapia com a combinação da redução nos níveis de AGE, juntamente com o bloqueio de RAGE pode ter efeitos sinérgicos

para a prevenção da nefropatia diabética. Além da capacidade de se ligarem aos RAGE, os AGE também podem interagir com os receptores AGE-R1 que detoxifica AGE e contribui para a contra-regulação de potentes sinais pró-inflamatórios desencadeados pelas vias dependentes de AGE-RAGE (OTT et al.; 2014). Outro sistema importante de detoxificação dos AGE é o sistema da glioxalase, via eliminação do metilglioxal (RABBANI; THORNALLEY, 2019).

Além da capacidade antioxidante da curcumina *per se* e de sequestrar o metilglioxal, os resultados encontrados nesse trabalho permitem sugerir que os menores níveis de AGE encontrados nos animais diabéticos tratados apenas com curcumina também podem ter sido devido a sua capacidade de aumentar os níveis de detoxificantes de AGE, como receptores AGE-R1 e GLO 1 (fígado e rim), e reduzir os níveis de RAGE (fígado).

Da mesma forma, além do potencial antiglicativo da aminoguanidina, os resultados desse trabalho utilizando apenas 50 mg/kg de aminoguanidina também permitem sugerir que os menores níveis de AGE encontrados podem ser atribuídos a sua capacidade de aumentar os níveis de AGE-R1 (fígado e rim) e GLO 1 (fígado), assim como reduzir os níveis de RAGE (fígado). Já o tratamento com apenas 100 mg/kg de aminoguanidina pode ter apresentado redução nos níveis de AGE fluorescentes pelo aumento na detoxificação dos AGE (AGE-R1 e GLO 1 no fígado e rim).

Nossos resultados corroboram outros trabalhos da literatura, uma vez que, Lin et al. (2012 a, b) demonstraram que a curcumina é capaz de induzir a expressão gênica de AGE-R1 e suprimir a expressão de RAGE em células estreladas hepáticas (estudo *in vitro*), por inibição da atividade da ERK, indução da expressão gênica e atividade do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR γ) e atenuação do estresse oxidativo. Tang e Chen (2014) também demonstraram que a curcumina eliminou os efeitos dos AGE na regulação divergente da expressão gênica de RAGE e AGE-R1 em células estreladas hepáticas, interrompendo a ativação da sinalização de leptina causada por AGE e ativando o fator de transcrição NRF 2 (*nuclear erythroid 2-related factor 2*), levando à elevação da GSH celular e à atenuação do estresse oxidativo. Em um estudo de cardiomiopatia diabética, utilizando ratos diabéticos induzidos por baixa dose de STZ combinada com ração de alto valor energético, foi possível observar entre os diversos efeitos benéficos da curcumina a redução nos níveis de RAGE (YU et al., 2012). Ainda, Yang et al. (2013) relataram que a curcumina elimina a resposta inflamatória induzida por AGE, por inibir a ativação de NF- κ B e o estresse oxidativo em condrócitos de coelho.

A manutenção nos níveis de GLO 1 no fígado e rim dos animais tratados com curcumina promove a detoxificação do metilglioxal e consequentemente contribui para um menor estresse glicativo. No entanto, Santel et al. (2008) relataram que a curcumina possui efeito inibitório sobre a GLO 1, entretanto este estudo foi realizado *in vitro*.

Nesse trabalho, os resultados encontrados com o tratamento utilizando aminoguanidina, sugerem que os efeitos observados são devido a sua capacidade de inibição na formação de AGE. Pois, a diminuição de AGE atenua a interação AGE-RAGE e a expressão de RAGE e de suas vias de ativação, desta forma inibir a formação de AGE é promissor para uma intervenção terapêutica para atenuação das complicações do DM (YAMAGISHI et al., 2008). Um estudo realizado com ratos diabéticos (indução por STZ) o tratamento com aminoguanidina diminuiu os níveis de AGE e reduziu a expressão anormal do gene RAGE no tecido renal (HUANG; LIN; ZHOU, 1998). Magdaleno et al. (2019) demonstraram que a aminoguanidina foi capaz de reduzir a fibrose cardíaca associada ao estresse oxidativo em ratos com DM tipo 2, por meio da inibição da sinalização AGE-RAGE. Rai et al. (2019) mostram que a aminoguanidina inibiu o acúmulo de AGE induzido pela frutose e normalizou a expressão de RAGE e AGE-R1 no músculo gastrocnêmio de ratos.

A ausência de alguns efeitos encontrados no tratamento com 100 mg/kg de aminoguanidina, quando comparada a menor dose (50 mg/kg), assim como, a perda do efeito benéfico da curcumina quando associada a 100 mg/kg de aminoguanidina, em alguns parâmetros, pode ter ocorrido devido a algumas características da aminoguanidina, principalmente pela maior dose. A ligação da aminoguanidina as proteínas plasmáticas é de aproximadamente 5% e em humanos com função renal normal, ela é bem absorvida e quase completamente eliminada por filtração glomerular (FOOTE et al., 1995; THORNALLEY et al., 2003). Aproximadamente 80% de uma dose administrada por via oral é recuperada inalterada na urina e sua meia-vida em indivíduos com função renal normal é de aproximadamente 4,4 horas (FOOTE et al., 1995). Foote et al. (1995) estudaram a farmacocinética da aminoguanidina em pacientes com insuficiência renal crônica mantidos em hemodiálise e mostraram que apenas 8,7% da dose administrada foi recuperada inalterada na urina, o que é bastante reduzido em relação a indivíduos com função renal normal e também relataram que a dose de aminoguanidina precisa ser reduzida em pacientes com doença renal em estágio terminal. Naturalmente, esses achados são importantes para o estudo do DM, uma vez que, problemas renais são comuns nessa patologia.

A eliminação renal da aminoguanidina prejudicada pode ser um fator crítico para a variação de seus efeitos, uma vez que, devido a sua alta reatividade favorece também a

eliminação de outras biomoléculas contendo grupo carbonila e não só precursores de AGE. Altas concentrações de aminoguanidina também podem se degradar lentamente e formar H_2O_2 , no entanto, sua degradação não é uma fonte significativa de estresse oxidativo em concentrações farmacológicas *in vivo* (THORNALLEY et al., 2003). Por fim, um estudo de ensaio clínico utilizando aminoguanidina em pacientes com DM tipo 2 com nefropatia diabética foi interrompido e um dos efeitos colaterais observado foi anormalidades nos testes de função hepática (FREEDMAN et al., 1999). Nossos resultados mostraram que, 100 mg/kg de aminoguanidina não apresentou efeito tóxico hepático e renal (FIGURAS 17 e 18, respectivamente), contudo, não foi capaz de preservar os níveis plasmáticos da enzima hepática ALP e também a proteinúria. Além disso, quando associada a curcumina, observamos a manutenção do efeito da aminoguanidina (100 mg/kg).

A curcumina possui baixa solubilidade em água e como estratégia para sua administração nosso laboratório tem utilizado o iogurte, o qual não apresentou interferências nas respostas observadas do DM experimental (GUTIERRES et al., 2012; ARCARO et al., 2014; ASSIS et al., 2017; GUTIERRES et al., 2019; ROXO et al., 2019). Em estudo do laboratório, Gutierrez et al. (2015) monitoraram a concentração da curcumina no plasma de ratos (por HPLC) e relataram que a meia-vida de eliminação da curcumina foi de $32,7 \pm 12,9$ minutos (via oral) e a biodisponibilidade oral foi cerca de 0,47%; e também relataram, que o(s) metabólito(s) da curcumina podem ser responsáveis pela atividade antidiabética. A curcumina quando administrada por via oral apresenta baixa absorção gastrointestinal e a maior parte é excretada inalterada pelas fezes. A pequena quantidade absorvida sofre metabolismo pelo fígado (principalmente) e intestino e é eliminada eficientemente por excreção biliar e renal (METZLER et al., 2013; LIU et al., 2016). Frente aos problemas de biodisponibilidade várias estratégias têm sido empregadas para melhorar as características da curcumina, dentre elas, é a co-administração oral com piperina. A piperina é considerada um adjuvante por aumentar a biodisponibilidade, uma vez que, atua por meio da inibição das enzimas de glucuronidação hepática e intestinal (Mirzaeia et al., 2017). Entretanto, em trabalho do laboratório, Arcaro et al. (2014) demonstraram que a co-administração de curcumina e piperina não apresentou nenhuma vantagem aos efeitos farmacodinâmicos da curcumina, ao menos sobre as atividades antidiabéticas e antioxidantes, e assim foi indicado que poderiam estar relacionados a biotransformação da curcumina. Outros trabalhos também sugerem que os efeitos da curcumina estão relacionados aos seus metabólitos (METZLER et al., 2013; PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014).

Nesse contexto, a associação de curcumina e 100 mg/kg de aminoguanidina pode estar apresentando algum prejuízo na absorção, eliminação renal ou mesmo no metabolismo hepático, com consequências em sua farmacodinâmica. Assim como também uma possível toxicidade nessa maior dose da aminoguanidina.

Além da instalação do estresse glico-oxidativo no fígado e rim de animais DIOG, esse grupo também apresentou prejuízos nas funções neutrofílicas (vs NIOG), uma vez que mostrou maior geração de $O_2^{\bullet-}$ (FIGURA 31), $HOCl/OCl^-$ (FIGURA 32) e *pool* de ERO (FIGURA 33) pelos neutrófilos peritoneais, que podem exacerbar o estresse oxidativo e contribuir para o dano tecidual. Além disso, animais DIOG também apresentaram menor número de células migradas para a cavidade peritoneal (FIGURA 30). Nossos resultados corroboram trabalhos da literatura, Kuwabara; Curi; Alba-Loureiro (2017) demonstraram que os neutrófilos de ratos diabéticos migram em menor quantidade para a cavidade peritoneal quando comparado com neutrófilos de ratos não diabéticos; e em pacientes diabéticos também é demonstrado a diminuição da quimiotaxia de neutrófilos (GUSTKE et al, 1998; TREVELIN et al., 2017). Além disso, estudos relataram que sob condições diabéticas os neutrófilos produzem mais $O_2^{\bullet-}$ (KARIMA et al., 2005; MARIN et al., 2011; YANO et al., 2012; WONG et al., 2015).

A presença do estresse oxidativo é um dos principais fatores envolvidos na disfunção endotelial e nas complicações diabéticas (MODONNA; DE CATERINA, 2011). Está bem descrito na literatura que os neutrófilos estão envolvidos na exacerbação do estresse oxidativo e da inflamação no diabetes (HATANAKA et al., 2006; RAYNER; LOVE; HAWKINS, 2014; VARIJIA et al., 2019).

A ativação de NOX2 com consequente produção de ERO desempenha um papel fundamental na defesa do hospedeiro contra patógenos, entretanto, a geração excessiva de ERO também pode danificar os tecidos adjacentes, expandindo a reação inflamatória (EL-BENNA et al., 2016). Nossos resultados mostraram que, o grupo DIOG (vs NIOG) apresentou maior geração de ERO ($O_2^{\bullet-}$ e *pool* de ERO) apenas com o estímulo de recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal, ou seja, sem o estímulo solúvel com PMA *in vitro*, sugerindo, portanto, que os neutrófilos do grupo DIOG já tinham sofrido um *priming* (preparo do neutrófilo para um estímulo subsequente). O PMA é um poderoso ativador de neutrófilos, responsável por ativar a PKC, que leva à fosforilação da subunidade p47phox da NOX2, que transloca para a membrana celular, resultando na montagem completa da NOX2 e consequente geração de $O_2^{\bullet-}$ (BABIOR, 1999). Várias alterações observadas no grupo DIOG podem contribuir para o “*priming*” dos neutrófilos, como a hiperglicemia, o

aumento nos níveis de HbA1c, frutossamina, AGE e hiperlipidemia (aumento nos níveis de TAG, colesterol total e colesterol-não HDL), assim como o estresse glico-oxidativo (EL-BENNA et al., 2016).

Karima et al. (2005) relataram que neutrófilos de indivíduos diabéticos possuem atividade aumentada de PKC, níveis aumentados de DAG e fosforilação aumentada de p47phox, ocasionando maior liberação de $O_2^{\bullet-}$ e desta forma correlacionaram o *priming* de neutrófilos ao aumento do estresse oxidativo na periodontite observada clinicamente. Omori et al. (2008) demonstraram que em neutrófilos de indivíduos diabéticos ocorre uma montagem prematura da NOX2, em que a hiperglicemia induz especificamente a pré-translocação de p47phox, para a membrana celular e sua pré-montagem com a p22phox. Além disso, eles relataram, utilizando células HL-60, que os AGE e sua sinalização por meio de RAGE-ERK 1/2 são um dos componentes responsáveis pelo *priming* da NOX2 e gera a liberação excessiva de $O_2^{\bullet-}$, possibilitando os autores sugerirem que a hiperglicemia crônica pode causar mudanças significativas na resposta imune inata e contribuir para as complicações diabéticas.

O *priming* na geração de ERO em neutrófilos pode estar envolvido em muitas doenças inflamatórias, como síndrome do desconforto respiratório agudo, artrite reumatóide, aterosclerose, hipertensão arterial, diabetes, doença renal, sepse e lesão tecidual induzida por isquemia (BABIOR, 2000; EL-BENNA et al., 2016). Assim como vários processos biológicos, após o *priming*, os neutrófilos podem retornar ao estado de repouso, sendo, portanto, um processo reversível (EDASHIGE et al., 1993). Em indivíduos saudáveis, os neutrófilos podem ser fisiologicamente “preparados”, ativados, desativados e podem morrer por apoptose. No entanto, nas doenças inflamatórias, os neutrófilos podem ser altamente “preparados” e ativados continuamente, contribuindo para a lesão tecidual. O retorno ao estado de repouso pode falhar e os neutrófilos podem ser liberados no sangue em estado “preparado”, esses neutrófilos podem ser ativados em outros órgãos, onde induzem lesão e inflamação nos tecidos (EL-BENNA et al., 2016).

Yano et al. (2012) monitoraram o $O_2^{\bullet-}$, produzido pelos neutrófilos, no fagossomo e no meio extracelular de camundongos diabéticos e relataram que o H_2O_2 , derivado da dismutação do $O_2^{\bullet-}$, somente possui a capacidade de ser bactericida em altas concentrações, como por exemplo nos fagossomos e o $O_2^{\bullet-}$ gerado extracelularmente não é capaz de matar as bactérias, pois para ser eficaz é necessário que o $O_2^{\bullet-}$ seja produzido próximo aos seus alvos no fagossomo. MARIN et al. (2011) mostraram o aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 por neutrófilos de ratos diabéticos (induzido por ALX), também demonstraram que os neutrófilos apresentaram aumento nos níveis de PCO e TBARS e diminuição na atividade de SOD.

STOCKER et al. (2017) demonstraram o aumento da atividade de MPO em plasma de ratos diabéticos (induzido por STZ), correlacionado com o aumento nos níveis plasmáticos de PCO e TBARS e redução na relação sanguínea do GSH/GSSG; os autores argumentaram que o HOCl/OCl⁻ gerado na reação catalisada pela MPO é capaz de penetrar na membrana celular e oxidar tióis intracelulares.

Nossos resultados mostraram que o tratamento de ratos diabéticos com a insulina foi capaz de reverter todos os marcadores de estresse glico-oxidativo plasmáticos e tissulares, bem como as alterações observadas nos neutrófilos do grupo DIOG. O tratamento de ratos/camundongos diabéticos com insulina promove aumento da quimiotaxia, diminuição da produção de O₂^{•-} e restauração da capacidade fagocítica e bactericida de neutrófilos (WALRAND et al., 2004; YANO et al., 2012; TREVELIN et al., 2017). Dentre os demais tratamentos, a associação de curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina foi a que apresentou melhores efeitos (combinados e sinérgicos) na função neutrofílica, mostrando respostas semelhantes as encontradas nos animais não diabéticos e diabéticos tratados com insulina, o que indica a normalização das funções neutrofílicas. Animais DCA-50 (vs DIOG) mostraram maior recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal e menor geração de O₂^{•-}, HOCl/OCl⁻ e *pool* de ERO. Portanto, essa associação demonstra potencial contra o estresse glico-oxidativo, assim como, benefícios para as funções dos neutrófilos.

Apesar do tratamento com curcumina administrada isoladamente (DC) não ter apresentado efeitos sobre a função neutrofílica, bem como 50 mg/kg de aminoguanidina (DA-50) também não ter mostrado efeitos benéficos em todos os parâmetros avaliados nos neutrófilos, trabalhos da literatura relatam o importante efeito desses dois compostos na função neutrofílica.

Tanto o tratamento com curcumina e/ou aminoguanidina apresentaram bom controle glicêmico, baixos níveis de HbA1c e AGE fluorescentes, assim como redução do estresse glico-oxidativo no fígado e rim. Desta forma, esses efeitos também podem ter contribuído para a diminuição na produção de ERO pelos neutrófilos, uma vez que, principalmente a hiperglicemia e os AGE, assim como sua sinalização, contribuem para o *priming* nessas células. Karima et al. (2005) demonstraram a correlação entre o nível de HbA1c elevado (indicador de mal controle glicêmico), liberação aumentada de O₂^{•-} pelos neutrófilos e gravidade da periodontite, sugerindo que o aumento do risco de doenças inflamatórias, como a periodontite está associada no diabetes ao aumento da inflamação e do estresse oxidativo mediadas pelos neutrófilos.

A interação AGE-RAGE nos neutrófilos além de promover o *priming* da NOX2 resultando em hiperativação, o que contribui significativamente para a inflamação crônica em pacientes diabéticos, também é capaz de prejudicar as funções neutrofílicas por meio de uma rápida ativação (dependente de cálcio) em neutrófilos humanos e resultando em sinal aberrante e respostas neutrofílicas alteradas. Embora os neutrófilos tratados com AGE *in vitro* exibem aumento na fagocitose, apresentam redução na capacidade de matar a bactéria fagocitada (intracelular). Essa interação AGE-RAGE pode implicar na proteção da morte bacteriana intracelular, o que demonstra um possível mecanismo por meio do qual recorrentes infecções podem ocorrer em condições de hiperglicemia (COLLISON et al., 2002; KIERDORF; FRITZ, 2013).

Ao contrário dos nossos resultados, Ferreira et al. (2016) demonstraram que neutrófilos peritoneais de ratos diabéticos induzidos por ALX não apresentaram diferenças nos níveis de $O_2^{\bullet-}$, contudo apresentaram reduções nos níveis de ERO (quimiluminescência dependente de luminol) e diminuição da atividade de MPO quando comparados aos neutrófilos de ratos não diabéticos. Enquanto que, nossos resultados mostraram aumento nos níveis desses três parâmetros. Esses autores também mostraram que o tratamento de ratos diabéticos com 100 mg/kg de aminoguanidina aumentou a geração de $O_2^{\bullet-}$ e o *pool* de ERO, e não apresentou diferença na atividade de MPO de neutrófilos peritoneais, enquanto que os nossos resultados mostraram que o tratamento com 100 mg/kg de aminoguanidina reduziu a geração de $O_2^{\bullet-}$, *pool* de ERO e atividade de MPO.

As diferenças supracitadas podem ter ocorrido devido a forma de indução (ALX vs STZ) e a cronicidade do DM, uma vez que os níveis de HbA1c observados no estudo de Ferreira et al. (2016) foram 2 vezes maiores em relação aos respectivos controles. Além disso, o tratamento com a aminoguanidina realizado por Ferreira et al. (2016) foi de dose única e administrado em meio aquoso.

Nossos resultados são coerentes com o demonstrado por Yildiz et al. (1998) que relataram que a aminoguanidina em ensaios *ex vivos* foi capaz de inibir a quimiluminescência dependente de luminol utilizando neutrófilos humanos isolados de sangue periférico de voluntários saudáveis e ainda em sistemas livre de células, em que a quimiluminescência foi induzida por H_2O_2 , $HOCl$, $OH^{\bullet}$ e $OONO^{\bullet-}$, mostrando uma interação direta da aminoguanidina contra essas espécies reativas. Também é conhecido que hidrazinas (parte da estrutura química da aminoguanidina) e hidrazidas podem ser inibidores de MPO (KETTLE et al., 1995). Contudo, torna-se necessário solicitar que em nossos experimentos a aminoguanidina foi utilizada como tratamento por 45 dias em ratos diabéticos.

Outros estudos demonstraram que a aminoguanidina pode melhorar a migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal (TREVELIN et al., 2017) e para feridas diabéticas (HU et al. 2015); ainda: Oak, Youn e Cai (2009) mostraram que a aminoguanidina atenuou a produção de $O_2^{\cdot-}$ pela NOX em aortas de camundongos diabéticos; Ward; McLeish (2004) estudaram a relação do metilglioxal no estímulo da produção de ERO por neutrófilos na doença renal crônica e demonstraram que o metilglioxal aumenta a produção de ERO por neutrófilos por meio da ativação de p38 MAPK, o qual promove a exocitose de grânulos intracelulares e a aminoguanidina foi capaz de inibir a ativação de p38 MAPK e a produção de ERO.

Em relação a curcumina, trabalhos demonstram que ela possui a capacidade de reduzir a expressão das subunidades da NOX2, incluindo a p22 phox, p47 phox, p67 phox e gp91 phox, e desta forma, ser capaz de proteger o desenvolvimento da cardiomiopatia diabética (SOETIKNO et al., 2012; YU et al., 2012). Srivastava (1989) relatou que a curcumina pode inibir a função neutrofílica, e com isso, contribuir para a sua ação anti-inflamatória; o autor mostrou que a curcumina foi capaz de inibir a geração de $O_2^{\cdot-}$ e liberação de MPO por neutrófilos isolados de sangue de macaco; Jančinová et al. (2009) mostraram o efeito da curcumina na inibição da quimiluminescência dependente de luminol e isoluminol, e também na redução da fosforilação da PKC em neutrófilos isolados de sangue periférico humano.

Nesse contexto, os resultados encontrados nesse trabalho, corroboram com os achados da literatura.

A diminuição (vs DIOG) / normalização (vs DINS e NIOG) nos níveis de HOCl/OCI⁻ (atividade de MPO) nos animais tratados com a associação curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina é essencial para prevenir a progressão das complicações do DM. A MPO de neutrófilos circulantes desempenha um papel significativo nos processos de inflamação e estresse oxidativo, pois a MPO gera espécies reativas que causam danos oxidativos aos lipídeos e proteínas celulares (TEJASWI et al., 2017). Kisic et al. (2016) demonstram o envolvimento da MPO na geração de intermediários reativos/clorinantes no dano oxidativo às biomoléculas de pacientes com doença renal crônica e doença renal em estágio terminal e, Tejaswi et al. (2017) relataram que a MPO está associada ao estresse oxidativo e é considerada um preditor significativo de doença arterial coronariana.

A atividade da enzima antioxidante PON1 foi preservada pelos tratamentos com curcumina e/ou aminoguanidina, esse efeito encontrado é significativo, devido ao papel protetor da PON1 nas doenças cardiovasculares associadas a MPO. Funções neutrofílicas alteradas podem levar ao desenvolvimento e progressão de complicações diabéticas,

principalmente aterosclerose no DM. A MPO pode facilitar a aterogênese e alterar lipídeos. A PON1 e MPO podem ser alvos terapêuticos para prevenir a doença arterial coronariana. Enquanto a enzima PON1, associada a HDL, contribui significativamente para impedir a oxidação das lipoproteínas, principalmente a LDL, a enzima MPO desempenha um papel de modificação oxidativa de proteína, o que inclui as apolipoproteínas. A PON1 se liga a tanto a MPO quanto a HDL na superfície lipídica da HDL e esta ligação ajuda a PON1 a inibir o início da LPO, que é mediada pela MPO. A PON1, MPO e HDL ligam-se um ao outro, formando um complexo ternário e a interação entre PON1 e MPO dentro do complexo HDL-PON1-MPO pode ter significância clínica potencial na doença cardiovascular (VARIJI et al., 2019).

O tratamento com a associação curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina além de ter apresentado os melhores efeitos na função neutrofílica (efeitos próximos aos grupos NIOG e DINS), essa associação também foi a que mais apresentou efeito satisfatório em relação aos níveis de NOx (nitrato + nitrito total) (efeito próximo aos grupos NIOG e DINS). O NO é capaz de modular as atividades quimiotáticas, fagocíticas e apoptóticas dos neutrófilos. O aumento ou inibição, assim como a localização incorreta da produção de NO são responsáveis pelos eventos patológicos. Os neutrófilos geram NO a uma taxa de 10-100 nmoles/5min/10⁶ células, e como compreendem a maior parte de leucócitos periféricos em humanos, contribuem para os níveis circulantes e apresentam grande impacto na homeostase cardiovascular (SAINI; SINGH, 2018).

A produção exacerbada de NO é prejudicial em muitas doenças como diabetes, artrite, glomerulonefrite, acidente vascular cerebral, choque séptico, sepse, encefalite e colite ulcerativa, e nessas doenças ocorre a participação ativa dos neutrófilos (SAINI; SINGH, 2018). Cerchiaro et al. (2001) relataram que os neutrófilos obtidos de ratos diabéticos apresentaram aumento na atividade e expressão da iNOS em relação aos animais não diabéticos e o tratamento dos animais diabéticos com insulina reduziu os dois parâmetros a níveis normais. Ainda, sugeriram que a superexpressão da iNOS pode ser responsável em parte pelos defeitos na interação leucócito-endotélio no DM. Bansal et al. (2011) demonstraram *in vitro* que os AGE podem aumentar o estresse oxidativo pelo aumento da geração de ERO e ERN em neutrófilos, por meio da ativação de NOX2 e iNOS, pela interação AGE-RAGE. O NO modula diversas funções fisiológicas em neutrófilos e também possui implicações patológicas, no entanto, mais estudos precisam ser realizados para preencher lacunas sobre a sinalização do NO nos neutrófilos (SAINI; SINGH, 2018).

Devido aos resultados satisfatórios na função neutrofílica com o tratamento curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina, houve o interesse na busca pelo efeito da metformina e sua associação na função neutrofílica. A metformina (dimetilguanidina) e a aminoguanidina (guanidina), possuem semelhança estrutural, e a metformina é um fármaco bastante utilizado para o tratamento do DM. Além disso, em trabalho do laboratório, Roxo et al. (2019) desmonstraram a importância da associação curcumina e metformina na recuperação de alterações plasmáticas observadas no modelo de DM experimental.

