



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DENIELE BEZERRA LÓS

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM METFORMINA SOBRE O NERVO
PERIFÉRICO EXPOSTO À HIPERGLICEMIA EM ANIMAIS INDUZIDOS À
DIABETES TIPO 1**

Recife

2018

DENIELE BEZERRA LÓS

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM METFORMINA SOBRE O NERVO
PERIFÉRICO EXPOSTO À HIPERGLICEMIA EM ANIMAIS INDUZIDOS À
DIABETES TIPO 1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Sílvia Regina Arruda de Moraes.

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Christina Alves Peixoto.

Recife

2018

Catálogo na fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Lós, Deniele Bezerra

Avaliação do tratamento com metformina sobre o nervo periférico exposto à hiperglicemia em animais induzidos à diabetes tipo 1 / Deniele Bezerra Lós – 2018

83 f. : il.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sílvia Regina Arruda de Moraes.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Christina Alves Peixoto.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biotecnologia. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Glândulas endócrinas – Doenças. 2. Diabetes. 3. Nervos periféricos. I. Moraes, Sílvia Regina Arruda de (orientadora). II. Peixoto, Christina Alves (coorientadora) III. Título.

616.462

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 – 146

DENIELE BEZERRA LÓS

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM METFORMINA SOBRE O NERVO
PERIFÉRICO EXPOSTO À HIPERGLICEMIA EM ANIMAIS INDUZIDOS À
DIABETES TIPO 1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em: 26/07/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Sílvia Regina Arruda de Moraes (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Amanda Karolina Soares e Silva (Examinadora Externa)
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz

Prof^a. Dr^a. Maria Das Graças Wanderley De Sales Coriolano (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho, com muito carinho, àqueles que são os pilares da minha vida: meus pais, Décio Lós e Maria das Graças e meus avós Lídia Lós (*in memoriam*), Amaro do Nascimento (*in memoriam*), Cristina Bezerra (*in memoriam*) e José Rosendo. E ao meu amor, companheiro e amigo Rodrigo Tenório.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua presença sempre constante em minha vida, nunca me desamparando nos momentos de dificuldades, medo ou ansiedade, concedendo-me coragem e discernimento, além de colocar verdadeiros “anjos da guarda” a quem eu chamo de amigos.

Aos meus pais, Décio Lós do Nascimento e Maria das Graças Bezerra Lós, por todo o incentivo, amor, dedicação, paciência, apoio, torcida e por me ensinarem a lutar, a respeitar meus mestres e trabalhar com honestidade e dedicação.

Aos meus avós, José Rosendo Bezerra, Maria Cristina de Oliveira Bezerra (*in memoriam*), Amaro Antônio do Nascimento (*in memoriam*) e Lídia Lós do Nascimento (*in memoriam*), que me concederam a honra de conviver e aprender com cada um deles o valor da vida e do trabalho.

Ao meu namorado, Rodrigo Oliveira Tenório, por ser um companheiro e meu grande amigo, incentivando na realização dos meus sonhos, vibrando com minhas conquistas, apoiando nos momentos difíceis, e dando sempre um toque especial de felicidade na minha vida.

Aos meus amigos que, apesar da vida corrida e cheia de compromisso, nunca deixaram de ser meus “anjos da guarda” e se fazer presente nos momentos mais importantes, mesmo que em pensamento ou oração, em especial a Diego Dantas, Catarina Rattes, Renata Janaína, Karyne Albino, Leandro Andrade, Larissa Paz, Alan Lucena e Alex Lucena. Em especial, ao meu amigo Ivson Silva, que foi e continua sendo um companheiro na ciência, compartilhando conhecimentos e sempre me incentivando alcançar objetivos mais altos e à Alice Valença e Simone Fraga, duas mulheres incríveis que, além de toda a parceria durante minha trajetória docente no Centro Acadêmico de Vitória (UFPE), me presentearam com valiosos ensinamentos profissionais e pessoais e nas quais me espelho como docente.

Aos amigos que o Laboratório de Plasticidade Neuromuscular (LAPLAN) me apresentou Kamilla Dinah, Ana Cristina, Cybelle Nery e Camila Rorigues. Em especial a Rodrigo Fragoso, por ser um grande amigo ao longo da minha jornada científica e aos meus parceiros Elvis Rodrigues e Wenddy Sougey que foram meus alunos de iniciação científica, sempre incansáveis e muitas vezes trabalhando em mais de um laboratório para conseguir me ajudar.

Aos meus amigos do Laboratório de Ultraestrutura, em especial a Shyrlene Rocha, Wilma Oliveira, Eduardo Silva, Maria Eduarda, Michel, Gabriel Rodrigues e Laise Santos pelos ensinamentos, sugestões, incentivos, troca de conhecimentos e pelos agradáveis momentos vividos dentro e fora do laboratório.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Sílvia Regina Arruda de Moraes, por todos os ensinamentos científicos, profissionais e pessoais, além da sua compreensão e conselho nos momentos mais difíceis.

À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Christina Alves Peixoto, pela sua grande contribuição científica ao meu estudo, acreditando no meu trabalho e me ajudando nos momentos mais críticos, sempre com muita compreensão e empatia.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia do Centro de Tecnologias e Estratégicas do Nordeste (CETENE), e em especial a Anne Gabrielle, por compartilhar comigo seu conhecimento, pelo companheirismo e pela sua amizade que vou sempre levar comigo.

A satisfação reside no esforço, não no resultado obtido. O esforço total é a plena vitória (Mahatma Gandhi).

RESUMO

A polineuropatia diabética distal é a complicação crônica mais comum do diabetes *mellitus*, repercutindo na qualidade de vida dos pacientes. A metformina é um fármaco amplamente utilizado para o tratamento de diabetes tipo 2 para controle glicêmico. No entanto, estudos demonstram que a metformina possui um potencial terapêutico na dor neuropática em modelos de lesão mecânica ou química do nervo periférico. O objetivo deste estudo foi avaliar se a administração de metformina logo após confirmação do diabetes e sem administração de insulina exógena, previne danos ao tecido nervoso periférico exposto à hiperglicemia crônica em animais induzidos ao diabetes *mellitus* tipo 1. Camundongos *Swiss* foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: animais não diabéticos (Controle); animais diabéticos (STZ), animais diabéticos tratados com 100 mg/kg/dia de metformina (STZ+M100) e animais diabéticos tratados com 200 mg/kg/dia de metformina (STZ+M200). O diabetes foi induzido via injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ, 90 mg/kg/dia), em dois dias consecutivos, e confirmado por glicemia de jejum no 4º dia após a indução. Neste mesmo dia, o tratamento com metformina foi iniciado, via gavagem, e durou 9 semanas. As doses em estudo foram fracionadas em duas administrações diárias, com intervalo de 7 horas entre elas. Os nervos isquiáticos do grupo STZ apresentaram alteração em todos os parâmetros morfométricos analisados. As duas doses de metformina foram eficazes em prevenir a atrofia axonal e em reduzir a expressão de mediadores pro-inflamatórios (interleucina-1 β , enzima oxido nítrico sintase induzível e oxido nítrico tecidual e sérico). No entanto, o tratamento com 200 mg de metformina foi benéfico por aumentar a expressão de marcadores anti-inflamatórios (interleucina-10 e inibidor kappa B-alfa), angiogênico (fator de crescimento endotelial vascular) e proteínas neuronais (fator de crescimento neural e proteína básica da mielina). Assim, a metformina, especialmente na dose de 200 mg, gerou efeito anti-inflamatório e neuroprotetor no nervo periférico exposto à hiperglicemia crônica, reduzindo as alterações deletérias que predispõem à instalação da polineuropatia diabética distal.

Palavras-chave: Nervo isquiático. Neuropatias diabéticas. Estreptozotocina. Sistema nervoso periférico. Histomorfometria.

ABSTRACT

Distal diabetic polyneuropathy is the most common chronic complication of diabetes mellitus, affecting the quality of life of patients. Metformin is a widely used drug for glycemic control of type 2 diabetes. However, studies have shown that metformin has a therapeutic potential in neuropathic pain in models of mechanical or chemical injury of the peripheral nerve. The aim of this study was to evaluate whether the administration of metformin, shortly after confirmation of diabetes and without administration of exogenous insulin, prevents damage to peripheral nervous tissue exposed to chronic hyperglycemia in animals induced by type 1 diabetes mellitus. Swiss mice were randomly assigned to 4 groups experimental: non-diabetic animals (Control); diabetic animals (STZ), diabetic animals treated with metformin 100 mg/kg/day (STZ + M100) and diabetic animals treated with metformin 200 mg/kg/day (STZ + M200). Diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 90 mg/kg/day) on two consecutive days, and confirmed by fasting glycemia on the 4th day after induction. On the same day, treatment with metformin was started via gavage and lasted for 9 weeks. The study doses were fractionated in two daily administrations, with a 7-hour interval between them. The sciatic nerves of the STZ group presented alterations in all the morphometric parameters analyzed. The two doses of metformin were effective in preventing axonal atrophy and in reducing the expression of proinflammatory mediators (interleukin-1 β , inducible nitric oxide synthase enzyme and tissue and nitric nitric oxide). However, treatment with 200 mg of metformin was beneficial in increasing the expression of anti-inflammatory markers (interleukin-10 and kappa B-alpha inhibitor), angiogenic (vascular endothelial growth factor) and neural proteins (neural growth factor and protein myelin). Thus, metformin, especially in the dose of 200 mg, generated an anti-inflammatory and neuroprotective effect in the peripheral nerve exposed to chronic hyperglycemia, reducing the deleterious alterations that predispose to the installation of diabetic distal polyneuropathy.

Keywords: Sciatic nerve. Diabetic neuropathies. Streptozocin. Peripheral Nervous System. Histomorphometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

- Figura 1 – Morfologia do nervo periférico..... 17
Figura 2 – Ativação da via Poliol na hiperglicemia..... 20

Metodologia

- Figura 3 – Cronograma temporal do experimento..... 25

Artigo 1

- Figura 1 – Monitoramento semanal dos níveis glicêmicos nos grupos experimentais..... 46
Figura 2 – Efeito da metformina no peso corporal dos animais no início e no final do experimento..... 46
Figura 3 – Efeito da metformina na histologia do tecido nervoso periférico..... 47
Figura 4 – Análise histomorfométrica do nervo isquiático de camundongos diabéticos..... 48
Figura 5 – Efeitos da metformina na expressão do NGF em nervo isquiático.... 49
Figura 6 – *Western blot* para NGF, VEGF e MBP..... 50
Figura 7 – Efeitos da metformina na expressão da proteína básica da mielina de nervo isquiático..... 51

Artigo 2

- Figura 1 – Monitoramento semanal dos níveis de glicose sanguínea..... 67
Figura 2 – Efeitos da metformina na expressão do TNF α no nervo isquiático... 68
Figura 3 – Efeitos da metformina na expressão do IL-1 β no nervo isquiático..... 69
Figura 4 – Efeitos da metformina na expressão do iNOS no nervo..... 70
Figura 5 – Análise da metformina nos níveis sérico e tecidual do nitrito em camundongos diabéticos..... 71
Figura 6 – Efeitos da metformina na expressão do I κ B α no nervo isquiático..... 72
Figura 7 – Efeitos da metformina na expressão do IL-10 no nervo isquiático de animais diabéticos..... 73

LISTA DE SIGLAS

AGEs	Advanced Glycation End-products (produtos finais da glicação avançada)
AMPK	5' Adenosine Monophosphato-activated Protein Kinase (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato)
AMPKK	Adenosine Monophosphato-activated Protein Kinase Kinase (quinase proteína quinase ativada por adenosina monofosfato)
AR	Aldose Reductase (aldose redutase)
BSA	Bovine Serum Albumin (soroalbumina bovina)
CETENE	Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste
DAB	3,3'-diaminobenzidine (3,3'-diaminobenzidina)
DAG	Diacylglycerol (diacilglicerol)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid (ácido etilenodiaminotetracético)
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase (óxido nítrico sintase endotelial)
GLUT4	Glucose Transporter type 4 (transportador de glicose tipo 4)
GSH	Glutathione (glutationa)
HRP	Horseradish peroxidase-conjugated (peroxidase conjugada)
IgG	Immunoglobulin G (imunoglobulina G)
I κ -B α	I kappa B alpha (I kappa B alfa)
IL-1 β	Interleukin-1 β (interleucina 1 β)
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase (óxido nítrico sintase induzível)
LAPLAN	Laboratório de Plasticidade Neuromuscular
MBP	Myelin Basic Protein (proteína básica da mielina)
NAD ⁺	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (nicotinamida adenina dinucleotídeo)
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato)
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B (fator nuclear kappa B)
NGF	Nerve Growth Factor (fator de crescimento neural)
NO	Nitric Oxide (óxido nítrico)
OMS	Organização Mundial de Saúde
pAMPK	phosphorylated AMPK (AMPK fosforilada)

PBS	Phosphate Buffered Saline (salina tamponada de fosfato)
PKC	Protein Kinase C (proteína quinase C)
PNDD	polineuropatia diabética distal
ROS	Reactive Oxygen Species (espécies reativas de oxigênio)
SDH	Sorbitol Dehydrogenase (sorbitol desidrogenase)
STZ	Streptozotocin (estreptozotocina)
STZ+M100	Grupo diabético (estreptozotocina) e tratado com 100 mg/Kg/dia de metformina
STZ+M200	Grupo diabético (estreptozotocina) e tratado com 200 mg/Kg/dia de metformina
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha (fator de necrose tumoral alfa)
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor A (Fator A de Crescimento do Endotélio Vascular)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	HIPÓTESE	15
1.2	OBJETIVOS	15
1.2.1	Objetivo Geral	15
1.2.2	Objetivos Específicos	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
1.1	MORFOLOGIA DO NERVO PERIFÉRICO.....	16
1.2	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO DIABETES.....	18
1.3	FISIOPATOLOGIA DA POLINEUROPATIA DIABÉTICA.....	19
1.4	UTILIZAÇÃO CONVENCIONAL DA METFORMINA E NOVA POSSIBILIDADE DE SEGUNDO USO DESTE MEDICAMENTO	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	TIPO DE ESTUDO	24
3.2	TERMOS ÉTICOS.....	24
3.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS	24
3.4	COLETA DO FRAGMENTO NERVOSO E PROCESSAMENTO PARA ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	25
3.5	PROCESSAMENTO E ANÁLISE DA IMUNOHISTOQUÍMICA	26
3.6	DOSAGEM INDIRETA DO OXIDO NÍTRICO	27
3.7	WESTERN BLOT	27
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4	RESULTADOS	29
4.1	ARTIGO ORIGINAL 1.....	29
4.2	ARTIGO ORIGINAL 2.....	52
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
	REFERÊNCIAS	75
	ANEXO – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	83

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é uma doença metabólica caracterizada por altas concentrações de glicose no sangue, seja devido à deficiência na produção de insulina decorrente da destruição das células β do pâncreas (diabetes tipo 1) ou devido à resistência à insulina por seus receptores (diabetes tipo 2) (HARATI, 2007).

Esta patologia continua sendo foco de investigação em diversos centros de pesquisa no mundo devido ao número de pessoas acometidas e a grande demanda financeira para o tratamento desta doença e suas complicações (FARMER; LI; DOBROWSKY, 2012; ZYCHOWSKA *et al.*, 2013). A neuropatia periférica, que é uma complicação comum do diabetes crônico, está presente em mais da metade dos pacientes com diabetes tipo 1 ou 2 (ARAIZA-SALDAÑA *et al.*, 2010), a neuropatia diabética pode apresentar sintomatologia de dormência, perda de sensibilidade, podendo evoluir com dor neuropática, frequentemente relatada como um formigamento, queimação ou sensação de choque elétrico (SCHREIBER, 2015).

A metformina é um dos fármaco hipoglicemiante mais usadas no tratamento do diabetes mellitus tipo 2 (ANDÚJAR-PLATAA; PI-SUNYERB; LAFERRÈRE, 2012), sendo indutora da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) (CHENG *et al.*, 2015), uma enzima que se torna ativa quando os níveis energéticos celulares estão baixos, desempenhando um papel central na regulação da homeostase energética e no estresse metabólico.

Para os pacientes com diabetes tipo 1, que apresentam déficit na produção de insulina pelas células beta pancreáticas, a ação hipoglicemiante da metformina apenas seria possível com a administração conjunta de insulina exógena. Contudo, além dos efeitos sobre o metabolismo glicolítico, o AMPK também gera efeitos moduladores sobre o estresse celular durante a inflamação (CHENG *et al.*, 2015; HATTORI *et al.*, 2006). Ao ser ativado, o AMPK inibe o fator nuclear kappa B (NF κ B), que possui papel fundamental nas reações inflamatórias, reduzindo os níveis de expressão dos seus alvos, como o TNF- α , e dessa forma, diminui a adesão monocitária às células endoteliais, além de aumentar a atividade do óxido nítrico sintase, que protege as células endoteliais contra estresses metabólicos e inflamatórios (CHENG *et al.*, 2015; HATTORI *et al.*, 2006; NEGI; SHARMA, 2015), resultando na prevenção e/ou redução da vasoconstrição no complexo de vasa

nervorum em organismo hiperglicêmico, evitando danos às fibras nervosas por isquemia (CHUNG; CHUNG, 2005).

Entretanto, embora o fármaco apresente o potencial anti-inflamatório, não existem estudos investigando o uso desse medicamento de forma precoce no diabetes e antes da instalação da neuropatia periférica diabética como forma de prevenir os danos ao tecido nervoso e suas complicações.

1.1 HIPÓTESE

A metformina, ativando vias de sinalização anti-inflamatórias, estimula a produção de fatores neurotróficos e inibe a expressão excessiva de mediadores pro-inflamatórios no tecido nervoso periférico, quando administrada imediatamente após a confirmação do diabetes *mellitus* tipo 1.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar se o tratamento com metformina iniciado imediatamente após confirmação de hiperglicemia, previne danos ao tecido nervoso periférico em animais induzidos ao diabetes tipo 1.

1.2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a integridade do tecido nervoso através da mensuração dos diâmetros de fibras nervosas e de axônios, da espessura da bainha de mielina e do número de fibras mielínicas.
- Analisar o efeito da metformina sobre a *vasa nervorum* por meio da expressão do fator de crescimento endotelial vascular.
- Verificar o nível de expressão dos marcadores inflamatórios IL-1 β , TNF- α , iNOS e o óxido nítrico tecidual e sérico.
- Quantificar a expressão das proteínas neurotróficas NGF e MBP produzidas pelas células de Schwann e/ou expressas nos axônios.
- Analisar a expressão dos mediadores anti-inflamatórios I κ B α e IL-10.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O diabetes *mellitus* é uma doença crônica, metabólica e caracterizada por altas concentrações de glicose no sangue, seja por deficiência na produção da insulina, conseguinte à destruição de células β das ilhotas pancreáticas (diabetes tipo 1) ou devido à resistência à ação insulínica em seus receptores (diabetes tipo 2) (HARATI, 2007).

A permanência do estado hiperglicêmico pode gerar lesões irreversíveis a vários tipos celulares, podendo desencadear diferentes comorbidades, tais como, nefropatia, doença cardiovascular, retinopatia e polineuropatia distal (AGRAWAL; KANT, 2014; IDF, 2017).

Diversos estudos estão sendo realizados, objetivando entender melhor a fisiopatologia do diabetes para proporcionar possibilidades terapêuticas mais efetivas, visto que o número de indivíduos com esta patologia vem crescendo anualmente, gerando custos bilionários no tratamento do diabetes e das suas complicações (FARMER; LI; DOBROWSKY, 2012; ZYCHOWSKA *et. al.*, 2013; IDF, 2017).