A metformina é o medicamento mais prescrito para o tratamento da hiperglicemia crônica em pacientes com DM tipo 2, associada a medidas para a promoção no estilo de vida, que incluem dietas específicas, controle do peso corporal e prática de exercícios físicos. A metformina é um antidiabético oral utilizado como fármaco de primeira linha de tratamento do DM nos protocolos desenvolvidos pela Associação Americana de Diabetes (ADA) e Associação Europeia dos Estudos em Diabetes (EASD), os quais foram baseados em estudos clínicos prospectivos em diabetes do Reino Unido (UKPDS) (NATHAN et al., 2009; VIOLLET et al., 2012). A metformina, no tratamento do DM tipo 2, possui diversos benefícios, entre eles, destaca-se sua ação antihiperglicêmica sem ocasionar episódios de hipoglicemia; amenização dos quadros de resistência à insulina, diminuindo assim as complicações do DM; atua como sensibilizador à insulina, reduzindo os níveis plasmáticos da insulina de jejum (GUNTON et al., 2003; VIOLLET et al., 2012).

Nossos resultados mostraram que, o tratamento com metformina foi mais eficaz na redução dos níveis glicêmicos do que o tratamento com a curcumina, e na associação de curcumina e metformina foi possível observar a manutenção do efeito da metformina (FIGURA 34A), que corroboram com os achados por Roxo et al. (2019).

Já em relação aos níveis de HbA1c, apenas os tratamentos com os compostos administrados isoladamente foram capazes de reduzir os níveis desse biomarcador, contudo as diferenças foram pequenas. Apesar do tratamento com associação não ter apresentado diferença na glicação inicial (FIGURA 34B), Roxo et al. (2019) mostraram que os tratamentos com curcumina e/ou metformina reduziram os níveis plasmáticos de AGE fluorescentes.

Além da redução na glicemia, a metformina também possui efeito inibitório na formação de AGE e aumento nas defesas antioxidantes (RAHBAR et al., 2000; BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2001; BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2003; ALDINI et al., 2007). Em relação as suas ações na diminuição dos níveis de AGE, a

metformina é capaz de reagir com alguns precursores de AGE, em especial glioxal e metilglioxal (FIGURA 5) (BEISSWENGER et al., 2001; ALDINI et al., 2007).

Assim como no primeiro experimento (curcumina e/ou aminoguanidina), o segundo experimento (curcumina e/ou metformina) também apresentou comprometimento da função neutrofílica nos animais DIOG (vs NIOG), com diminuição na quantidade de células migradas para a cavidade peritoneal e aumento na geração de $O_2^{\bullet-}$, HOCl/OCl⁻ e *pool* de ERO.

O tratamento com a metformina aumentou a quantidade de células migradas para a cavidade peritoneal, assim como a aminoguanidina, no entanto, na associação curcumina e metformina houve a perda desse efeito (FIGURA 35). Animais DMET apresentaram menores níveis de HOCl/OCl⁻ (vs DIOG), esse efeito foi semelhante ao de 100 mg/kg de aminoguanidina (FIGURA 32). No entanto, animais DMET, não apresentaram diferenças na geração de $O_2^{\bullet-}$ (diferente de ambas as doses de aminoguanidina) e no *pool* de ERO (semelhante a 50 mg/kg de aminoguanidina) (FIGURAS 35A e 37, respectivamente). Portanto, o tratamento com a metformina administrada isoladamente apresentou semelhanças em algumas respostas da aminoguanidina ora com a dose de 50 mg/kg ora com 100 mg/kg, como também diferente das mesmas. Apesar da metformina ter apresentado somente um efeito na proteção da geração de espécies reativas em neutrófilos, ela apresentou uma tendência de melhoria (próxima aos grupos NIOG e DINS). Essa tendência de melhoria também pode ser observada no grupo tratado com curcumina.

Já a associação de curcumina e metformina apresentou semelhança aos efeitos observados com a associação de curcumina e 100 mg/kg de aminoguanidina, pois mostrou respostas mais próximas ao do grupo DIOG, não apresentando benefícios na função neutrofílica. Esse efeito pode ter ocorrido devido a dose utilizada da metformina (250 mg/kg, ROXO et al., 2019), uma vez que essa variação na resposta também foi observada com a aminoguanidina.

Diante do exposto, os efeitos benéficos no controle glicêmico (glicemia e HbA1c), assim como a prevenção da formação AGE, sugerindo prevenção do *priming* de neutrófilos, devem não ser os únicos responsáveis pelos efeitos dos tratamentos na função neutrofílica.

Coborando nossos resultados, Bonnefont-Rousselot et al. (2003) demonstraram que a metformina diminuiu a quimiluminescência dependente de luminol, no entanto, não de forma significativa, quando polimorfonucleares de sangue humano foram estimulados com PMA, ou principalmente por N-formil Metionil-Leucil-Fenilalanina (fMLP). Ainda, mostraram que a metformina também eliminou *in vitro* o radical OH[•], mas não o $O_2^{\bullet-}$. Park et al. (2013) relataram que a ativação de AMPK aumenta a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro* e *in vivo* e a

morte bacteriana. Os autores demonstraram que o tratamento de neutrófilos com metformina (ativador de AMPK), ensaios *ex vivo*, aumenta a quimiotaxia de neutrófilos e a morte bacteriana, e ainda, em ensaio *in vivo*, o tratamento com a metformina (125 mg/kg, intraperitoneal por 12 horas) apresentou erradicação mais eficiente de bactérias em modelo de sepse induzida por peritonite (camundongo).

6 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que os tratamentos com curcumina e aminoguanidina incorporadas no iogurte, isoladas ou co-administradas, promoveram diversos efeitos benéficos nos biomarcadores metabólicos e do estresse glico-oxidativo analisados no plasma, fígado e rim. Os tratamentos com curcumina e aminoguanidina, administrados isoladamente, apresentaram melhoria na maioria dos parâmetros investigados e os tratamentos com as associações também foram benéficos frente a esses biomarcadores. O tratamento que apresentou maior benefício foi a associação de curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina, que além de preservar os efeitos dos respectivos compostos isolados sobre alguns parâmetros, também promoveu respostas combinadas e sinérgicas, em relação aos tratamentos isolados. A associação de curcumina e 50 mg/kg de aminoguanidina foi promissora no controle glicêmico, na redução do estresse glico-oxidativo (plasma, fígado e rim) e na melhoria da função neutrofílica, portanto, demonstrando potencial na atenuação e/ou prevenção das complicações do DM.

REFERÊNCIAS

- ABATE, G.; DELBARBA, A.; MARZIANO, M.; MEMO, M.; UBERTI, D. Advanced glycation end products (AGES) in food: focusing on Mediterranean pasta. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 5, n. 6, p. 1-8, 2015.
- ABDEL-AZIZ, M. T.; EL-ASMAR, M. F.; EL-NADI, E. G.; RASHED, L. A.; AHMED, L. A.; OBAIA, E. M.; SABRY, D.; HASSOUNA, A. A.; ABDEL-AZIZ, A. T. The effect of curcumin on insulin release in rat-isolated pancreatic islets. **Angiology**, v. 61, p. 557-66, 2010.
- ABRAHAM, P.; RABI, S. Protective effect of aminoguanidine against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats. **Redox Report**, v. 16, n.1, p. 8-14, 2011.
- AGGARWAL, B. B.; SUNG, B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: na age-old spice with modern targets. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.30, n. 2, 2008.
- AHMED, A. F.; MAHMOUD, M. F.; OUF, M. A.; EL-FATHAAH, E. A. Aminoguanidine potentiates the hepatoprotective effect of silymarin in CCL4 treated rats. **Annals of Hepatology**, v. 10, n. 2, p. 207-15, 2011.
- AK, T.; GÜLÇİN, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chemico-Biological Interactions**, v.174, p.27-37, 2008.
- ALBA-LOUREIRO, T. C. HIRABARA, S. M.; MENDONÇA, J. R.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. C. Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils. **Journal of Endocrinology**, v.188, p. 295–303, 2006.
- ALDINI, G.; DALLE-DONNE, I.; FACINO, R. M.; MILZANI, A.; CARINI, M. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. **Medicinal research reviews**, v. 27, n. 6, p. 817-868, 2007.
- Aldridge, W. N. Serum esterases 2- An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenylphosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. **Biochemical Journal**, v. 53, p. 117–124, 1953.
- ALIZADEH, M.; KHEIROURI, S. Curcumin against advanced glycation end products (AGEs) and AGEs-induced detrimental agentes. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 7, p. 1169 – 1177, 2019.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes - 2018. **Diabetes Care**, Alexandria, US, v. 41, Suppl 1, p. S13-S27, 2018.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, Alexandria, US, v. 37, Suppl 1, p. 581-590, 2014.
- AMULIC, B. et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 459-489, 2012.

ARCARO, C.A.; GUTIERRES, V.O.; ASSIS, R.P.; MOREIRA, T.F.; COSTA, P.I.; BAVIERA, A.M.; BRUNETTI, I.L. Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic rats. **PloS one**, v.9, p.e113993, 2014.

ARMBRUSTER, D. A. Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness. **Clinical Chemistry**, v. 33, n. 12, p. 2153-2163, 1987.

ARUN, N.; NALINI, N. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 57, p. 41–52, 2002.

ASSIS, R. P; ARCARO, C.A.; GUTIERRES, V.O; OLIVEIRA, J. O.; COSTA, P. I.; BAVIERA, A. M.; BRUNETTI, I. L. Combined effects of curcumin and lycopene or bixin in yoghurt on inhibition of ldl oxidation and increases in hdl and paraoxonase levels in streptozotocin-diabetic rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n.4, 2017.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1 – 31, 2014.

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

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, v. 109, p. 33–44, 2000.

BABIOR, B. M. The leukocyte NADPH oxidase. **Israel Medical Association Journal**, v. 4 pt. 11, p. 1023-1024, 2002.

BABU, P. S., SRINIVASAN, K. Renal lesions in streptozotocin-induced diabetic rats maintained on onion and capsaicin containing diets. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v.10, p.477-483, 1999.

BANSAL, S.; SIDDARTH, M.; CHAWLA, D.; BANERJEE, B. D.; MADHU, S. V.; TRIPATHI, A. K. Advanced glycation end products enhance reactive oxygen and nitrogen species generation in neutrophils in vitro. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 361, n. 1-2, p. 289-96, 2012.

BARZEGAR, A.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin. **PLoS ONE**, v.6, p.1-7, 2011.

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

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, p.276-87, 1971.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 87, pt.1, p. 245-313, Jan. 2007.

BEERS, R.F.J.R.; SIZER, I.W. A spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.195, p.133-40, 1952.

BEISSWENGER, P. J.; HOWELL, S. K.; O'DELL, R. M.; WOOD, M. E.; TOUCHETTE, A. D.; SZWERGOLD, B. S. α -Dicarbonyls increase in the postprandial period and reflect the degree of hyperglycemia. **Diabetes care**, v. 4, n. 4, p. 726-732, 2001.

BEST, L.; ELLIOTT, A. C.; BROWN, P. D. Curcumin induces electrical activity in rat pancreatic beta-cells by activating the volume-regulated anion channel. **Biochem Pharmacol**, v. 73, n. 11, p. 1768-1775, 2007.

BHAT, S.; JAGADEESHAPRASAD, M. G.; PATIL, Y. R.; SHAIKH, M. L.; REGIN, B. S.; MOHAN, V.; GIRI, A. P.; BALASUBRAMANYAM, M.; BOPPANA, R.; KULKARNI, M. J. Proteomic insight reveals elevated levels of albumin in circulating immune complexes in diabetic plasma. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 15, n. 6, p. 2011-2020, 2016.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 12, pt.1, p. 64-76, 2000.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; RAJI, B.; WALRAND, S.; GARDÈS-ALBERT, M.; JORE, D.; LEGRAND, A.; PEYNET, J.; VASSON, M. P. An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. **Metabolism**, v. 52, n. 5, p. 586-589, 2003.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; THÉRON, P.; BEAUDEUX, J. L.; PEYNET, J.; LEGRAND, A.; DELATTRE, J. Aging and oxidative stress. Which potential markers? **Annales de biologie clinique**, v. 59, n. 4, p. 453-9, 2001

BORG, D. J.; FORBES, J. M. Targeting advanced glycation with pharmaceutical agents: where are we now? **Glycoconj J**, v. 33, p. 653–670, 2016.

BRENNAN, M. L.; HAZEN, S. L. Emerging role of myeloperoxidase and oxidant stress markers in cardiovascular risk assessment. **Current Opinion in Lipidology**, v. 14, 353–359, 2003.

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

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, p. 1615-1625, 2005.

BROWNLEE, M.; Vlassara, H.; KOONEY, A.; ULRICH, P.; CERAMI, A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. **Science**, v. 232, p. 1629–1632, 1986.

BUCALA, R.; MAKITA, Z.; VEGA, G.; GRUNDY, S.; KOSCHINSKY, T.; CERAMI, A.; Vlassara, H. Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products

contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 9441-9445, 1994.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. In: *Methods in enzymology*. Academic press, 484-490. 1985.

CARR, B. C.; EMIGH, C. E.; BENNETT, L. D.; PANSICK, A. D.; BIRCH, D. G.; NGUYEN, C. Towards a treatment for diabetic retinopathy: Intravitreal toxicity and preclinical safety evaluation of inducible nitric oxide synthase inhibitors. **Retina**, v. 37, n. 1, p. 22–31, 2017.

CERCHIARO, G. A.; SCAVONE, C.; TEXEIRA, S.; SANNOMIYA, P. Inducible nitric oxide synthase in rat neutrophils: role of insulin. **Biochemical Pharmacology**, v. 62, n. 3, p. 357-362, 2001.

CHANDRAKALA, M. P.; TEKULAPALLY, K. An evaluation of Hypolipidemic effect of Curcumin: A double blind, placebo controlled, randomized trial. **International Journal of Phytotherapy Research**, v.4, p. 20–26, 2014.

CHANG, K. C. et al. Aminoguanidine prevents arterial stiffening and cardiac hypertrophy in streptozotocin-induced diabetes in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. 8, p. 944–950, 2006.

CHEN, C.; JOHNSTON, T.D.; JEON, H.; GEDALY, R.; MCHUGH, P.P.; BURKE, T.G.; RANJAN, D. An *in vitro* study of liposomal curcumin: Stability, toxicity and biological activity in human lymphocytes and Epstein-Barr virus-transformed human B-cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 133-139, 2009.

CHEN, X.; LIN, W.; LU, S.; SHI, Y.; ZOU, J.; LIU, Z.; LIAO, W. Insulin prevents latent skin lesions by inhibiting the generation of advanced glycation end products in streptozotocin-induced diabetic rats. **Endocrine Pathology**, v. 20, 163–169, 2009.

CHILELLI, N.C.; BURLINA, S.; LAPOLLA, A. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: A “glycooxidation-centric” point of view. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 23, p. 913-919, 2013.

CHISTIAKOV, D. A.; MELNICHENKO, A. A.; OREKHOV, A. N.; BOBRY SHEV, Y. V. Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. **Biochimie**, v. 132, p. 19-27, 2017.

COLLISON, K. S.; PARHAR, R. S.; SALEH, S. S.; MEYER, B. F.; KWAASI, A. A.; HAMMAMI, M. M.; SCHMIDT, A. M.; STERN, D. M.; AL-MOHANNA, F. A. RAGE-mediated neutrophil dysfunction is evoked by advanced glycation end products (AGEs). **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, p. 433-444, 2002.

CORBETTA, J. A.; MCDANIEL, M. L. The Use of Aminoguanidine, a Selective iNOS Inhibitor, to Evaluate the Role of Nitric Oxide in the Development of Autoimmune Diabetes. **Methods**, v. 10, n. 1, p. 21-30, 1996.

COSTA, L. G.; MCDONALD, B. E.; MURPHY, S. D.; OMENN, G. S.; RICHTER, R. J.; MOTULSKY, A. G.; FURLONG, C. E. Serum Paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 103, p. 66-76, 1990.

DALLE-DONNE, I.; ALDINI, G.; CARINI, M.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 389-406, 2006.

DALLE-DONNE, I.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. Protein carbonylation in human diseases. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 4, P. 169 - 176, 2003.

DAOUD, A. K.; TAYYAR, M. A.; FOUDA, I. M., HARFEIL, N. A. Effects of diabetes versus *in vitro* hyperglycemia on select immune cell functions. **Journal of Immunotoxicology**, v. 6, p. 36-41, 2009.

DAVÌ, G.; FALCO, A.; PATRONO, C. Lipid Peroxidation in Diabetes Mellitus. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 1 & 2, p. 256 – 268, 2005.

DAVIES, M. J.; DAVIES, M. J.; GAGLIARDINO, J. J.; GRAY, L. J.; KHUNTI, K.; MOHAN, V.; HUGHES, R. Real-world factors affecting adherence to insulin therapy in patients with Type 1 or Type 2 diabetes mellitus: a systematic review. **Diabetic Medicine**, v. 30, p. 512-524, 2013.

DEGENHARDT, T. P.; ALDERSON, N. L.; ARRINGTON, D. D.; BEATTIE, R. J.; BASGEN, J. M; STEFFES, M. W.; THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. **Kidney International**, v. 61, p. 939-950, 2002.

DENEKE, S. M.; FANBURG, B. L. Regulation of cellular glutathione. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 257, n. 4, p. 163-173, 1989.

DORCELY, B.; KATZ, K.; JAGANNATHAN, R.; CHIANG, S. S.; OLUWADARE, B.; GOLDBERG, I. J.; BERGMAN, M. Novel biomarkers for prediabetes, diabetes, and associated complications. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 10, p. 345-361, 2017.

DU, Y.; SMITH, M. A.; MILLER, C. M.; KERN, T. S. Diabetes-induced nitrate stress in the retina, and correction by aminoguanidine. **Journal of Neurochemistry**, v. 80, p. 771 – 779, 2002.

DUDHGAONKAR, S. P.; TANDAN, S. K.; KUMAR, D.; NAIK, A. K.; RAVIPRAKASH, V. Ameliorative effect of combined administration of inducible nitric oxide synthase inhibitor with cyclooxygenase-2 inhibitors in neuropathic pain in rats. **European Journal of Pain**, v. 11, p. 528-534, 2007.

EDASHIGE, K., WATANABE, Y., SATO, E. F., TAKEHARA, Y., UTSUMI, K. Reversible priming and protein-tyrosyl phosphorylation in human peripheral neutrophils under hypotonic conditions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 302, p. 343-347, 1993.

EKICI, K.; TEMELLI, O.; PARLAKPINAR, H.; SAMDANCI, E.; POLAT, A.; BEYTUR, A.; TANBEK, K.; EKICI, C.; DURSUN, I. H. Beneficial effects of aminoguanidine on radiotherapyinduced kidney and testis injury. **First International Journal of Andrology**, 2015.

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, p. 279–289, 2008.

EL-BENNA, J.; HURTADO-NEDELEC, M.; MARZAIOLI, V.; MARIE, J-C.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A.; DANG, P. M. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. **Immunological Reviews**, v. 273, n.1, p. 180-193, 2016.

EMEL'YANOV, V. V. Glycation, antiglycation, and deglycation: their role in aging mechanisms and geroprotective effects (literature review). **Advances in Gerontology**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.

ENGELN, L.; STEHOUWER, C. D. A.; SCHALKWIJK, C. G. Current therapeutic interventions in the glycation pathway: evidence from clinical studies. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 15, n. 8, p. 677-689, 2013.

ESWORTHY, R. S.; CHU, F. F.; GEIGER, P.; GIROTTI, A. W.; DOROSHOW, J. H. Reactivity of plasma glutathione peroxidase with hydroperoxide substrates and glutathione. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 307, n. 1, p. 29-34, 1993.

FAN, C.; WO, X.; DOU, X.; XU, L.; QIAN, Y.; LUO, Y.; YAN, J. Regulation of LDL receptor expression by the effect of curcumin on sterol regulatory element pathway. **Pharmacological Reports**, v. 58, n. 577, 2006.

FARIA, A.; PERSAUD, S. J. Cardiac oxidative stress in diabetes: Mechanisms and therapeutic potential. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 172, p. 50-62, 2017.

FELIG, P.; BERGMAN, M. The endocrine Pancreas: diabetes mellitus. **Endocrinology and Metabolism**, 3 ed. New York: McGraw-Hill. cap 19, p. 1107-1250, 1995.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v.43, n.1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, C. S.; ARAÚJO, T. H.; ÂNGELO, M. L.; PENNACCHI, P. C., OKADA, S. S.; PAULA, F. B. A; MIGLIORINI, S.; RODRIGUES, M. R. Neutrophil dysfunction induced by hyperglycemia: modulation of myeloperoxidase activity. **Cell biochemistry and function**, 2012.

FERREIRA, C. S.; PENNACCHI, P. C.; ARAÚJO, T. H.; TANIWAKI, N. N.; PAULA, F. B. A.; DUARTE, S. M. S.; RODRIGUES, M. R. Aminoguanidine treatment increased NOX2 response in diabetic rats: Improved phagocytosis and killing of *Candida albicans* by neutrophils. **European Journal of Pharmacology**, v. 772, p. 83–91, 2016.

FERRETTI, G.; BACCHETTI, T.; MARCHIONNI, C.; CALDARELLI, L.; CURATOLA, G. Effect of glycation of high density lipoproteins on their physicochemical properties and on paraoxonase activity. **Acta Diabetologica**, v. 38, n. 4, p. 163–169, 2001.

FOOTE, E. F.; LOOK, Z. M.; GILES, P.; KEANE, W. F.; HALSTENSON, C. E. The Pharmacokinetics of Aminoguanidine in End-Stage Renal Disease Patients on Hemodialysis. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 25, n. 3, p. 420-425, 1995.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiological Reviews**, v. 93, p. 137–188, 2013.

FORBES, J. M.; COUGHLAN, M. T.; COOPER, M. E. Oxidative Stress as a Major Culprit in Kidney Disease in Diabetes. **Diabetes**, v. 57, p. 1446 – 1454, 2008.

FORBES, J. M.; FOTHERINGHAM, A. K. Vascular complications in diabetes: old messages, new thoughts. **Diabetologia**, 2017.

FREEDMAN, B. I.; WUERTH, J. P.; CARTWRIGHT, K.; BAIN, R. P.; DIPPE, S.; HERSHON, K.; MOORADIAN, A. D.; SPINOWITZ, B. S. Design and Baseline Characteristics for the Aminoguanidine Clinical Trial in Overt Type 2 Diabetic Nephropathy (ACTION II). **Controlled Clinical Trials**, v. 20, p. 493–510, 1999.

FUJIMOTO, M.; SHIMIZU, N.; KUNII, K.; MARTYN, J. A.; UEKI, K.; KANEKI, M. A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. **Diabetes**, v. 54, p. 1340-8, 2005.

FUJIWARA, H.; HOSOKAWA, M.; ZHOU, X.; FUJIMOTO, S.; FUKUDA, K.; TOYODA, K.; NISHI, Y.; FUJITA, Y.; YAMADA, K.; YAMADA, Y.; SEINO, Y.; INAGAKIA, N. Curcumin inhibits glucose production in isolated mice hepatocytes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 80, n. 2, p. 185-91, 2008.

GAHRUIE, H. H, Eskandari MH, Mesbahi G, Hanifpour MA. Scientific and technical aspects of yogurt fortification: A review. **Food Sci Human Wellness**, v. 4, p. 1-8, 2015.

GAO, L.; HU, Y.; LI, J. Pigment epithelium-derived factor protects human glomerular mesangial cells from diabetes via NOXO1-iNOS suppression. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 5, p. 7855-7863, 2017.

GHOSH, S.; BANERJEE, S.; SIL, P. C. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 111 - 124, 2015.

GHOSH, S.; BHATTACHARYYA, S.; RASHID, K.; SIL, P. C. Curcumin protects rat liver from streptozotocin-induced diabetic pathophysiology by counteracting reactive oxygen species and inhibiting the activation of p53 and MAPKs mediated stress response pathways. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 365–376, 2015.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, v.107, p.1058- 1070, 2010.

GIUSTARINI, D.; ROSSI, R.; MILZANI, A.; DALLE-DONNE, I. Nitrite and Nitrate Measurement by Griess Reagent in Human Plasma: Evaluation of Interferences and Standardization. **Methods in Enzymology**, v. 440, p. 361-380, 2008.

GIARDINO, I.; FARD, A. K.; HATCHELL, D. L.; BROWNLEE, M. et al. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. **Diabetes**, New York, v. 47, pt. 7, p. 1114-1120, 1998.

GOH, S. Y.; COOPER, M. E. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, p. 1143-1152, 2008.

GOLDBERG, I. J. Clinical review 124: Diabetic dyslipidemia: causes and consequences. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, p. 965-971, 2001.

GONZALEZ, A. M. N.; GUTIERREZ, R. M. P.; COTERA, L. B. F. Antidiabetic activity of piper *Auratum* leaves in streptozotocin-induced diabetic rat, beneficial effect on advanced glycation endproduct. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, 2014

GOWTHAMARAJAN, K.; KARRI, V. V. S. R.; MN, S. K.; MALAYANDI, R. Multiple Biological Actions of Curcumin in the Management of Diabetic Foot Ulcer Complications: A Systematic Review. **Tropical Medicine and Surgery**, v. 3, p. 1 – 6, 2015.

GUGLIUCCI, A. “Blinding” of AMP-dependent kinase by methylglyoxal: A mechanism that allows perpetuation of hepatic insulin resistance? **Medical Hypotheses**, v. 73, p. 921–924, 2009.

GUGLIUCCI, A. Fructose surges damage hepatic adenosyl-monophosphate-dependent kinase and lead to increased lipogenesis and hepatic insulin resistance. **Medical Hypotheses**, v. 93, p. 87–92, 2016.

GÜL, M.; EMRE, S.; ESXREFO, M.; VARD, N. Protective effects of melatonin and aminoguanidine on the cornea in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cornea**, v. 27, n. 7, 2008.

GUNTON, J. E.; DELHANTY, P. J., TAKAHASHI, S., BAXTER, R. C. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n.3, p. 1323-1332, 2003.

GUSTKE, C. J.; Stein, S. H.; Hart, T. C. et al. HLA-DR alleles are associated with IDDM, but not with impaired neutrophil chemotaxis in IDDM. **Journal of Dental Research**, v. 77, n. 7, p. 1497–1503, 1998.