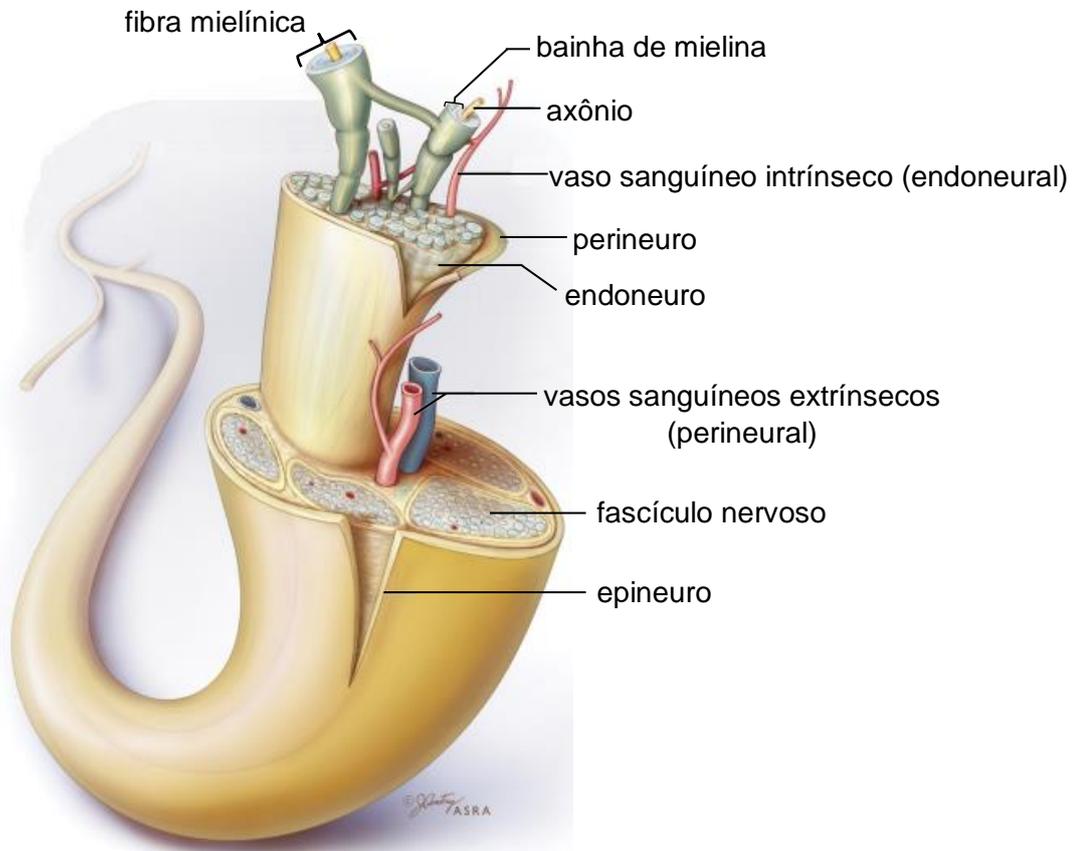
2.1 MORFOLOGIA DO NERVO PERIFÉRICO

O nervo periférico é constituído por prolongamentos axonais de neurônios, envoltos por bainha de mielina produzida pelas células de Schwann e circundados por um componente de matriz extracelular altamente rico em colágeno, nutridos por uma complexa rede de pequenos vasos sanguíneos anastomosados (CARRIEL *et. al.*, 2011). O nervo possui um arcabouço estrutural constituído de tecido conjuntivo, que confere proteção e certa elasticidade ao tecido nervoso, sendo dividido em três camadas: epineuro, perineuro e endoneuro (Figura 1) (MIZISIN; WEERASURIYA, 2011).

O epineuro é uma espessa camada de tecido conjuntivo denso mais externo do nervo periférico e, normalmente, interioriza-se no nervo de forma a dividir os fascículos em unidades distintas (BOVE, 2008; YEGIYANTS *et. al.*, 2010). Este revestimento conjuntivo confere continuidade estrutural ao nervo, devido à orientação longitudinal das fibrilas de colágeno que a constitui (YAO *et. al.*, 2010). Além disso, o epineuro também abriga uma repleta rede vascular anastomótica, *vasa nervorum*, que cursa internamente, através das camadas de células perineurais, para originar os

microvasos endoneurais na camada mais interna do nervo (MIZISIN; WEERASURIYA, 2011).

Figura 1 – Morfologia do nervo periférico.



Fonte: Imagem adaptada de NEAL *et al.*, 2009.

O perineuro, por sua vez, corresponde a uma densa camada de tecido conjuntivo, interposta por fibras colágenas e ocasionais fibras elásticas, que envolve concentricamente os fascículos nervosos, conferindo ao nervo certa resistência à tensão (BOVE, 2008; MIZISIN; WEERASURIYA, 2011; BROSSIER; CARROLL, 2012). Por fim, o endoneuro é a camada de revestimento situada, internamente, nos fascículos, circundando as fibras nervosas, na qual abriga células residentes: colágeno, fibroblastos, mastócitos, macrófagos teciduais e uma rede microvascular endoneural (BROSSIER; CARROLL, 2012). As células do perineuro associadas ao endotélio que compõe os microvasos do endoneuro constituem a chamada “barreira sangue-nervo” ou “interface sangue-nervo”, que atua na manutenção e regulação da homeostase endoneural (BOVE, 2008; RUITER *et al.*, 2009).

Por fim, a unidade funcional do nervo é a fibra nervosa. Situada nos fascículos nervosos e protegida pelo endoneuro, cada fibra nervosa é constituída por um prolongamento axonal que se apresenta, em menor ou maior grau, envolvido por camadas concêntricas de bainha de mielina, produzidas pelas células de Schwann ao longo da extensão axonal, envolvendo concentricamente uma única fibra nervosa (YEGIYANTS *et. al.*, 2010).

Biópsias de nervo sural de pacientes com PNDD demonstram alterações na morfologia do nervo, tais como: atrofia axonal, desmielinização fibras nervosas, axônios em fase de degeneração e regeneração, além de alterações morfológica nas redes microvasculares (BIESSELS *et al.*, 2014). Assim, altos níveis glicêmicos comprometem vários tipos de fibras nervosas, iniciando pelas fibras nervosas finas amielínicas do tipo C, evoluindo para as fibras pouco mielinizadas tipo A δ , até atingir também as fibras grossas mielínicas do tipos A α e A β , gerando um quadro sintomatológico de dor e hiperalgesia, que configura a polineuropatia diabética distal dolorosa (PEDROSA, 2014).

2.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO DIABETES

A quantidade de indivíduos com diabetes *mellitus* continua crescendo progressivamente. Em 2015, cerca de 415 milhões de pessoas em todo o mundo foram diagnosticadas com esta doença (GONÇALVES *et. al.*, 2017) e, em 2017, essa prevalência aumentou para 424,9 milhões, não cessando de crescer, pelo menos até 2045 onde, segundo a previsão da Federação Internacional de Diabetes, o diabetes acometerá cerca de 628,6 milhões de pessoas (IDF, 2017). No Brasil, a prevalência do diabetes é igualmente alarmante. Enquanto que, no mundo, 9 em cada 100 indivíduos com idade entre 20 e 79 anos possuem diabetes, no Brasil a proporção é de 8 diabético para cada 100 indivíduos adultos (WHO, 2016; IDF, 2017).

Em consonância com o perfil epidemiológico, os gastos no ano de 2017 com cuidados em saúde nos setores público e privado, já atingem a cifra de US\$ 727 bilhões, através de ações preventivas ao diabetes, assistência médica e farmacológica para o controle da patologia, bem como para o tratamento das frequentes complicações decorrentes da hiperglicemia crônica, conforme assistência preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (IDF, 2017).

Contudo, apesar desta intensa mobilização de recursos financeiros e de assistência médica, as taxas de mortalidade associadas a complicações do diabetes ou de comorbidades são ainda muito preocupantes, chegando a atingir a estimativa global de 4 milhões de óbitos, todos os anos (IDF, 2017). A polineuropatia diabética distal (PNDD) pode afetar qualquer nervo do sistema nervoso periférico sendo, contudo, frequentemente negligenciada em seu tratamento e, principalmente, no que diz respeito à sua prevenção e diagnóstico precoce (ZYCHOWSKA *et. al.*, 2013; GONÇALVES *et. al.*, 2017).

Apesar do desenvolvimento de várias medidas de políticas públicas em saúde no Brasil, visando prover mais assistência primária à população e, mesmo com os constantes alertas advindos dos resultados dos diversos estudos científicos, da OMS e da própria Sociedade Brasileira de Diabetes sobre a importância de diagnosticar precocemente complicações como o pé diabético, alguns recursos diagnósticos muitas vezes não estão disponíveis para a população diabética brasileira. Conforme dados disponíveis no site da OMS, os serviços de assistência primária no Brasil carecem de instrumentos de diagnósticos, que vão de um simples diapasão, utilizado para detectar distúrbios sensoriais, ao ultrassom Doppler, útil para determinar o estado vascular dos membros inferiores de pacientes diabéticos (WHO, 2016).

Dessa forma, contribui para retardar o diagnóstico da polineuropatia que muitas vezes só é obtido quando esses pacientes já apresentam um quadro clínico conhecido como pé diabético, complicação caracterizada por infecções, ulcerações e até necrose dos membros inferiores, decorrentes de distúrbios neurológicos e vasculares secundários à hiperglicemia crônica, que podem culminar com amputações não traumáticas dos segmentos acometidos (SKOPLJAK *et. al.*, 2014; WHO, 2016). Assim, a PNDD precisa ser considerada com mais atenção, tendo em vista que mais da metade dos pacientes com diabetes do tipo 1 ou do tipo 2 são acometidos por essa comorbidade, tornando-se oneroso e grave problema de saúde mundial (ARAIZA-SALDAÑA *et. al.*, 2010; IDF, 2017a).

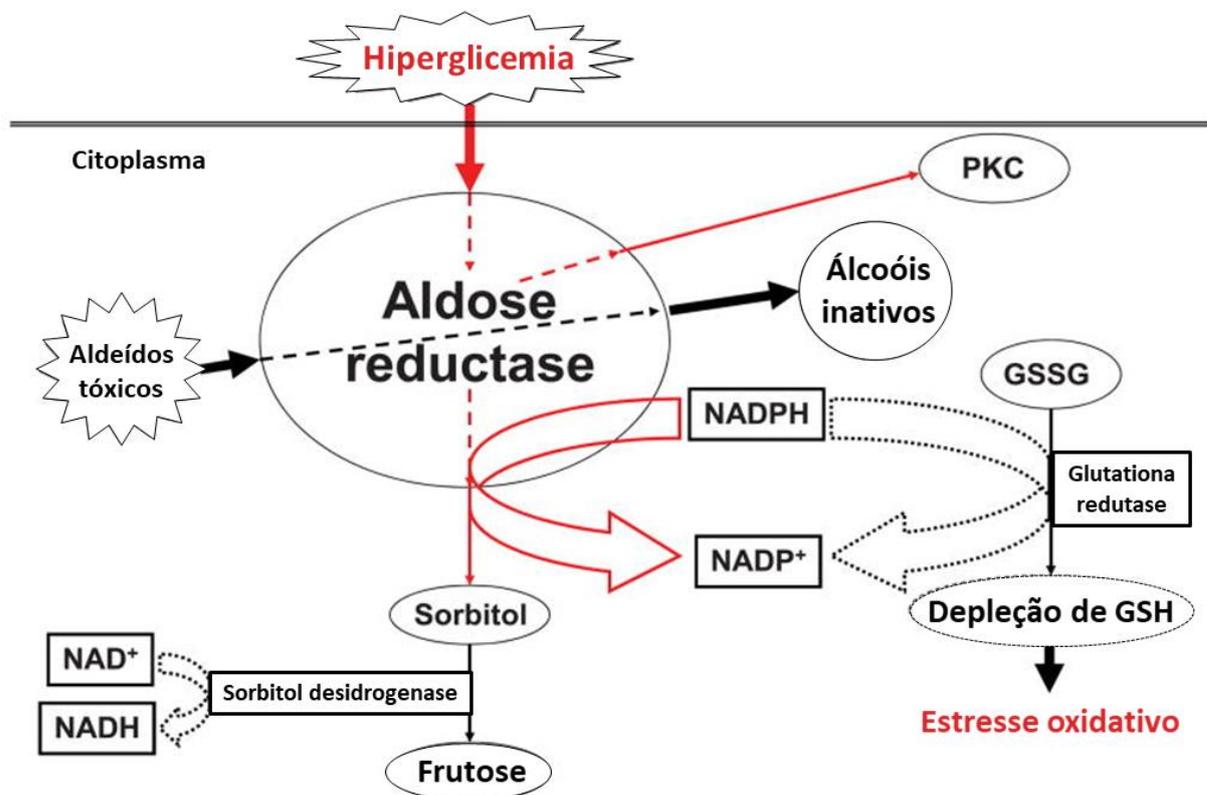
2.3 FISIOPATOLOGIA DA POLINEUROPATIA DIABÉTICA

De acordo com a OMS, a polineuropatia é caracterizada pela destruição de tecido especializado do sistema nervoso periférico e que, associado com as alterações vasculares que frequentemente acompanham o diabetes, aumenta a

chance de gerar infecções e ulcerações nos membros inferiores, com risco de amputação (WHO, 2017). A PNDD pode causar sintomatologia variada como dormência, dor neuropática, perda de sensibilidade, formigamento, queimação ou sensação de choque elétrico (SCHREIBER, 2015), comprometendo a qualidade de vida dos pacientes, pois além dos distúrbios sensoriais, a PNDD pode estar relacionada à depressão e maior risco de quedas (PEDROSA, 2014).

A patogênese da PNDD está relacionada com a incapacidade de armazenamento de glicose pelo tecido nervoso periférico. Assim, no estado hiperglicêmico, os níveis de glicose intracelular elevam-se e saturam a principal via glicolítica dos neurônios, sendo o excesso de glicose clivado pela enzima aldose redutase através da via polioliol, conforme esquematizado na Figura 2 (CHUNG; CHUNG, 2005; ZYCHOWSKA *et. al.*, 2013; HYPERGLYCEMIA; INDEX; DISEASES, 2014).

Figura 2 – Ativação da via Polioliol na hiperglicemia. Proteína quinase C (PKC), glutaciona dissulfeto (GSSG), glutaciona (GSH), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada (NADP⁺); nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada (NAD⁺); nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH).



Fonte: adaptada de CHIU; TAYLOR, 2011.

A via poliol, quando ativada e na presença do cofator nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), converte a glicose em sorbitol (CHUNG; CHUNG, 2005; SCHREIBER, 2015; ZYCHOWSKA *et al.*, 2013), que se acumula no citoplasma devido à sua baixa permeabilidade à membrana plasmática (TOMLINSON; GARDINER, 2008; DAM *et. al.*, 2013). O sorbitol citoplasmático é então reduzido à frutose, pela ação da enzima sorbitol desidrogenase (SDH) na presença da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) (CHUNG; CHUNG, 2005; RAMASAMY; GOLDBERG, 2010). Altos níveis intracelulares de glicose e frutose geram ligações irreversíveis com proteínas, formando os chamados produtos da glicação avançada (AGEs, do inglês, *advanced glycation end products*), que causam alteração funcional ao nervo periférico quando as proteínas glicadas são formadas em seus axônios (HARATI, 2007).

Assim, a manutenção do estado hiperglicêmico torna a célula nervosa vulnerável ao dano celular por toxicidade (TOMLINSON; GARDINER, 2008), promovendo um estresse oxidativo devido ao desequilíbrio gerado pelo aumento de radicais livres, as espécies reativas de oxigênio (ROS) (VINCENT; BROWNLEE; RUSSELL, 2002), e a menor disponibilidade de agentes antioxidantes (MELLO; QUINCOZES-SANTOS; FUNCHAL, 2012). Esse processo, quando crônico, resulta em degeneração de pequenas fibras sensoriais, como as fibras amielínicas nociceptivas do tipo C, com possível prognóstico de desnervação epidermal, onde o paciente passa a apresentar hipoalgesia, tornando-o mais susceptível à lesão tecidual por baixa percepção aos estímulos nocivos (FARMER; LI; DOBROWSKY, 2012; PREMKUMAR; PABBIDI, 2013). Além da perturbação direta às células do parênquima nervoso, é importante considerar também na fisiopatologia da lesão nervosa, as disfunções microvasculares na *vasa nervorum* decorrente do diabetes. *Vasa nervorum* constitui uma intrínseca rede vascular interconectada responsável pela nutrição do nervo periférico (EMANUELI *et. al.*, 2003).

No diabetes, ocorre um aumento da síntese de diacilglicerol (DAG) em células endoteliais, que leva à ativação indevida da proteína quinase C (PKC) (WILLIAMSON *et. al.*, 1993; CHUNG; CHUNG, 2005). Uma vez ativa, a PKC gera alterações como o aumento da permeabilidade vascular e da espessura da membrana basal, além de redução do fluxo sanguíneo na *vasa nervorum* devido ao aumento na contratilidade do músculo liso vascular (vasoconstrição), comprometendo a nutrição axonal e, conseqüentemente, repercutindo na condução do impulso nervoso (CHUNG; CHUNG, 2005; SCHAAN, 2003). Essas alterações vasculares podem estar presentes já mesmo

em estágios iniciais da doença e, apesar da possibilidade de tratamento medicamentoso para controle dos níveis glicêmicos, os pacientes diabéticos estão continuamente suscetíveis a desenvolverem polineuropatia (DAM *et. al.*, 2013).

2.4 UTILIZAÇÃO CONVENCIONAL DA METFORMINA E NOVA POSSIBILIDADE DE SEGUNDO USO DESTE MEDICAMENTO

Derivada da guanidina, um composto ativo da *Galega officinalis*, a metformina é uma das drogas mais antigas e que continua sendo utilizada na atualidade para o tratamento do diabetes *mellitus* tipo 2 (JÚNIOR *et. al.*, 2008; ANDÚJAR-PLATAA; PI-SUNYERB; LAFERRÈRE, 2012), devido à estimulação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) (CHENG *et al.*, 2015).

Fisiologicamente, AMPK é uma enzima que é ativada quando os níveis energéticos celulares estão baixos, atuando como um sensor energético intracelular, o que representa um papel central na regulação da homeostasia energética (SANTOMAURO JÚNIOR *et. al.*, 2008). Em situações de hipóxia, a menor disponibilidade de glicose e exposição a toxinas, geram uma perturbação na equilibrada relação ATP-ADP da célula. Assim, com a depleção energética, os níveis intracelulares de AMP encontram-se aumentados, ligando-se ao AMPK para intensificar o catabolismo e reduzir o anabolismo celular (KIM *et. al.*, 2016). A ativação de AMPK se dá através da fosforilação do resíduo treonina 172, que se encontra no sítio de ativação da subunidade α , na presença de quinases reguladoras, as AMPK quinases (AMPKK). Com isso, AMPK promove fosforilação das enzimas citoplasmáticas que atuam na translocação do transportador de glicose GLUT4 (do inglês, Glucose Transporter 4), além de aumentar a sensibilidade à insulina (PEIXOTO *et. al.*, 2017).

Além dos efeitos sobre o metabolismo glicolítico, o AMPK também gera efeitos moduladores sobre o estresse celular durante a inflamação (HATTORI *et. al.*, 2006; CHENG *et. al.*, 2015). Ao ser ativado, o AMPK inibe o fator nuclear kappa B (NF- κ B), que possui papel fundamental nas reações inflamatórias, resultando em menor transcrição de alvos da via do NF- κ B, dentre eles o TNF- α , e por conseguinte reduz a adesão monocitária às células endoteliais (CHENG *et. al.*, 2015; HATTORI *et. al.*, 2006; NEGI; SHARMA, 2015). Além disso, a forma ativa do AMPK estimula a atividade do óxido nítrico sintase endotelial que protege as células endoteliais contra estresses

metabólicos e inflamatórios, resultando na prevenção e/ou redução da vasoconstrição do complexo de *vasa nervorum*, em organismo exposto à hiperglicemia, reduzindo os danos às fibras nervosas, secundários à isquemia tecidual causada pelo diabetes (CHUNG; CHUNG, 2005).

Sabe-se que a via de sinalização da AMPK encontra-se reduzida em neurônios sensoriais de animais induzidos ao diabetes tipo 1 e que esta redução pode estar relacionada com disfunção na cadeia respiratória mitocondrial, contribuindo para o desenvolvimento da polineuropatia diabética distal (ROY CHOWDHURY *et. al.*, 2012; WANG, S. *et. al.*, 2018). Em estudo experimental, ratos induzidos ao diabetes tipo 1 desenvolveram polineuropatia com sintomatologia de hiperalgesia e alodinia após 3 semanas. A partir daí, foi iniciado o tratamento com metformina, nas doses de 200 mg/kg e 500 mg/kg, durante 7 dias consecutivos, resultando em atenuação da hiperalgesia mecânica e térmica (MA *et. al.*, 2015). O potencial benéfico do tratamento com a metformina para lesões no nervo periférico foi identificado previamente em outros dois estudos, através da redução da sintomatologia de dor neuropática (MELEMEDJIAN *et. al.*, 2011) e como fator neuroprotetor para inflamação em nervo periférico secundária à administração de quimioterápicos (MAO-YING *et. al.*, 2014).

Entretanto, embora o fármaco apresente o potencial anti-inflamatório, não existem estudos investigando o uso desse medicamento, de forma precoce no diabetes, atuando na prevenção de danos estruturais e metabólicos ao nervo periférico, frequentemente observada na patologia da polineuropatia diabética distal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo experimental de caráter quantitativo.

3.2 TERMOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado na Comissão de Ética para o uso de animais do Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM), (protocolo nº 81/2015) (ANEXO).

3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 40 camundongos *Swiss Webster*, com 12 semanas de vida, mantidos à temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e com acesso a ração e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais:

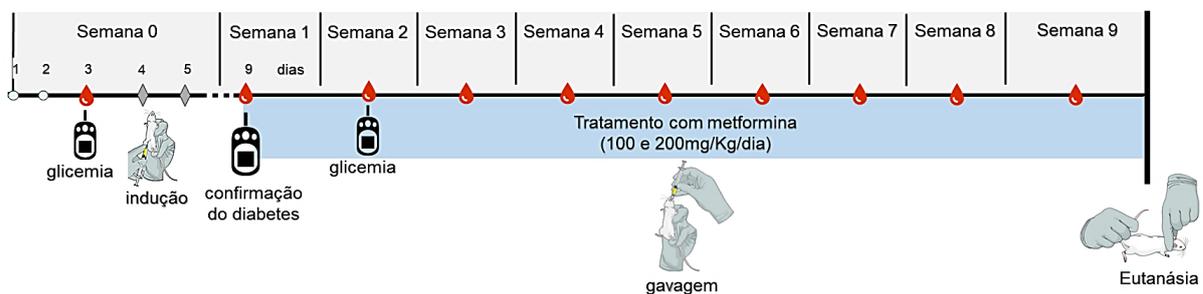
- Grupo Controle (Controle, n=10): composto por animais sadios.
- Grupo Diabético (STZ, n=10): animais induzidos ao diabetes tipo I por administração da droga estreptozotocina por via intraperitoneal.
- Grupo diabético tratado com metformina na dose de 100 mg/kg (STZ+M100, n=10): animais induzidos ao diabetes tipo I e tratados com metformina via gavagem.
- Grupo diabético tratado com metformina na dose de 200 mg/kg (STZ+M200, n=10): animais induzidos ao diabetes tipo I e tratados com metformina via gavagem.

A estreptozotocina foi administrada na dose de 90 mg/Kg em dois dias consecutivos após jejum de 12 horas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016). No quarto dia, após indução ao diabetes (Figura 3), foi realizada análise glicêmica do sangue retirado da cauda de cada animal utilizando um glicosímetro digital (J&J's Lifescan One Touch Ultra *glucometer*). Foram considerados diabéticos os camundongos com glicose sanguínea superior a 270 mg/dl (JOLIVALT *et al.*, 2016).

Confirmado o diabetes, os animais foram tratados com cloridrato de metformina, em dose fracionada e administrada em dois momentos intervalados por

sete horas, para obter maior constância dos níveis plasmáticos de metformina, totalizando as doses de 100 ou 200 mg/kg/dia, para os respectivos grupos STZ+M100 e STZ+M200. O tratamento com metformina foi realizado ao longo de nove semanas nos grupos citados, enquanto que os grupos Controle e STZ receberam água para injeção via gavagem, simulando o estresse gerado pela administração das doses. A avaliação glicêmica foi realizada semanalmente, conforme estabelecido previamente no cronograma do experimento (Figura 3).

Figura 3 – Cronograma temporal do experimento.



Fonte: Própria do autor (2018).

3.4 COLETA DO FRAGMENTO NERVOSO E PROCESSAMENTO PARA ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Concluída as nove semanas do experimento, os animais foram anestesiados com solução de xilazina (20 mg/Kg), cetamina (50 mg/Kg) e tramal (50 mg/kg), via intraperitoneal na quantidade de 0,1ml desta solução por animal.

Sob completa sedação, foram rebatidas a pele da região do tórax e as seis costelas inferiores para exposição do coração do animal. O átrio direito foi seccionado para dar vazão ao sangue, enquanto que no ventrículo esquerdo foi injetado lentamente 15mL de solução salina, seguindo a perfusão com mais 30 ml de solução de Karnowsky (glutaldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e 0,1M tampão cacodilato de sódio, pH = 7,4) para fixação dos tecidos.

Ao término da perfusão, foi realizada uma incisão na região da pata posterior direita de cada animal e rebatimento da musculatura e exposição do nervo isquiático, onde um fragmento desse tecido foi coletado e mantido no mesmo fixador em que foi perfundido inicialmente. Para o processamento das amostras, os fragmentos foram pós-fixado em tetróxido de ósmio 1%, seguido de desidratado em concentrações

crescentes de acetona em água destilada (50% até 100%), e de resina Epoxi em acetona (1:3 até a resina pura), sendo emblocado e mantido na estufa por 48h.

Foram obtidos cortes histológicos semifinos de 0,5 μ m de espessura, utilizando navalha de vidro. O material foi corado com azul de toluidina para marcação da bainha de mielina e seguiu para análise histomorfométrica. As imagens de todos os campos histológicos do nervo foram capturadas utilizando um microscópio óptico (Olympus – BX50, com aumento de 50x e de 1000x) conectado a uma vídeo-câmera e a um computador.

A contagem de todas as fibras mielínicas e dos vasos endoneurais visualizados em todo o diâmetro do nervo foi realizada através do programa *Mesurim Pro 08*. Para análise do diâmetro axonal, diâmetro da fibra mielínica e, conseqüentemente, espessura da bainha de mielina e razão G (BETINI, 2010), foram analisadas previamente 100 fibras de cada nervo, para em seguida ser realizado um cálculo amostral por intervalo de confiança para obter o número representativo da população de fibras mielínicas, admitindo o erro amostral de 1% e o nível de confiança de 95%.

As fotos dos campos histológicos foram selecionadas aleatoriamente através de tabela randômica confeccionada no *software* Excel 2010 e as fibras foram mensuradas no programa *ImageJ*.

3.5 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DA IMUNOHISTOQUÍMICA

Os animais foram perfundidos com 15mL de solução salina, seguido de perfusão com 30ml de paraformaldeído (4%) tamponado (tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4), para que os fragmentos de nervo fossem coletados conforme descrito na seção anterior. Os fragmentos de nervo isquiático foram imediatamente coletados e pós-fixado na mesma solução fixadora por duas horas. Os fragmentos foram desidratados em soluções crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 100%), clareadas em xilol e incluídos em parafina líquida (60°C). Por fim, os nervos foram emblocado individualmente, com parafina específica para este fim (56° - 58°C), de modo que a extremidade do nervo foi direcionada para a área de corte.

Foram realizados cortes transversais de 4 μ m de espessura dos fragmentos nervosos. Em seguida, o material foi desparafinado com banhos de xilol, hidratados em soluções de concentrações decrescentes de álcool em água destilada (100%, 95%, 80% e 70%) e aquecido em panela de vapor, submerso em tampão citrato 0,01M

(pH 6,0), para realizar a recuperação antigênica. Os cortes foram ainda submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (3%) e álcool metílico, seguido do bloqueio dos sítios inespecíficos (BSA 1% + Tween 20 em PBS) antes de serem incubados overnight com anticorpo primário (anti-NGF, anti-IL-1 β , anti-iNOS, anti-TNF- α e anti-VEGF).

No segundo dia do processamento, os cortes foram incubados por 60 minutos, com o anticorpo secundário IgG conjugado com biotina. A reação imunohistoquímica foi amplificada usando o Kit Dako LSAB+System-HRP e revelada com 3'-3'-diaminobenzidina (DAB).

3.6 DOSAGEM INDIRETA DO OXIDO NÍTRICO

Foi realizada punção sanguínea intracardíaca e a retirada do fragmento de nervo isquiático na ausência de fixador e congelando imediatamente em nitrogênio líquido. Na sequência, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. O óxido nítrico foi mensurado utilizando a reação de Griess (1% de sulfanilamida e N-1-naftil-etilenodiamina diluídos em 2,5% de H₃PO₄), através da detecção de nitrito. Amostras em duplicata foram adicionados a uma placa de ELISA, na proporção volumétrica de 1:1 para a amostra e o Reagente de Griess, acrescido de uma curva padrão (solução de nitrito de sódio na concentração inicial de 100 μ M e diluída em série em PBS). Através da leitura no espectrofotômetro a 490 nm, a absorbância, das diferentes amostras, foi comparada com a curva padrão e os resultados foram obtidos.

3.7 WESTERN BLOT

Os fragmentos de nervo isquiático de todos os grupos foram coletados e colocados em um eppendorf, na ausência de solução fixadora, e instantaneamente congelado em nitrogênio líquido (temperatura de -160°C). O material foi armazenado em freezer à temperatura de -80°C.

Para o processamento, quatro fragmentos de nervo de animais diferentes do mesmo grupo foram colocados juntos em um tubo contendo coquetel de extração (10mM de EDTA, 2mM de fluoreto de sulfonil fenilmetano, 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de ortovanadato de sódio, 100mM de trisma

base – pH 7.4 e 0,1 mg de aprotinina/ml). Foi utilizado um macerador manual para liberar as proteínas intracelulares, a partir do rompimento tecidual e lise celular.

A solução obtida foi centrifugada e extraído o sobrenadante (*pool*), sendo repetindo todo o processo para cada grupo experimental.

As proteínas foram separadas pelo peso molecular através da técnica de eletroforese, sendo aplicada 30µg de proteínas totais para cada grupo experimental, em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio, nas concentrações de 12% (para os marcadores para VEGF e β -actina) e 14% (marcadores para NGF e MBP).

Concluída a separação por eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (BioRad, CA, USA), que foram colocadas em solução de leite desnatado (5%) em solução basal por 1 hora para bloqueio dos sítios inespecíficos. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: anti-NGF (Santa Cruz Biotechnology, cod.: sc-548, diluição: 1:1000), anti-MBP (Abcam, cod.: ab7349, diluição: 1:1000), anti-VEGF (Abcam, cod.: ab1316, diluição: 1:1000) e anti-IL-10 (Abcam, cod.: ab33471); e o anticorpo secundário IgG conjugado com peroxidase anti-*mouse* (Sigma-Aldrich, cod.: A0168, diluição 1:80.000) ou anti-*rabbit* (Sigma-Aldrich, cod.: A9169, diluição 1:80.000), conforme especificações do anticorpo primário.

Para a revelação das bandas de proteínas foi utilizado um reagente quimioluminescente (Fisher Scientific Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, cod.: 34080), um scanner para detectar imagem quimioluminescente (C-DiGit Chemiluminescence Western Blot Scanner; LI-COR bioscience) e um *software* de imagens (Image Studio Software, LI-COR Biosciences, v. 5.0). As imagens obtidas foram quantificadas em pixels utilizando o *software* ImageJ 1.38.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram estruturados em um banco de dados e inicialmente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para escolha do teste estatístico mais adequado. Para os dados das variáveis que seguiram a distribuição normal, foi realizada a Análise de Variância – ANOVA (*one-way*), seguida do teste de Tukey. Às variáveis com distribuição assimétrica foram aplicados o teste de Kruskal-Wallis, seguido do *post hoc* de Dunn. A análise estatística foi realizada pelo *software* GraphPad PRISMA (versão 6). Foi adotado o nível de confiabilidade de 95%.

4 RESULTADOS

De acordo com as normas do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO), os resultados obtidos serão apresentados sob a forma de dois artigos originais.

4.1 ARTIGO ORIGINAL 1

METFORMINA ATUA PREVENTIVAMENTE REDUZINDO AS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E MOLECULARES DO NERVO ISQUIÁTICO EM ANIMAIS INDUZIDOS AO DIABETES TIPO 1

Deniele Bezerra Lós^{1,2,7}, Christina Alves Peixoto², Wilma Helena de Oliveira^{2,3}, Eduardo Duarte-Silva^{2,4}, Elvis da Silva Rodrigues de Freitas^{5,7}, Wenddy Wyllie Damascena Sougey^{5,7}, Anne Gabrielle Vasconcelos de Oliveira⁶, Sílvia Regina Arruda de Moraes⁷

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, Recife, Brasil.

²Laboratório de Ultraestrutura, Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Recife, Brasil.

³Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Centro de Biociência, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Brasil.

⁴Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia da Saúde, Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Recife, Brasil.

⁵Departamento de Fisioterapia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Brasil.

⁶Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE, Recife, Brasil.

⁷Laboratório de Plasticidade Neuromuscular, Departamento de Anatomia, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Brasil.

RESUMO

Introdução: a polineuropatia diabética distal (PNDD) é a complicação mais comum em pacientes diabéticos, acarretando alterações na funcionalidade do nervo. A metformina é um dos principais fármacos utilizados para o controle glicêmico no diabetes em decorrência da ativação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK). A ativação da via do AMPK, por outro lado, tem sido relacionada a uma menor liberação de citocinas inflamatórias e auxilia no processo de regeneração de nervo periférico lesionado. O presente estudo teve como objetivo avaliar se a administração precoce de metformina previne mudanças estruturais desencadeadas pela neuropatia periférica diabética em camundongos *Swiss Webster*.

Métodos: o diabetes foi induzido por injeção de estreptozotocina (90 mg/kg) em dois dias consecutivos. Animais com níveis de glicose no sangue ≥ 270 mg/dl foram considerados diabéticos e receberam cloridrato de metformina (100 mg/kg e 200 mg/kg) por gavagem oral duas vezes por dia durante 9 semanas.

Resultados: Os animais diabéticos apresentaram redução nos parâmetros de diâmetros axonal, diâmetro de fibra, quantidade de fibras mielínicas e espessura da bainha de mielina. Em contrapartida, os animais diabéticos que receberam tratamento com metformina demonstraram menor perda e atrofia axonal além de promover aumento na expressão de proteínas que têm ação trófica (fator de crescimento nervoso), angiogênica (fator de crescimento endotelial vascular) e estrutural para a bainha de mielina (proteína básica da mielina). Apenas para os parâmetros histomorfométricos de diâmetro da fibra mielina e espessura da bainha de mielina, o grupo tratado com a dose de 200 mg/kg de metformina apresentou melhores resultados para estas variáveis em relação ao grupo STZ, contudo, assim como o tratamento com a dose de 100 mg/kg não foi suficiente para estabelecer os valores dessas variáveis para valores encontrados no grupo controle.

Conclusão: O tratamento preventivo com metformina reduziu o comprometimento ao nervo isquiático decorrente do diabetes, além de estimular a produção de substâncias estruturais e angiogênicas.

Palavras-chave: polineuropatia diabética distal, bainha de mielina, proteína quinase ativada por adenosina monofosfato, angiogênese, histomorfometria.

INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica caracterizada por níveis glicêmicos superiores a 126 mg/dl e/ou níveis de glicose plasmática \geq 200 mg/dl duas horas após uma carga de glicose oral de 75g (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). A manutenção do estado hiperglicêmico afeta órgãos, como coração, olhos, rins e nervos devido a complicações microvasculares (HUANG *et al.*, 2017; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

Assim, os distúrbios em nervos periféricos integram a lista de comorbidades mais frequentes em pacientes diabéticos, que decorre da redução do fluxo sanguíneo endoneural e gera alterações estruturais no nervo, com redução da síntese de proteínas constituintes da bainha de mielina (proteína básica de mielina e proteína mielina zero) e hipotrofia axonal associada à menor produção de fatores neurotróficos (HAO *et al.*, 2017).

Tais mudanças estruturais têm repercussões na funcionalidade do nervo, gerando sintomas como dor, alodinia, parestesia ou mesmo anestesia em membros inferiores, reduzindo a qualidade de vida desses pacientes e aumentando o risco de ulcerações e amputações de membros (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017; NGUYEN; SHAW; GRANT, 2012; SINGH; KISHORE; KAUR, 2014)

Em condições fisiológicas, o sistema nervoso periférico é dotado de uma barreira de proteção contra toxinas e metabólitos circulantes que podem prejudicar os neurônios, além de fornecer produtos essenciais a favor da manutenção da homeostase do parênquima nervoso, a barreira do sangue-nervo (WEERASURIYA; MIZISIN, 2011). Esta, consiste em uma interface entre os microvasos endoneurais ou perineurais, onde as células endoteliais, não fenestradas, estão conectadas por junções apertadas (GAUDET; POPOVICH; RAMER, 2011; KANDA, 2013).

O estado hiperglicêmico perturba o microambiente endoneural causando alterações na barreira sangue-nervo, como: perda de junções gaps de células endoteliais, degeneração microvascular de pericitos, além de hipertrofia e hiperplasia da membrana basal dos vasos endoneurais (SHIMIZU *et al.*, 2011), tornando o parênquima nervoso mais propenso à entrada de substâncias tóxicas, além de gerar um quadro de hipóxia tecidual por insuficiência vascular.

Além da barreira sangue-nervo, as células de Schwann desempenham um papel importante no embainhamento axonal e também nas respostas contra danos ao tecido nervoso, devido à sua relação íntima com o axônio (DEY *et al.*, 2013).

Sabe-se que as células de Schwann possuem transportadores de glicose não dependentes de insulina, o GLUT1, proporcionando glicose para a demanda metabólica do neurônio. Assim, o excesso de glicose das células de Schwann pode mover-se diretamente para o axônio (MAGNANI *et al.*, 1998), ativando a via de poliols e reduzindo a disponibilidade de fatores antioxidantes, o que leva a um estado de estresse oxidativo decorrente da hiperglicemia (SCHREIBER, 2015).

A metformina é o principal fármaco utilizado no tratamento do diabetes tipo 2, devido a sua ação celular em promover o aumento da sensibilização dos receptores à insulina, atuando sobre o metabolismo da glicose e dos lipídios e diminuindo os níveis de glicose plasmática através da ativação da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) (ZHOU *et al.*, 2001).

Além disso, estudos *in vivo* demonstraram que a metformina possui um potencial neuroprotetor em modelo de neuropatia periférica induzida por quimioterapia (MAO-YING *et al.*, 2014), além de reduzir a sintomatologia de alodinia neuropática em modelo de lesão mecânica do nervo (MELEMEDJIAN *et al.*, 2011) e por atenuar a hiperalgesia em modelo de neuropatia periférica diabética dolorosa induzida por estreptozotocina (MA *et al.*, 2015).

No entanto, até o momento, nenhum estudo avaliou se a metformina é capaz de prevenir ou retardar os danos no tecido nervoso periférico, secundários à hiperglicemia crônica. Assim, este estudo teve como objetivo verificar o efeito neuroprotetor da metformina contra alterações estruturais no nervo isquiático de camundongos induzidos ao diabetes tipo 1 e sem administração exógena de insulina, a fim de propor mais uma possibilidade terapêutica para o tratamento do diabetes e de suas complicações.

MATERIAL E MÉTODOS

Indução ao diabetes e tratamento com metformina

Foram utilizados 44 camundongos *Swiss Webster* com 12 semanas de vida e peso corporal de 40 ± 4 g, mantidos em biotério com ciclo de 12h/12h de luz e escuridão, na temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e com acesso à ração e água *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (81/2015 - CEUA / FIOCRUZ).

Os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Grupo controle (Control), constituído de animais saudáveis; Grupo diabético (STZ), animais induzidos ao diabetes e que não receberam tratamento com metformina; Grupo diabético e tratado com 100 mg/kg/dia de metformina (STZ+M100); Grupo diabético e tratado com 200 mg/kg/dia de metformina (STZ+M200).

Para indução ao diabetes tipo 1 foi realizado o protocolo descrito por Oliveira *et al.* (2016) que consistiu em injeção intraperitoneal de 90 mg/kg de estreptozotocina (ARIZA *et al.*, 2014) diluída em tampão citrato (pH 4,5), em dois dias consecutivos, estando os animais em um jejum prévio de 12 horas. Aos animais do grupo controle, foi administrada injeção intraperitoneal contendo apenas tampão citrato.

No quarto dia após a indução ao diabetes, amostra de sangue foi coletada da veia caudal de todos os animais para mensurar os níveis de glicose, utilizando um glicômetro digital (One Touch Ultra Lifescan). Animais com glicemia ≥ 270 mg/dl foram incluídos no estudo (JOLIVALT *et al.*, 2016) e a glicemia foi mensurada semanalmente para confirmar a manutenção do estado hiperglicêmico nos animais induzidos ao diabetes e, assim, assegurar que o nervo isquiático estivesse submetido aos efeitos do diabetes. Os animais não receberam insulina para controle da hiperglicemia.

O tratamento foi iniciado no mesmo dia da confirmação do diabetes e consistiu na administração de metformina diluída em água para injeção na dose de 100 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia para os animais dos grupos STZ+M100 e STZ+M200, respectivamente, via gavagem, fracionada em duas doses diárias (OLIVEIRA *et al.*, 2016), durante nove semanas. Aos grupos controle e STZ foi administrada apenas água para injeção nos mesmos horários e forma de administração.

Processamento e análise histológica

Completadas 9 semanas, contadas a partir do início do tratamento, os animais foram profundamente anestesiados e receberam perfusão intracardíaca com solução salina fisiológica e fixada em solução de Karnowsky (2,5% de glutaldeído, 4% de paraformaldeído e tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, pH = 7,4).

Na sequência, foi realizada uma incisão na pele da pata posterior do animal e rebatimento da musculatura para visualização do nervo isquiático, que foi dissecado e removido um fragmento que foi mantido em solução de Karnowsky por 24 horas, seguido de pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio

0,1 M (pH 7,4) por duas horas. Após esse tempo, os fragmentos foram imersos em uranila a 5% durante 24 horas e depois foram desidratados em concentração crescente de acetona diluída em água e emblocado em resina *Epoxy*.

Foram realizados cortes semifinos, transversalmente ao comprimento do nervo, corados com solução de azul de toluidina (1%), para serem realizadas fotomicrografias de todo o diâmetro do nervo, em magnificação de 1000 vezes, para análise histomorfométrica.

Foi utilizado o *software* Mesurim Pro 0.8 para quantificar o número absoluto de fibras mielínicas em cada secção de nervo. Através do programa ImageJ 1.50i foram mensurados os diâmetros axonal e da fibra de pelo menos 200 fibras mielínicas por animal (WANG, L. *et al.*, 2015). A partir destes dados, foi calculada espessura da bainha de mielina (diâmetro da fibra – diâmetro axonal / 2) (IKEDA; OKA, 2012; UGRENOVIĆ *et al.*, 2016).