GUTIERRES, V. O.; ASSIS, R. P.; ARCARO, C. A.; OLIVEIRA, J. O.; LIMA, T. F. O.; BERETTA, A. L. R. Z.; COSTA, P. I.; BAVIERA, A. M; BRUNETTI, I. L. Curcumin improves the effect of a reduced insulin dose on glycemic control and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v. 33, n.4, p. 976-988, 2019.

GUTIERRES, V.O.; CAMPOS, M.L.; ARCARO, C.A.; ASSIS, R.P.; BALDAN-CIMATTI, H.M.; PECCININI, R.G.; PAULA-GOMES, S.; KETTELHUT, I.C.; BAVIERA, A.M.; BRUNETTI, I.L. Curcumin pharmacokinetic and pharmacodynamic evidences in streptozotocin-diabetic rats support the antidiabetic activity to be via metabolite(s). **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, 2015, in press.

GUTIERRES, V.O.; PINHEIRO, C.M.; ASSIS, R.P.; VENDRAMINI, R.C.; PEPATO, M.T.; BRUNETTI, I.L. Curcumin-supplemented yoghurt improves physiological and biochemical markers of experimental diabetes. **The British Journal of Nutrition**, v.108, p.440-8, 2012.

HAFEZ, H. M.; IBRAHIM, M. A.; IBRAHIM, S. A.; AMIN, E. F.; GOMA, W.; ABDELRAHMAN, A. M. Potential protective effect of etanercept and aminoguanidine in methotrexate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. **European Journal of Pharmacology**, 2015.

HAFIZUR, R. M.; MOMIN, S.; FATIMA, N. Prevention of advanced glycation endproducts formation in diabetic rats through beta-cell modulation by *Aegle marmelos*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.17, n. 227, p. 1-15, 2017.

HALLETT, M. B.; LLOYDS, D. L. Neutrophil priming: the cellular signals that say ‘amber’ but not ‘green’. **Immunol Today**, v. 16, p. 264–268, 1995.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p. 3007–3017, 1998.

HARISA, G. E. D. Effects of aminoguanidine on some biochemical changes associated with acetic acid -induced ulcerative colitis in rats. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 139-147, 2010.

HATANAKA, E.; MONTEAGUDO, P. T.; MARROCOS, M. S. M.; CAMPA, A. Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, p. 443–447, 2006.

HEDRICK, C. C.; THORPE, S. R.; FU, M. X.; HARPER, C. M.; YOO, J.; KIM, S. M.; WONG, H.; PETERS, A. J. Glycation impairs high-density lipoprotein function. **Diabetologia**, v. 43, p. 312 – 320, 2000.

HOLLENBACH, M. The role of glyoxalase-I (Glo-I), advanced glycation endproducts (AGEs), and their receptor (RAGE) in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma (HCC). **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 11, p. 2466, 2017.

HOTAMISLIGIL, G. S. Foundations of Immunometabolism and Implications for Metabolic Health and Disease. **Immunity**, v. 47, p. 406-420, 2017.

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

HU, H.; JIANG, H.; REN, H.; HU, X.; WANG, X.; HAN, C. AGEs and chronic subclinical inflammation in diabetes: disorders of immune system. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 31, p. 127–137, 2015.

HU, T. Y. Trapping of Methylglyoxal by Curcumin in Cell-Free Systems and in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 8190–8196, 2012.

HUANG, Y.; LIN, S.; ZHOU, J. Gene expression of receptor for advanced glycosylation end products and its modulation by aminoguanidine in diabetic kidney tissue. **Chinese Medical Journal**, v. 111, n.8, p.698-704, 1998.

HUSSEIN, H. K.; ABU-ZINADAH, O. A. Antioxidant effect of curcumin extract in induced diabetic wister rats. **International Journal of Zoological Research**, p. 1 -11, 2010.

IHM S.; YOO, H. J.; PARK, S. W.; IHM, J. Effect of aminoguanidine on lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Metabolism**, v. 48, n. 9, p. 1141-1145, 1999.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 9ª edição, 2019. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org>>. Acesso em 09 de novembro de 2019.

ITAKURA, M.; YOSHIKAWA, H.; BANNAI, C.; KATO, M.; KUNIKI, K.; KAWAKAMI, Y.; YAMAOKA, T.; YAMASHITA, K. Aminoguanidine decreases urinary albumin and high-molecular-weight proteins in diabetic rats. **Life Sciences**, v. 49; n. 12; p. 889-897, 1991.

JAGDALE, A. D.; BAVKAR, L. N.; MORE, T. A.; JOGLEKAR, M. M.; ARVINDEKAR, A. U. Strong inhibition of the polyol pathway diverts glucose flux to protein glycation leading to rapid establishment of secondary complications in diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 30, n. 3, p. 398-405, 2016.

JAIN, S. K. Elevated Lipid Peroxidation Levels in Red Blood Cells of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. **Metabolism**, v. 39, n. 9, p. 971-975, 1990.

JANČINOVÁ, V.; PEREČKO, T.; NOSÁL, R.; KOŠTÁLOVÁ, D.; BAUEROVÁ, K.; DRÁBIKOVÁ, K. Decreased activity of neutrophils in the presence of diferuloylmethane (curcumin) involves protein kinase C inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 612, p. 161–166, 2009.

JANG, E. M.; CHOI, M. S.; JUNG, U. J.; KIM, M. J.; KIM, H. J.; JEON, S. M. Beneficial effects of curcumin on hyperlipidemia and insulin resistance in high-fat-fed hamsters. **Metabolism**, v. 57, p. 1576-1583, 2008.

JENKINS, A. J.; KLEIN, R. L.; ZHENG, D. Paraoxonase genotype (192 Gln-Arg) and serum paraoxonase-arylesterase activity: relationship with Type I diabetes and nephropathy. **Diabetes**, p. 643, 2000.

JEENGER, M. K.; SHRIVASTAVA, S.; YERRA, V. G.; NAIDU, V. G. M.; RAMAKRISHNA, S.; KUMAR, A. Curcumin: A pleiotropic phytonutrient in diabetic complications. **Nutrition**, v. 31, n. 2, p. 276-282, 2015.

JHA, J. C.; BANAL, C.; CHOW, B. S. M.; COOPER, M. E.; JANDELEIT-DAHM, K. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 25, n. 12, 2016.

JOGLEKAR, M. M.; PANASKAR, S. N.; ARVINDEKAR, A. U. Inhibition of advanced glycation end product formation by cymene – A common food constituent. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 107–115, 2014.

JOGLEKARA, M. M.; BAVKARA, L. N.; SISTLAB, S.; ARVINDEKARA, A. U. Effective inhibition of protein glycation by combinatorial usage of limonene and aminoguanidine through differential and synergistic mechanisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 563–569, 2017.

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

KABEYA, L. M. et al. 7-Hydroxycoumarin modulates the oxidative metabolism, degranulation and microbial killing of human neutrophils. **Chemico-Biological Interactions**, v. 206, p. 63-75, 2013.

KARALLIEDDE, J.; GNUDI, L. Future strategies to prevent renal microvascular disease complications in diabetes. **Future Cardiology**, v. 4, n. 1, p. 77-83, 2008.

KARIMA, M.; KANTARCI, A.; OHIRA, T.; HASTURK, H.; JONES, V. L.; NAM, B-H.; MALABANAN A.; TRACKMAN, P. C.; BADWEY, J. A.; VAN DYKE, T. E. Enhanced superoxide release and elevated protein kinase C activity in neutrophils from diabetic patients: association with periodontitis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 4, p. 862–870, 2005.

KARLI, R.; ALACAM, H.; DURAN, L.; ALICI, O.; KATI, C.; KARLI, A.; GUZEL, A. Analysis of the protective biochemical and pathologic effects of aminoguanidine on an experimental aspiration pneumonitis model induced by bile acids. **Current Therapeutic Research**, v. 73, n. 6, p. 208-219, 2012.

KAUL, K.; APOSTOLOPOULOU, M.; RODEN, M. Insulin resistance in type 1 diabetes mellitus. **Metabolism clinical and experimental**, v. 64, p. 1629 – 1639, 2015.

KAUSHIK, S.; KAUR, J. Chronic cold exposure affects the antioxidant defense system in various rat tissues. **Clinica Chimica Acta**, v. 333, p. 69–77, 2003.

KETTLE, A. J.; GEDYE, C. A.; HAMPTON, M. B; WINTERBOURN, C. C. Inhibition of myeloperoxidase by benzoic acid hydrazides. **Biochemical Journal**, v. 308, p. 559-563, 1995.

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

KIERDORF, K.; FRITZ, G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, p. 55-68, 2013.

KIM, J. H.; PARK, J. M.; KIM, E.; LEE, J. O.; LEE, S. K.; JUNG, J. H.; YOU, G. Y.; PARK, S. H.; SUH, P.; KIM, H. S. Curcumin stimulates glucose uptake through AMPK-p38 MAPK pathways in L6 myotube cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 223, n. 3, p. 771-8, 2010.

KISIC, B.; MIRIC, D.; DRAGOJEVIC, I.; RASIC, J.; POPOVIC, L. Role of Myeloperoxidase in Patients with Chronic Kidney Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-10, 2016.

KLEBANOFF, S. J.; KETTLE, A. J.; ROSEN, H.; WINTERBOURN, C. C.; NAUSEEF, W. M. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, p. 185-198, 2013.

KOHN, H. I.; LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **Journal Pharmacology Experiment Ther**, v.82, p.292-300, 1944.

KOMERS, R.; ANDERSON, S. Paradoxes of nitric oxide in the diabetic kidney. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 284, p. F1121–F1137, 2003.

KORDONOURI, O.; JAMES, R. W.; BENNETTS, B. Modulation by blood glucose levels of activity and concentration of paraoxonase in young patients with type 1 diabetes mellitus. **Metabolism**, p. 657–660, 2001.

KORUK, M.; TAYSI, S.; SAVAS, M. C.; YILMAZ, O.; AKCAY, F.; KARAKOK, M. Oxidative stress and enzymatic antioxidante status in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 34, n.1, p. 57-62, 2004

KOYE, D. N.; SHAW, J. E.; REID, C. M.; ATKINS, R. C.; REUTENS, A. T.; MAGLIANO, D. J. Systematic Review or Meta-analysis Incidence of chronic kidney disease among people with diabetes: systematic review of observational studies. **Systematic Review or Meta-analysis**, p. 388 – 901, 2017.

KUWABARA, W. M. T.; CURI, R.; ALBA-LOUREIRO, T. C. Autophagy is impaired in neutrophils from streptozotocin-induced diabetic rats. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.

LAAKSO, M.; KUUSISTO, J. Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, p. 293–302, 2014.

LAWSON, S.; WARD, D. T.; CONNER, C.; GALLAGHER, C.; TSOKOS, G.; SHEA-DONOHUE, T. Diabetic hyperglycemia: a facilitating factor in systemic capillary leak. **Journal of Surgical Research**, v. 105, p. 95–101, 2002.

LETCHFORD, K.; LIGGINS, R.; BURT, H. Solubilization of hydrophobic drugs by methoxy poly (ethylene glycol)-block-polycaprolactone diblock copolymer micelles: Theoretical and experimental data and correlations. **Journal Pharmaceutical Science**, v. 97, p. 1179-90, 2007.

LEVINE, R.L.; WILLIAMS, J.A.; STADTMAN, E.R.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v.233, p.346-357, 1994.

LEVITAN, I.; VOLKOV, S.; SUBBAIAH, P. V. Oxidized LDL: Diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, p. 39–75, 2010.

LEVY, D.; REICHERT, C. O.; BYDLOWSKI, S. P. Paraoxonases Activities and Polymorphisms in Elderly and Old-Age Diseases: An Overview. **Antioxidants**, v. 8, n. 118, p. 1-24, 2019.

LI, S.; TAN, H.; WANG, N.; ZHANG, Z.; LAO, L.; WONG, C.; FENG, Y. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 26087–26124, 2015.

LI, Y.; ZHANG, S.; GENG, J. X.; HU, X. Y. Curcumin inhibits human non-small cell lung cancer A549 cell proliferation through regulation of Bcl-2/Bax and cytochrome C. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, p. 4599 – 4602, 2013.

LIN, J.; TANG, Y.; KANG, O.; FENG, Y.; CHEN, A. Curcumin eliminates the inhibitory effect of advanced glycation end-products (AGEs) on gene expression of AGE receptor-1 in hepatic stellate cells in vitro. **Laboratory Investigation**, v. 92, p. 827–841, 2012b.

LIN, J.; TANG, Y.; KANG, O.; FENG, Y.; CHEN, A. Curcumin inhibits gene expression of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in hepatic stellate cells in vitro by elevating PPAR γ activity and attenuating oxidative stress. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, p. 2212–2227, 2012a.

LIU, H.; WANG, C.; QI, X.; ZOU, J.; SUN, Z. Antiglycation and antioxidant activities of mogroside extract from *Siraitia grosvenorii* (Swingle) fruits. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 5, p. 1880–1888, 2018.

LIU, L.; SHANG, Y.; LI, M.; HAN, X.; WANG, J.; WANG, J. Curcumin ameliorates asthmatic airway inflammation by activating nuclear factor-E2-related factor 2/haem oxygenase (HO)-1 signalling pathway. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 42, n. 5, p. 520 – 529, 2015.

LIU, W.; ZHAI, Y.; HENG, X.; CHE, F. Y.; CHEN, W.; SUN, D.; ZHAI, G. Oral Bioavailability of Curcumin: Problems and Advancements. **Journal of Drug Targeting**, v. 24, n. 8, p.694-702, 2016.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

LUO, D.; FAN, Y.; XU, X. The effects of aminoguanidine on retinopathy in STZ-induced diabetic rats. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 4386–4390, 2012.

LV, G.; QIU, Z.; YE, H.; MA, C.; CHANG, S.; LIN, Z. The Protective Effect and MoA of Panax notoginseng Saponins Combined with Aminoguanidine on Kidney in Diabetic Nephropathy Rats. **Records of Natural Products**, p. 202 – 210, 2018.

MACHADO, A. P.; PINTO, R. S.; MOYSÉS, Z. P.; NAKANDAKARE, E. R., QUINTÃO, E. C. R., PASSARELLI, M. Aminoguanidine and metformin prevent the reduced rate of HDL-mediated cell cholesterol efflux induced by formation of advanced glycation end products. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, p. 392–403, 2006.

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P. N.; MACKNESS, M. I. The paraoxonase gene family and coronary heart disease. **Current Opinion in Lipidology**, p. 357–362, 2002.

MACKNESS, M. I.; MACKNESS, B.; DURRINGTON, P. N.; CONNELLY, P. W.; HEGELE, R. A. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. **Current Opinion in Lipidology**, v. 7, p. 69-76, 1996.

MADONNA, R.; DE CATERINA, R. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes-part I: pathways of vascular disease in diabetes. **Vascular Pharmacology**, v. 54, p. 68-74, 2011.

MAGDALENO, F.; BLAJSZCZAK, C. C.; CHARLES-NIÑO, C. L.; GUADRÓN-LLANOS, A. M.; VÁZQUEZ-ÁLVAREZ, A. O.; MIRANDA-DÍAZ, A. G.; NIETO, N.; ISLAS-CARBAJAL, M. C.; RINCÓN-SÁNCHEZ, A. R. Aminoguanidine reduces diabetes-associated cardiac fibrosis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 18, p. 3125-3138, 2019.

MAITI, K.; MUKHERJEE, K.; GANTAIT, A.; SAHA, B. P.; MUKHERJEE, P. K. Curcumin–phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. **International Journal Pharmaceutics**, v. 330, n. 1-2, p. 155-163, 2007.

MARIN, D. P.; BOLIN, A. P.; MACEDO, R. C. S.; SAMPAIO, S. C.; OTTON, R. ROS production in neutrophils from alloxan-induced diabetic rats treated in vivo with astaxanthin. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 103–109, 2011.

MARNETT, L. J. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. **Mutation Research**, v. 424, p. 83–95, 1999.

MASTORIKOU, M.; MACKNESS, B.; LIU, Y.; MACKNESS, M. Glycation of paraoxonase-1 inhibits its activity and impairs the ability of high-density lipoprotein to metabolize membrane lipid hydroperoxides. **Diabetic Medicine**, v. 25, p. 1049–1055, 2008.

MAZOR, R.; SHURTZ-SWIRSKI, R.; FARAH, R.; KRISTAL, B.; SHAPIRO, G.; DORLECHTER, F.; COHEN-MAZOR, M.; MEILIN, E.; TAMARA, S.; SELA, S. Primed polymorphonuclear leukocytes constitute a possible link between inflammation and oxidative stress in hyperlipidemic patients. **Atherosclerosis**, v.197, p. 937–943, 2008.

MAZUR A. An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. **Journal of Biological Chemistry**, v.164, p. 271–289, 1946.

MEGHANA, K.; SANJEEV, G.; RAMESH, B. Curcumin prevents streptozotocin-induced islet damage by scavenging free radicals: a prophylactic and protective role. **European Journal of Pharmacology**, v. 577, p.183-191, 2007.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual review of biochemistry**, v. 52, n. 1, p. 711-760, 1983.

METZLER, M.; PFEIFFER, E.; SCHULZ, S. I.; DEMPE, J. S. Curcumin Uptake and Metabolism. **BioFactors**, v. 39, n. 1, p.14–20, 2013.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. O. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. **NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 62-71, 2001.

MIRZAEIA, H.; SHAKERIB, A.; RASHIDIE, B.; JALILIA, A.; BANIKAZEMIC, Z.; SAHEBKARD, A. Phytosomal curcumin: A review of pharmacokinetic, experimental and clinical studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 85, 102–112, 2017.

MOORTHY, C; KATHIRESAN, K. Curcumin–Piperine/Curcumin–Quercetin/Curcumin–Silibinin dual drug-loaded nanoparticulate combination therapy: A novel approach to target and treat multidrug-resistant cancers. **Journal of Medical Hypotheses and Ideas**, v.7, p. 15-20, 2013.

MOHAMED, A. M.; EL-SHARKAWY, F. Z.; AHMED, S. A. A.; AZIZ, W. M.; BADARY, O. A. Glycemic control and therapeutic effect of *Nigella sativa* and *Curcuma longa* on rats with streptozotocin-induced diabetic hepatopathy. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 4, n. 2, p. 45-57, 2009.

MOHAMED, J.; NAFIZAH, N. A. H.; ZARIYANTEY A. H.; BUDIN S. B.; Mechanisms of Diabetes-Induced Liver Damage The role of oxidative stress and inflammation. **Sultan Qaboos University Med**, v. 16, p. 132 – 141, 2016.

MOHAMMED, A.; ISLAM, M. S. Spice-Derived Bioactive Ingredients: Potential Agents or Food Adjuvant in the Management of Diabetes Mellitus. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.

MORI, D. M.; BAVIERA, A. M.; RAMALHO, L. T. O; VENDRAMINI, R. C.; BRUNETTI, I. L.; PEPATO, M. T. Temporal response pattern of biochemical analytes in experimental Diabetes. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 38, p. 183-191, 2003.

MORRIS, S.M. JR; BILLIAR, T. R. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. **American Journal of Physiology**, v. 266, n. 6, p. 29-39, 1994.

MORSY, M. A., IBRAHIM, S. A., AMIN, E. F., KAMEL, M. Y., RIFAAI, R. A., HASSAN, M. K. Curcumin ameliorates methotrexate-induced nephrotoxicity in rats. **Advances in Pharmacological Sciences**. v. 9, 2013.

NA, L. X.; ZHANG, Y. L.; LI, Y; LIU, L. Y.; LI, R.; KONG, T.; SUN, C. H. Curcumin improves insulin resistance in skeletal muscle of rats. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. 7, p. 526-533, 2011.

NAGAREDDY, P. R.; SOLIMAN, H.; LIN, G.; RAJPUT, P. S.; KUMAR, U.; MCNEILL, J. H.; MACLEOD, K. M. Selective inhibition of protein kinase C beta(2) attenuates inducible

nitric oxide synthasemediated cardiovascular abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes**, v.58, p. 2355-64, 2009.

NAJAFIAN, M. Effect of Curcumin on Metabolism of Lipids in Streptozotocin induced Diabetic and normal Rats. **Advances in Environmental Biology**, v. 8, n. 12, p. 170-177, 2014.

NANNIPIERI, M.; GONZALES, C.; BALDI, S.; POSADAS, R.; WILLIAMS, K.; HAFFNER, S. M. Liver enzymes, the metabolic syndrome, and incident diabetes: The Mexico City diabetes study. **Diabetes Care**, v. 28, p. 1757–162, 2005.

NASRI, H.; ABEDI-GHESHLAGHI. Z.; RAFIEIAN-KOPAEI. M. Curcumin and kidney protection; current findings and new Concepts. **Acta Persica Pathophysiologicala**, v. 1, p. 1 – 5, 2016.

NATHAN, D. M.; BUSE, J. B.; DAVIDSON, M. B.; FERRANNINI, E.; HOLMAN, R. R.; SHERWIN, R.; ZINMAN, B.; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION; EUROPEAN ASSOCIATION FOR STUDY OF DIABETES. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. **Diabetes care**, v. 32, n. 1, p. 193-203, 2009.

NIEDOWICZ, D. M.; DALEKE, D. L. The role of oxidative stress in diabetic complications. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 43, n. 2, p. 289-330, 2005.

NOWOTNY, K.; JUNG, T.; HÖHN, A.; WEBER, D.; GRUNE, T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. **Biomolecules**, v. 5, n. 1, p. 194-222, 2015.

OAK, J.; YOUN, J.; CAI, H. Aminoguanidine inhibits aortic hydrogen peroxide production, VSMC NOX activity and hypercontractility in diabetic mice. **Cardiovascular Diabetology**, v. 8, n. 65, 2009.

OMORI, K.; OHIRA, T.; UCHIDA, Y.; AYILAVARAPU, S.; BATISTA, E. L., JR.; YAGI, M.; IWATA, T.; LIU, H.; HASTURK, H.; KANTARCI, A.; VAN DYKE, T. E. Priming of neutrophil oxidative burst in diabetes requires preassembly of the NADPH oxidase. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, p. 292–301, 2008.

ORMAN, D.; VARDI, N.; ATES, B.; TASLIDERE, E.; ELBEC, H. Aminoguanidine mitigates apoptosis, testicular seminiferous tubulesdamage, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Tissue and Cell**, v. 47, p. 284–290, 2015.

OTT, C.; JACOBS, K.; HAUCKE, E.; SANTOS, A. N.; GRUNE, T.; SIMM, A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biology**, v. 2, p. 411–429, 2014.

PAN, M. H.; HUANG, T. M.; LIN, J. K. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 27, n. 4, p. 486–494, 1999.

PANAGIOTOPOULOS, S.; O'BRIEN, R. C.; BUCALA, R.; COOPER, M. E.; JERUMS, G. Aminoguanidine has an anti-atherogenic effect in the cholesterol-fed rabbit. **Atherosclerosis**, v. 136, 125–131, 1998.

PANAHI, Y.; AHMADI, Y.; TEYMOURI, M.; JOHNSTON, T. P.; SAHEBKAR, A. Curcumin as a potential candidate for treating hyperlipidemia: a review of cellular and metabolic mechanisms. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, p. 141-152, 2018.

PARK, D. W.; JIANG, S.; TADIE, J. M.; STIGLER, W. S.; GAO, Y.; DESHANE, J.; ABRAHAM, E.; ZMIJEWSKI, J. W. Activation of AMPK Enhances Neutrophil Chemotaxis and Bacterial Killing. **Molecular Medicine**, v. 19, p. 387-98, 2013.

PASSARELLI, M.; TANG, C.; MCDONALD, T. O.; O'BRIEN, K. D.; GERRITY, R. G.; HEINECKE, J. W.; ORAM, J. F. Advanced glycation end product precursors impair abca1-dependent cholesterol removal from cells. **Diabetes**, v. 54, 2005.

PASUPULATI, A. K.; CHITRA P. S.; REDDY, G. B. Advanced glycation end products mediated cellular and molecular events in the pathology of diabetic nephropathy. **Biomolecular Concepts**, 2016.

PAUTZ, A; ART, J.; HAHN, S.; NOWAG, S.; VOSS, C.; KLEINERT, H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Nitric Oxide**, v. 23, n. 2, p. 75-93, 2010.

PETERSON, K.P. et al. What is hemoglobin A1c? An analysis of glycated hemoglobins by electrospray ionization mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 44, pt. 9, p. 1951-1958, 1998.

PHILIS-TSIMIKAS, A.; PARTHASARATHY, S.; PICARD, S.; PALINSKI, W.; WITZTUM, J. L. Aminoguanidine has both pro-oxidant and antioxidant activity toward LDL. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v. 15, pt. 3, p. 367-376, 1995.

PILZ, J.; MEINEKE, I.; GLEITER, C. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. **Journal of Chromatography**, v. 742, p. 315-325, 2000.

PINKAS, A.; ASCHNER, M. Advanced glycation end-products and their receptors: Related pathologies, recent therapeutic strategies, and a potential model for future neurodegeneration studies. **Chemical research in toxicology**, v. 29, n. 5, p. 707-714, 2016.

PITOCCO, D.; ZACCARDI, F.; STASIO, E. D.; ROMITELLI, F.; SANTINI, S. A.; ZUPPI, C.; GHIRLANDA, G. Oxidative Stress, Nitric Oxide, and Diabetes. **The Review of DIABETIC STUDIES**, v. 7, n. 7, p. 15-25, 2010.

PODREZ, E. A.; ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis, **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 1717–1725, 2000.

POKUPEC, R.; KALAUZ, M.; TURK, N.; TURK, Z. Advanced glycation endproducts in human diabetic and non-diabetic cataractous lenses. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 241, p. 378–384, 2003.

POULSEN, M. W.; HEDEGAARD, R. V.; ANDERSEN, J. M.; DE COURTEN, B.; BÜGEL, S.; NIELSEN, J.; SKIBSTED, L. H.; DRAGSTED, L. O. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 10-37, 2013.

PRASAD, S.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B. B. Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: the Golden Pigment from Golden Spice. **Cancer Research and Treatment**, v. 46, n.1, p. 2-18, 2014.

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

RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J. Glyoxalase 1 modulation in obesity and diabetes. **Antioxidants & redox signaling**, v. 30, n. 3, p. 354-374, 2019.

RADENKOVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, M.; PROSTRAN, M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 78, p. 13–31, 2016.

RAHBAR, S; NATARAJAN, R.; YERNENI, K.; SCOTT, S.; GONZALES, N.; NADLER, J. L. Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. **Clinica chimica acta**, v. 301, p. 65-77, 2000.

RAIA, A. K.; JAISWALA, N.; MAURYAA, C. K.; SHARMAA, A.; AHMADA, I.; AHMADA, S.; GUPTAB, A. P.; GAYENB, J. R.; TAMRAKARA, A. K. Fructose-induced AGEs-RAGE signaling in skeletal muscle contributes to impairment of glucose homeostasis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 71, p. 35–44, 2019.

RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 50, p. 567–575, 2011.

RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; RENGARAJAN, T.; PALANISWAMI, R.; GNANADHAS, E. N.; LAKSHMINARASIAH, U.; GOPAS, J.; NISHIGAKI, I. Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 332–347, 2014.

RASHID, K.; SIL, P. C. Curcumin enhances recovery of pancreatic islets from cellular stress induced inflammation and apoptosis in diabetic rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 282, p. 297–310, 2015.

RAYNER, B.S.; LOVE, D. T.; HAWKINS, C. L. Comparative reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants with mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 71, p. 240-255, 2014.

RAZA, M; AHMAD, M.; GADO, A.; AL-SHABANAH, O. A. A comparison of hepatoprotective activities of aminoguanidine and N-acetylcysteine in rat against the toxic damage induced by azathioprine. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 134, n. 4, p. 451-456, 2003.

REGNELL, S. E.; LERNMARK, Å. Hepatic steatosis in type 1 diabetes. **The Review of Diabetic Studies**, v. 8, p. 454–467, 2011.

RICHTER, R. J.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. **Circulation: Genomic and Precision Medicine**, v. 1, n. 2, p. 147-152, 2008.

ROCHETTE, L.; ZELLER, M.; COTTIN, Y.; VERGELY, C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. **Biochimica et Biophysica ACTA**, v. 1840, p. 2709–2729, 2014.

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

ROXO, D. F.; ARCARO, C. A.; GUTIERRES, V. O.; COSTA, M. C.; OLIVEIRA, J. O.; LIMA, T. F. O.; ASSIS, R. P.; BRUNETTI, I. L.; BAVIERA, A. M. Curcumin combined with metformin decreases glycemia and dyslipidemia, and increases paraoxonase activity in diabetic rats. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 11, n. 1, p. 33, 2019.

RUSH, J. W.E; SANDIFORD, S. D. Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. **Clinical biochemistry**, v. 36, n. 5, p. 345-351, 2003.

SAINI, R.; SINGH, S. Inducible nitric oxide synthase: An asset to neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v.105, p. 49–61, 2019.

SANTEL, T.; PFLUG, G; HEMDAN, N. Y. A.; SCHAFER, A.; HOLLENBACH, M. et al. Curcumin Inhibits Glyoxalase 1—A Possible Link to Its Anti-Inflammatory and Anti-Tumor Activity. **PLOS ONE**, v. 3, n. 10, 2008.

SCHAUR, R. J.; SIEMS, W.; BRESGEN, N.; ECKL, P. M. 4-Hydroxy-nonenal—A Bioactive Lipid Peroxidation Product. **Biomolecules**, v. 5, p. 2247-2337, 2015.

SEBEKOVÁ, K.; KUPCOVÁ, V.; SCHINZEL, R.; HEIDLAND A. Markedly elevated levels of plasma advanced glycation end products in patients with liver cirrhosis: Amelioration by liver transplantation. **Journal of Hepatology**, v. 36, p. 66–71, 2002.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SELVIN, E.; RAWLINGS, A. M.; LUTSEY, P. L.; MARUTHUR, N.; PANKOW, J. S.; STEFFES, M., CORESH, J. Fructosamine and glycated albumin and the risk of cardiovascular outcomes and death. **Circulation**, 2015.

SHAIKH, J.; ANKOLA, D. D.; BENIWAL, V.; SINGH, D.; KUMAR, M. N. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. **European Journal Pharmaceutical Science**, v. 37, n. 3-4, p. 223-230, 2009.

SHAMSALDEENA, Y. A; MACKENZIE, L. S.; LIONE, L. A.; BENHAM, C. D. Methylglyoxal, a metabolite increased in diabetes is associated with insulin resistance, vascular dysfunction and neuropathies. **Current Drug Metabolism**, v. 17, p. 359-367, 2016.

SHAO, W.; YU, Z.; CHIANG, Y.; YANG, Y.; CHAI, T.; FOLTZ, W.; LU, H.; FANTUS, G.; JIN, T. Curcumin prevents high fat diet induced insulin resistance and obesity via attenuating lipogenesis in liver and inflammatory pathway in adipocytes. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e28784, 2012.

SHARMA, S.; KULKARNI, S. K.; CHOPRA, K. Curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma Longa*), ameliorates diabetic nephropathy in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, p. 940–945, 2006.

SHOBA, G.; JOY, D.; JOSEPH, T.; MAJEED, M.; RAJENDRAN, R.; SRINIVAS, P. S. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta Medica**, v. 64, n. 4, p. 353–356, 1998.

SHUNMOOGAM, N.; NAIDOO, P.; CHILTON, R. Paraoxonase (PON)-1: a brief overview on genetics, structure, polymorphisms and clinical relevance. **Vascular Health and Risk Management**, v. 14, p. 137–143, 2018.

SINDHU, R. K.; KOO, J. R.; ROBERTS, C. K.; VAZIRI, N. D. Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapies. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 26, p. 43–53, 2004.

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

SLIMAN, S.; EUBANK, T. D.; KOTHA, S. R.; KUPPUSAMY, M. L.; SHERWANI, S. I.; BUTLER, E. S. O. C.; KUPPUSAMY, P.; ROY, S.; MARSH, C. B.; STERN, D. M.; PARINANDI, N. L. et al. Hyperglycemic oxoaldehyde, glyoxal, causes barrier dysfunction, cytoskeletal alterations, and inhibition of angiogenesis in vascular endothelial cells: aminoguanidine protection. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 333, n.1, p. 9–26, 2010.

SOETIKNO, V.; SARI, F. R.; SUKUMARAN, V.; LAKSHMANAN, A. P.; MITO, S.; HARIMA, M.; THANDAVARAYAN, R. A.; SUZUKI, R.; NEGATA, M.; TAKAGI, R.; WATANABE, K. Curcumin prevents diabetic cardiomyopathy in streptozotocin-induced diabetic rats: possible involvement of PKC-MAPK signaling pathway. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 604–614, 2012.

SONG, J. X.; SONG Y.; JIANG S.; YUAN H.; ZHANG X. Association of plasma myeloperoxidase level with risk of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes, **Disease Markers**, v. 5, 2015.

SONG, Y.; ZHANG, F.; YING, C.; KUMAR, K. A.; ZHOU, X. Inhibition of NF-κB activity by aminoguanidine alleviates neuroinflammation induced by hyperglycemia. **Metabolic Brain Disease**, v. 32, p. 1627 – 1937, 2017.

SOSKIC, S. S.; DOBUTOVI, B. D.; SUDAR, E. M.; OBRADOVI, M. M.; NIKOLI, D. M.; DJORDJEVIC, J. D.; RADAK, D. J.; MIKHAILIDIS, D. P.; ISENOVI, E. R. Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and its Potential Role in Insulin Resistance, Diabetes and Heart Failure. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**, v. 5, p. 153–163, 2011.

SOULIS, T.; COOPER, E. M.; SASTRA, S.; THALLAS, V.; PANAGIOTOPOULOS, S.; BJERRUM, J. O. et al. Relative contributions of advanced glycation and nitric oxide synthase inhibition to aminoguanidine-mediated renoprotection in diabetic rats. **Diabetologia**, v. 40, p. 1141–1151, 1997.

SOULIS-LIPAROTA, T.; COOPER, M.; PAPAZOGLU, D.; CLARKE, B.; JERUMS, G. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-Induced diabetic rat. **Diabetes**, v. 40, p. 1328-1334, 1991.

SRINIVASAN, M. Effect of curcumin on blood sugar as seen in a diabetic subject. **Indian Journal of Medical Sciences**, v. 26, n. 4, p. 269 – 270, 1972.

SRIVASTAVA, R. Inhibition of neutrophil response by curcumin. **Agents and Actions**, v. 28, 1989.

STOCKER, P.; CASSIEN, M.; VIDAL, N.; THÉTIOT-LAURENT, S.; PIETRI, S. A fluorescent homogeneous assay for myeloperoxidase measurement in biological samples. A positive correlation between myeloperoxidase generated HOCl level and oxidative status in STZ-diabetic rats. **Talanta**, v. 170, p. 119-127, 2017.

STUMP, C. S.; NAIR, K. S. Alterations in protein metabolism in Diabetes Mellitus. In **Principles of Diabetes Mellitus**, v. 2, 2010.

SUZUKI, Y. J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Protein Carbonylation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 3, p. 323 – 325, 2010.

SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiological Research**, v. 50, p. 536-546, 2001.

TAHARA, Y.; SHIMA, K. Kinetics of HbA_{1c}, glycated albumin, and fructosamine and analysis of their weight functions against preceding plasma glucose level. **Diabetes Care**, v. 18, n. 4, 1995.

TAN, A. L.; SOURRIS, K. C.; HARCOURT, B. E.; THALLAS-BONKE, V.; PENFOLD, S.; ANDRIKOPOULOS, S.; THOMAS, M. C.; O'BRIEN, R. C.; BIERHAUS, A.; COOPER, M. E.; FORBES, J. M.; COUGHLAN, M. T. Disparate effects on renal and oxidative parameters following RAGE deletion, AGE accumulation inhibition, or dietary AGE control in experimental diabetic nephropathy. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 3, n. 298, p. 763-70, 2010.

TANG, Y.; CHEN, A. Curcumin eliminates the effect of advanced glycation end-products (AGEs) on the divergent regulation of gene expression of receptors of AGEs by interrupting leptin signalling. **Laboratory Investigation**, v. 94, n. 5, p. 503–516, 2014.

TANGVARASITTICHAJ, Surapon. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. **World journal of diabetes**, v. 6, n. 3, p. 456, 2015.

TASLIDERE, E.; VARDI, N.; ORMAN, D.; ELBE, H. Anti-Apoptotic Effects of Aminoguanidine Against Liver Damage on Experimental Diabetes in Rats. **Journal of Turgut Ozal Medical Center**, v. 21, n. 2, p. 111-117, 2014.

TEJASWIA, G.; SUCHITRAA, M. M.; RAJASEKHARB, D.; KIRANMAYIA, V. S.; SRINIVASA RAOA, P.V.L.N. Myeloperoxidase, protein carbonyls and oxidative stress in coronary artery disease. **Journal of Indian College of Cardiology**, v. 7, n. 4, p. 149-152, 2017.

THOMAS, M. C.; BAYNES, J. W.; THORPE, S. R.; COOPER, M.E. The Role of AGEs and AGE Inhibitors in Diabetic Cardiovascular Disease. **Current Drug Targets**, v. 6, p. 453-474, 2005.

THORNALLEY, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 419, n. 1, p. 31-40, 2003.

TORRES, M. C. L.; SOARES, N. F. F.; PEREIRA, J. A. M. Extração, purificação e avaliação da atividade da glutathione S-transferase de fígado bovino. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 2, p. 302-307, 2006.

TREVELIN, S. C.; CARLOS, D.; BERETTA, M.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q. Diabetes mellitus and sepsis: a challenging association. **Shock**, v. 47, n. 3, p. 276-287, 2017.

TURNER, R. C.; CULL, C. A.; FRIGHI, V.; HOLMAN, R. R. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. **Journal of the American Medical Association**, v. 281, n. 21, p. 2005-12, 1999.

ULLAH, A.; KHAN, A.; KHAN, I. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, p. 547-553, 2016.

UNOKI, H.; YAMAGISHI, S. Advanced Glycation End Products and Insulin Resistance. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 987-989, 2008.

URIBARRI, J. **Dietary AGEs and Their Role in Health and Disease**. 1. ed. Boca Raton, Flórida, Estados Unidos: Taylor & Francis Group, 2017.

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

VAN GELDER, B. F.; SLATER, E. C. The extinction coefficient of cytochrome c. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 58, p. 593-595, 1962.

VAREED, S. K.; KAKARALA, M.; RUFFIN, M. T. Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 17, n. 6, p. 1411-1417, 2008.

VARIJI, A.; SHOKRIA, Y.; FALLAHPOURA, S.; ZARGARIB, M.; BAGHERIC, B. ABEDIANKENARID, S.; ALIZADEHE, A.; MAHROOZB, A. The combined utility of myeloperoxidase (MPO) and paraoxonase 1 (PON1) as two important HDL-associated enzymes in coronary artery disease: Which has a stronger predictive role? **Atherosclerosis**, v. 280, p. 7–13, 2019.

VIOLLET, B.; Guigas, B; Sanz Garcia, N.; Leclerc, J.; Foretz, M.; Andreelli, F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. **Clinical science**, v. 122, n.6, p. 253-270, 2012.

VLASSARA, H.; STRIKER, G. E. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, n. 9, p. 526, 2011.

WALRAND, S.; GUILLET, C.; BOIRIE, Y.; VASSON, M-P. In vivo evidences that insulin regulates human polymorphonuclear neutrophil functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, 2004.

WARD, R. A.; MCLEISH, K. R. Methylglyoxal: a stimulus to neutrophil oxygen radical production in chronic renal failure? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 19, p. 1702-1707, 2004.

WATSON, A. D.; BERLINER, J. A.; HAMA, S. Y.; LA DU, B. N.; FAULL, K. F.; FOGELMAN, A. M.; NAVAB, M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, p. 2882–2891, 1995.

WELSH, K. J.; KIRKMAN, M. S.; SACKS, D. B. Role of glycated proteins in the diagnosis and management of diabetes: research gaps and future directions. **Diabetes Care**, v. 39, p. 1458-1462, 2016.

WELT, K.; WEISS, J.; MARTIN, R.; DETTMER, D.; HERMSDORF, T.; ASAYAMA, K. Ultrastructural, immunohistochemical and biochemical investigations of the rat liver exposed to experimental diabetes and acute hypoxia with and without application of Ginkgo extract. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 55, p. 331 – 345, 2004.

WIERSMA, J. J.; MEUWESE, M. C.; VAN MIERT, J. N. I; KASTELEIN, A.; TIJSSEN, J. G. P.; PIEK, J. J.; TRIP, M. D. Diabetes mellitus type 2 is associated with higher levels of myeloperoxidase. **Medical Science Monitor**, v. 14, p. 406–410, 2008.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Redox Reactions and Microbial Killing in the Neutrophil Phagosome. **Antioxidants e Redox Signaling**, v. 18, n. 6, p. 642-660, 2013.

WOLF, V. G. et al. Octyl gallate, a food additive with potential beneficial properties to treat *Helicobacter pylori* infection. **Food & Function**, 2017.

WONG, R. K.; PETTIT, A. I.; DAVIES, J. E.; NG, L. L. Augmentation of the neutrophil respiratory burst through the action of advanced glycation end products: a potential contributor to vascular oxidant stress. **Diabetes**, v.51, 2846– 2853, 2002.

WONG, S. L.; DEMERS, M.; MARTINOD, K.; GALLANT, M.; WANG, Y; GOLDFINE, A. B.; KAHN, C. R; WAGNER, D. D. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis which severely impairs wound healing. **Nature Medicine**, v. 21, n. 7, p. 815–819, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Classification of diabetes mellitus. Classification of diabetes mellitus. **Geneva: World Health Organization**, 2019.

WU, C. H.; HUANG, S. M.; LIN, J. A.; YEN, G. C. Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. **Food & Function**, v. 2, p. 224–234, 2011.

WU, L.; PARHOFER, K. G. Diabetic dyslipidemia. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 63, p. 1469 – 1479, 2014.

XAVIER, S.; SADANANDAN, J.; GEORGE, N.; PAULOSE, C. S. β_2 -adrenoceptor and insulin receptor expression in the skeletal muscle of streptozotocin induced diabetic rats: antagonism by vitamin D₃ and curcumin. **European Journal of Pharmacology**, v. 687, n. 1-3, p. 14-20, 2012.

XUE, M.; RABBANI, N.; MOMIJI, H.; IMBASI, P.; ANWAR, M. M.; KITTERINGHAM, N.; PARK, B. K.; SOUMA, T.; MORIGUCHI, T.; YAMAMOTO, M.; THORNALLEY, P. J. Transcriptional control of glyoxalase 1 by Nrf2 provides a stress-responsive defence against dicarbonyl glycation. **Biochemical Journal**, v. 443, n. 1, p. 213-222, 2012.

YAMAGISHI, S.; NAKAMURA, K.; MATSUI, T.; UEDA, S.; FUKAMI, K.; OKUDA, S. Agents that block advanced glycation end product (AGE)-RAGE (receptor for AGEs)-oxidative stress system: a novel therapeutic strategy for diabetic vascular complications. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.17, n. 7, 2008.

YAMAGISHI, S.; NAKAMURA, N.; MATSUI, T.; Glycation and cardiovascular disease in diabetes: A perspective on the concept of metabolic memory. **Journal of Diabetes**, v. 9, p. 141–148, 2017.

YANG, Q.; WU, S.; MAO, X.; WANG, W.; TAI, H. Inhibition effect of curcumin on TNF- α and MMP-13 expression induced by advanced glycation end products in chondrocytes. **Pharmacology**, v. 91, p. 77–85, 2013.

YANO, H.; KINOSHITA, M.; FUJINO, K.; NAKASHIMA, M.; YAMAMOTO, Y.; MIYAZAKI, H.; HAMADA, K.; ONO, S.; IWAYA, K.; SAITOH, D.; SEKI, S.; TANAKAA, Y. Insulin Treatment Directly Restores Neutrophil Phagocytosis and Bactericidal Activity in Diabetic Mice and Thereby Improves Surgical Site Staphylococcus aureus Infection. **Infection and Immunity**, v. 80, n.12, p. 4409–4416, 2012.

YILDIZ, G.; DEMIRYÜREK, A. T.; SAHIN-ERDEMLI, I.; KANZIK, I. Comparison of antioxidant activities of aminoguanidine, methylguanidine and guanidine by luminol-enhanced chemiluminescence. **British Journal of Pharmacology**, v. 124, p. 905-910, 1998.

YU, W.; LIU, X.; FENG, L.; YANG, H.; YU, W.; FENG, T.; WANG, S.; WANG, J.; LIU, N. Glycation of paraoxonase 1 by high glucose instigates endoplasmic reticulum stress to induce endothelial dysfunction in vivo. **Scientific Reports**, p. 1 – 11, 2017.

YU, W.; W, J.; CAI, F.; XIANG, J.; ZHA, W.; FAN, D.; GUO, S.; MING, Z.; LIU, C. Curcumin Alleviates Diabetic Cardiomyopathy in Experimental Diabetic Rats. **PLOS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

YU, W.; WU, J.; CAI, F.; XIANG, J.; ZHA, W.; FAN, D.; GUO, S.; MING, Z.; LIU, C. Curcumin alleviates diabetic cardiomyopathy in experimental diabetic rats. **PLoS One**, v. 7, p. e52013, 2012.

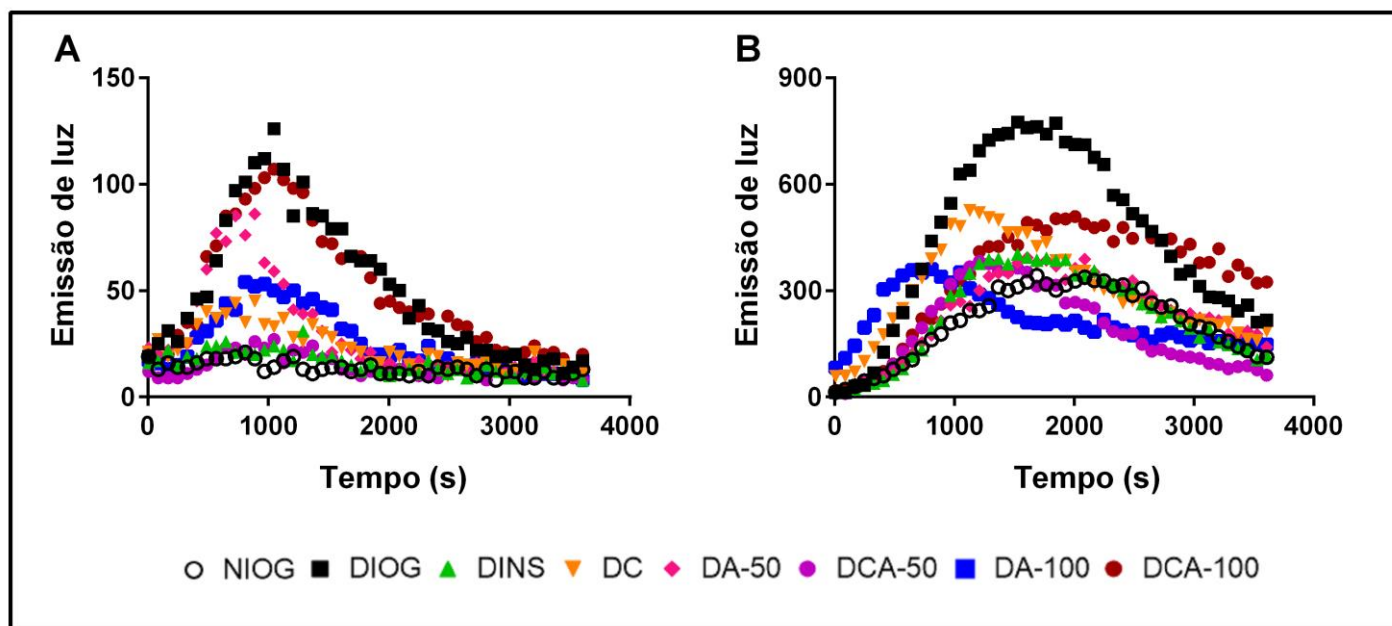
ZHANG, D.; FU, M.; GAO, S.; LIU, J. Curcumin and Diabetes: A Systematic Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1 – 16, 2013.

ZILIN, S.; NAIFENG, L.; BICHENG, L.; JIPING, W. The determination of AGE-peptides by flow injection assay, a practical marker of diabetic nephropathy. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 313, p. 69-75, 2001.

ZUWALA-JAGIELLO, J.; PAZGAN-SIMON, M.; SIMON, K.; WARWAS M. Elevated advanced oxidation protein products levels in patients with liver cirrhosis. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, p. 679–685, 2009.

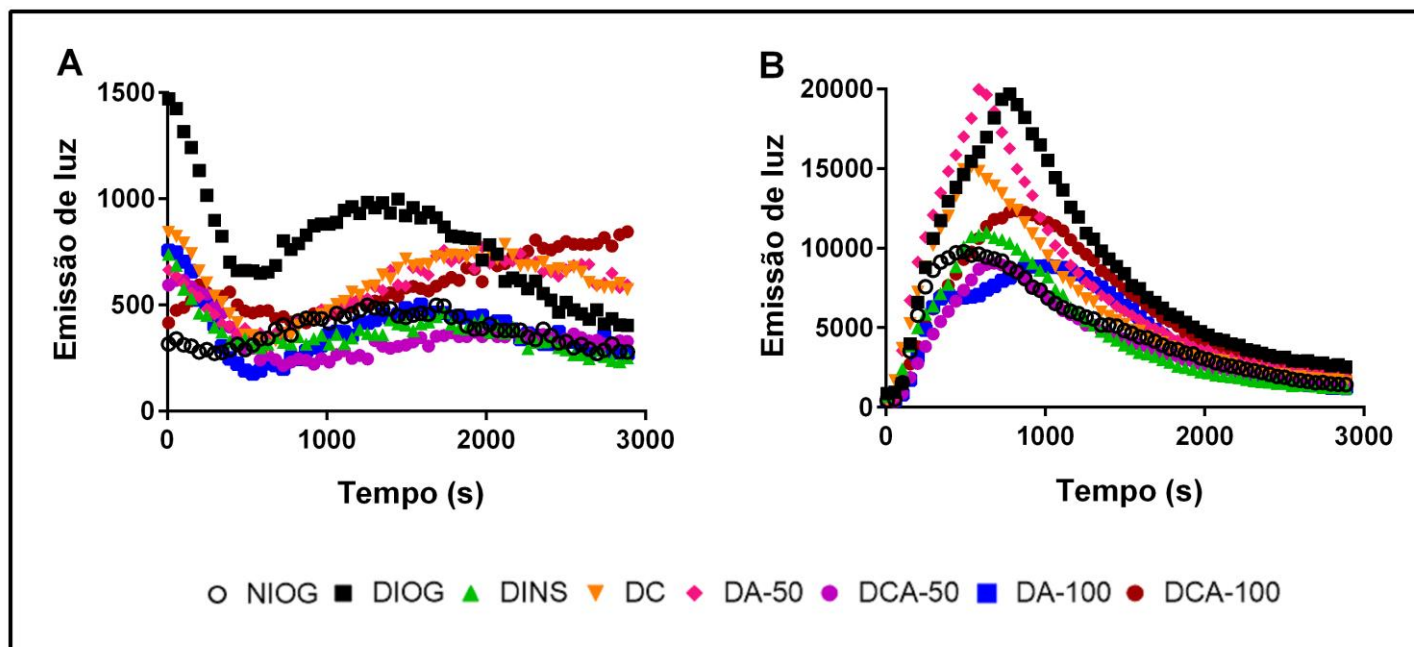
APÊNDICE I: Cínéticas de emissão de luz nos ensaios da função neutrofílica

Figura 1 – Cinética de emissão de luz em ensaio de quimiluminescência dependente de lucigenina em neutrófilos peritoneais, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.



As reações foram realizadas com neutrófilos ($3,0 \times 10^6$ células/mL) em 10 mM de PBS-D, pH 7,4 e 10 μ M de lucigenina, concentrações finais. As reações foram iniciadas na ausência (**A**) ou presença (**B**) de 0,1 μ M de PMA e monitoradas por 60 minutos em luminômetro. Ratos não diabéticos tratados com iogurte (NIOG); ratos diabéticos tratados com: iogurte (DIOG); 4 U/dia de insulina (DINS); 90 mg/kg de curcumina em iogurte (DC); 50 mg/kg de aminoguanidina em iogurte (DA-50); 90 mg/kg de curcumina + 50 mg/kg de aminoguanidina em iogurte (DCA-50); 100 mg/kg de aminoguanidina em iogurte (DA-100); 90 mg/kg de curcumina + 100 mg/kg de aminoguanidina em iogurte (DCA-100).