Processamento para Imunohistoquímica e Imunofluorescência

Seguindo o mesmo protocolo descrito acima, os animais foram perfundidos com solução salina e solução fixadora com paraformaldeído a 4% (Sigma-Aldrich) diluída em fosfato 0,1 M (solução fosfatada de sódio fosfato monobásico e heptahidratado dibásico - Sigma-Aldrich), pH 7,4. Após a coleta, cada fragmento de nervo foi mantido *overnight* na mesma solução fixadora.

As amostras foram desidratadas em concentrações de etanol diluído em água destilada, clareadas em xilol e emblocadas em parafina. Secções transversais de 4 µm de espessura foram realizadas e aderidas a lâminas tratadas com 3-amino-propil-trietoxissilano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os cortes foram reidratados e tratados com tampão citrato 20mM (pH 6,0) a 100°C, durante 30 minutos, para recuperação antigênica.

Em seguida, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena através utilizando solução de 3% de peróxido de hidrogênio H₂O₂ diluído em álcool metílico. Na sequência, os sítios inespecíficos foram bloqueados em solução contendo albumina de soro bovino a 1%, Tween 20 a 0,2% e PBS.

Os cortes foram incubados em anticorpo primário, *overnight*, a 4°C em câmara úmida. Foram utilizados os anticorpos anti-NGF (SC-548; Santa Cruz Biotechnology, 1:100) e anti-MBP (ab7349; Abcam, 1:200).

Após a lavagem, as lâminas marcadas com o anti-NGF foram incubadas com o anticorpo secundário IgG conjugado com biotina, amplificado usando o kit DakoCytomation (Biotinylated Link Universal HRP; K0690; USA) e reveladas com o cromógeno 3'-3-diaminobenzidina (DAB), à temperatura ambiente e sob proteção de luz. As lâminas foram montadas em Entellan (1079610100; Merck, EUA) e foram realizadas cinco fotomicrografias do nervo isquiático de dois animais diferentes por grupo, utilizando a magnificação de 1000 vezes. As imagens foram quantificadas utilizando o software GIMP 2.6.11 (software GNU Image Manipulation Program, Austrália).

As lâminas para a análise da MBP, através da imunofluorescência, foram incubadas com o anticorpo secundário conjugada ao fluoróforo Alexa 488 goat anti-mouse (A11008, Invitrogen, 1:500) e sequência os cortes foram incubados com DAPI (Vector laboratories, USA, 1:500), para marcação nuclear. As lâminas foram montadas com um meio preparado com gelatina e analisado em microscópio de fluorescência (DM2500, Leica Microsystems, Alemanha) acoplado com câmera digital (Leica DFC345 FX) para obtenção das imagens para análise qualitativa.

Western Blot

Para a técnica de western blot, nenhum fixador foi utilizado. Assim, os animais foram profundamente anestesiados para retirada do fragmento de nervo isquiático, que foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido, em seguida, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

Para cada grupo experimental, foram unidos um fragmento de nervo de quatro animais e colocados em um tubo contendo coquetel de extração (10 mM/L de EDTA, 2mmol/L de fenilmetano fluoreto de sulfonilo, fluoreto de sódio 100 mmol/L, pirofosfato de sódio a 10 mmol/L, ortovanadato de sódio a 10 mmol/L, aprotinina a 10 m e 100 mmol/L Tris aminometano - ph7.4), para serem homogeneizados utilizando um macerador manual para a quebra dos tecidos e liberação das proteínas. Em seguida, o material foi centrifugado e extraído apenas o sobrenadante, obtendo-se um pool de amostras para cada grupo.

Em um gel de eletroforese foram aplicados 20µg de proteína total para cada grupo. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de

nitrocelulose (BioRad 162-0115), bloqueadas por 1 hora com solução contendo 5% de leite desnatado diluído em PBS e incubada overnight a 4°C em anticorpo primário.

Neste estudo foram utilizados os anticorpos: anti-MBP (ab62631; Abcam, 1:1000 - gel de 14%), anti-VEGF (ab1316; Abcam, 1:1000 - gel de 12%) e anti-NGF (ab6199; Abcam, 1:1000 - gel de 14%). Para cada anticorpo, a técnica de western blot foi realizada duas vezes, para confirmação do resultado e o marcador β -actina (A2228, Sigma-Aldrich, 1:3000 - gel de 12%) foi utilizado como normalizador.

Para revelação, as membranas foram molhadas com solução de quimioluminescência (Super Signal, 34080) e visualizadas através do C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences, USA) e do software Image Studio Digits (LI-COR Biosciences versão 5.0, USA). O software ImageJ versão 1.50i foi utilizado para quantificação dos pixels.

Análise estatística

Os dados foram analisados no programa Prisma 6.0. Inicialmente, foi utilizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para os dados que apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste ANOVA *one-way* e pós-teste de Tukey. Para as variáveis que não tiveram distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (SD), com nível de confiabilidade de 95%.

RESULTADOS

Níveis de glicose plasmática e peso corporal

O monitoramento da glicemia, realizado semanalmente para todos os grupos experimentais, confirmou a validade do modelo utilizado neste estudo. No início do experimento, todos os animais apresentaram valores glicêmicos inferiores a 150 mg/dl (Figura 1) e, após indução ao diabetes, os animais dos grupos STZ, STZ+M100 e STZ+M200 iniciaram um quadro de hiperglicemia (424 ± 90 mg/dl, 420 ± 102 mg/dl e 484 ± 121 mg/dl, respectivamente), que se manteve durante todo o experimento e diferindo do nível glicêmico do grupo controle (125 ± 17 mg/dl, $p < 0,05$).

Apesar do estado hiperglicêmico verificado em todos os animais diabéticos, apenas o grupo STZ apresentou uma redução significativa no peso corporal ao final do experimento em comparação ao peso inicial do próprio grupo antes da indução ao diabetes (STZ peso inicial: 39 ± 2.8 g; STZ peso final: 32 ± 5.4 g), enquanto que não foi observado diferença significativa no peso dos dois grupos diabéticos e tratados com metformina entre o início e o final do experimento (Figura 2).

Análise histomorfométrica do nervo isquiático

Através da quantificação absoluta das fibras mielínicas, foi possível verificar que o grupo STZ apresentou menor quantidade de fibras mielínicas em relação ao grupo controle (Controle: 3454 ± 208 vs STZ: 2426 ± 472 , $p=0.0422$). O tratamento com metformina preveniu a perda axonal relacionada ao diabetes, para as duas doses utilizadas nos estudo apresentando valores médios de fibras semelhantes ao grupo controle (Controle: 3454 ± 208 vs STZ+M100: 3706 ± 402 , $p=0,8427$ e Controle: 3454 ± 208 vs STZ+M200: 4266 ± 578 , $p=0,0901$) e superiores ao encontrado no grupo STZ (STZ: 2426 ± 472 vs STZ+M100: 3706 ± 402 , $p=0.0118$; STZ: 2426 ± 472 vs STZ+M200: 4266 ± 578 , $p=0.0008$) (Figura 4).

A estrutura dos axônios, avaliada através da mensuração dos diâmetros axonais revelaram a presença de axônios atrofiados nos nervos isquiáticos dos animais diabéticos em comparação aos nervos do grupo controle (Controle: $2,68 \pm 0,97$ μm vs STZ: $2,44 \pm 0,97$ μm , $p<0,0001$), estando preservados nos animais diabéticos que foram tratados com metformina (Controle vs STZ+M100: $2,64 \pm 0,93$ μm , $p>0,9999$; Controle vs STZ+M200: $2,56 \pm 0,89$ μm , $p=0,1886$), principalmente na menor dose em estudo, que demonstrou axônios estatisticamente maiores que os do grupo STZ ($p=0,0001$) (Figura 4).

Para confirmar se a redução observada nos diâmetros axonais do grupo STZ estava associada à expressão de fatores neurotróficos, foi avaliado neste estudo os níveis proteicos de NGF expressos pelas células de Schwann e axônios. Os achados reforçam os resultados descritos acima, onde os níveis basais encontrados no grupo STZ (Figura 5 e 6) parece não ser suficiente para manter o trofismo axonal diante das alterações metabólicas causadas pela hiperglicemia. Por outro lado, a metformina potencializou a expressão de NGF, acima dos níveis fisiológicos, promovendo

melhores condições para a manutenção do trofismo axonal, apesar da exposição tecidual ao excesso de glicose (Figura 5 e 6).

Morfologicamente, o excesso de glicose gerou uma redução da espessura da bainha de mielina nas fibras mielínicas dos animais diabéticos (Controle: $0,84 \pm 0,28$ vs STZ: $0,74 \pm 0,29$ μm , $p < 0,0001$) e que não pôde ser prevenida pelo tratamento com metformina (Controle vs STZ+M100: $0,65 \pm 0,25$ μm , $p < 0,0001$; Controle vs STZ+M200: $0,78 \pm 0,26$ μm , $p = 0,0003$), no entanto, a dose de 200 mg/dl possibilitou que as fibras mielínicas apresentassem a mielina mais preservada em comparação aos animais diabéticos sem tratamento (STZ vs M200, $p = 0,0164$) (Figura 4-D).

Por outro lado, através da análise molecular de um dos componentes da bainha de mielina, foi possível identificar que o tecido nervoso apresentou uma concentração maior da proteína básica da mielina (MBP) nos grupos tratados em relação ao controle, indicando que o mecanismo de reparação da bainha de mielina estava ativo e produzindo de forma ativa componentes constituintes da bainha, mesmo que ainda não fosse possível verificar por análise histomorfométrica da espessura da mielina (Figura 6 e 7).

Para verificar a expressão da proteína responsável pelo estímulo à angiogênese e manutenção da integridade vascular, foi realizado a técnica de western blot para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e foi evidenciado que o tecido nervo nos animais diabéticos apresentou aumento na expressão dessa proteína, em relação ao grupo controle (controle: 24384 ± 579 vs STZ: 31309 ± 2958 , $p = 0,0341$). Porém os animais tratados com metformina apresentaram expressão aumentada deste fator, o que poderia indicar um maior empenho tecidual para aumentar a rede vascular e atender à demanda metabólica em resposta ao estresse causado pela hiperglicemia (Figura 6).

DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado, através da histomorfometria e da expressão de importantes proteínas estrutural, neurotrófica e angiogênica, os efeitos da administração precoce da metformina, nas doses de 100 e 200 mg/kg/dia, no nervo isquiático de camundongos induzidos experimentalmente ao diabetes tipo 1.

Os resultados apresentados apontam que a administração oral da metformina iniciada no mesmo dia da confirmação do quadro hiperglicêmico em animais induzidos ao diabetes e estendida por nove semanas, preservou o nervo periférico de danos estruturais decorrentes da hiperglicemia crônica.

A metformina apesar de ser um fármaco amplamente utilizado para controlar os níveis glicêmicos em indivíduos diabéticos (SMIESZEK *et al.*, 2017) apenas apresenta esse efeito hipoglicemiante quando na ausência de déficits na produção de insulina pelo pâncreas (diabetes tipo 2) ou quando a deficiência desse hormônio, decorrente da destruição de células pancreáticas (diabetes tipo 1), é suprida por terapia insulínica (BEYSEL *et al.*, 2018).

O modelo experimental utilizado neste estudo, promove destruição das células beta das ilhotas pancreáticas, comprometendo a produção e liberação de insulina (LENZEN, 2008; ARIZA *et al.*, 2014). Assim, como não houve administração de insulina e considerando que a hiperglicemia persistiu durante todo o experimento nos animais induzidos ao diabetes, os achados deste estudo foram relacionados apenas com o potencial anti-inflamatório e neuroprotetor da metformina sobre o tecido nervoso periférico.

Estudos apontam evidências acerca do potencial farmacológico da metformina no tratamento da neuropatia periférica (MAO-YING *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2015) porém, como caráter inovador, este estudo teve um enfoque preventivo em relação ao início da patologia neuropática, afim de evitar ou retardar o comprometimento nervoso decorrente da hiperglicemia crônica.

Conforme observado neste estudo, animais induzidos ao diabetes via administração de estreptozotocina apresentam alteração nos parâmetros murinométricos, como a perda do peso corporal (NUKADA *et al.*, 2011; MA *et al.*, 2015). No diabetes tipo 1, com o déficit na produção de insulina, ocorre a depleção da reserva energética, somado ao aumento do catabolismo proteico, gerando uma redução no peso corporal do organismo diabético, conforme foi verificado nos animais do grupo STZ deste estudo (HEBERT; NAIR, 2010).

Em contrapartida, a metformina preveniu a redução de peso nos animais diabéticos (grupos STZ+M100 e STZ+M200), possivelmente decorrente do efeito adipogênico da metformina, verificado em um estudo *in vitro*, através de via de sinalização não mediada pelo AMPK (CHEN, D. *et al.*, 2018).

As alterações estruturais encontradas no nervo isquiático do grupo diabético deste estudo evidenciaram que em 9 semanas de indução, estes animais apresentavam alterações morfométricas, compatíveis com aquelas descritas em outros estudos com nervos periféricos acometidos pela polineuropatia diabética distal (ARIZA *et al.*, 2014; WANG, L. *et al.*, 2015).

Como o nosso objetivo não foi tratar a neuropatia e sim preveni-la, os achados positivos foram acerca dos parâmetros em que o nervo isquiático dos animais diabéticos tratados com metformina apresentou similaridade aos dos animais saudáveis. Assim, foi possível verificar que o tratamento com metformina foi capaz de prevenir atrofia e degeneração axonal identificada no grupo STZ.

Em um estudo prévio foi verificado que o tratamento com 200 mg de metformina foi capaz de reduzir os níveis de malondialdeído e produtos finais da glicação avançada (AGEs), dois importantes marcadores do estresse oxidativo, em nervo isquiático de ratos (MA *et al.*, 2015).

Assim, além de reduzir o acúmulo de substâncias tóxicas à célula, a metformina pode ter ação neuroprotetora através do estímulo à produção e liberação de fatores neurotróficos, conforme os dados verificados nos grupos tratados deste estudo, onde houve aumento expressivo na produção de NGF.

O NGF, assim como outros fatores neurotróficos, possui importância para a sobrevivência neuronal, além de desempenhar papel neuroprotetor e regenerativo no sistema nervoso periférico (QIN *et al.*, 2016). Além disso, foi demonstrado que a metformina é capaz de estimular a liberação de outro fator neurotrófico, o BDNF, por células gliais de nervo olfatório (SMIESZEK *et al.*, 2017).

Outra estrutura que deve ser considerada e que sofre diretamente com os efeitos da hiperglicemia é a bainha de mielina. Na patogênese da neuropatia diabética, as AGEs ligam-se irreversivelmente com componentes da bainha de mielina, alterando a arquitetura de proteínas estruturais da mielina e que, em decorrência disso, passam a ser alvo da ação fagocitária de macrófagos e precisam ser substituídas por novas proteínas (SUGIMOTO; YASUJIMA; YAGIHASHI, 2008).

Dependendo da velocidade e da capacidade de reposição destas proteínas modificadas pelas AGEs, pode haver comprometimento da integridade da camada mielínica, reduzindo a velocidade de condução das fibras nervosas (FAZAN *et al.*, 2010).

Os dados do presente estudo revelaram que as 9 semanas após indução ao diabetes foi suficiente para evidenciar uma redução na espessura da bainha de mielina e que o tratamento com metformina na dose de 200 mg/kg apesar de não evitar, pôde atenuar a intensidade de adelgaçamento da bainha, além de claramente estimular a produção de MBP pelas células de Schwann.

É esperado que o processo de neuropatia no nervo isquiático leve à redução da espessura da bainha de mielina, independentemente do tamanho da fibra mielínica (NOWICKI *et al.*, 2012), inclusive camundongos recém-nascidos e induzidos ao diabetes (ARIZA *et al.*, 2014).

A nível estrutural o grupo diabético tratado com 100 mg de metformina apesar de estruturalmente apresentar uma bainha de mielina mais delgada, demonstrou um conteúdo proteico preservado, indicando um possível esforço por parte das células de Schwann em restaurar a mielina aos seus parâmetros fisiológicos.

Em contrapartida, o grupo diabético mesmo com a espessura de mielina comprometida, sua expressão de MBP foi semelhante a níveis fisiológicos, o que sugere uma incapacidade por parte das células de Schwann em reparar a mielina degradada e que, na permanência desse quadro, pode gerar um processo mais severo de desmielinização.

Considerando as alterações microvasculares comuns no curso da patologia da neuropatia diabética (SHIMIZU *et al.*, 2011), a expressão do fator angiogênico VEGF foi avaliada neste estudo. Os resultados mostram que, apesar das alterações esperadas nas células endoteliais, pericitos e membrana basal dos vasos endoneurais do nervo periférico (KANDA, 2013), foi identificado no grupo STZ uma expressão significativa do VEGF em relação ao grupo controle.

Essa resposta tecidual configura o estado inflamatório que o nervo se encontra, considerando as anormalidades vasculares características do comprometimento que o diabetes gera sob os vasos endoneurais (KANDA, 2013), necessitando aumentar o aporte vascular na tentativa de restaurar a homeostasia no nervo.

Enquanto isso, nos grupos tratados com metformina, este efeito foi potencializado. Assim como foi verificado que a inibição da atividade do AMPK pode comprometer a secreção de VEGF em situações de hipóxia (LEE *et al.*, 2003), nosso estudo revelou que a administração de metformina é capaz de aumentar a expressão do VEGF.

O VEGF é um importante fator que promove a angiogênese através de estímulo à proliferação de células endoteliais e através de um estudo prévio, foi identificado que o AMPK é capaz de modulação indiretamente a expressão do VEGF como mecanismo de resposta à hipóxia tecidual (LEE *et al.*, 2003; FISSLHALER; FLEMING, 2009), decorrente do espessamento da membrana basal dos vasos endoneurais do nervo periférico (SHIMIZU *et al.*, 2011).

Assim, acreditamos que a metformina promoveu o aumento da expressão do VEGF, melhorando o aporte nutricional do nervo isquiático exposto à hiperglicemia, além de prevenir a atrofia e degeneração axonal através do estímulo à produção de substância neurotróficas.

CONCLUSÃO

O tratamento preventivo com metformina reduziu o comprometimento ao nervo isquiático decorrente do diabetes tipo 1, mesmo na ausência de reposição de insulina, além de estimular a produção de substâncias neurotróficas e angiogênicas.

REFERÊNCIAS

- ARIZA, L. *et al.* Experimental diabetes in neonatal mice induces early peripheral sensorimotor neuropathy. *Neuroscience*, v. 274, p. 250–259, 2014.
- BEYSEL, S. *et al.* The effects of metformin in type 1 diabetes mellitus. *BMC Endocrine Disorders*, v. 18, n. 1, p. 1–6, 2018.
- CHEN, D. *et al.* Dual Effects of Metformin on Adipogenic Differentiation of 3T3-L1 Preadipocyte in AMPK-Dependent and Independent Manners. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 6, p. E1547, 2018.
- DEY, I. *et al.* Diabetic Schwann cells suffer from nerve growth factor and neurotrophin-3 underproduction and poor associability with axons. *Glia*, v. 61, n. 12, p. 1990–9, dez. 2013.
- FAZAN, V. P. S. *et al.* Diabetic Peripheral Neuropathies: A Morphometric Overview. *International Journal of Morphology*, v. 28, n. 1, p. 51–64, mar. 2010.
- FISLTHALER, B.; FLEMING, I. Activation and Signaling by the AMP-Activated Protein Kinase in Endothelial Cells. *Circulation Research*, v. 105, n. 2, p. 114–127, 2009.
- GAUDET, A. D.; POPOVICH, P. G.; RAMER, M. S. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *Journal of neuroinflammation*, v. 8, n. 1, p. 110, jan. 2011.
- HAO, G. *et al.* The protective effect of the active components of ERPC on diabetic peripheral neuropathy in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 202, n. October 2016, p. 162–171, 2017.
- HEBERT, S. L.; NAIR, K. S. Protein and energy metabolism in type 1 diabetes. *Clinical Nutrition*, v. 29, n. 1, p. 13–17, 2010.
- HUANG, D. *et al.* Macrovascular Complications in Patients with Diabetes and Prediabetes. *BioMed Research International*, 2017.
- IKEDA, M.; OKA, Y. The relationship between nerve conduction velocity and fiber morphology during peripheral nerve regeneration. *Brain and behavior*, v. 2, n. 4, p. 382–90, jul. 2012.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. *IDF Diabetes Atlas*. 8th. ed. [S.l.]: www.diabetesatlas.org, 2017.
- KANDA, T. Biology of the blood–nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, v. 84, n. 2, p. 208–212, 2013.
- LEE, M. *et al.* AMP-activated Protein Kinase Activity Is Critical for Hypoxia-inducible Factor-1 Transcriptional Activity and Its Target Gene Expression under Hypoxic

Conditions in DU145 Cells*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 41, p. 39653–39661, 2003.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, v. 51, n. 2, p. 216–226, 2008.

MA, J. *et al.* Metformin attenuates hyperalgesia and allodynia in rats with painful diabetic neuropathy induced by streptozotocin. *European Journal of Pharmacology*, v. 764, p. 599–606, 2015.