Figura 2 – Cinética de emissão de luz em ensaio de quimiluminescência dependente de luminol em neutrófilos peritoneais, após 45 dias, de ratos não diabéticos e ratos diabéticos não tratados e tratados com insulina, curcumina e/ou aminoguanidina.



As reações foram realizadas com neutrófilos ($2,0 \times 10^6$ células/mL) em 10 mM de PBS-D, pH 7,4 e 50 μ M de luminol, concentrações finais. As reações foram iniciadas na ausência (A) ou presença (B) de 0,1 μ M de PMA e monitoradas por 60 minutos em luminômetro. Ratos não diabéticos tratados com iogurte (NIOG); ratos diabéticos tratados com: iogurte (DIOG); 4 U/dia de insulina (DINS); 90 mg/kg de curcumina em iogurte (DC); 50 mg/kg de aminoguanidina em iogurte (DA-50); 90 mg/kg de curcumina + 50 mg/kg de aminoguanidina em iogurte (DCA-50); 100 mg/kg de aminoguanidina em iogurte (DA-100); 90 mg/kg de curcumina + 100 mg/kg de aminoguanidina em iogurte (DCA-100).

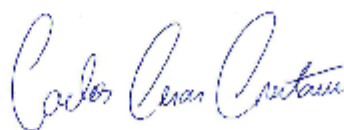
ANEXO I: CEUA/FCF/CAr: 25/2016

C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Exploração do potencial antidiabético da aminoguanidina e curcumina em iogurte, sozinhos ou co-administrados: modulação do estresse oxidativo, formação de AGE e parâmetros da função neutrofílica", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAr: 25/2016, sob a responsabilidade de Tayra Ferreira Oliveira de Lima e Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado ad-referendum pelo Coordenador da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em 15 de setembro de 2016.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Janeiro de 2020
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	68
Peso/Idade	150 g 3 a 4 semanas
Sexo	Macho
Origem	Botucatu

Araraquara, 15 de setembro de 2016.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

CAPÍTULO 2

Curcumin and aminoguanidine, administered alone or in combination, improve metabolic control and oxidative status and increase glycation product detoxification in streptozotocin-diabetic rats

Tayra Ferreira Oliveira Lima¹, Mariana Campos Costa¹, Ingrid Delbone Figueiredo¹, Maiara Destro Inácio¹, Maria Rita Rodrigues², Renata Pires Assis^{1,3}, Amanda Martins Baviera¹, Iguatemy Lourenço Brunetti^{1*}

Institutional address:

¹ São Paulo State University (Unesp), School of Pharmaceutical Sciences, Department of Clinical Analysis, Araraquara, São Paulo, Brazil.

² Federal University of Alfenas (UNIFAL-MG), School of Pharmaceutical Sciences, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Alfenas, Minas Gerais, Brazil.

³ Paulista University (UNIP), Institute of Health Sciences, Araraquara, São Paulo, Brazil.

*** Corresponding author**

Iguatemy Lourenço Brunetti

Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University

Rodovia Araraquara Jaú, km 01 – s/n, Campos Ville, Araraquara, São Paulo, Brazil

CEP 14800-903

Phone: +55 16 3301 5703

Fax: +55 16 3322 0073

E-mail: iguatemy.brunetti@unesp.br

Abstract

Both the oxidative stress and the exacerbated generation of advanced glycation end products (AGEs) have important roles in the hyperglycemia-induced complications of diabetes mellitus. Curcumin has antioxidant and antidiabetic properties; its combination with compounds able to prevent protein glycation, such as aminoguanidine, arises as an interesting therapy to counteract the diabetic complications. The current study aimed to investigate the effects of the treatment with curcumin or aminoguanidine mixed into yoghurt, alone or in combination, on streptozotocin-diabetic rats; the focus was mainly placed on the potential of this combined therapy to oppose oxidative and glycative stress. Curcumin (90 mg/kg) or aminoguanidine (50 and 100 mg/kg) into yoghurt, individually, attenuated the metabolic disturbances and reduced both the oxidative and glycative stress in plasma, liver, and kidney of diabetic rats; the best effects of aminoguanidine were reached with the minor dose. When the combined therapies of curcumin and aminoguanidine were performed, the treatment causing the best benefits to diabetes was curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine, since it triggered cytoprotective mechanisms related to increases in the activities of antioxidant enzymes and in components belonging to AGE detoxification, as well as reduced biomarkers of glycoxidative damage and normalized nitrate/nitrite levels. Also, this combined therapy allowed a timely management of glycemia and reduced the dyslipidemia. These findings provide evidence for the beneficial effects of the combination between curcumin (natural antioxidant) and aminoguanidine (prototype therapeutic agent with antiglycation activity) as a promising candidate for complementary therapies targeting the diabetic complications associated with glycoxidative stress.

Keywords: diabetes mellitus, oxidative stress, advanced glycation end products, combined therapy.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic syndrome resulting from defects in pancreatic insulin secretion and/or insulin action in target tissues, leading to various abnormalities in carbohydrate, lipid, and protein metabolism. In 2019, DM affected approximately 463 million people worldwide, and this is predicted to rise to 578 million by 2030, and 700 million by 2045 [1]. Chronic hyperglycemia participates in the onset of various microvascular (diabetic nephropathy, neuropathy, and retinopathy) and macrovascular (atherosclerosis, coronary artery diseases, and stroke) complications in uncontrolled diabetes, which are cited as major causes of morbidity and mortality in diabetics [2]. Exacerbation in the generation of both reactive oxygen species (ROS) and advanced glycation end products (AGEs), largely due to persistent hyperglycemia, causes oxidative and glycative stress in various tissues (liver, kidney, retina, peripheral nerves, and vascular endothelium); glycoxidative stress has been suggested to be a major factor contributing to the pathogenesis of diabetic complications [3].

AGEs appear as final products of protein glycation, which begins with a non-enzymatic reaction of condensation (Maillard reaction) of the carbonyl groups of reducing sugars (such as glucose and fructose) and the primary amino group of amino acid side chains of proteins (lysine and arginine residues). AGEs can also be formed by glucose autooxidation and as a result of lipid peroxidation and oxidative stress as they generate dicarbonyl compounds, including glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone [4]. AGEs play key role in the development of a phenomenon called “metabolic memory”; after prolonged exposure to hyperglycemia, the irreversible accumulation of AGEs in tissues and its subsequent abnormalities remain, contributing to the development of the diabetic complications, even after the effective glycemic control. The metabolic memory is also linked with the binding of AGE to its receptor, RAGE [5]. The stimulation of AGE/RAGE axis is implicated in the development of inflammation and oxidative stress, resulting in cell dysfunction [6].

The organism possesses endogenous systems for detoxification of AGEs and thus diminishing their deleterious effects, and include the AGE-receptor family (AGE-R) and the glyoxalase system. AGE-R consists of three distinct receptors: AGE-R1 (OST-48), AGE-R2 (80K-H), and AGE-R3 (galectin-3). The AGE-R1 receptor, when activated, increases the rate of AGEs removal, since it promotes the endocytosis and degradation of proteins modified by AGEs, thus playing a protective role against the injuries in tissues mediated by glycoxidative stress [4,6]. AGE-R1 receptor also opposes the proinflammatory effects of RAGE; by

facilitating the uptake of AGEs, AGE-R1 prevents the activation of proinflammatory signaling pathways related to AGE/RAGE axis [4]. It has been demonstrated that the detoxification mechanisms dependent on AGE-receptors are impaired in DM, especially with reductions in AGE-R1 activity, consequently contributing to AGEs accumulation and therefore, leading to injuries and dysfunctions in tissues [7]. The glyoxalase system participates in the detoxification of methylglyoxal, a precursor for AGEs. It comprises two enzymes: glyoxalase 1 (GLO 1) catalyzing hemithioacetal isomerization (spontaneously produced in the reaction between methylglyoxal and reduced glutathione) to S-D-lactoylglutathione, and glyoxalase 2 (GLO 2) catalyzing the hydrolysis of S-D-lactoylglutathione to D-lactate [8]. The increased expression of components belonging to the glyoxalase system reduces the intracellular formation of AGEs, which in turn decreases oxidative stress and cellular apoptosis [8]. However, evidence pointed that exacerbated glycoxidative stress may also cause saturation of the glyoxalase system, thus impairing the capacity to reduce the high levels of methylglyoxal [9].

The search for therapeutic strategies stimulating the endogenous antioxidant defenses and the AGE detoxification systems appears as promising options to counteract diabetic complications related to glycoxidative stress. Curcumin (diferuloylmethane; $C_{21}H_{20}O_6$) is a yellow pigment isolated from the dried rhizomes of *Curcuma longa* L. (turmeric). Curcumin exerts pleiotropic activities against various diseases, including DM [10]. Previous studies from our laboratory showed interesting results regarding the use of curcumin in combination with other natural antioxidants [11] or with antidiabetic agents [12] to attenuate a great variety of diabetic disturbances. Therefore, in addition to advancing the understand of the curcumin beneficial actions on diabetes, this study aimed to investigated a novel therapeutic strategy by combining curcumin and aminoguanidine (pimagedine; CH_6N_4), a prototype therapeutic agent having antiglycation activity. Aminoguanidine scavenges dicarbonyl compounds thus preventing the formation of AGEs [13]; previous studies demonstrated that aminoguanidine efficiently dampens AGEs formation in both *in vitro* [14] and *in vivo* models [15,16].

The current study aimed to investigate whether the treatments with curcumin and aminoguanidine, individually or in combination, have beneficial effects on the metabolic disturbances observed in streptozotocin-diabetic rats. The main focus was placed on the ability of these compounds in stimulate endogenous antioxidant defenses and components related to AGE detoxification. Advancing with this evidence, it could be introduced a new possible therapeutic strategy to oppose the diabetic complications related to glycoxidative stress.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing 140-160 g (6 weeks) were housed under controlled conditions of temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 5\%$) and with a 12 h light/dark cycle. Rats received water and lab chow diet (Presence, Brazil) *ad libitum* throughout the 45 days of experiment. The experimental procedures were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation from the School of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara, (CEUA/FCF/CAr resolution number 25/2016).

2.2 Induction of diabetes mellitus

After 3 days of adaptation, experimental type 1 DM was induced by a single intravenous injection of 40 mg/kg streptozotocin, STZ (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) dissolved in 0.01 M citrate buffer (pH 4.5), in previously 12 hours fasted rats. Normal rats received only citrate buffer. For this procedure, all the animals were anesthetized with isoflurane. Three days after the STZ administration, rats with post-prandial glycemia values of approximately 400 mg/dL were used to compose the diabetic groups. Plasma glucose levels were determined by the glucose oxidase method using commercial kit (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil). Diabetic animals were matched into the different experimental groups using similar values of glycemia and body weight.

2.3 Experimental design and treatments

Curcumin from *Curcuma longa* L. (Turmeric; purity of 78%, product number C1386, batch number SLBN7214V, purchased from Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) and aminoguanidine (purity of 97%, product number 109266, batch number STBD3851V, purchased from Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) were mixed with commercial plain yoghurt (170 g contain 9.1 g carbohydrates, 6.8 g protein, 7.0 g total fat, 126 kcal, Nestlé®, Brazil), alone or in combination, using a homogenizer (27,000 rpm) for 90 seconds at ambient temperature (25°C).

Diabetic rats were distributed into seven groups (10 rats/group): diabetic rats treated with yoghurt (DYOG); 90 mg/kg curcumin in yoghurt (DC); 50 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DA-50); 100 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DA-100); 90 mg/kg curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DCA-50); 90 mg/kg curcumin + 100 mg/kg

aminoguanidine in yoghurt (DCA-100), and 4U/day insulin (DI4U). The experiment also had a group of normal rats treated with yoghurt (NYOG).

The oral treatments were given twice a day. Curcumin and/or aminoguanidine were administered as a half dose by gavage (45 mg/kg for curcumin, 25 mg/kg and 50 mg/kg for minor and major aminoguanidine doses, respectively) in 0.5 mL of yoghurt, totaling 1.0 mL/rat/day of treatment. Insulin treatments were also given twice a day; rats received two subcutaneous injections of insulin (Biohulin®, NU-100, Brazil), 2 U/rat each injection. The treatments were given at 08:00 h and 17:00 h, during 45 days.

Body weight were monitored weekly, and glycemia at every 15 days. Blood samples were collected from the tip of the tail in heparinized tubes (Hemofol®, 5,000 UI/mL, Brazil) and plasma samples were obtained for the determination of glucose. At the 40th day of treatment, animals were housed into individual metabolic cages and received water and lab chow diet (Presence, Brazil) *ad libitum*, for adaptation. On the 43rd day, the urine was collected in a period of 24 h, and an aliquot of the urine was taken for the determination of proteinuria. The levels of plasma glucose and the urinary levels of protein were determined using commercial kits (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil).

At the end of treatments, blood samples were collected from the tail for determination of the activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and alkaline phosphatase (ALP). After that, rats were euthanized by decapitation and blood samples were collected for the analysis of glycated hemoglobin (HbA1c), and plasma levels of glucose, fructosamine, triglycerides, total-cholesterol (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil), and for the measurement of biomarkers of oxidative damage [thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein carbonyl groups (PCO), fluorescent advanced glycation end products (AGEs), total nitrate and nitrite (NOx)] and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase 1 (PON 1). Liver and kidneys were carefully removed, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for the subsequent analysis of the biomarkers of oxidative damage (TBARS, PCO and fluorescent AGEs), antioxidants defenses (superoxide dismutase, SOD; catalase, CAT; glutathione peroxidase, GSH-Px; glutathione reductase, GSH-Rd; non-protein sulfhydryl (NPSH) groups levels), and components belonging to AGE detoxification (AGE-R1 and GLO 1).

2.4 Oxidative stress biomarkers

2.4.1 Lipid peroxidation (LPO)

LPO products, including malondialdehyde (MDA), were measured in deproteinized tissue samples (plasma, liver and kidney) through thiobarbituric acid (TBA) reaction according to Kohn and Liversedge [17]. TBARS levels were measured fluorometrically with excitation and emission wavelengths of 510 and 553 nm, respectively. 1,1,3,3-tetramethoxypropane (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) was used as standard. The results were expressed as $\mu\text{mol/L}$ (plasma) and nmol/g tissue (liver and kidney).

2.4.2 Protein carbonyl groups (PCO)

The PCO levels in plasma, liver and kidney were determined according to Levine et al. [18]. The carbonyl groups in proteins reacts with 2,4-dinitrophenylhydrazine to form 2,4-dinitrophenylhydrazone, which was monitored spectrophotometrically at 370 nm. The concentration of PCO was obtained by the molar extinction coefficient of the hydrazone ($22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Results were expressed as nmol/mg protein.

2.4.3 Fluorescent advanced glycation end products (AGEs)

Fluorescent AGEs in plasma and liver were assessed according to Zilin et al. [19] with modifications, whereas fluorescent AGEs in kidney were measured according to Pokupec et al. [20]. Plasma and liver homogenates were treated with 0.12 M trichloroacetic acid, 0.1 M sodium hydroxide, and 1.2 M chloroform (plasma) or 2.4 M chloroform (liver). Kidney homogenates were supplemented with 0.1 M sodium hydroxide. The tubes were shaken vigorously, maintained at $10 \pm 2^\circ\text{C}$ for 30 min, and centrifuged at 10,000 g for 10 min at 10°C . Fluorescence intensities relative to the AGEs in supernatants were measured spectrofluorometrically with excitation and emission wavelengths of 370 and 440 nm, respectively, using a microplate multi-mode reader with split set at 16 nm, Synergy H1TM, BioTek Instruments Inc (Winooski, 17 VT, USA). The results were expressed as arbitrary units (UA) of fluorescence/mg protein.

2.4.4 Total nitrate and nitrite (NOx)

Estimation of plasma NO levels was performed by indirect method according to Miranda et al. [21], with modification, via quantification of its stable final products of oxidation pathways: nitrate e nitrite. Plasma NOx levels were determined using Griess reagents followed by reduction of nitrous species with vanadium (III) chloride (VCl_3). Plasma was deproteinized with 70 mM zinc acetate following by centrifugation at 10,000 g for 15 min at 4°C . Supernatants were incubated with 17 mM VCl_3 and Griess reagents for 30 min at

37°C. The tubes were centrifuged at 10,000 g for 2 min at 25°C. NO_x levels in supernatants were monitored spectrophotometrically at 540 nm. Nitrate (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) was used as standard. The results were expressed as $\mu\text{mol/L}$.

2.5 Antioxidant defenses

2.5.1 Paraoxonase 1 (PON1) activity

PON1 activity was determined according to Assis et al. [11], via hydrolysis of paraoxon and the release of *p*-nitrophenol. The activity was monitored by measuring the absorbance at 405 nm over a period of 5 min. The results were calculated using the molar extinction coefficient of *p*-nitrophenol ($18,000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). The PON1 activity was expressed in units/liter (unit = μmol paraoxon hydrolyzed/min).

2.5.2 Non-protein sulfhydryl (NPSH) groups

Non-protein sulfhydryl (NPSH) groups represent an indirect measurement of GSH and were determined according to Sedlak and Lindsay [22], measuring the reduction of 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) at 412 nm. Results were expressed as mmol/mg tissue.

2.5.3 Activities of the antioxidant enzymes

2.5.3.1 Sample preparation

Liver and kidney samples (0.1 g) were homogenized in 1 mL of sodium phosphate buffer (10 mmol/L, pH 7.4) at 4°C. The homogenates were centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C and the supernatants were used for the analysis of the activities of SOD, CAT and GSH-Px. The protein levels in the supernatants were determined according to Lowry et al. [23], using bovine serum albumin as standard.

2.5.3.2 Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was evaluated according to Beauchamp and Fridovich [24]; the oxidation of xanthine generates superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) by the catalytic action of xanthine oxidase, which reduces nitroblue tetrazolium chloride (NBT) to a formazan product. In the presence the SOD, inhibition of NBT reduction occurs, which is monitored at 550 nm. The results were expressed as U/mg protein. One unit of SOD is defined as the enzyme amount required to inhibit the rate of NBT reduction by 50%.

2.5.3.3 Catalase (CAT) activity

CAT activity was measured by monitoring the disappearance of hydrogen peroxide (H_2O_2) at 230 nm, according to Beers and Sizer [25]. The results were expressed as mmol of H_2O_2 consumed/min/mg protein.

2.5.3.4 Glutathione peroxidase (GSH-Px) activity

GSH-Px activity was evaluated according to Rush and Sandiford [26]. GSH-Px catalyzes the oxidation of GSH in the presence of H_2O_2 . In the presence of GSH-Rd, the oxidized glutathione (GSSG) is reduced to GSH with concomitant oxidation of NADPH to NADP^+ . NADPH disappearance was monitored at 340 nm. The results were expressed as mmol of NADPH consumed/min/mg protein.

2.5.3.5 Glutathione reductase (GSH-Rd) activity

GSH-Rd activity was evaluated according to Carlberg and Mannervik [27], via reduction of GSSG in GSH with concomitant oxidation of NADPH to NADP^+ . NADPH disappearance was monitored at 340 nm. The results were expressed as mmol of NADPH consumed/min/mg protein.

2.6 Western blot analysis

Samples of liver and kidney were homogenized (Polytron Omni TH01, Kennesaw, GA) in ice-cold buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 24 mM sodium deoxycholate, 0.01% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium orthovanadate, 1.5 μM aprotinin, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), and 2.1 μM leupeptin. The homogenates were centrifuged at 10,500 g at 4°C for 40 min, and the supernatants were used for protein determination [23]. Sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 2% SDS, 33.2 mM dithiothreitol (DTT), and 0.01% bromophenol blue; pH 6.8) was added to the supernatants. Samples containing 30-50 μg protein were subjected to SDS-PAGE electrophoresis on 10-12% acrylamide gels and were then electroblotted onto nitrocellulose membranes. Proteins were detected by overnight incubation at 4°C with specific primary antibodies: anti-AGE-R1 (Anti-DDOST) (1:500) and anti-GLO 1 (1:1000) (Abcam,

Cambridge, UK). Anti- β -Actin (1:500; Cell Signaling, Danvers, MA) was used as an internal control. Primary antibody binding was detected by peroxidase-conjugated secondary antibodies (anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (1:1000) or anti-mouse IgG, HRP-linked antibody (1:2000), Cell Signaling, Danvers, MA) and visualized utilizing an enhanced chemiluminescent substrate (1.1 mM luminol sodium salt, 2.0 mM 4-iodophenylboronic acid, 5.3 mM hydrogen peroxide, and 0.1 M Tris-HCl, pH 8.8). Chemiluminescent bands were captured with a C-Digit Blot Scanner (LI-COR, Lincoln, NE), and band intensities were analyzed using LI-COR Image Studio 4.0. All results were normalized to β -actin and expressed as % of NYOG group.

2.7 Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ standard error of mean (SEM). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls test was used to compare the temporal inter-group differences about the physiological and biochemical parameters, as well as glycoxidative stress biomarkers. Paired Student's *t* test was used to compare the intra-group changes in the physiological and biochemical parameters, relative to day 0. Data were considered statistically different at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using the program GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

3. Results

3.1 Body weight

In agreement with the catabolic state typical of the experimental model of type 1 DM (i.e., diabetes induced by STZ administration), DYOG rats had minor body weight values throughout the experimental period when compared with NYOG rats. As expected, diabetic rats treated with insulin (DINS) had an increased body weight gain, which was similar that of NYOG group (Figure 1A).

The treatment of diabetic rats with 90 mg/kg curcumin into yoghurt (DC) also promoted an increase in the body weight gain in comparison with DYOG rats, from the 30th day of treatment; however, it remained lower than values of DINS and NYOG groups (Figure 1A). Diabetic rats treated with 50 mg/kg (DA-50) or 100 mg/kg (DA-100) aminoguanidine into yoghurt did not present improvements in the body weight gain, which remained lower than values of DYOG rats (Figure 1A).

After 45 days, the combined treatments of curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine (DCA-50) or curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine (DCA-100) promoted increases in the body weight gain of diabetic rats, in comparison with DYOG group (Figure 1A). It must be emphasized that the co-administration of curcumin with aminoguanidine to diabetic rats bring beneficial responses to the body weight gain, since maintained the curcumin effects, allowing to diabetic rats the recovering of the capacity to gain weight, although with less efficiency when compared with insulin treatment.

3.2 Glycemia

According to our results, it can be observed that the induction of diabetes in rats was effective, since all groups started the experiment with blood glucose levels of approximately 400 mg/dL (Figure 1B). DYOG rats showed significant increases in the glycemia over the course of the study, mainly after 15 days of experiment, evidencing the worsening of DM. As expected, DINS rats had reductions in the glycemia, whose levels were similar to those of NYOG rats. Glycemia of NYOG rats remained within normal values until the end of the experiment (Figure 1B).

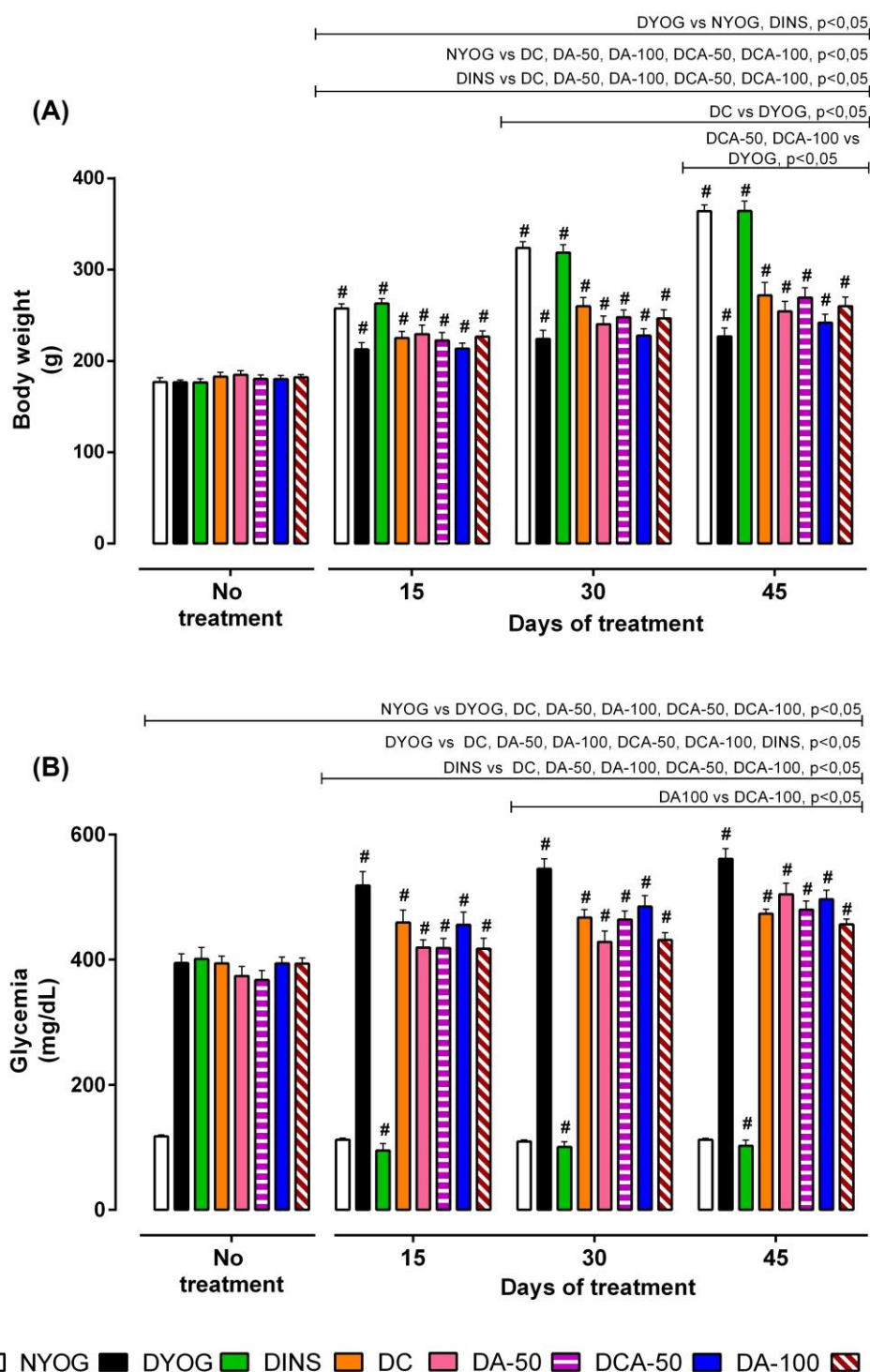


Figure 1. Body weight and glycemia of streptozotocin-diabetic rats treated for 45 days with yoghurt enriched with curcumin, alone or in combination with aminoguanidine. Body weight (A) and glycemia (B). Values are expressed as mean $\pm$ SEM, $n = 10$. Normal rats treated with yoghurt (NYOG) and diabetic rats treated with: yoghurt (DYOG); 4U/day insulin (DINS); 90 mg/kg curcumin in yoghurt (DC); 50 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DA-50); 90 mg/kg curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DCA-50); 100 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DA-100); 90 mg/kg curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DCA-100). Differences between groups were considered significant at $p < 0.05$ and

were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test. Differences in the same group relative to day 0 were analyzed using a paired Student's t test. #, different compared to day 0 ($p < 0.05$).