MAGNANI, P. *et al.* Regulation of glucose transport in cultured Schwann cells. *Journal of the peripheral nervous system: JPNS*, v. 3, n. 1, p. 28–36, 1998.

MAO-YING, Q.-L. *et al.* The Anti-Diabetic Drug Metformin Protects against Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in a Mouse Model. *PLoS ONE*, v. 9, n. 6, p. e100701, 23 jun. 2014.

MELEMEDJIAN, O. K. *et al.* Targeting adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) in preclinical models reveals a potential mechanism for the treatment of neuropathic pain. *Molecular pain*, v. 7, n. 70, p. 1–14, jan. 2011.

NGUYEN, D. V.; SHAW, L. C.; GRANT, M. B. Inflammation in the pathogenesis of microvascular complications in diabetes. *Frontiers in Endocrinology*, v. 3, p. 1–7, 2012.

NOWICKI, M. *et al.* Altered Sciatic Nerve Fiber Morphology and Endoneural Microvessels in Mouse Models Relevant for Obesity, Peripheral Diabetic Polyneuropathy, and the Metabolic Syndrome. *Journal of Neuroscience Research*, v. 90, n. 1, p. 122–131, 2012.

NUKADA, H. *et al.* Increased susceptibility to ischemia and macrophage activation in STZ-diabetic rat nerve. *Brain Research*, v. 1373, p. 172–182, 2011.

OLIVEIRA, W. H. DE *et al.* Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice. *Brain Research*, v. 1644, p. 149–160, 2016.

QIN, J. *et al.* Concentrated growth factor increases Schwann cell proliferation and neurotrophic factor secretion and promotes functional nerve recovery in vivo. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 37, n. 2, p. 493–500, 2016.

SCHREIBER, A. K. Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. *World Journal of Diabetes*, v. 6, n. 3, p. 432, 2015.

SHIMIZU, F. *et al.* Advanced glycation end-products induce basement membrane hypertrophy in endoneurial microvessels and disrupt the blood-nerve barrier by stimulating the release of TGF- β and vascular endothelial growth factor (VEGF) by pericytes. *Diabetologia*, v. 54, n. 6, p. 1517–1526, 2011.

SINGH, R.; KISHORE, L.; KAUR, N. Diabetic peripheral neuropathy: current

perspective and future directions. *Pharmacological Research*, v. 80, p. 21–35, 2014.

SMIESZEK, A. *et al.* Antioxidant and Anti-Senescence Effect of Metformin on Mouse Olfactory Ensheathing Cells (mOECs) May Be Associated with Increased Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels — An Ex Vivo Study. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 4, p. 1–19, 2017.

SUGIMOTO, K.; YASUJIMA, M.; YAGIHASHI, S. Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Current pharmaceutical design*, v. 14, n. 10, p. 953–61, 2008.

UGRENOVIĆ, S. *et al.* Morphometric analysis of the diameter and g-ratio of the myelinated nerve fibers of the human sciatic nerve during the aging process. *Anatomical Science International*, v. 91, n. 3, p. 238–245, 2016.

WANG, L. *et al.* Therapeutic benefit of extended thymosin β 4 treatment is independent of blood glucose level in mice with diabetic peripheral neuropathy. *Journal of Diabetes Research*, v. 2015, p. 1–13, 2015.

WEERASURIYA, A.; MIZISIN, A. P. The Blood-Nerve Barrier: Structure and Functional Significance. *Methods in molecular biology*. [S.l.: s.n.], 2011. v. 686. p. 149–173.

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

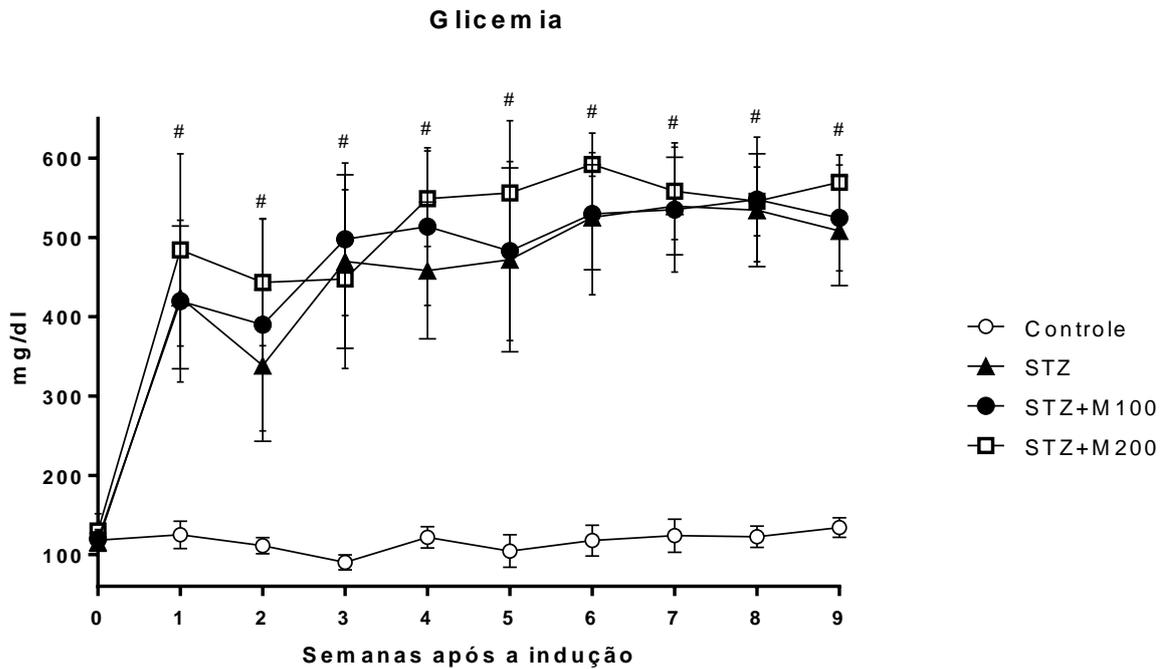


Figura 1: Monitoramento semanal dos níveis glicêmicos nos grupos experimentais. Valores expressos em média \pm desvio padrão (n=7 animais por grupo). STZ: animais diabéticos; STZ+M100: animais diabéticos tratados com 100 mg de metformina; STZ+M200: animais diabéticos tratados com 200 mg de metformina.

#STZ, STZ+M100 e STZ+M200 diferem do controle, $p < 0,05$. ANOVA *one-way*, pós-teste de Tukey.

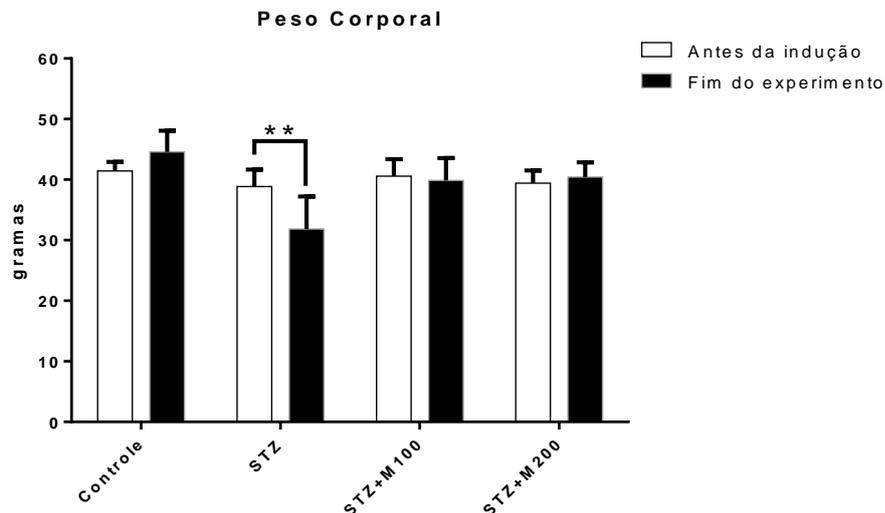


Figura 2: Efeito da metformina no peso corporal dos animais no início e no final do experimento. Valores expressos em média \pm desvio padrão (n=7 animais por grupo). STZ: animais diabéticos; STZ+M100: animais diabéticos tratados com 100 mg de metformina; STZ+M200: animais diabéticos tratados com 200 mg de metformina. **Diferença no peso corporal do grupo STZ entre o início e o final do experimento, $p < 0,01$. ANOVA *one-way*, pós-teste de Tukey.

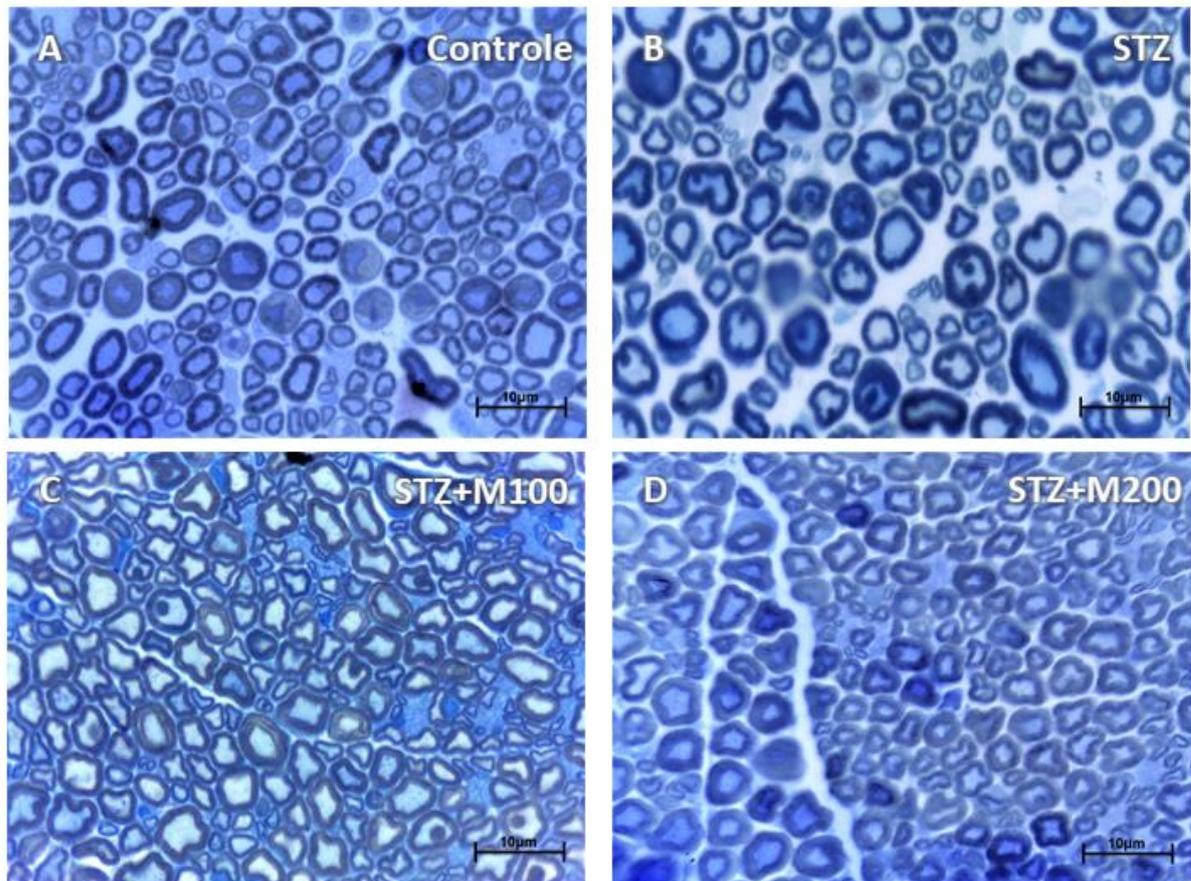


Figura 3: Efeito da metformina na histologia do tecido nervoso periférico. STZ: animais diabéticos; STZ+M100: animais diabéticos tratados com 100 mg de metformina; STZ+M200: animais diabéticos tratados com 200 mg de metformina. Cortes semifinos (0,5 µm) corados com azul de toluidina. Barra de escala: 10 µm.

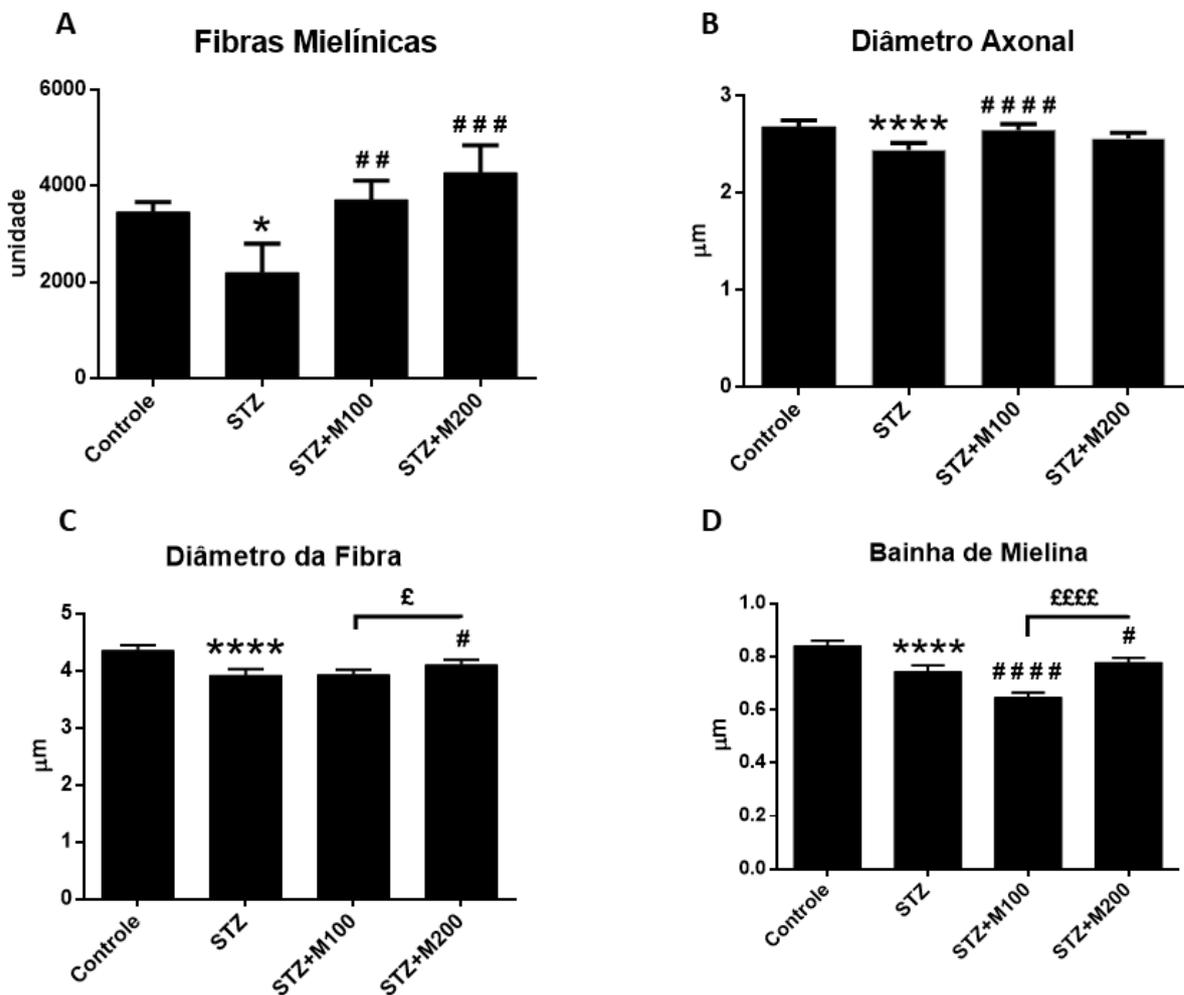


Figura 4: Análise histomorfométrica do nervo isquiático de camundongos diabéticos. (A) Quantificação de fibras mielínicas utilizando o programa Mesurim Pro 3.3, teste ANOVA *one-way*, *post-hoc* Tukey e resultados expressos como média \pm desvio padrão. (B) Quantificação do diâmetro axonal, (C) do diâmetro da fibra mielínica e (D) da espessura da bainha de mielina utilizando o *software* ImageJ 1.50i, teste de Kruskal-Wallis, *post-hoc* Dunn e resultados expressos como média e intervalo de confiança de 95%. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ vs grupo controle; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ vs grupo STZ; ##### $p < 0,0001$ vs STZ+M100.

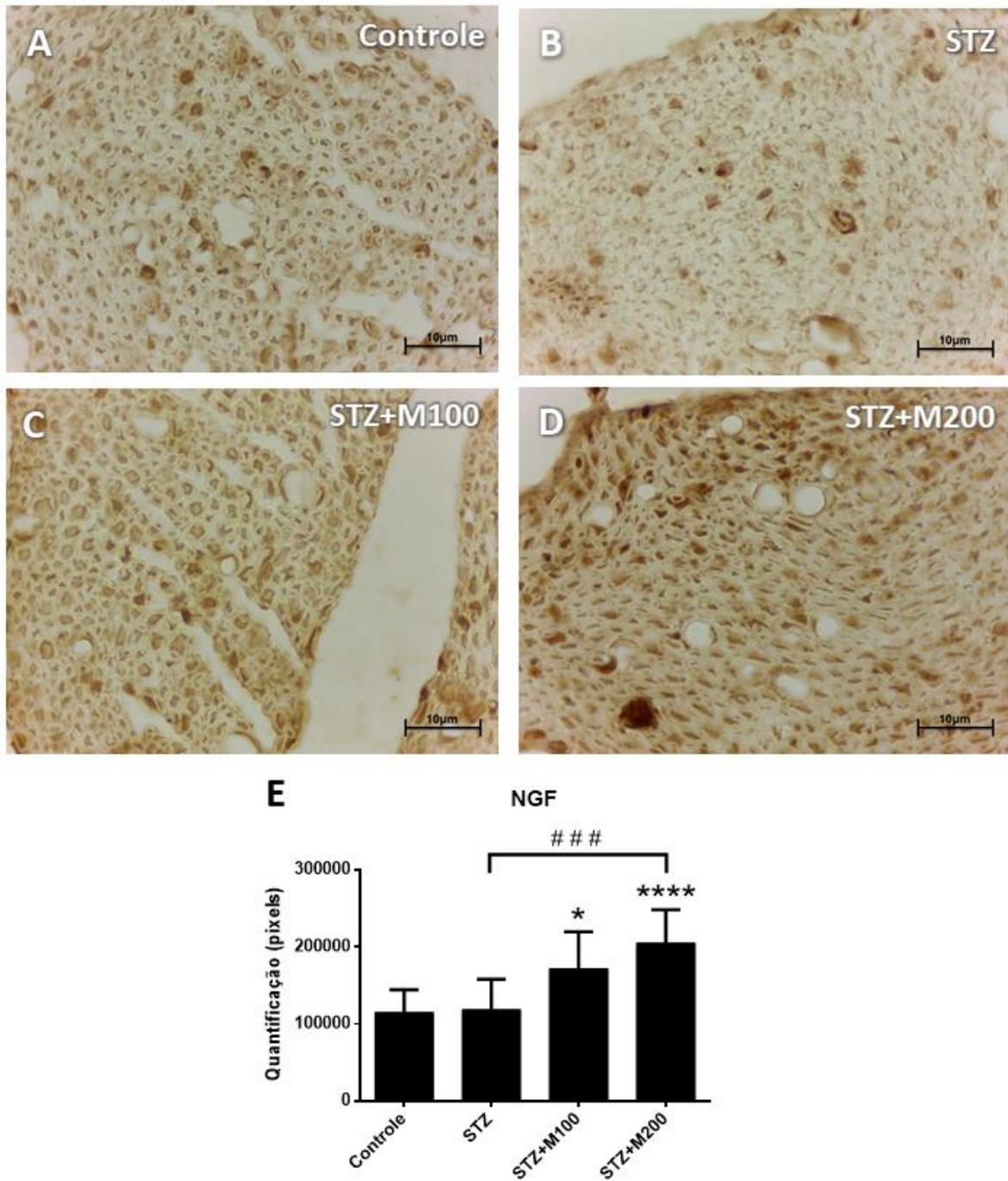


Figura 5: Efeitos da metformina na expressão do NGF em nervo isquiático. Grupo controle (A), grupo diabético (B), grupo diabético tratado com 100 mg/kg de metformina (C) e grupo diabético tratado com 200 mg/kg de metformina (D). A quantificação da imunohistoquímica (cinco áreas aleatórias, n=2 animais por grupo) foi realizada no aumento de 1000x, utilizando o *software* GIMP 2.8.22 (E). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ vs grupo controle; ### $p < 0,001$ vs grupo STZ. ANOVA *one-way*, *post-hoc* Tukey.