The treatment of diabetic rats with curcumin-enriched yoghurt (DC) improved the glycemia control, avoiding the progressive increase in glycemia levels as observed in DYOG group, mainly from the 15th day of treatment (Figure 1B). Diabetic rats treated with aminoguanidine, at both doses (DA-50 or DA-100 rats), also showed low glycemia levels in comparison with DYOG rats, from the 15th day of treatment (Figure 1B).

The combined therapies of curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine (DCA-50) and curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine (DCA-100) significantly decreased the glycemia of diabetic rats, from the 15th day of treatment, when compared with values of DYOG. Thus, it can be highlighted the benefits of the combined therapy in the management of glycemia in the course of diabetes. Curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine preserved the beneficial effects of the isolated treatments with curcumin or aminoguanidine in decreasing glycemia, whereas curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine added benefits to the aminoguanidine treatment, since the glycemia levels of DCA-100 rats were minor than those of DA-100 rats, which represents the maintenance of the curcumin effects on decrease the glycemia (Figure 1B).

3.3 HbA1c and fructosamine

In addition to monitor the temporal changes in glycemia, the HbA1c and fructosamine levels were evaluated, in attempting to verify the efficiency in the glycemetic control of STZ-diabetic rats submitted to the treatments with curcumin and aminoguanidine, isolated and co-administered. Both HbA1c and fructosamine are Amadori products irreversibly formed during the early steps of non-enzymatic protein glycation; their levels are positively correlated with blood glucose levels fluctuations [28].

HbA1c is generated by irreversible, non-enzymatic reaction between hemoglobin (Hb) and glucose inside the erythrocytes. Its levels depend on two parameters: the life span of erythrocytes (approximately 120 days) and the glucose circulating levels. Therefore, HbA1c is used to monitor long-term blood glucose levels, reflecting the average glycemia levels over 2 to 3 months [28,29]. Fructosamine is a stable ketoamine, formed by the non-enzymatic glycation process involving circulating proteins, usually albumin, but also includes globulins and lipoproteins. Fructosamine levels reflect the average glucose levels into the bloodstream over 2 to 3 weeks due to the turnover of plasma proteins [28].

After 45 days of experiment, DYOG rats had high levels of HbA1c and fructosamine, corroborating the hyperglycemia and the worsening of DM. Among all treated groups, DINS rats had the lowest levels of HbA1c and fructosamine, but yet remained higher than values of NYOG rats (Table 1).

The treatments with curcumin or with aminoguanidine at both doses, alone, decreased the HbA1c and fructosamine levels; it is interesting to note that the treatment with curcumin alone decreased the HbA1c at levels similar to those of the best treatment, i.e., insulin, emphasizing the potential of this bioactive phytochemical in attenuating protein glycation processes. The treatments of diabetic rats for 45 days with curcumin + aminoguanidine (50 and 100 mg/kg) also reduced the levels of HbA1c and fructosamine, whose levels were similar to those of the isolated treatments (Table 1).

3.4 Lipid profile

After 45 days of experiment, dyslipidemia was observed in DYOG rats, since they had increased plasma levels of triglycerides and total-cholesterol, in comparison with NYOG rats. The treatment of diabetic rats with 4U/day insulin was effective in reduce both triglycerides and total-cholesterol plasma levels, reaching values similar to those of NYOG rats (Table 1).

Overall, the levels of triglycerides and total-cholesterol in plasma of diabetic rats treated with curcumin or aminoguanidine (50 and 100 mg/kg) alone were decreased, when compared with values of DYOG rats, however remained higher than values of DINS and NYOG rats (Table 1).

The combined therapy of curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine aggregated benefits to the treatment of dyslipidemia in diabetic rats, since the plasma levels of triglycerides and total-cholesterol were similar to those of DINS and NYOG rats (Table 1). Although the triglyceride levels in rats treated with curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine were similar than values found with the isolated treatments, it should be noted that there was a further reduction in triglyceride levels in DCA-50 rats, allowing the reaching of values similar those of DINS and NYOG rats. In relation to total-cholesterol levels, curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine promoted an additive effect, since their levels were lower than those of the isolated treatments (Table 1).

The treatment with curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine was also effective in combating dyslipidemia in diabetic rats, as it maintained the triglycerides and total-cholesterol levels similar to those of DINS and NYOG rats and reached values lower than those of the isolated treatments (Table 1).

Table 1: Biochemical parameters of streptozotocin-diabetic rats after 45 days of treatment with yoghurt enriched with curcumin, alone or in combination with aminoguanidine.

	Groups							
	NYOG	DYOG	DINS	DC	DA50	DCA50	DA100	DCA100
HbA1c (%)	10.5 ± 0.4	18.6 ± 0.3 (a)	13.8 ± 0.6 (a,b)	15.0 ± 0.6 (a,b)	17.1 ± 0.4 (a,b,c)	17.0 ± 0.4 (a,b,c)	16.0 ± 0.4 (a,b,c)	15.6 ± 0.5 (a,b,c)
Fructosamine (µmol/L)	74.4 ± 6.3	209.9 ± 18.3 (a)	118.9 ± 9.8 (a,b)	168.5 ± 12.2 (a,b,c)	163.6 ± 8.0 (a,b,c)	172.6 ± 6.7 (a,b,c)	159.6 ± 9.4 (a,b,c)	167.9 ± 12.3 (a,b,c)
Triglycerides (mg/dL)	94.4 ± 9.5	229.5 ± 23.3 (a)	81.0 ± 10.1 (b)	157.9 ± 18.9 (a,b,c)	150.1 ± 22.3 (a,b,c)	115.4 ± 9.7 (b)	158.5 ± 11.9 (a,b,c)	109.2 ± 9.9 (b)
Total-Cholesterol (mg/dL)	57.0 ± 2.0	72.2 ± 1.7 (a)	57.4 ± 2.0 (b)	63.9 ± 1.1 (a,b,c)	64.2 ± 2.2 (a,b,c)	56.9 ± 1.9 (b,d,e)	65.3 ± 2.4 (a,b,c)	60.3 ± 2.9 (b)
ALT (U/L)	80.9 ± 3.6	226.5 ± 13.5 (a)	93.4 ± 6.4 (b)	173.9 ± 13.6 (a,b,c)	171.1 ± 12.1 (a,b,c)	182.1 ± 21.9 (a,b,c)	178.2 ± 14.7 (a,b,c)	169.7 ± 9.0 (a,b,c)
AST (U/L)	107.2 ± 4.5	182.8 ± 17.1 (a)	96.9 ± 6.4 (b)	137.1 ± 8.3 (b)	134.2 ± 12.8 (b)	139.0 ± 14.9 (b)	135.7 ± 8.2 (b)	130.5 ± 8.2 (b)
ALP (U/L)	176.1 ± 10.4	1313.2 ± 93.8 (a)	363.4 ± 44.3 (b)	982.3 ± 70.0 (a,b,c)	995.1 ± 88.9 (a,b,c)	937.5 ± 84.9 (a,b,c)	1354.3 ± 97.4 (a,c,d,e,f)	1113.7 ± 90.1 (a,c)
Proteinuria (mg/24h)	5.4 ± 0.9	17.7 ± 1.4 (a)	5.0 ± 0.8 (b)	11.8 ± 0.9 (a,b,c)	18.7 ± 0.9 (a,c,d)	12.0 ± 1.2 (a,b,c,e)	16.8 ± 1.3 (a,c,d)	14.7 ± 1.2 (a,c)

Values are expressed as mean ± SEM, n = 10. Normal rats treated with yoghurt (NYOG) and diabetic rats treated with: yoghurt (DYOG); 4U/day insulin (DINS); 90 mg/kg curcumin in yoghurt (DC); 50 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DA-50); 90 mg/kg curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DCA-50); 100 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DA-100); 90 mg/kg curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DCA-100). Differences between groups were considered significant at $p < 0.05$ and were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test. a: differences to NYOG; b: differences to DYOG; c: differences to DINS; d: differences to DC; e: differences to DA50.

3.5 Biomarkers of hepatic damage

After 45 days of experiment, the levels of biomarkers related to hepatic damage (ALT, AST, and ALP) were increased in the plasma of DYOG rats (Table 1). The treatment of diabetic rats with insulin had the best effects on attenuating the damage of liver, since the plasma levels of ALT, AST and ALP were significantly decreased when compared with values of DYOG rats, being AST levels similar to values of NIOG rats (Table 1).

Diabetic rats treated with curcumin or with 50 mg/kg aminoguanidine alone had decreases in plasma levels of ALT, AST and ALP, when compared to values of DYOG rats. Although the isolated treatment with 100 mg/kg aminoguanidine significantly reduced the levels ALT and AST in diabetic rats, this treatment was not able to avoid the increase in the ALP levels (Table 1).

The changes in biomarkers of hepatic damage in diabetic rats treated with curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine (DCA-50) were similar to those of the isolated treatments (DC and DA-50), i.e., this combined therapy decreased the plasma levels of ALT, AST, and ALP (Table 1). The combined therapy of curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine (DCA-100) also reduced the ALT and AST levels in a similar way of the isolated treatments; however, this combination did not reduce plasma ALP, whose levels were similar to those of DA-100 rats and less effective than curcumin alone (Table 1), suggesting that the high dose of aminoguanidine may have toxic impacts to hepatobiliary system in STZ-diabetic rats.

3.6 Biomarker of renal damage

DYOG rats showed increases in protein urinary levels (proteinuria), which suggested the presence of kidney damage. DINS rats had lower proteinuria levels than DYOG rats, being similar to levels found in NYOG rats (Table 1).

The treatment with curcumin alone decreased the proteinuria levels of diabetic rats, in comparison to DYOG rats. In contrast, treatments with aminoguanidine alone, at both doses, were not able to prevent the proteinuria in diabetic rats (Table 1).

The treatment of diabetic rats with curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine (DCA-50) was effective in preventing the increase in the proteinuria levels, whose values were similar to those of rats treated with curcumin. On the other hand, the combined therapy of curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine (DCA-100) was not able to prevent proteinuria; the effects of this treatment on proteinuria were similar to those of 100 mg/kg aminoguanidine alone (Table 1).

3.7 Biomarkers of oxidative damage and antioxidant defenses in plasma

It can be observed that the glycoxidative stress is presented in STZ-diabetic rats after 45 days of experiment, because the PON 1 activity in plasma was decreased (Figure 2A), whereas the levels of fluorescent AGEs (Figure 2B), PCO (Figure 2C), TBARS (Figure 2D), and NOx (Figure 2E) were significantly increased in plasma of DYOG rats. The treatment with insulin prevented the onset of glycoxidative stress in diabetic rats.

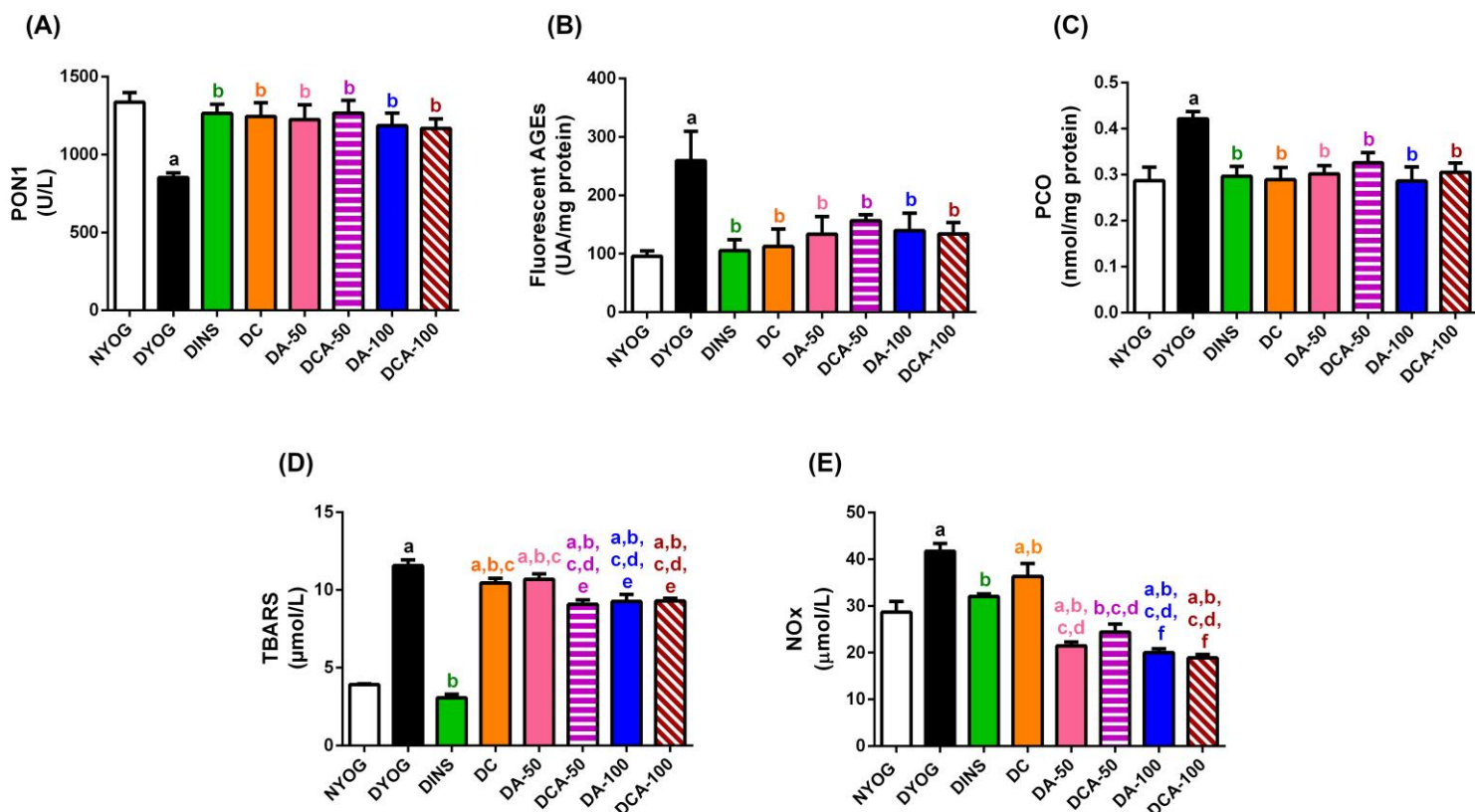


Figure 2. Antioxidant defenses (PON1) and glycoxidative stress biomarkers (fluorescent AGEs, PCO, TBARS and NOx) in plasma of streptozotocin-diabetic rats after 45 days of treatment with yoghurt enriched with curcumin, alone or in combination with aminoguanidine. Activity of PON1 (A) and levels of fluorescent AGEs (B), PCO (C), TBARS (D) and Total nitrate + nitrite (NOx) (E). Values are expressed as mean $\pm$ SEM, $n = 10$. Normal rats treated with yoghurt (NYOG) and diabetic rats treated with: yoghurt (DYOG); 4U/day insulin (DINS); 90 mg/kg curcumin in yoghurt (DC); 50 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DA-50); 90 mg/kg curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DCA-50); 100 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DA-100); 90 mg/kg curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DCA-100). Differences between groups were considered significant at $p < 0.05$ and were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test. a: differences to NYOG; b: differences to DYOG; c: differences to DINS; d: differences to DC; e: differences to DA50; f: differences to DCA50.

DC, DA-50 and DA-100 rats had significant increases in the activity of PON 1, when compared with DYOg rats. The treatments with curcumin + aminoguanidine (50 or 100 mg/kg) also increased the PON 1 activity, in a similar way of the isolated treatments. The activities of PON 1 in diabetic rats under all these treatments were similar to those of DINS and NYOG rats (Figure 2A).

The treatments with curcumin and aminoguanidine (50 and 100 mg/kg), isolated or co-administrated, reduced the plasma levels of fluorescent AGEs (Figure 2B) and PCO (Figure 2C), whose levels were similar to those of DINS and NYOG rats, showing the beneficial responses of these combined therapies against glycoxidative stress in diabetes.

Corroborating the increase in the activity of PON 1, diabetic rats treated with curcumin or aminoguanidine alone had reduced levels of TBARS, in comparison with DYOg rats; DA-100 rats had TBARS levels were lower than those of DA-50 and DC rats (Figure 2D).

The combined therapy of curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine aggregated benefits in combating oxidative stress in diabetic rats, since the plasma levels of TBARS were lower than those of the isolated treatments (DC and DA-50 groups). The treatment with curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine was also effective in combating lipid peroxidation, since maintained the best effect achieved by the treatment with 100 mg/kg aminoguanidine in reducing plasma TBARS of diabetic rats (Figure 2D)

The treatments of diabetic rats with aminoguanidine alone, at both doses, significantly reduced the plasma levels of NO_x, being the values lower than those of NYOG and DINS rats, which is not appropriate as very low NO_x levels may also culminate in unwanted responses. The treatment with curcumin alone was the less effective in reducing plasma NO_x levels; the NO_x levels in DC rats were decreased only in comparison with DYOg rats (Figure 2E).

Diabetic rats treated with curcumin + 50 mg/kg curcumin aggregated benefits to curcumin in reducing NO_x levels, since the plasma levels of NO_x were significantly reduced, in comparison with DYOg rats, and reached values similar to those of NYOG rats; this was a better result than that achieved by the isolated treatments. Similar to the responses observed in diabetic rats treated with 100 mg/kg aminoguanidine, the combined treatment of curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine reduced NO_x levels in comparison with DYOg, NYOG and DINS groups (Figure 2E). Both NO levels and the activity/expression of iNOS are involved to several pathophysiologies. Therefore, iNOS must be tightly regulated, because the

overproduction of NO but also its poor production can result in impairments to the organism homeostasis [30].

These findings indicate that the combined therapies of curcumin + aminoguanidine, at both doses, were more efficient than the isolated treatments in promoting decreases in biomarkers of glycativ and oxidative damage in plasma, as well as avoided the fall in the antioxidant defenses in plasma of diabetic rats. Furthermore, the combined therapy curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine was more efficient than the isolated treatments and than the treatment combined of curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine, since maintained NO_x levels similar to those of DINS and NYOG rats.

3.8 Antioxidant defenses and AGE detoxification components in liver and kidney

Similar to the impairments observed in the activities of PON1 and iNOS (indirectly estimated by NO_x levels), other important enzymes participating in the ROS homeostasis are altered in STZ-diabetic rats, as well as the NPSH levels and the components related to AGE detoxification.

After 45 days of experiment, DYOGR rats showed substantial decreases in cytoprotective components in liver and kidney. It was observed that the activities of the antioxidant enzymes SOD (liver and kidney; Figures 3A and 4A, respectively) and CAT (liver and kidney; Figures 3B and 4B, respectively) were decreased, as well as the levels of NPSH (liver and kidney; Figures 3E and 4E, respectively). Components of AGE detoxification were also significantly decreased in DYOGR rats, including AGE-R1 (liver, Figures 5A and B and kidney, Figures 6A and B) and GLO 1 (liver, Figures 5A and C and kidney, Figures 6A and C). Interestingly, DYOGR rats had increases in the activities of GSH-Px and GSH-Rd in liver (Figures 3C and D, respectively) and kidney (Figures 4C and D, respectively), when compared with values of NYOG rats; these changes in the components of the glutathione redox system may be interpreted as a compensatory mechanism against oxidative stress. The treatment of diabetic rats with insulin prevented all these disturbances.

The treatment of diabetic rats with curcumin alone increased the activity of SOD in kidney (Figure 4A), but did not improve hepatic SOD activity (Figure 3A). The activities of CAT in liver (Figure 3B) and kidney (Figure 4B) of diabetic rats were increased by curcumin treatment.

The treatment with 50 mg/kg aminoguanidine alone showed the same profile of curcumin treatment, for SOD and CAT: it increased the activities of CAT in liver and kidneys

(Figures 3B e 4B, respectively), and increased the activity of SOD only in kidneys (Figure 4A).

However, a distinct response was achieved when curcumin and 50 mg/kg aminoguanidine were administered in combination to diabetic rats, having better efficacies in the antioxidant defenses. The benefits previously achieved with the isolated therapies were maintained (i.e., the increases in the activities of SOD and CAT in kidneys, and the increase in the activity of CAT in liver). Additionally, curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine treatment was able to promote a significant increase in the activity of SOD in liver (Figure 3A), showing again the benefit of this combined therapy in combating oxidative stress in diabetes.

The treatment with 100 mg/kg aminoguanidine alone was less effective than 50 mg/kg aminoguanidine in the maintenance of the antioxidant responses in liver and kidney of diabetic rats.

Although 100 mg/kg aminoguanidine increased the activity of CAT in kidneys (Figure 4B), it was not effective in increasing the activity of this enzyme in liver (Figure 3B), nor did it improve the activity of SOD in both tissues (Figures 3A and 4A). Once again, the combination therapy added benefits to aminoguanidine about the recovering of the antioxidant protection. Curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine significantly increased the activities of CAT in the liver (Figure 3B) and SOD in the kidneys (Figure 4A), therefore maintaining the curcumin effects as well as the effects of the treatments on increasing the activity of CAT in the kidneys (Figure 4B); however, this combined treatment was unable to improve SOD activity in the liver (Figure 3A).

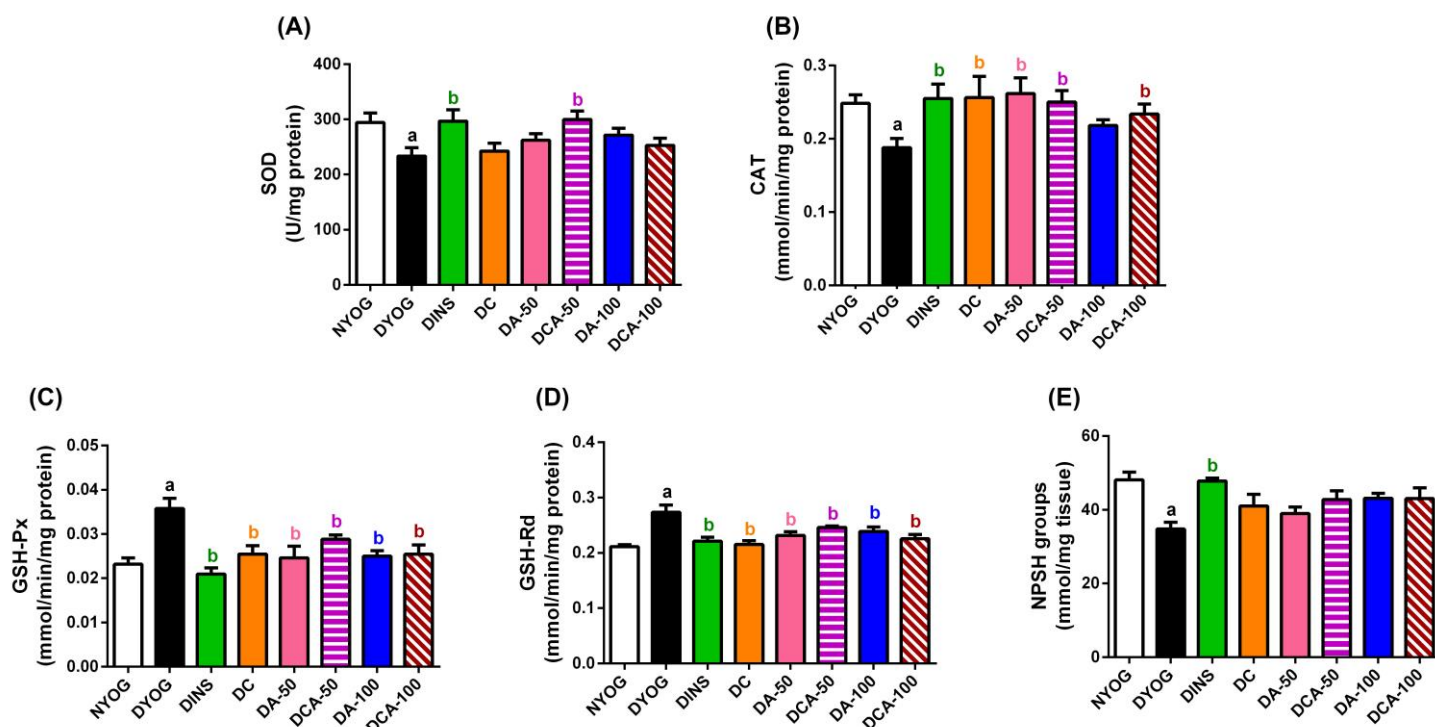


Figure 3. Antioxidant systems biomarkers (SOD, CAT, GSH-Px, GSH-Rd and NPSH groups) in liver of streptozotocin-diabetic rats after 45 days of treatment with yoghurt enriched with curcumin, alone or in combination with aminoguanidine. Activities of SOD (A), CAT (B), GSH-Px (C) and GSH-Rd (D), and levels of NPSH groups (E). Values are expressed as mean $\pm$ SEM, $n = 10$. Normal rats treated with yoghurt (NYOG) and diabetic rats treated with: yoghurt (DYOG); 4U/day insulin (DINS); 90 mg/kg curcumin in yoghurt (DC); 50 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DA-50); 90 mg/kg curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DCA-50); 100 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DA-100); 90 mg/kg curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DCA-100). Differences between groups were considered significant at $p < 0.05$ and were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test. a: differences to NYOG; b: differences to DYOG.