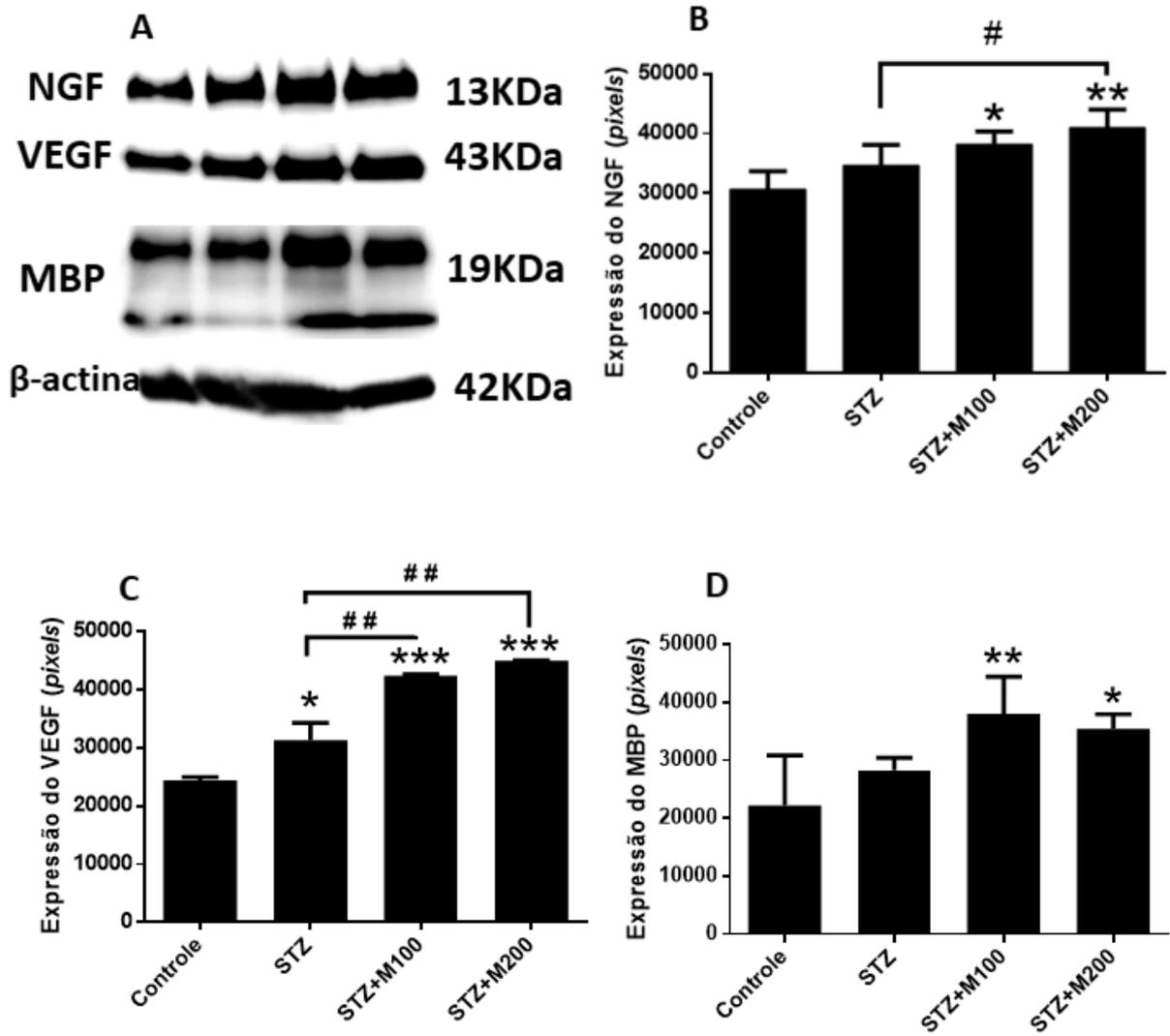


Figura 6: Western blot para NGF, VEGF e MBP (A). Análise densiométrica de NGF (B), VEGF (C) e MBP (D), com n=4 animais por grupo, foi realizada com o *software* ImageJ 1.50i (F).

*p<0,05, **p<0,01 e *** p <0,001 vs grupo controle;

#p <0,05 e ## p <0,01 vs grupo STZ.

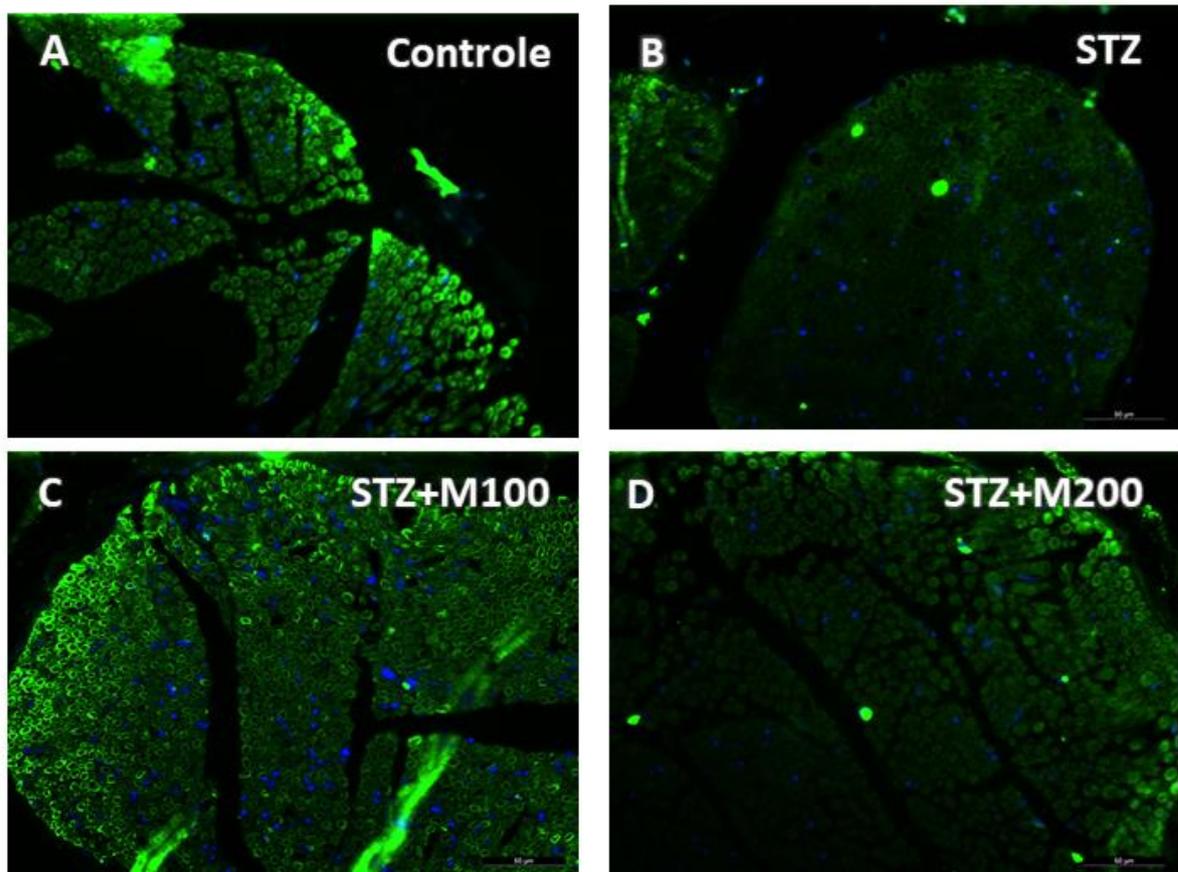


Figura 7: Efeitos da metformina na expressão da proteína básica da mielina de nervo isquiático. Aumento de 400x nos grupos controle (A), diabético (B), diabético tratado com 100 mg/kg de metformina (C) e diabético tratado com 200 mg/kg de metformina (D).

4.2 ARTIGO ORIGINAL 2

INIBIÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E REDUÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA: A METFORMINA EM NOVA FUNÇÃO TERAPÊUTICA

Deniele Bezerra Lós^{1,2,7}, Christina Alves Peixoto², Wilma Helena de Oliveira^{2,3}, Clarissa Figueredo Braga⁴, Maria Eduarda Rocha de França^{2,3}, Shyrlene Meiry da Rocha Araújo^{2,3}, Gabriel Barros Rodrigues^{2,3}, Sura Wanessa Santos Rocha⁵, Sílvia Regina Arruda de Moraes⁶

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, Recife, Brasil.

²Laboratório de Ultraestrutura, Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Recife, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Biociência, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Brasil.

⁴Departamento de Farmácia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Brasil.

⁵Intituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco – UPE, Recife, Brasil.

⁶Laboratório de Plasticidade Neuromuscular, Departamento de Anatomia, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Brasil.

Introdução: A hiperglicemia crônica desencadeia distúrbio metabólico nas células do tecido nervoso periférico, promovendo agressão tecidual mediada por várias citocinas inflamatórias, liberadas em resposta ao estresse metabólico. Estudos recentes têm indicado que a metformina, além de ser um fármaco hipogliceminante, pode exercer efeito anti-inflamatório em nervos periféricos lesionados. O objetivo deste estudo foi investigar se a metformina é capaz de atenuar a resposta inflamatória no nervo isquiático de camundongos diabéticos insulino-dependentes, sem administração suplementar de insulina.

Métodos: Camundongos *Swiss Weber* foram induzidos ao diabetes através de injeção intraperitoneal de estreptozotocina (90 mg/kg) em dois dias consecutivos. Os animais com glicemia ≥ 270 mg/dl foram alocados aleatoriamente em 3 grupos diabéticos. Dois destes grupos receberam tratamento diário com metformina de 100 mg/kg e 200 mg/kg, respectivamente, via gavagem, durante 9 semanas.

Resultados: O tratamento preventivo com metformina, sobretudo na dose de 200 mg/kg/dia, foi capaz de reduzir a inflamação por inibição da expressão de citocinas inflamatórias (IL-1 β e iNOS) e pelo óxido nítrico, além de apresentar papel anti-inflamatório por induzir a liberação de IL-10 e I κ B α .

Conclusão: A metformina reduz a inflamação em nervo periférico, mesmo diante de exposição crônica das fibras nervosas a altos índices glicêmicos, impedindo resposta inflamatória excessiva.

Keywords: Polineuropatia distal, AMPK, Diabetes tipo 1, Nervo isquiático, Células de Schwann.

INTRODUÇÃO

A polineuropatia diabética distal é uma comorbidade frequente em pacientes diabéticos (IDF, 2017). A manutenção do estado hiperglicêmico compromete a homeostasia do nervo periférico, podendo resultar em distúrbios sensoriais diversos, que cursa desde uma sintomatologia dolorosa, até anestesia cutânea nas extremidades dos membros, comprometendo a qualidade de vida desses pacientes e aumentando o risco de formação de feridas ulcerativas e amputações de membros (NGUYEN; SHAW; GRANT, 2012; SINGH; KISHORE; KAUR, 2014; FELDMAN *et al.*, 2017).

A patogênese da polineuropatia diabética distal é multifatorial, uma vez que a hiperglicemia gera acúmulo de metabólitos tóxicos em todas as células do tecido nervoso periférico. O efeito da hiperglicemia nas células endoteliais compromete o mecanismo de vasodilatação da *vasa nervorum*, repercutindo com redução de fluxo sanguíneo no tecido nervoso (OLVER *et al.*, 2014).

Além disso, o excesso de glicose que é captado, principalmente pelas células de Schwann, provoca distúrbio metabólico nestas células e, devido à sua função de oferecer suporte metabólico ao axônio, acaba transferindo o para o axônio o excedente de glicose e até mesmo resíduos do estresse metabólico (FREEMAN *et al.*, 2016).

Níveis elevados de glicose no meio intracelular satura a principal via glicolítica no neurônio, ativando secundariamente a via poliol, iniciando assim o comprometimento estrutural e funcional do nervo, uma vez que a ativação frequente desta via glicolítica promove o acúmulo de produtos finais da glicação avançada (AGEs), sorbitol e frutose, além de reduzir a disponibilidade do fosfato de dinucleotídeo de adenina (NADPH), um importante antioxidante intracelular (VINCENT; BROWNLEE; RUSSELL, 2002; MELLO; QUINCOZES-SANTOS; FUNCHAL, 2012).

O estresse metabólico decorrente da ativação da via poliol causa o aumento da expressão de vários fatores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e a interleucina-1 (IL-1). Estas citocinas, estão intimamente relacionadas com o mecanismo de dor neuropática em nervos periféricos lesionados e com o recrutamento de neutrófilos e macrófagos M1 para o local da lesão, aumentando ainda mais a inflamação tecidual (NADEAU *et al.*, 2011).

As células de Schwann contribuem ativamente para o início do processo inflamatório do nervo, por apresentar em seu citoplasma tanto RNAm para TNF α , quanto a própria citocina expressa e pronta para ser liberada na ocorrência de uma agressão à célula de Schwann ou ao axônio, dado a íntima relação desta célula glial com o axônio (SHAMASH; REICHERT; ROTSHENKER, 2002).

Na ocorrência de uma lesão mecânica no nervo periférico, a rápida liberação de TNF α e IL-1 são imprescindíveis para a recuperação funcional do nervo (NADEAU *et al.*, 2011) contudo, na hiperglicemia crônica, os altos níveis de TNF α liberados no tecido nervoso parecem estar relacionados com alterações na eletrofisiologia e morfologia do nervo periférico em animais com polineuropatia diabética (SHI *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2015).

A liberação de TNF- α e IL-1 β , a formação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) e o produto do estresse oxidativo ativam a via do fator nuclear kappa B (NF- κ B), um regulador chave da imunidade inata e da inflamação (ZHANG *et al.*, 2015).

O NF- κ B quando inativo encontra-se no citoplasma ligado a proteínas inibitórias da família I κ B, como o I κ B- α , contudo quando o I κ B é fosforilado pela proteína quinase I κ B (IKK), é iniciada sua degradação através da via ubiquitina-proteassoma, liberando o NF- κ B (KONDYLIS *et al.*, 2017), que por sua vez é translocado para o núcleo das células de Schwann e passa a regular a expressão de vários genes relacionados com a via da inflamação, tais como TNF α , IL-1 β , ciclooxigenase-2 e a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), retroalimentando a inflamação através da ativação de mais NF- κ B (CHEN, X. *et al.*, 2018; NEGI; SHARMA, 2015; ZHANG *et al.*, 2015).

Recentes estudos apontam que a metformina apresenta um grande potencial farmacológico, além do tradicional efeito hipoglicemiante amplamente utilizado na prática clínica. No sistema nervoso periférico a metformina se mostrou eficaz em controlar a resposta inflamatória em nervos de ratos com polineuropatia diabética (HASANVAND *et al.*, 2016), em reduzir a sintomatologia de hiperalgesia e alodinia (MA *et al.*, 2015) e em promover neuroproteção de nervo periférico em animais tratados com quimioterápicos (MAO-YING *et al.*, 2014).

A metformina é um agonista da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), que tem papel fundamental na regulação da energia intracelular. Além disso, o AMPK em sua forma ativa pode atuar como inibidor indireto da via do NF- κ B, através da ativação de mediadores subsequentes na via do AMPK, como o

SIRT1, FOXO, P53 e PGC1 α , que atuam suprimindo a expressão de fatores pró-inflamatórios (SALMINEN; HYTTINEN; KAARNIRANTA, 2011; PEIXOTO *et al.*, 2017).

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar se a metformina é capaz de atenuar a resposta inflamatória mediada por citocinas, no nervo isquiático de camundongos diabéticos insulino-dependentes, sem administração suplementar de insulina.

METODOLOGIA

Desenho do estudo, indução ao diabetes e tratamento com metformina

Foram utilizados 28 camundongos *Swiss Webster* com 12 semanas de vida e peso corporal de 40 ± 4 g, mantidos a uma temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e com acesso à ração e água *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais do Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (81/2015 - CEUA / FIOCRUZ).

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Grupo controle (Controle), constituído de animais sadios; Grupo diabético (STZ), animais induzidos ao diabetes e que não receberam tratamento com metformina; Grupo diabético e tratado com 100 mg/kg/dia de metformina (STZ+M100); Grupo diabético e tratado com 200 mg/kg/dia de metformina (STZ+M200).

Para indução ao diabetes tipo 1 (DM1) foi realizado o protocolo descrito por Oliveira *et al.*, 2016, que consistiu em injeção intraperitoneal de 90 mg/kg de estreptozotocina (ARIZA *et al.*, 2014) diluída em tampão citrato (pH 4,5), em dois dias consecutivos, estando os animais em um jejum prévio de 12 horas. Aos animais do grupo controle, foi administrada injeção intraperitoneal contendo apenas tampão citrato.

No quarto dia após a indução ao diabetes, amostra de sangue foi coletada da veia caudal de cada animal para mensurar os níveis de glicose, utilizando um glicômetro digital (One Touch Ultra Lifescan). Animais com glicemia ≥ 270 mg/dl foram aceitos em seus respectivos grupos diabéticos (JOLIVALT *et al.*, 2016) e a glicemia foi mensurada semanalmente para confirmar a manutenção do estado hiperglicêmico e, assim, assegurar que o nervo isquiático estivesse submetido aos efeitos do diabetes. Os animais não receberam insulina para controle da hiperglicemia.

O tratamento foi iniciado no mesmo dia da confirmação do diabetes e consistiu na administração de metformina diluída em água para injeção na dose de 100 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia para os animais dos grupos STZ+M100 e STZ+M200, respectivamente, via gavagem, fracionada em duas doses diárias (OLIVEIRA *et al.*, 2016), ao longo de 9 semanas. Aos grupos controle e STZ foi administrada apenas água para injeção nos mesmos horários dos grupos tratados.

Processamento para Imunohistoquímica

Completadas 9 semanas, contadas a partir da confirmação do diabetes, os animais foram profundamente anestesiados e receberam perfusão intracardíaca com solução salina e solução fixadora com paraformaldeído a 4% (Sigma-Aldrich) diluída em fosfato 0,1 M (solução fosfatada de sódio fosfato monobásico e hepta-hidratado dibásico - Sigma-Aldrich), pH 7,4. Através de uma incisão na pele da pata posterior do animal e rebatimento da musculatura, o nervo isquiático foi visualizado, dissecado e coletado um fragmento que foi mantido *overnight* na mesma solução fixadora.

As amostras foram desidratadas em concentrações de etanol diluído em água destilada, clareadas em xilol e emblocadas em parafina. Secções transversais de 4 µm de espessura foram realizadas e aderidas a lâminas tratadas com 3-amino-propil-trietoxissilano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os cortes foram reidratados e tratados com tampão citrato 20mM (pH 6,0) a 100°C, durante 30 minutos, para recuperação antigênica. Em seguida, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena através utilizando solução de 3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) diluído em álcool metílico. Na sequência, os sítios inespecíficos foram bloqueados em solução contendo albumina de soro bovino a 1%, Tween 20 a 0,2% e PBS.

Os cortes foram incubados em anticorpo primário, *overnight*, a 4°C em câmara úmida. Foram utilizados os anticorpos anti-IkBα (sc-371; Santa Cruz Biotechnology, 1:100), anti-IL-1β (sc-7884; Santa Cruz Biotechnology, 1:100), anti-TNFα (500-P64; Prepotech, 1:50) e anti-iNOS (ab3523; Abcam, 1:50). Após a lavagem, as lâminas de imunohistoquímica foram incubadas com o anticorpo IgG secundário conjugado com biotina, amplificado usando o kit DakoCytomation (Biotinylated Link Universal HRP; K0690; USA) e visualizado através do cromógeno 3'-3-diaminobenzidina (DAB), à temperatura ambiente e protegido da luz. As lâminas foram montadas em Entellan (1079610100; Merck, EUA) para serem obtidas cinco fotomicrografias do nervo

isquiático de dois animais diferentes por grupo, utilizando a magnificação de 1000 vezes. As imagens foram quantificadas usando o software GIMP 2.6.11 (software GNU Image Manipulation Program, Austrália).

Western Blot

Para esta técnica, os animais foram profundamente anestesiados para retirada do fragmento de nervo isquiático e na sequência foram eutanasiados por deslocamento cervical. O fragmento foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido, na ausência de fixadores.

Para cada grupo experimental, foram unidos um fragmento de nervo de quatro animais e colocados em um tubo contendo coquetel de extração (10mmol/L de EDTA, 2mmol/L de fenilmetano fluoreto de sulfonilo, fluoreto de sódio 100 mmol/L, pirofosfato de sódio a 10 mmol/L, ortovanadato de sódio a 10 mmol/L, aprotinina a 10 e 100mmol/L Tris aminometano - pH7,4), para serem homogeneizados utilizando um macerador manual para a quebra dos tecidos e liberação das proteínas. Em seguida, o material foi centrifugado e extraído apenas o sobrenadante, obtendo-se um *pool* de amostras para cada grupo.

Em um gel de eletroforese foram aplicados 20µg de proteína total para cada grupo. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (BioRad 162-0115), bloqueadas por 1 hora com solução contendo 5% de leite desnatado diluído em PBS e incubada *overnight* a 4°C com o anticorpo primário para IL-10 (ab33471; Abcam, 1:1000). A técnica foi realizada em duplicata, para confirmação do resultado e o marcador β-actina (A2228, Sigma-Aldrich, 1:3000) foi utilizado como controle.

Para revelação, as membranas foram molhadas com solução de quimioluminescência (Super Signal, 34080) e visualizadas através do C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences, USA) e do *software* Image Studio Digits (LI-COR Biosciences versão 5.0, USA). O *software* ImageJ versão 1.50i foi utilizado para quantificação dos pixels.

Mensuração do Óxido Nítrico

Com os animais profundamente anestesiados, foi realizada a punção sanguínea intracardíaca e a retirada do fragmento de nervo isquiático na ausência de fixador e congelando imediatamente em nitrogênio líquido. Na sequência, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

O óxido nítrico foi mensurado utilizando a reação de Griess (1% de sulfanilamida e N-1-naftil-etilenodiamina diluídos em 2,5% de H_3PO_4), através da detecção de nitrito. Amostras em duplicata foram adicionados a uma placa de ELISA, na proporção volumétrica de 1:1 para a amostra e o Reagente de Griess, acrescido de uma curva padrão (solução de nitrito de sódio na concentração inicial de 100 μM e diluída em série em PBS). Através da leitura no espectrofotômetro a 490 nm, a absorbância, das diferentes amostras, foi comparada com a curva padrão e os resultados foram obtidos.

Análise estatística

Os dados foram analisados no programa Prisma 6.0. Inicialmente, foi utilizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para os dados que apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste ANOVA *one-way* e pós-teste de Tukey. Para as variáveis que não tiveram distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (SD), com nível de confiabilidade de 95%.

RESULTADOS

Tratamento com metformina sem administração conjunta de insulina não reduziu a hiperglicemia

O monitoramento da glicemia, realizado semanalmente em todos os grupos experimentais, confirmou a validade do modelo utilizado neste estudo, onde os animais, que apresentavam valores glicêmicos equivalentes entre si no início do experimento, iniciaram um quadro de hiperglicemia após indução ao diabetes e mantiveram os altos índices glicêmicos durante todo o experimento, mesmo nos grupos tratados com metformina. Os animais não induzidos ao diabetes, por sua vez, mantiveram-se normoglicêmico ao longo do experimento (Figura 1).

Metformina atenua a inflamação do tecido nervo exposto à hiperglicemia crônica

A análise do nervo isquiático para a citocina TNF α através da imunohistoquímica evidencia a marcação em vários axônios nos grupos STZ, STZ+M100 e STZ+M200, diferindo do grupo controle (Figura 2). Apesar da marcação no grupo STZ+M200 ter sido ligeiramente mais fraca (Figura 2-D), este grupo ainda apresenta expressão significativa deste marcador inflamatório em relação ao grupo sadio (Figura 2-A).

Por outro lado, a citocina pró-inflamatória IL-1 β , apresentou-se superexpressa apenas no grupo STZ, onde células de Schwann e vários axônios encontram-se marcados com grande intensidade (Figura 3-B) e diferindo estatisticamente com o grupo controle (Figura 3-E). Os grupos tratados com metformina apresentaram pequena expressão desta proteína, sobretudo nas células de Schwann, porém em níveis basais, similar ao evidenciado no grupo controle (Figura 3).

A análise da expressão iNOS revelou que o grupo STZ apresentou células de Schwann marcadas para esta enzima em relação ao controle e que apenas o tratamento com metformina na maior dose foi efetivo em prevenir a síntese desse marcador inflamatório, apresentando valores basais semelhante ao encontrado no grupo controle (Figura 4).

Tratamento com Metformina preveniu o aumento dos níveis de NO

A dosagem do óxido nítrico no soro dos animais do grupo STZ revelou um aumento significativo na produção desse gás em relação ao grupo controle (Figura 5-A). O mesmo aumento foi identificado para o NO tecidual no grupo diabético (Figura 5-B).

Em contrapartida, ambos os grupos tratados com metformina, mesmo não apresentando níveis de NO similar ao encontrado no grupo controle, estiveram igualmente inferiores aos níveis do grupo STZ.

Metformina aumenta a expressão de marcadores anti-inflamatórios

Através da imuno-histoquímica, foi analisado a expressão do I κ B α nos axônios e no citoplasma das células de Schwann. O grupo STZ não apresentou diferença significativa ao grupo controle, contudo o grupo STZ+M100 teve uma expressão aumentada desta proteína em relação ao grupo STZ. Porém, o destaque foi maior no grupo STZ+M200, que apresentou uma superexpressão do I κ B α , na sua forma inativa, em comparação a todos os demais grupos (Figura 6).

Por fim, foi realizada a técnica de Western blot para a citocina anti-inflamatória IL-10 e foi identificado que o grupo um aumento significativo nos grupos STZ+M100 e STZ+M200, tanto em relação ao grupo controle, quanto em relação ao grupo STZ (Figura 7).

DISCUSSÃO

A metformina é um fármaco oral amplamente utilizado para o tratamento do diabetes tipo 2. Por outro lado, os achados deste estudo reforçaram o potencial anti-inflamatório da metformina no tecido nervoso periférico, atenuando a expressão de citocinas inflamatórias, mas também estimulando a liberação de citocinas anti-inflamatórias.

No presente estudo foi utilizado o modelo experimental de indução ao DM1, através de injeção de estreptozotocina e na ausência de insulino-terapia, a fim de verificar se o tratamento com metformina, iniciado antes da instalação da polineuropatia diabética distal, seria capaz de atenuar a resposta inflamatória à hiperglicemia, prevenindo o dano tecidual mediado pelo excesso da expressão de citocinas inflamatórias. Assim, a manutenção da hiperglicemia nos grupos diabéticos, mesmo naqueles que receberam tratamento diário de metformina, reforça a incapacidade deste fármaco de normalizar os níveis glicêmicos na DM1, sem administração complementar de insulina (MENG *et al.*, 2018).

Por ser um agonista do AMPK, a metformina possui um potencial que vai além do aumento na captação da glicose pelos tecidos. A ativação do AMPK pode atenuar ou inibir a produção de ROS nas mitocôndrias e também a ativação da via do NF- κ B em situações de estresse celular (CHEN, X. *et al.*, 2018). Os níveis aumentados dos mediadores inflamatórios IL-1 β e TNF α no grupo STZ deste estudo está de acordo com o encontrado na literatura, onde a hiperglicemia crônica provoca um aumento na expressão e liberação desses marcadores (KUMAR; SHARMA, 2010).

Apesar de não ter ocorrido redução na expressão da citocina inflamatória TNF α nos grupos tratados com metformina, ela foi capaz de atenuar a inflamação mediada pelo IL-1 β , cuja produção, juntamente com o TNF α nas células de Schwann, recruta macrófagos para iniciar o processo de degeneração walleriana (SHAMASH; REICHERT; ROTSHENKER, 2002).

Estes achados estão de acordo com os resultados de um ensaio *in vitro*, no qual a metformina controlou a inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em macrófagos, através da inibição do complexo I mitocondrial (KELLY *et al.*, 2015). Somado a isto, a metformina atuou de forma benéfica ao tecido nervoso através do aumento na expressão da citocina anti-inflamatória IL-10, atuando de forma inibitória na via de degeneração walleriana das fibras nervosas (BE'ERI *et al.*, 1998), controlando assim o dano funcional e estrutural do nervo.

Inevitavelmente, a manutenção de altos índices glicêmicos gera, no nervo periférico, a ativação da via poliol que promove, no primeiro momento, a conversão da glicose excedente em sorbitol pela ação da aldose redutase degradando nessa reação o cofator NADPH (FELDMAN *et al.*, 2017). A depleção do estoque intracelular do NADPH compromete a produção fisiológica de NO nas fibras nervosas e a restauração da glutatona, importante antioxidante intracelular (FELDMAN *et al.*, 2017; MOUSTAFA *et al.*, 2018).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora de vários processos fisiológicos porém, na inflamação, ela é produzida pela isoforma induzível da enzima NO sintase (iNOS) em macrófagos e vários outros tipos celulares, que ao ser produzido em excesso pode ser citotóxico e levar ao estresse nitrosativo (SOSKIĆ *et al.*, 2011). O aumento na liberação de citocinas inflamatórias exerce influência sobre o aumento da expressão de iNOS em macrófagos ou células da glia, resultando na grande produção de NO (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). Os níveis de NO tecidual e no soro sanguíneo neste estudo, apresentaram-se aumentados no grupo STZ em relação ao grupo controle, o que já era esperado devido ao caráter inflamatório que o diabetes *mellitus* gera nos tecidos, mediado por citocinas inflamatórias, como TNF α e IL-1 β , somado ao estresse oxidativo que aumentam a expressão de iNOS e, por sua vez, libera mais NO (KUMAR; SHARMA, 2010; SOSKIĆ *et al.*, 2011).

Assim, a produção de óxido nítrico fica alterada na polineuropatia diabética, sendo menos produzido fisiologicamente pelas células endoteliais, através da ação enzima eNOS, porém, excessivamente produzido mediante aumento na produção de

iNOS (SOSKIĆ *et al.*, 2011; OŠIŃA *et al.*, 2017). O tratamento com metformina, reduziu os níveis iNOS no nervo isquiático, sobretudo na dose de 200 mg/Kg, conseqüentemente, os grupos tratados apresentaram níveis mais baixos de NO em relação ao grupo STZ. Do mesmo modo como ocorre com o TNF α e o IL-1 β , o iNOS apresenta sua expressão aumentada no diabetes em decorrência da ativação da via do NF- κ B que, ao ser translocado para o núcleo, atua no aumento da transcrição destas e de outras citocinas inflamatórias (SANDIREDDY *et al.*, 2014).

Em estudo prévio, foi confirmado o aumento nos níveis de p-AMPK decorrente da administração de doses idênticas de metformina às utilizadas no presente estudo (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Essa ativação do AMPK promove aumento intracelular do I κ B α (PEIXOTO *et al.*, 2017), que foi verificado em nosso estudo, inclusive com relação positiva para a relação dose-resposta na produção do I κ B α .

O aumento da forma inativa do I κ B α está relacionado com a inibição da via do NF κ B. Quando ativo, o NF κ B inicia a cascata inflamatória intracelular presente no curso da fisiopatologia da polineuropatia diabética (KUMAR; NEGI; SHARMA, 2012). Dessa forma, o tratamento com metformina também reduziu a inflamação no nervo periférico, por inibição da via (SALMINEN; HYTTINEN; KAARNIRANTA, 2011; KONDYLIS *et al.*, 2017)

CONCLUSÃO

Os achados deste estudo mostram que o tratamento com metformina no período de nove semanas, iniciado imediatamente após confirmação do diabetes tipo 1, parece proteger o nervo periférico das alterações metabólicas decorrente da hiperglicemia crônica, através da inibição da expressão de citocinas inflamatórias, além da estimulação a produção de mediadores anti-inflamatórios em axônios e células de Schwann.

REFERÊNCIAS

- ARIZA, L. *et al.* Experimental diabetes in neonatal mice induces early peripheral sensorimotor neuropathy. *Neuroscience*, v. 274, p. 250–259, 2014.
- BE'ERI, H. *et al.* The cytokine network of wallerian degeneration: IL-10 and GM-CSF. *European Journal of Neuroscience*, v. 10, n. 8, p. 2707–13, ago. 1998.
- CHEN, X. *et al.* Activation of AMPK inhibits inflammatory response during hypoxia and reoxygenation through modulating JNK-mediated NF- κ B pathway. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 2018.
- FELDMAN, E. L. *et al.* New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. *Neuron*, v. 93, n. 6, p. 1296–1313, 2017.
- FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.
- FREEMAN, O. J. *et al.* Metabolic dysfunction is restricted to the sciatic nerve in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*, v. 65, n. 1, p. 228–238, 2016.
- HASANVAND, A. *et al.* Anti-inflammatory effect of AMPK signaling pathway in rat model of diabetic neuropathy. *Inflammopharmacology*, v. 24, n. 5, p. 207–219, 2016.
- IDF. Global Perspective on Diabetes. *Diabetes Voice*, v. 64, n. 4, p. 1–32, 2017. Disponível em: <www.idf.org>.
- JOLIVALT, C. G. *et al.* Peripheral Neuropathy in Mouse Models of Diabetes. *Current protocols in mouse biology*, v. 6, n. 3, p. 223–55, 2016.
- KELLY, B. *et al.* Metformin inhibits the production of reactive oxygen species from NADH: Ubiquinone oxidoreductase to limit induction of interleukin-1 β (IL-1 β) and boosts interleukin-10 (IL-10) in lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 33, p. 20348–20359, 2015.
- KONDYLIS, V. *et al.* The interplay of IKK, NF- κ B and RIPK1 signaling in the regulation of cell death, tissue homeostasis and inflammation. *Immunological Reviews*, v. 277, n. 1, p. 113–127, 2017.
- KUMAR, A.; NEGI, G.; SHARMA, S. S. Suppression of NF- κ B and NF- κ B regulated oxidative stress and neuroinflammation by BAY 11-7082 (I κ B phosphorylation inhibitor) in experimental diabetic neuropathy. *Biochimie*, v. 94, n. 5, p. 1158–1165, 2012.
- KUMAR, A.; SHARMA, S. S. NF- κ B inhibitory action of resveratrol: A probable mechanism of neuroprotection in experimental diabetic neuropathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 394, n. 2, p. 360–365, 2010.
- MA, J. *et al.* Metformin attenuates hyperalgesia and allodynia in rats with painful diabetic neuropathy induced by streptozotocin. *European Journal of Pharmacology*,

v. 764, p. 599–606, 2015.

MAO-YING, Q.-L. *et al.* The Anti-Diabetic Drug Metformin Protects against Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in a Mouse Model. *PLoS ONE*, v. 9, n. 6, p. e100701, 23 jun. 2014.

MELLO, A. DE S.; QUINCOZES-SANTOS, A.; FUNCHAL, C. Correlation Between Hyperglycemia and CNS Cells, Focusing on the Glial Activity. *Revista Neurociências*, v. 20, n. 2, p. 294–301, 2012.

MENG, H. *et al.* Effect of Metformin on Glycemic Control in Patients with Type 1 Diabetes: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, v. 34, n. 4, 2018.

MOUSTAFA, P. E. *et al.* Liraglutide ameliorated peripheral neuropathy in diabetic rats: Involvement of oxidative stress, inflammation and extracellular matrix remodeling. *Journal of Neurochemistry*, 2018.

NADEAU, S. *et al.* Functional recovery after peripheral nerve injury is dependent on the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF: implications for neuropathic pain. *The Journal of Neuroscience*, v. 31, n. 35, p. 12533–42, 31 ago. 2011.

NEGI, G.; SHARMA, S. S. Inhibition of I κ B Kinase (IKK) Protects Against Peripheral Nerve Dysfunction of Experimental Diabetes. *Molecular Neurobiology*, v. 51, n. 2, p. 591–598, 2015.

NGUYEN, D. V.; SHAW, L. C.; GRANT, M. B. Inflammation in the pathogenesis of microvascular complications in diabetes. *Frontiers in Endocrinology*, v. 3, p. 1–7, 2012.

OLIVEIRA, W. H. DE *et al.* Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice. *Brain Research*, v. 1644, p. 149–160, 2016.

OLVER, T. D. *et al.* Exercise training enhances insulin-stimulated nerve arterial vasodilation in rats with insulin-treated experimental diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 306, n. 12, p. 941–950, 2014.

OŠIŃA, K. *et al.* Modifications of expression of genes and proteins involved in DNA repair and nitric oxide metabolism by carbatonides [disodium-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridine- 3,5-bis (carbonyloxyacetate) derivatives] in intact and diabetic rats. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, v. 68, n. 13, p. 212–227, 2017.

PEIXOTO, C. A. *et al.* AMPK activation: Role in the signaling pathways of neuroinflammation and neurodegeneration. *Experimental Neurology*, v. 298, p. 31–41, 2017.

SALMINEN, A.; HYTTINEN, J. M. T.; KAARNIRANTA, K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: Impact on healthspan and lifespan. *Journal of Molecular Medicine*, v. 89, n. 7, p. 667–676, 2011.

SANDIREDDY, R. *et al.* Neuroinflammation and Oxidative Stress in Diabetic Neuropathy: Futuristic Strategies Based on These Targets. *International Journal of Endocrinology*, 2014.

SHAMASH, S.; REICHERT, F.; ROTSHENKER, S. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 22, n. 8, p. 3052–60, 15 abr. 2002.

SHI, X. *et al.* Beneficial effect of TNF- α inhibition on diabetic peripheral neuropathy. *Journal of neuroinflammation*, v. 10, n. 1, p. 69, 2013.

SINGH, R.; KISHORE, L.; KAUR, N. Diabetic peripheral neuropathy: current perspective and future directions. *Pharmacological Research*, v. 80, p. 21–35, 2014.

SOSKIĆ, S. S. *et al.* 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.

VINCENT, A. M.; BROWNLEE, M.; RUSSELL, J. W. Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Annals of the New York Academic Science*, v. 959, p. 368–383, 2002.

ZHANG, H. H. *et al.* Promoted interaction of nuclear factor- κ B with demethylated purinergic P2X3 receptor gene contributes to neuropathic pain in rats with diabetes. *Diabetes*, v. 64, n. 12, p. 4272–4284, 2015.

ZHU, T. *et al.* Toll-like receptor 4 and tumor necrosis factor-alpha as diagnostic biomarkers for diabetic peripheral neuropathy. *Neuroscience Letters*, v. 585, p. 28–32, 2015.

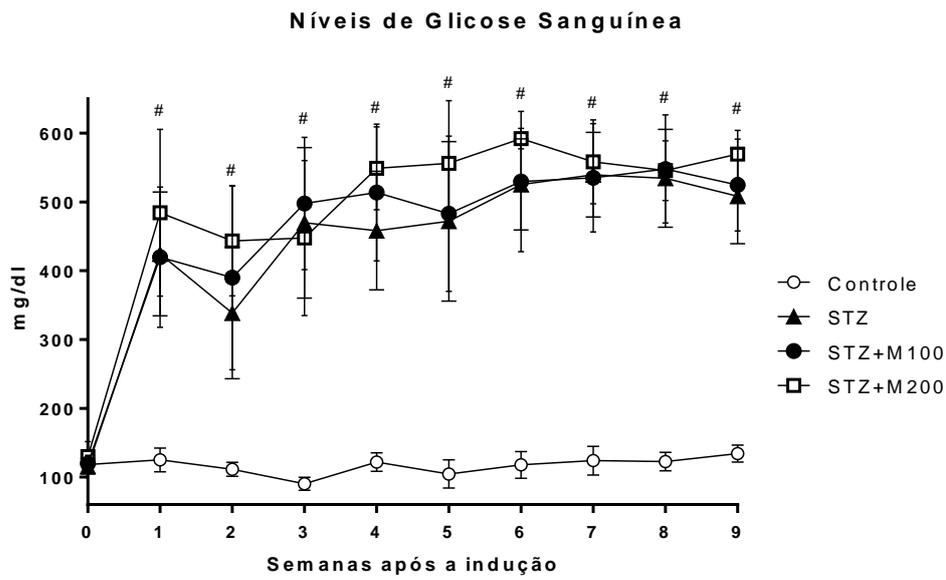


Figura 1: Monitoramento semanal dos níveis de glicose sanguínea. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão, $n=7$ animais por grupo.

$p<0,05$ grupos STZ, STZ+M100 e STZ+M200 vs grupo controle.