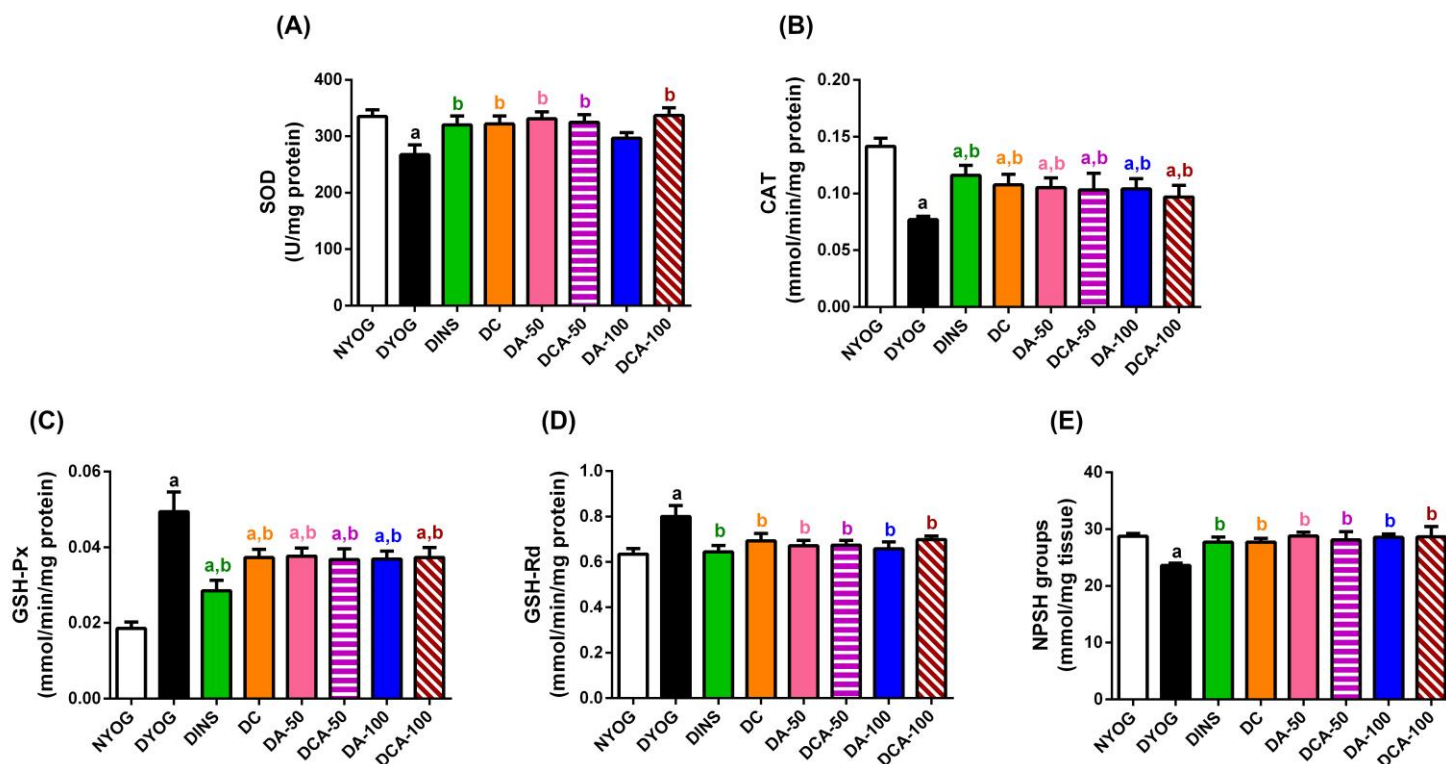


Figure 4. Antioxidant systems biomarkers (SOD, CAT, GSH-Px, GSH-Rd and NPSH groups) in kidney of streptozotocin-diabetic rats after 45 days of treatment with yoghurt enriched with curcumin, alone or in combination with aminoguanidine. Activities SOD (A), CAT (B), GSH-Px (C) and GSH-Rd (D), and levels of NPSH groups (E). Values are expressed as mean $\pm$ SEM, $n = 10$. Normal rats treated with yoghurt (NYOG) and diabetic rats treated with: yoghurt (DYOG); 4U/day insulin (DINS); 90 mg/kg curcumin in yoghurt (DC); 50 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DA-50); 90 mg/kg curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DCA-50); 100 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DA-100); 90 mg/kg curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DCA-100). Differences between groups were considered significant at $p < 0.05$ and were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test. a: differences to NYOG; b: differences to DYOG.

The activities of GSH-Px and GSH-Rd in liver (Figures 3C and D, respectively) and kidneys (Figures 4C and D, respectively) were similar among all treatments (insulin, curcumin, aminoguanidine and curcumin + aminoguanidine at both doses) and with the same values of NYOG rats. The levels of NPSH in kidneys of diabetic rats were increased in a same magnitude after all treatments (Figure 4E); on the other hand, in liver, insulin was the unique treatment able to recover the NPSH levels (Figure 3E).

In liver of diabetic rats, the treatments with curcumin and aminoguanidine (50 and 100 mg/kg), isolated or in combination, significantly increased the protein levels of AGE-R1

(Figures 5A and B) and GLO 1 (Figures 5A and C). The benefits of these treatments were similar to those of insulin therapy, and reached the values found in NYOG rats.

In kidney of diabetic rats, the best effects on increasing the protein levels of AGE-R1 (Figures 6A and B) and GLO 1 (Figures 6A and C) were reached with insulin. On the other hand, discrete effects on increasing AGE-R1 (Figures 6A and B) and GLO 1 (Figures 6A and C) levels were observed with the treatment of curcumin alone. Treatments with aminoguanidine alone had interesting impacts on AGE detoxification components in kidneys: 50 mg/kg aminoguanidine caused a robust increase in AGE-R1 levels (likewise the insulin effect) (Figures 6A and B) and practically did not improve GLO 1 levels (Figures 6A and C), whereas 100 mg/kg aminoguanidine caused a discrete increase in AGE-R1 (Figures 6A and B) and significantly increased the levels of GLO 1 (Figures 6A and C). Between the combined therapies and the impacts on AGE detoxification components, curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine showed the best results, preserving the beneficial effects of both treatments, i.e., increasing the levels of AGE-R1 (aminoguanidine effect; Figures 6A and B) and GLO 1 (curcumin effect; Figures 6A and C). Curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine promoted slight increases in AGE-R1 (Figures 6A and B) and GLO 1 (Figures 6A and C) levels.

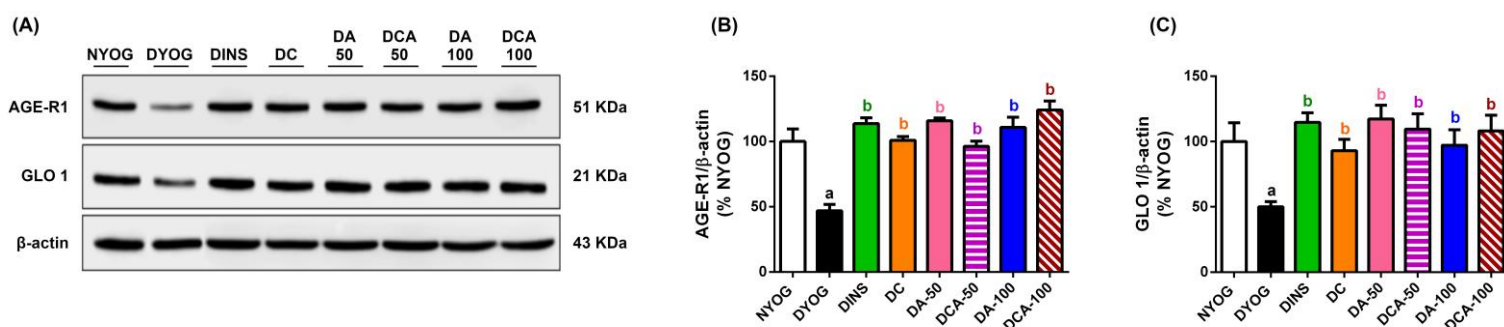


Figure 5. AGE detoxification biomarkers (AGE-R1 and GLO 1) in liver of streptozotocin-diabetic rats after 45 days of treatment with yoghurt enriched with curcumin, alone or in combination with aminoguanidine. Representative lanes of protein levels as detected by western blot analysis for AGE-R1, GLO 1 and β actin (A), densitometric analysis of western blot results for AGE-R1 (B) and GLO 1 (C). Values are expressed as mean ± SEM, n = 6. Normal rats treated with yoghurt (NYOG) and diabetic rats treated with: yoghurt (DYOG); 4U/day insulin (DINS); 90 mg/kg curcumin in yoghurt (DC); 50 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DA-50); 90 mg/kg curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DCA-50); 100 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DA-100); 90 mg/kg curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DCA-100). Differences between groups were

considered significant at $p < 0.05$ and were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test. a: differences to NYOG; b: differences to DYOG.

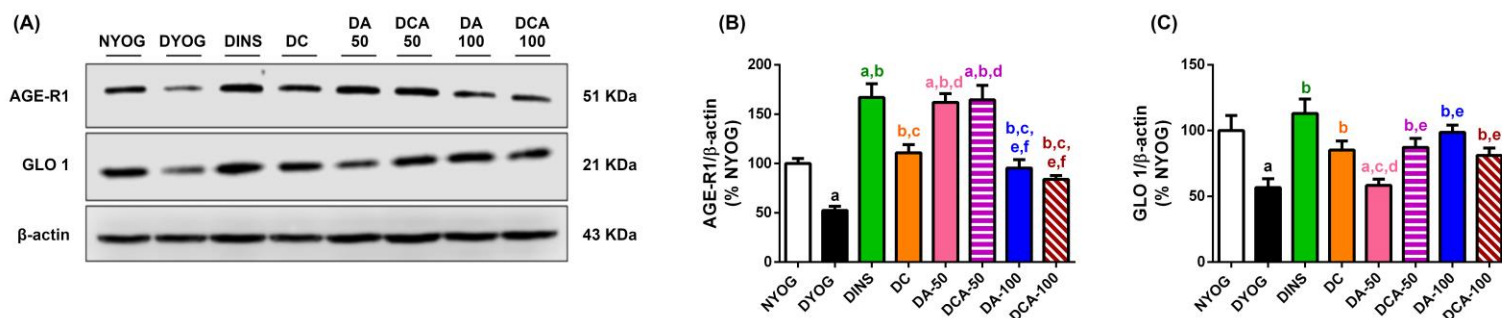


Figure 6: AGE detoxification biomarkers (AGE-R1 and GLO 1) in kidney of streptozotocin-diabetic rats after 45 days of treatment with yoghurt enriched with curcumin, alone or in combination with aminoguanidine. Representative lanes of protein levels as detected by western blot analysis for AGE-R1, GLO 1 and β actin (A), densitometric analysis of western blot results for AGE-R1 (B) and GLO 1 (C). Values are expressed as mean $\pm$ SEM, $n = 6$. Normal rats treated with yoghurt (NYOG) and diabetic rats treated with: yoghurt (DYOG); 4U/day insulin (DINS); 90 mg/kg curcumin in yoghurt (DC); 50 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DA-50); 90 mg/kg curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DCA-50); 100 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DA-100); 90 mg/kg curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DCA-100). Differences between groups were considered significant at $p < 0.05$ and were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test. a: differences to NYOG; b: differences to DYOG; c: differences to DINS; d: differences to DC; e: differences to DA50; f: differences to DCA50.

3.9 Biomarkers of oxidative damage in liver and kidney

In addition to the detrimental impacts in plasma, glycoxidative stress was also observed in liver and kidney of DYOG rats, as increases were observed in the levels of fluorescent AGEs (liver and kidney; Figures 7A and 8A, respectively), PCO (liver and kidney; Figures 7B and 8B, respectively), and TBARS (kidney; Figure 8C). Interestingly, DYOG rats had reduced levels of TBARS in liver (Figure 7C) in comparison with NYOG rats. Similar to the effects on plasma, the treatment with insulin prevented the glycoxidative stress installation in liver and kidney of diabetic rats.

Although the TBARS levels were not changed in the liver (Figure 7C) and kidneys (Figure 8C) of DC, DA-50, DA-100, DCA-50, and DCA-100 rats, these groups showed significant reductions in fluorescent AGEs and PCO levels in liver (Figures 7A and B, respectively) and also in kidneys (Figures 8A and B, respectively), being these values similar

to those of DINS and NYOG rats, reiterating the beneficial properties of these treatments in attenuating the glycoxidative stress in diabetic rats.

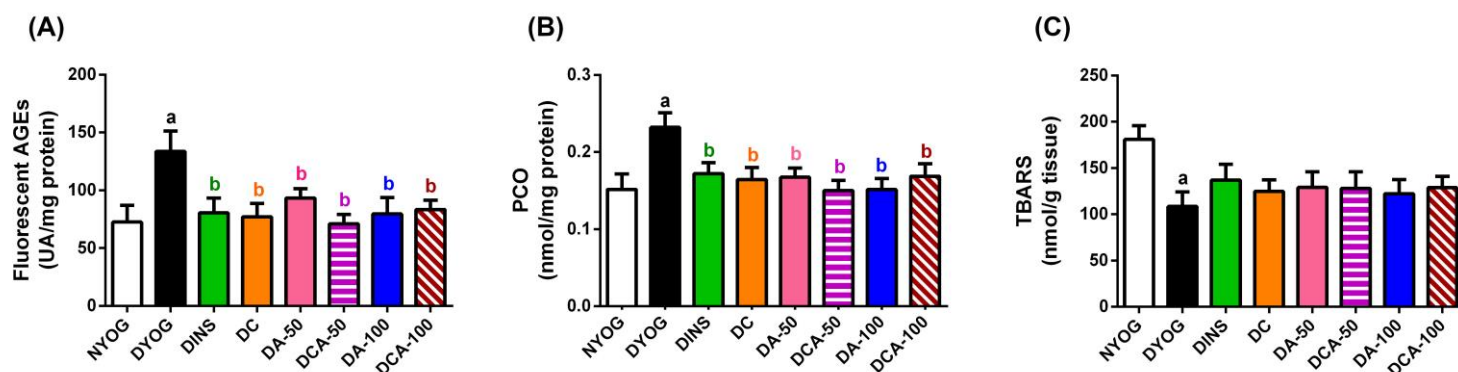


Figure 7: Glycoxidative stress biomarkers (fluorescent AGEs, PCO, TBARS) in liver of streptozotocin-diabetic rats after 45 days of treatment with yoghurt enriched with curcumin, alone or in combination with aminoguanidine. Levels of fluorescent AGEs (A), PCO (B) and TBARS (C). Values are expressed as mean $\pm$ SEM, $n = 10$. Normal rats treated with yoghurt (NYOG) and diabetic rats treated with: yoghurt (DYOG); 4U/day insulin (DINS); 90 mg/kg curcumin in yoghurt (DC); 50 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DA-50); 90 mg/kg curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DCA-50); 100 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DA-100); 90 mg/kg curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DCA-100). Differences between groups were considered significant at $p < 0.05$ and were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test. a: differences to NYOG; b: differences to DYOG.

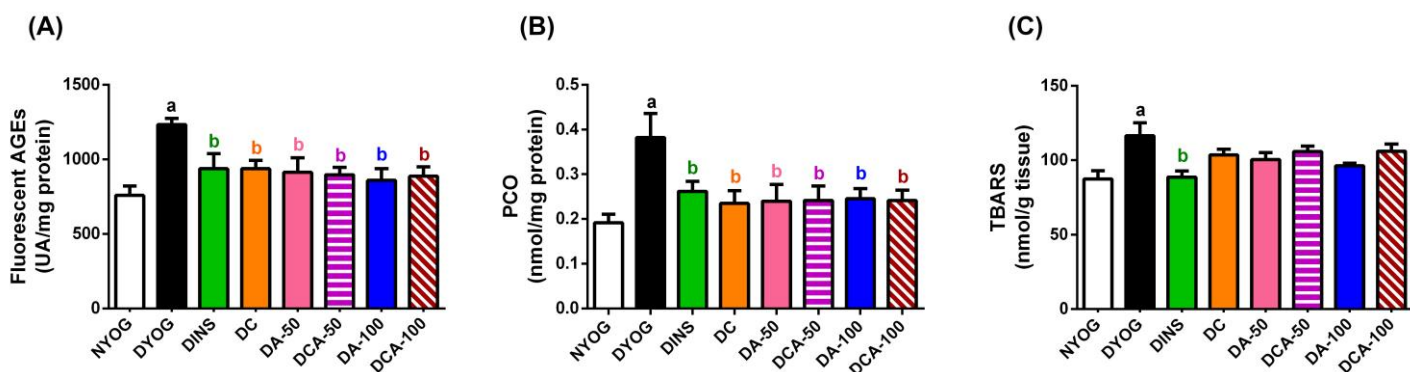


Figure 8: Glycoxidative stress biomarkers (fluorescent AGEs, PCO, TBARS) in kidney of streptozotocin-diabetic rats after 45 days of treatment with yoghurt enriched with curcumin, alone or in combination with aminoguanidine. Levels of fluorescent AGEs (A), PCO (B) and TBARS (C). Values are expressed as mean $\pm$ SEM, $n = 10$. Normal rats treated with yoghurt (NYOG) and diabetic rats treated with: yoghurt (DYOG); 4U/day insulin (DINS); 90 mg/kg curcumin in yoghurt (DC); 50 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DA-50);

90 mg/kg curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DCA-50); 100 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DA-100); 90 mg/kg curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine in yoghurt (DCA-100). Differences between groups were considered significant at $p < 0.05$ and were analyzed using one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test. a: differences to NYOG; b: differences to DYOG.

4. Discussion

Studies aimed to evaluate the benefits of combined therapies among natural and/or synthetic compounds for the management of diabetes have often focused on changes in classical physiometabolic parameters and biomarkers of oxidative stress [11,12]. The present study advanced our understanding in the potential of combined therapies in counteract not only oxidative but also glycativ stress in a condition of chronic hyperglycemia. In this sense, the findings of this study brought evidence about the beneficial effects of the combined therapy between curcumin (natural bioactive compound) and aminoguanidine, a prototype therapeutic agent having a great performance in preventing non-enzymatic glycation that is accelerated in DM.

The treatments of diabetic rats with two well-known compounds that have *per se* antioxidant (curcumin) and antiglycation (aminoguanidine) properties, alone and potentially in combination, they are promising in attenuating or preventing the diabetic complications associated with glycoxidative stress. Besides, the present study showed that these two compounds, when in combination and administered *in vivo*, they elicit cytoprotective mechanisms that go beyond their relevant intrinsic actions, increasing the endogenous antioxidant defenses (especially SOD, CAT, and PON 1) and stimulating the expression of components that participate in the detoxification of AGEs (AGE-R1 and GLO 1), becoming very promising the association between curcumin and aminoguanidine in combating the complications of DM associated with glycoxidative stress. This study also demonstrated that the higher dose of aminoguanidine (100 mg/kg) does not reproduce some of the beneficial effects observed with the lowest dose (50 mg/kg), and even causes loss of effects when co-administered with curcumin. Therefore, the combined therapy between curcumin and the lower dose of aminoguanidine appears to be an interesting strategy for the management of DM and to prevent the long-term complications of this syndrome.

In this study, normal (NYOG) or diabetic rats (DYOG) treated with yoghurt were considered the control groups related to the absence (NYOG) or the presence (DYOG) of metabolic disturbances and glycoxidative stress due to insulin deficiency. Treatment with

yoghurt alone did not change the physiological and biochemical parameters classically altered in STZ-induced experimental model of DM [31]. For this reason, studies from our laboratory use yoghurt as a vehicle for oral administration of compounds that have low solubilities in water, such as curcumin, carotenoids, and other natural antioxidants [11,31,32]. Furthermore, the administration of phytochemicals into yoghurt did not impair their benefits against diabetic symptoms.

The antidiabetic and antioxidant activities of curcumin have been well documented [11,31,33]. Curcumin has been found to stimulate the insulin release from pancreatic beta cells [34,35] and to increase the peripheral insulin sensitivity [33]. According to Gutierrez et al. [36], the antihyperglycemic effect of curcumin-enriched yoghurt may be related to its ability to increase both the peripheral insulin sensitivity and the glucose tolerance in STZ-diabetic rats, which seem to be associated with an increase in the AKT phosphorylation levels and GLUT 4 translocation in skeletal muscles. Taken together, these mechanisms may explain, at least in part, the timely glycemic control in diabetic rats treated with curcumin, since we observed reductions in plasma levels of glucose (Figure 1B), HbA1c and fructosamine (Table 1). The improvement in the insulin sensitivity and the preservation of the pancreatic function may be also contributing to the other benefits observed in diabetic rats treated with curcumin, including the increased body weight gain (Figure 1A) and the reductions in dyslipidemia and urinary protein excretion (Table 1).

The antihyperglycemic effect of curcumin-enriched yoghurt helps to explain, at least in part, the reductions in the levels of glycoxidative stress biomarkers, including AGEs (plasma, liver and kidney; Figures 2B, 7A and 8A, respectively), PCO (plasma, liver and kidney; Figures 2C, 7B and 8B, respectively), TBARS (plasma; Figure 2D), and NOx (plasma; Figure 2E). Additionally, curcumin has a potent antioxidant power *per se* [37], which could be also contributing with its *in vivo* antioxidant activity. Reductions in the oxidative damage may also be a consequence of the curcumin actions in increasing the activities of antioxidant enzymes, such as PON 1 (plasma; Figure 2A), SOD (kidney; Figure 4A), and CAT (liver, Figure 3B and kidney, Figure 4B), as well as by increasing NPSH levels (kidney; Figure 4E). Corroborating these findings, previous studies showed that the treatment of diabetic rats or obese mice with curcumin-enriched yoghurt attenuated oxidative stress, in parallel to increases in the activities of SOD and CAT in the liver and kidneys [11,32].

Our study also advances in novel mechanisms of action by which curcumin may have beneficial effects in counteract the *in vivo* glycoxidative stress. The treatment of diabetic rats with curcumin-enriched yoghurt increased the levels of components related to AGE

detoxification, including AGE-R1 (liver, Figures 5A and B and kidney, Figures 6A and B) and GLO 1 (liver, Figures 5A and C and kidney, Figures 6A and C). It has been reported that curcumin has the ability to trap methylglyoxal [38], as well as increases the GLO 1 levels in liver of mice fed a high-fat diet [32], induces AGE-R1 expression and inhibit RAGE expression in *ex vivo* models [39]. However, to the best of our knowledge, this is the first evidence of that curcumin induces components of AGE detoxification in STZ-diabetic rats, increasing the levels of AGE-R1 and GLO 1 in liver and kidneys. Such responses may be contributing to the reductions observed in AGEs levels in these tissues, and consequently, dampening glycoxidative stress.

The curcumin effects on improving the endogenous antioxidant defenses as well as the components that detoxify AGEs in the liver and kidneys of STZ-diabetic rats may have contributed to the improvements in the integrity and/or function of these tissues, as noted by the decreases in plasma levels of ALT, AST and ALP and in urinary protein levels (Table 1). Liver is an important organ participating in the control of energy metabolism and xenobiotic biotransformation. This organ has a high susceptibility to glycoxidative stress, which in combination with an exacerbated inflammatory response contribute to the onset and progression of liver damage [40]. Nephropathy is one main prevalent complication of type 1 and 2 DM, and is the leading cause of chronic renal failure and end-stage renal disease [41]. Glycoxidative stress plays an important role in the initiation and progression of diabetic nephropathy, characterized by functional and structural abnormalities [42].

It has been well reported the antiglycation potential of aminoguanidine; it inhibits AGEs formation mainly by trapping intermediate reactive dicarbonyl compounds, such as methylglyoxal, glyoxal, and 3-deoxyglycosone [13]. However, its *in vivo* effects may be limited due to a rapid renal elimination [13].

The aminoguanidine effects on lowering the glycemic levels (Figure 1B) may be due to its antiglycation activity, since AGE/RAGE interaction triggers intracellular signaling pathways that cause oxidative stress and inflammation, these are directly associated with insulin resistance [43]. In addition, methylglyoxal seems to impair the insulin signaling via suppression of the stimulatory phosphorylation of the insulin receptor substrate 1 (IRS 1), as well as its inhibits the activity of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) [44]. Also, it has been shown that methylglyoxal blocks the interaction between AMP (adenosine monophosphate) and AMP-dependent protein kinase (AMPK), favoring both gluconeogenesis and lipogenesis [45]. The reductions in the glycemia levels of STZ-diabetic rats treated with aminoguanidine

are in agreement with other studies that also observed falls in glycemia of diabetic rats orally treated for 56 days [16] or 70 days [46] with aminoguanidine.

The decreases in the circulating levels of HbA1c and fructosamine in STZ-diabetic rats treated with aminoguanidine may be a consequence, at least in part, of the improvements in the glycemic control. In addition, the well-known antiglycation activity of aminoguanidine may have significant participation. Taken together, the minor AGEs levels in plasma, liver and kidneys of diabetic rats treated with aminoguanidine corroborate these hypotheses. The mitigation of protein glycation and its detrimental consequences can contribute to diminish LPO and the oxidation of proteins. To slow the formation of AGEs also attenuates AGE/RAGE interaction, decreasing the expression of RAGE. Therefore, inhibiting AGEs formation is a promising therapeutic strategy to counteract the diabetic complications [6,47].

Although the improvements in glycemia and protein glycation processes, the treatment with aminoguanidine did not cause benefits to the body weight gain (Figure 1A), as previously observed [15]. Regarding the effects of aminoguanidine on renal function, literature reports divergent responses. Lv et al. [16] observed that the treatment of diabetic rats with aminoguanidine for 56 days reduced proteinuria; unlike our present findings, where it was not observed the renoprotective effect of aminoguanidine in STZ-diabetic rats. On the other hand, Wilkinson-Berka et al. [48] demonstrated that the treatment of STZ-diabetic rats with aminoguanidine for 84 days did not reduce albuminuria, and the authors also reported that aminoguanidine has oscillating effects on albuminuria that may be time-dependent.

The treatment with 100 mg/kg aminoguanidine had the smallest amount of benefits, since it was not able to avoid the increase in plasma ALP levels (Table 1), as well as did not recover the activities of CAT in the liver (Figure 3B) and SOD in kidneys (Figure 4A). Although the treatment with 100 mg/kg aminoguanidine caused increases in AGE-R1 in kidneys, this effect was smaller than that of 50 mg/kg aminoguanidine (Figures 6A and B). Conversely, the treatment with 100 mg/kg aminoguanidine promoted the best effects on increasing the GLO 1 levels in kidneys of diabetic rats (Figures 6A and C).

The treatment of diabetic rats with curcumin + 100 mg/kg aminoguanidine had beneficial combined effects on body weight gain (Figure 1A) and glycemia management (Figure 1B), and increased the activities of SOD (kidney; Figure 4A) and CAT (liver; Figure, 3B), which seem to be related to the curcumin effects. As well, the reduction in plasma TBARS levels of DCA-100 rats can be related to the effects of aminoguanidine (Figure 2D). Nonetheless, this combined therapy caused the loss of many curcumin effects on protecting liver and kidneys, since DCA-100 rats had increased levels of ALP in plasma and proteinuria

(Table 1). The failure to maintain some beneficial effects of the low aminoguanidine dose as well as the loss of the beneficial effects of curcumin when administered in combination with 100 mg/kg aminoguanidine may have occurred due to toxicity as a consequence of the high dose and/or due to impairments in the pharmacokinetics/pharmacodynamics of curcumin. Aminoguanidine exhibits good absorption and is almost completely eliminated unchanged in the urine [13,49]. However, individuals with impairments in the renal function demonstrate reductions in the rates of aminoguanidine elimination, so they need dose adjustments [49]. The clinical trial that administered aminoguanidine to type 2 diabetic individuals with diabetic nephropathy had early termination due to observed side effects including gastrointestinal disturbance and abnormalities in liver function tests [50].

Attempting to increase the bioavailability and antidiabetic activity of curcumin, a previous study from our laboratory administered to STZ-diabetic rats curcumin in combination with piperine; piperine inhibits the enzymes involved in biotransformation processes, including cytochrome P450 3A4 (CYP3A4). However, it was observed loss of the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin when administered in combination with piperine. Additionally, this combined therapy apparently was toxic to the liver, since it increased the levels of ALT in plasma of diabetic rats. The authors suggested that the *in vivo* antidiabetic activity of curcumin may be related to its metabolite(s) [51]. Furthermore, in other recent study from our laboratory, obese, high-fat diet fed mice were treated with curcumin in combination with trigonelline (an alkaloid isolated from fenugreek seeds); this combined therapy impaired various benefits reached with the treatments alone, which may be a consequence of inhibition of biotransformation processes and/or the reaching of toxic doses [32]. Altogether, these previous studies corroborating our present findings on the loss of effects when curcumin was co-administered with 100 mg/kg aminoguanidine, abolishing the beneficial effects of curcumin to diabetes and also losing the benefits of aminoguanidine at minor dose.

One of the main advances achieved with the present study is related to the promising findings with the combined therapy of curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine in combating the symptoms of DM and the disorders associated with glycoxidative stress. In this regard, this study demonstrated that the beneficial effects of this combined therapy on diabetes can be achieved via two strategies: (i) the best effects of the isolated treatments were maintained, including the recovering in the body weight gain and the reduction in proteinuria (curcumin effects), as well as the increase in the levels of AGE-R1 (aminoguanidine effects) and GLO 1 (curcumin effects) in kidneys; (ii) additive effects were reached, by further decreases in

plasma triglycerides, total-cholesterol, and TBARS, in which levels were minor than those of the isolated treatments. Besides, this was the unique treatment that increased the activity of SOD in liver and kept the NO_x levels close to values normal, non-diabetic animals. Curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine also presented a good ability to manage glycemia in diabetic rats, and reduced biomarkers of early (HbA1c and fructosomine) and advanced (fluorescent AGEs) protein glycation (curcumin and aminoguanidine effects). It is well known that the accelerated formation of AGEs during chronic hyperglycemia increases the RAGE expression. Increased AGE/RAGE interaction leads to NF- κ B activation that triggers inflammation, and also exacerbates ROS production [4]. Therefore, having a therapeutic option able to oppose the deleterious effects of advanced glycation seems extremely useful to combat glycoxidative stress, inflammation, and thus the detrimental events leading to the diabetic complications.

The promising potential of curcumin combined with 50 mg/kg aminoguanidine to dampen glycoxidative stress in diabetes by triggering endogenous cytoprotective machinery can be evidenced by two important findings. First, the increased activities of SOD and CAT in liver and kidneys of diabetic rats, which may be helpful to convert ROS into relatively unreactive O₂ molecules and/or H₂O, therefore these antioxidant enzymes are critical for attenuating or protecting biomolecules against oxidative damage [52]. Second, the increased levels of GLO 1 and AGE-R1 in liver and kidneys of diabetic rats, components that are directly involved in the inhibition of AGEs formation and their removal, respectively, thereby preventing cell and tissue damages [4,6].

Aminoguanidine is also known to inhibit the enzyme nitric oxide synthase, inducible form (iNOS) [13]. Such aminoguanidine effect has been studied in DM models, demonstrating its importance in the attenuation/prevention of disease complications [53,54]. Among the isoforms of nitric oxide synthase (NOS), iNOS (inducible) generates higher amounts of NO than eNOS (constitutive), as iNOS is expressed under immunological (proinflammatory cytokines) and non-immunological stimulus, including hyperglycemia, obesity, increased free fatty acids, and oxidative stress [55]. Considering this, it can be suggested that the increased levels of NO_x in plasma of DYOG rats may be due to the increased activity and/or expression of iNOS. In DM, impaired cardiovascular function is partially attributed to the pathological overexpression of iNOS in cardiovascular tissues [56]. Besides, iNOS is also an important source of ROS in diabetic kidneys [57]. Thus, our data provided evidence that curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine had the most satisfactory effect on NO_x levels, reducing them to values similar those of normal, NYOG rats (Figure 2E). Decreases in the activity of PON1 also favors the development of cardiovascular

complications in DM [58,59]. PON1 is associated with HDL and has antioxidant activity by hydrolyzing lipid hydroperoxides, thus preventing oxidative stress [59]; in diabetes, decreases in its activity seem to be related to non-enzymatic glycation [60,61]. Our findings indicate that the treatment of diabetic rats with curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine may have beneficial actions against cardiovascular complications, mainly by increasing PON 1 activity and normalizing NOx levels (Figures 2A and E, respectively). Corroborating our findings, previous studies have also shown that the treatment of diabetic or obese animals with curcumin into yoghurt was able to preserve PON 1 activity [11,32]. Finally, curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine also promoted an additive effect on reducing triglycerides and total-cholesterol plasma levels (Table 1). Altogether, (i) the significant reduction in dyslipidemia, (ii) the increases in the PON 1 activity, and (iii) the normalization in NOx levels, these findings provide consistent evidence about the potential of curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine combined therapy for the management of cardiovascular complications observed in DM.

Interestingly, there was a significant decrease in TBARS levels in liver of diabetic, DYOG rats (Figure 7C), paralleled by increases in the activities of enzymes belonging to the glutathione redox system, GSH-Px and GSH-Rd (Figures 3C and D). It can be hypothesized that, with the onset of glycoxidative stress in DM, there was an increased production of lipid peroxides that in combination with the decreased levels of GSH (since NADPH has been quickly oxidized in the polyol pathway due to hyperglycemia), may be causing stimulus to compensatory mechanisms leading to high GSH-Px activity/expression, as this enzyme has lipid peroxides as substrates [62]. In addition, the enzyme glutathione S-transferase (GST), also participates in the detoxification of LPO products in liver [63]. Therefore, it can be argued that lipid peroxides (indirectly estimated by TBARS) have been overproduced in DM, and could be more efficiently eliminated by increasing the levels of GSH-Px and GSH-Rd, or even by GST activity, whose levels are high in the liver [63]. The low levels of NPSH (which include GSH) in the liver of DYOG rats suggested increased oxidation rates of this metabolite, probably due to the increased GSH-Px activity. However, it can be noted that this compensatory mechanism was not able to avoid the oxidative stress in liver, in view of the increased levels of PCO as well as the fall in the activities of SOD and CAT. Finally, DYOG rats also had increases in the activities of GSH-Px and GSH-Rd in kidneys (Figures 4C and D, respectively). However, unlike the liver, the TBARS levels in kidneys were increased (Figure 8C), suggesting that in the kidneys the production of lipid peroxides is higher than that of liver, as well as the low activity of GST in kidneys in relation to the liver [63]. Thus, even

occurring an increased activity of the glutathione redox system in kidneys of diabetic rats, LPO continues to prevail in this organ. However, it is still important to mention that all treatments performed in this study induced similar responses in the activities of GSH-Px and GSH-Rd in liver (Figure 3C and D, respectively) and kidneys (Figure 4C and D, respectively) to those of insulin, and that diabetic-treated animals had changes in the glutathione system that were identical to the profile of normal animals.

5. Conclusion

Therapeutic strategies able to promote an effective glycemic control and also to decrease the glycoxidative stress are extremely helpful to attenuate the biochemical and pathophysiological changes observed in DM, as well as to protect against its long-term complications. The treatments of diabetic rats with curcumin and aminoguanidine into yoghurt, individually or in combination, promoted several benefits in biomarkers of metabolic disturbances and glycoxidative stress analyzed in plasma, liver, and kidneys. According to our findings, the best treatment was the combination between curcumin and 50 mg/kg aminoguanidine. The advances achieved in this present study highlight the *in vivo* mechanisms by which these compounds elicit cytoprotective machinery to counteract the harmful impacts of glycoxidative stress during diabetes, with emphasis on the antioxidant defenses and components of AGE detoxification. The beneficial effects of the combined therapy of curcumin + 50 mg/kg aminoguanidine reinforce the promising potential of an antiglycation agent in diabetic therapy, especially the type 1 DM but even to type 2 DM, as well as the importance in prospecting natural and/or synthetic compounds with such properties.

Data Availability

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Grant Number 311126/2018-9), São Paulo Research Foundation (FAPESP) and Scientific Support and Development Program of School of Pharmaceutical Sciences (UNESP) (PADC/FCFAR/UNESP) for the financial support.

References

- [1] International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium: 2019. Available at: <http://www.diabetesatlas.org>.
- [2] American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. **Diabetes Care**, vol. 37, supl. 1, pp. S81-90, 2014.
- [3] MOLDOGAZIEVA, N. T.; MOKHOSOEV, I. M.; MEL'NIKOVA, T. I.; POROZOV, Y. B.; TEREENTIEV, A. A. Oxidative stress and advanced lipoxidation and glycation end products (ALEs and AGEs) in aging and age-related diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2019, pp. 1-14, 2019.
- [4] OTT, C.; JACOBS, K.; HAUCKE, E.; SANTOS, A. N.; GRUNE, T.; SIMM, A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biology**, vol. 2, pp. 411-429, 2014.
- [5] YAMAGISHI, S.; NAKAMURA, N.; MATSUI, T. Glycation and cardiovascular disease in diabetes: A perspective on the concept of metabolic memory. **Journal of Diabetes**, vol. 9, pp. 141-148, 2017.
- [6] PASUPULATI, A. K.; CHITRA P. S.; REDDY, G. B. Advanced glycation end products mediated cellular and molecular events in the pathology of diabetic nephropathy. **Biomolecular Concepts**, pp. 1-17, 2016.
- [7] PINKAS, A.; ASCHNER, M. Advanced glycation end-products and their receptors: Related pathologies, recent therapeutic strategies, and a potential model for future neurodegeneration studies. **Chemical Research in Toxicology**, vol. 29, no. 5, pp. 707-714, 2016.
- [8] RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J. Glyoxalase 1 modulation in obesity and diabetes. **Antioxidants & Redox Signaling**, vol. 30, no. 3, pp. 354-374, 2019.
- [9] XUE, M.; RABBANI, N.; MOMIJI, H.; IMBASI, P.; ANWAR, M. M.; KITTERINGHAM, N.; PARK, B. K.; SOUMA, T.; MORIGUCHI, T.; YAMAMOTO, M.; THORNALLEY, P. J. Transcriptional control of glyoxalase 1 by Nrf2 provides a stress-responsive defence against dicarbonyl glycation. **Biochemical Journal**, vol. 443, no. 1, pp. 213-222, 2012.

- [10] RIVERA-MANCÍA, S.; TRUJILLO, J.; CHAVERRI, J. P. Utility of curcumin for the treatment of diabetes mellitus: Evidence from preclinical and clinical studies. **Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism**, vol. 14, pp. 29-41, 2018.
- [11] ASSIS, R. P.; ARCARO, C.A.; GUTIERRES, V.O.; OLIVEIRA, J. O.; COSTA, P. I.; BAVIERA, A. M.; BRUNETTI, I. L. Combined effects of curcumin and lycopene or bixin in yoghurt on inhibition of LDL oxidation and increases in HDL and paraoxonase levels in streptozotocin-diabetic rats. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 18, no. 4, pp. 332, 2017.
- [12] GUTIERRES, V. O.; ASSIS, R. P.; ARCARO, C. A.; OLIVEIRA, J. O.; LIMA, T. F. O.; BERETTA, A. L. R. Z.; COSTA, P. I.; BAVIERA, A. M.; BRUNETTI, I. L. Curcumin improves the effect of a reduced insulin dose on glycemic control and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. **Phytotherapy Research**, vol. 33, no. 4, pp. 976-988, 2019.
- [13] THORNALLEY, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 419, no. 1, pp. 31-40, 2003.
- [14] LIU, H.; WANG, C.; QI, X; ZOU, J.; SUN, Z. Antiglycation and antioxidant activities of mogroside extract from *Siraitia grosvenorii* (Swingle) fruits. **Journal of Food Science and Technology**, vol. 55, no. 5, pp. 1880-1888, 2018.
- [15] LUO, D.; FAN, Y.; XU, X. The effects of aminoguanidine on retinopathy in STZ-induced diabetic rats. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 22, pp. 4386-4390, 2012.
- [16] LV, G.; QIU, Z.; YE, H.; MA, C.; CHANG, S.; LIN, Z. The protective effect and MoA of *Panax notoginseng* saponins combined with aminoguanidine on kidney in diabetic nephropathy rats. **Records of Natural Products**, vol. 12, no. 6, pp. 602, 2018.
- [17] KOHN, H. I.; LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **Journal Pharmacology Experiment Therapeutics**, vol. 82, pp. 292-300, 1944.
- [18] LEVINE, R.L.; WILLIAMS, J.A.; STADTMAN, E.R.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, vol. 233, pp. 346-357, 1994.
- [19] ZILIN, S.; NAIFENG, L.; BICHENG, L.; JIPING, W. The determination of AGE-peptides by flow injection assay, a practical marker of diabetic nephropathy. **Clinica Chimica Acta**, vol. 313, pp. 69-75, 2001.
- [20] POKUPEC, R.; KALAUZ, M.; TURK, N.; TURK, Z. Advanced glycation endproducts in human diabetic and non-diabetic cataractous lenses. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, vol. 241, pp. 378-384, 2003.

- [21] MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. O. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, vol. 5, no. 1, pp. 62-71, 2001.
- [22] SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, vol. 25, pp. 192-205, 1968.
- [23] LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 193, pp. 265-275, 1951.
- [24] BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, vol. 44, pp. 276-87, 1971.
- [25] BEERS, R. F. J. R.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 195, pp. 133-40, 1952.
- [26] RUSH, J. W. E; SANDIFORD, S. D. Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. **Clinical Biochemistry**, vol. 36, no. 5, pp. 345-351, 2003.
- [27] CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. In: *Methods in enzymology*. **Academic Press**, vol. 113, pp. 484-490, 1985.
- [28] WELSH, K. J.; KIRKMAN, M. S.; SACKS, D. B. Role of glycated proteins in the diagnosis and management of diabetes: research gaps and future directions. **Diabetes Care**, vol. 39, pp. 1458-1462, 2016.
- [29] DONG, P. T.; LIN, H.; HUANG, K. C.; CHEN, J. X. Label-free quantitation of glycated hemoglobin in single red blood cells by transient absorption microscopy and phasor analysis. **Science Advances**, vol. 5, no. 5, pp. eaav0561, 2019.
- [30] PAUTZ, A.; ART, J.; HAHN, S.; NOWAG, S.; VOSS, C.; KLEINERT, H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Nitric Oxide**, vol. 23, no. 2, pp. 75-93, 2010.
- [31] GUTIERRES, V. O.; PINHEIRO, C. M.; ASSIS, R. P.; VENDRAMINI, R. C.; PEPATO, M. T.; BRUNETTI, I. L. Curcumin-supplemented yoghurt improves physiological and biochemical markers of experimental diabetes. **The British Journal of Nutrition**, vol. 108, pp. 440-448, 2012.
- [32] COSTA, M. C.; LIMA, T. F. O.; ARCARO, C. A.; INACIO, M. D.; BATISTA-DUHARTE, A.; CARLOS, I. Z.; SPOLIDORIO, L. C.; ASSIS, R. P.; BRUNETTI, I. L.; BAVIERA, A. M. Trigonelline and curcumin alone, but not in combination, counteract oxidative stress and inflammation and increase glycation product detoxification in the liver and kidney of mice with high-fat diet-induced obesity. **Journal of Nutritional Biochemistry**, vol. 76, pp. 108303, 2020.

- [33] ZAHERI, Z.; FAHREMAND, F.; REZVANI, M. E.; KARIMOLLAH, A.; MORADI, A. Curcumin exerts beneficial role on insulin resistance through modulation of SOCS3 and Rac-1 pathways in type 2 diabetic rats. **Journal of Functional Foods**, vol. 60, 2019.
- [34] BEST, L.; ELLIOTT, A. C.; BROWN, P. D. Curcumin induces electrical activity in rat pancreatic beta-cells by activating the volume-regulated anion channel. **Biochemical Pharmacology**, vol. 73, no. 11, pp. 1768-1775, 2007.
- [35] ROUSE, M.; YOUNES, A.; EGAN, J. M. Resveratrol and curcumin enhance pancreatic b-cell function by inhibiting phosphodiesterase activity. **Journal of Endocrinology**, vol. 223, pp. 107-117, 2014.
- [36] GUTIERRES, V. O.; CAMPOS, M. L.; ARCARO, C. A.; ASSIS, R. P.; BALDAN-CIMATTI, H. M.; PECCININI, R. G.; PAULA-GOMES, S.; KETTELHUT, I. C.; BAVIERA, A. M.; BRUNETTI, I. L. Curcumin pharmacokinetic and pharmacodynamic evidences in streptozotocin-diabetic rats support the antidiabetic activity to be via metabolite(s). **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, vol. 2015, 2015.
- [37] LLANO, S.; GÓMEZ, S.; LONDOÑO, J.; RESTREPO, A. Antioxidant activity of curcuminoids. **Physical Chemistry Chemical Physics**, vol. 21, no. 7, pp. 3752-3760, 2019.
- [38] HU, T. Y. Trapping of methylglyoxal by curcumin in cell-free systems and in human umbilical vein endothelial cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 60, pp. 8190-8196, 2012.
- [39] ALIZADEH, M.; KHEIROURI, S. Curcumin against advanced glycation end products (AGEs) and AGEs-induced detrimental agentes. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 59, no. 7, pp. 1169-1177, 2017.
- [40] SANTOS, J. C. F.; VALENTIM, I. B.; ARAÚJO, O. R. P.; ATAIDE, T. R.; GOULART, M. O. F. Development of nonalcoholic hepatopathy: contributions of oxidative stress and advanced glycation end products. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 14, no. 10, pp. 19846-19866, 2013.
- [41] KOYE, D. N.; SHAW, J. E.; REID, C. M.; ATKINS, R. C.; REUTENS, A. T.; MAGLIANO, D. J. Incidence of chronic kidney disease among people with diabetes: a systematic review of observational studies. **Diabetic Medicine**, vol. 34, no. 7, pp. 887-901, 2017.
- [42] FORBES, J. M.; COUGHLAN, M. T.; COOPER, M. E. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. **Diabetes**, vol. 57, pp. 1446-1454, 2008.
- [43] KAUL, K.; APOSTOLOPOULOU, M.; RODEN, M. Insulin resistance in type 1 diabetes mellitus. **Metabolism Clinical and Experimental**, vol. 64, pp. 1629-1639, 2015.

- [44] SHAMSALDEENA, Y. A.; MACKENZIE, L. S.; LIONE, L. A.; BENHAM, C. D. Methylglyoxal, a metabolite increased in diabetes is associated with insulin resistance, vascular dysfunction and neuropathies. **Current Drug Metabolism**, vol. 17, pp. 359-367, 2016.
- [45] GUGLIUCCI, A. Fructose surges damage hepatic adenosyl-monophosphate-dependent kinase and lead to increased lipogenesis and hepatic insulin resistance. **Medical Hypotheses**, vol. 93, pp. 87-92, 2016.
- [46] ORMAN, D.; VARDI, N.; ATES, B.; TASLIDERE, E.; ELBEC, H. Aminoguanidine mitigates apoptosis, testicular seminiferous tubules damage, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Tissue and Cell**, vol. 47, pp. 284-290, 2015.
- [47] YAMAGISHI, S.; NAKAMURA, K.; MATSUI, T.; UEDA, S.; FUKAMI, K.; OKUDA, S. Agents that block advanced glycation end product (AGE)-RAGE (receptor for AGEs)-oxidative stress system: a novel therapeutic strategy for diabetic vascular complications. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, vol. 17, no. 7, 2008.
- [48] WILKINSON-BERKA, J. L.; KELLY, D. J.; KOERNER, S. M.; JAWORSKI, K.; DAVIS, B.; THALLAS, V.; COOPER, M. E. ALT-946 and aminoguanidine, inhibitors of advanced glycation, improve severe nephropathy in the diabetic transgenic (mREN-2) 27 rat. **Diabetes**, vol. 51, no. 11, pp. 3283-3289, 2002.
- [49] FOOTE, E. F.; LOOK, Z. M.; GILES, P.; KEANE, W. F.; HALSTENSON, C. E. The pharmacokinetics of aminoguanidine in end-stage renal disease patients on hemodialysis. **American Journal of Kidney Diseases**, vol. 25, no. 3, pp. 420-425, 1995.
- [50] FREEDMAN, B. I.; WUERTH, J. P.; CARTWRIGHT, K.; BAIN, R. P.; DIPPE, S.; HERSHON, K.; MOORADIAN, A. D.; SPINOWITZ, B. S. Design and baseline characteristics for the aminoguanidine clinical trial in overt type 2 diabetic nephropathy (action II). **Controlled Clinical Trials**, vol. 20, pp. 493-510, 1999.
- [51] ARCARO, C. A.; GUTIERRES, V. O.; ASSIS, R. P.; MOREIRA, T. F.; COSTA, P. I.; BAVIERA, A. M.; BRUNETTI, I. L. Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic rats. **PloS One**, vol. 9, pp. e113993, 2014.
- [52] JHA, J. C.; BANAL, C.; CHOW, B. S. M.; COOPER, M. E.; JANDELEIT-DAHM, K. Diabetes and kidney disease: Role of oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, vol. 25, no. 12, 2016.
- [53] DU, Y.; SMITH, M. A.; MILLER, C. M.; KERN, T. S. Diabetes-induced nitrative stress in the retina, and correction by aminoguanidine. **Journal of Neurochemistry**, vol. 80, pp. 771- 779, 2002.

- [54] SONG, Y.; ZHANG, F.; YING, C.; KUMAR, K. A.; ZHOU, X. Inhibition of NF- κ B activity by aminoguanidine alleviates neuroinflammation induced by hyperglycemia. **Metabolic Brain Disease**, vol. 32, pp. 1627-1937, 2017.
- [55] SOSKIC, S. S.; DOBUTOVI, B. D.; SUDAR, E. M.; OBRADOVI, M. M.; NIKOLI, D. M.; DJORDJEVIC, J. D.; RADAK, D. J.; MIKHAILIDIS, D. P.; ISENOVI, E. R. Regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and its potential role in insulin resistance, diabetes and heart failure. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**, vol. 5, pp. 153-163, 2011.
- [56] FARIA, A.; PERSAUD, S. J. Cardiac oxidative stress in diabetes: Mechanisms and therapeutic potential. **Pharmacology & Therapeutics**, vol. 172, pp. 50-62, 2017.
- [57] GAO, L.; HU, Y.; LI, J. Pigment epithelium-derived factor protects human glomerular mesangial cells from diabetes via NOXO1-iNOS suppression. **Molecular Medicine Reports**, vol. 16, no. 5, pp. 7855-7863, 2017.
- [58] MACKNESS, B.; DURRINGTON, P. N.; MACKNESS, M. I. The paraoxonase gene family and coronary heart disease. **Current Opinion in Lipidology**, pp. 357-362, 2002.
- [59] CHISTIAKOV, D. A.; MELNICHENKO, A. A.; OREKHOV, A. N.; BOBRY SHEV, Y. V. Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. **Biochimie**, vol. 132, pp. 19-27, 2017.
- [60] MASTORIKOU, M.; MACKNESS, B.; LIU, Y.; MACKNESS, M. Glycation of paraoxonase-1 inhibits its activity and impairs the ability of high-density lipoprotein to metabolize membrane lipid hydroperoxides. **Diabetic Medicine**, vol. 25, pp. 1049-1055, 2008.
- [61] YU, W.; LIU, X.; FENG, L.; YANG, H.; YU, W.; FENG, T.; WANG, S.; WANG, J.; LIU, N. Glycation of paraoxonase 1 by high glucose instigates endoplasmic reticulum stress to induce endothelial dysfunction in vivo. **Scientific Reports**, vol. 7, pp. 45827, 2017.
- [62] JAGDALE, A. D.; BAVKAR, L. N.; MORE, T. A.; JOGLEKAR, M. M.; ARVINDEKAR, A. U. Strong inhibition of the polyol pathway diverts glucose flux to protein glycation leading to rapid establishment of secondary complications in diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and its Complications**, vol. 30, no. 3, pp. 398-405, 2016.
- [63] KAUSHIK, S.; KAUR, J. Chronic cold exposure affects the antioxidant defense system in various rat tissues. **Clinica Chimica Acta**, vol. 333, pp. 69-77, 2003.