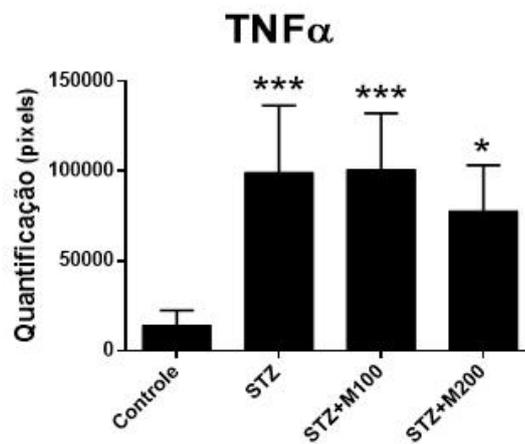
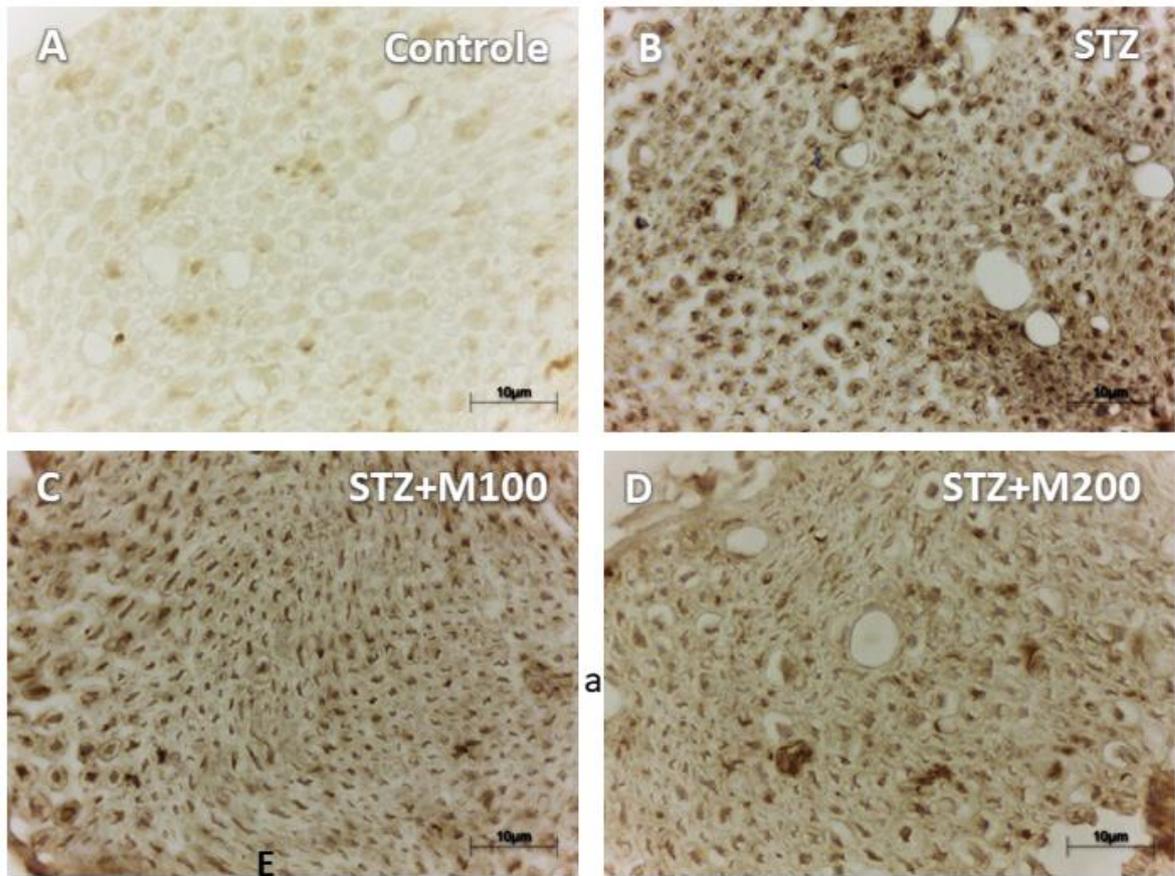


Figura 2: Efeitos da metformina na expressão do TNF α no nervo isquiático. Grupo controle (A), grupo diabético (B), grupo diabético tratado com 100 mg/kg de metformina (C) e grupo diabético tratado com 200 mg/kg de metformina (D). A quantificação da imunohistoquímica (cinco áreas aleatórias, n=2 animais por grupo) foi realizada no aumento de 1000x, utilizando o software GIMP 2.8.22. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

*p <0,05 e ***p <0,001 vs grupo controle.

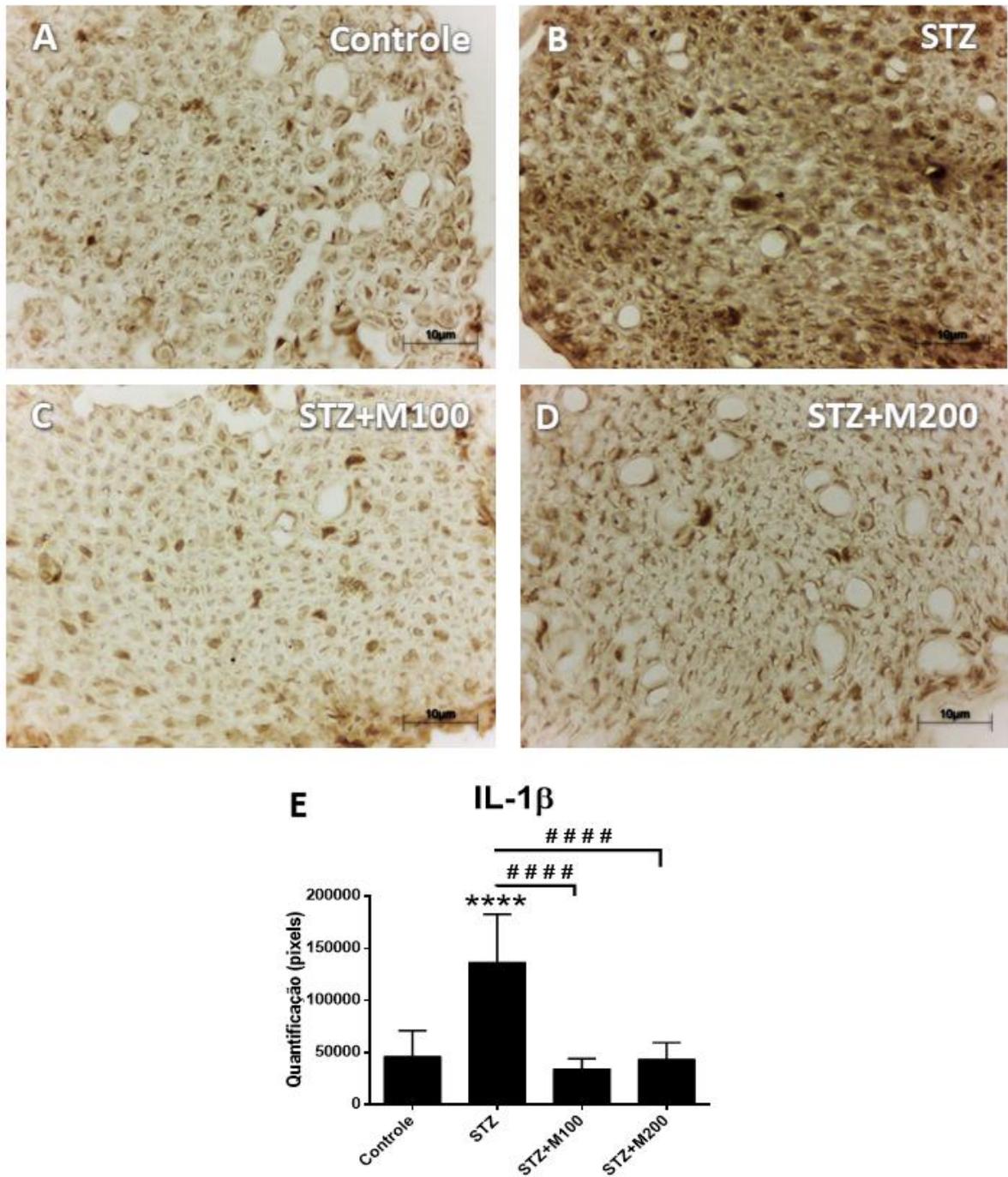


Figura 3: Efeitos da metformina na expressão do IL-1 β no nervo isquiático. Grupo controle (A), grupo diabético (B), grupo diabético tratado com 100 mg/kg de metformina (C) e grupo diabético tratado com 200 mg/kg de metformina (D). A quantificação da imunohistoquímica (cinco áreas aleatórias, n=2 animais por grupo) foi realizada no aumento de 1000x, utilizando o *software* GIMP 2.8.22. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

**** p <0,0001 vs grupo controle; ##### p <0,0001 vs grupo STZ.

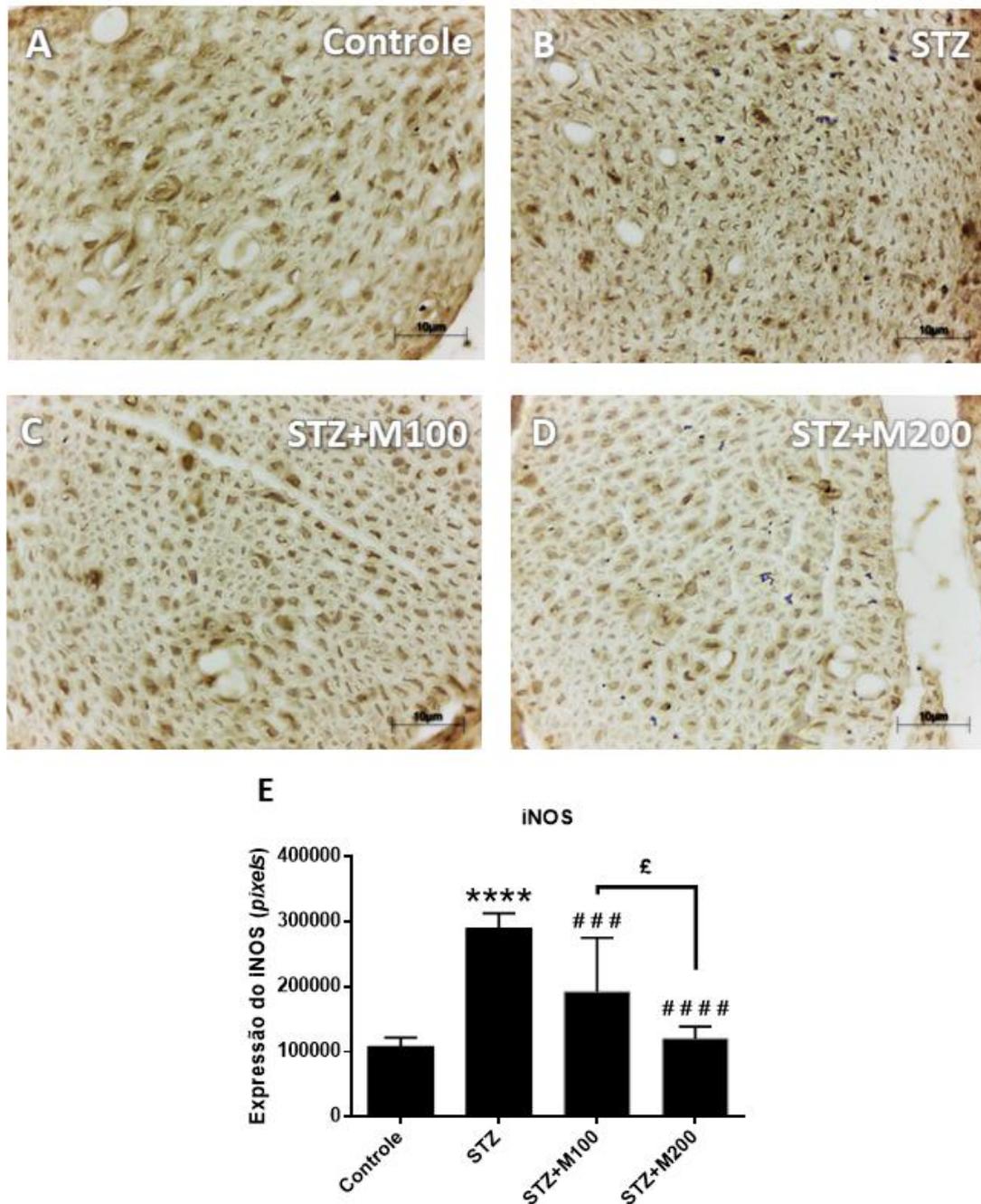


Figura 4: Efeitos da metformina na expressão do iNOS no nervo. Grupo controle (A), grupo diabético (B), grupo diabético tratado com 100 mg/kg de metformina (C) e grupo diabético tratado com 200 mg/kg de metformina (D). A quantificação da imunohistoquímica (cinco áreas aleatórias, n=2 animais por grupo) foi realizada no aumento de 1000x, utilizando o *software* GIMP 2.8.22. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

p<0,01 **p <0,0001 vs grupo controle; ###p<0,001 e ####p<0,0001 vs grupo STZ.

£p<0,0001 vs grupo STZ+M100.

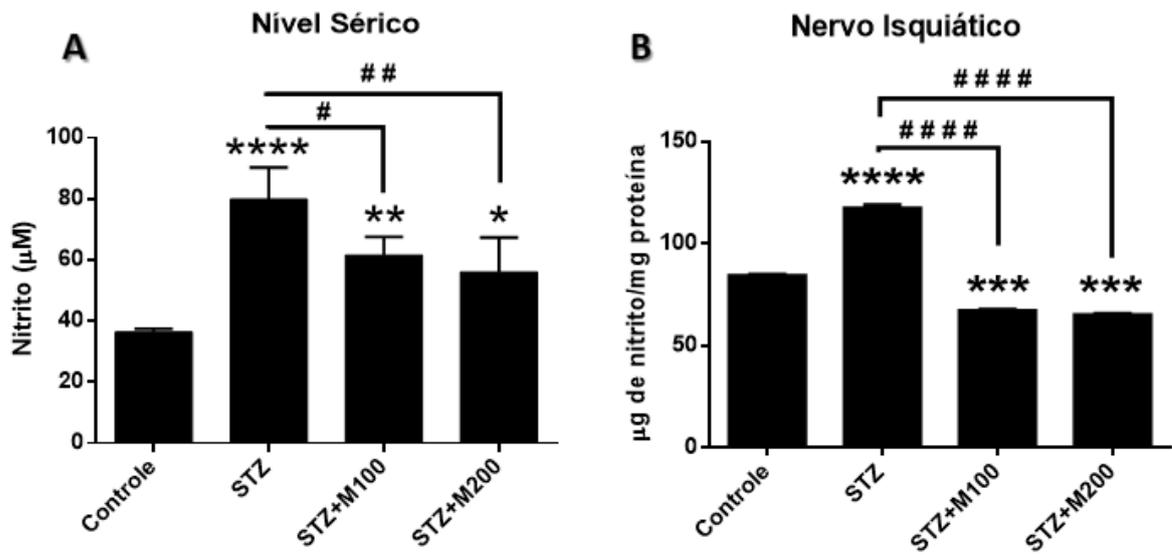


Figura 5: Análise da metformina nos níveis sérico e tecidual do nitrito em camundongos diabéticos. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ vs grupo controle.

$p < 0,05$; ## $p < 0,01$ e #### $p < 0,0001$ vs grupo STZ.

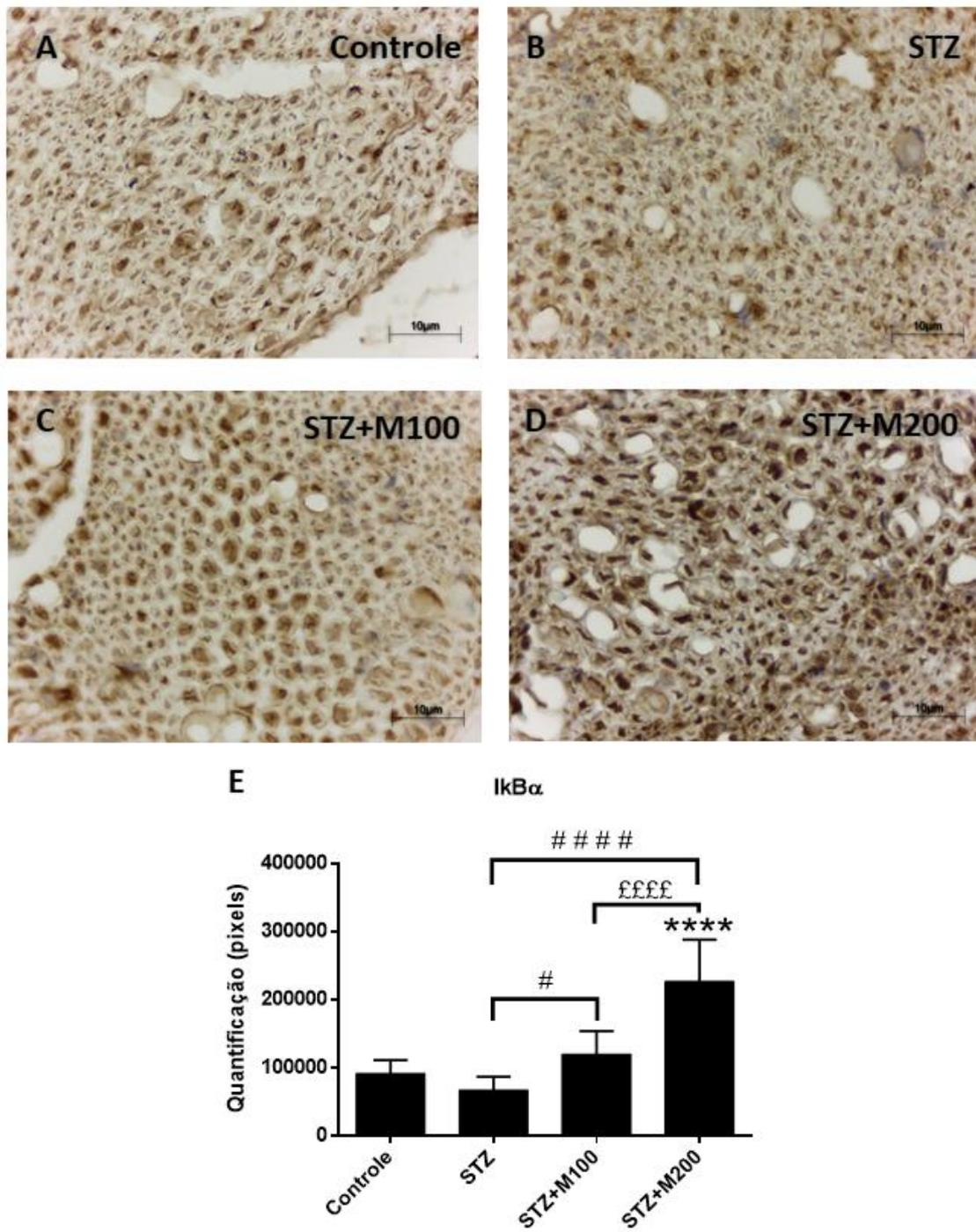


Figura 6: Efeitos da metformina na expressão do IkB α no nervo isquiático. Grupo controle (A), grupo diabético (B), grupo diabético tratado com 100 mg/kg de metformina (C) e grupo diabético tratado com 200 mg/kg de metformina (D). A quantificação da imunohistoquímica (cinco áreas aleatórias, n=2 animais por grupo) foi realizada no aumento de 1000x, utilizando o *software* GIMP 2.8.22. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

****p < 0,0001 vs grupo controle.

#p < 0,05 e #####p < 0,0001 vs grupo STZ.

££££p < 0,0001 vs grupo STZ+M100.

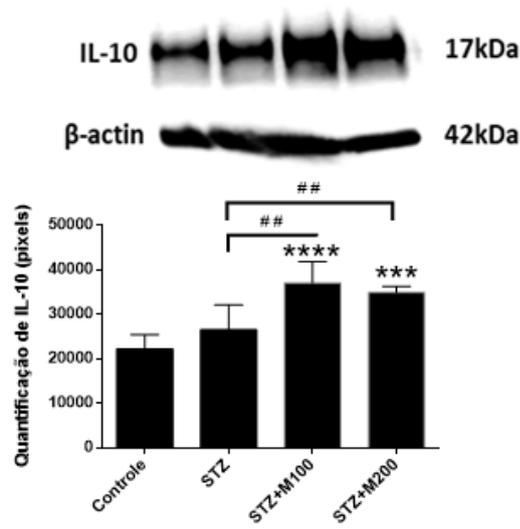


Figura 7: Efeitos da metformina na expressão do IL-10 no nervo isquiático de animais diabéticos. A quantificação dos resultados do western blot (n=4 animais por grupo) foi realizada através do *software* ImageJ 1.50i. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

*** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ vs grupo controle.

$p < 0,01$ vs grupo STZ.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metformina é um fármaco que atua na linha de frente para o controle do diabetes do tipo 2, onde não há deficiência na produção de insulina. Os achados desse estudo experimental, por outro lado, apontam uma nova possibilidade terapêutica para o uso da metformina, agindo de forma profilática à polineuropatia diabética distal, mesmo na presença de hiperglicemia crônica e sem a administração conjunta de insulina.

Assim, o presente estudo evidenciou que o tratamento com metformina, sobretudo na dose de 200 mg/kg, preveniu a instalação alterações estruturais compatíveis com aquelas encontradas em nervos acometidos pela polineuropatia diabética distal (adelgaçamento da bainha de mielina, redução e atrofia de fibras mielínicas). Para isso, a metformina atuou através da inibição de moléculas pró-inflamatórias relacionadas à via do NF- κ B, como o IL-1 β , iNOS e o óxido nítrico, além de aumentar a liberação de fatores anti-inflamatórios (IL-10, I κ -B α), angiogênico (VEGF) e neurotróficos (MBP e NGF).

Desse modo, o uso terapêutico da metformina proposto neste estudo precisa ser investigado de forma mais específica, sobretudo através de ensaios clínicos, para validar a aplicabilidade deste tratamento em humanos.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, N. K.; KANT, S. Targeting inflammation in diabetes : Newer therapeutic options. *World Journal of Diabetes*, v. 5, n. 5, p. 697–710, 2014.
- ANDÚJAR-PLATAA, P.; PI-SUNYERB, X.; LAFERRÈRE, B. Metformin effects revisited. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 18, n. 3, p. 386–392, 2012.
- ARAIZA-SALDAÑA, C. I. *et al.* Sildenafil and glyceryl trinitrate reduce tactile allodynia in streptozotocin-injected rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 631, n. 1–3, p. 17–23, 2010.
- ARIZA, L. *et al.* Experimental diabetes in neonatal mice induces early peripheral sensorimotor neuropathy. *Neuroscience*, v. 274, p. 250–259, 2014.
- BE'ERI, H. *et al.* The cytokine network of wallerian degeneration: IL-10 and GM-CSF. *European Journal of Neuroscience*, v. 10, n. 8, p. 2707–13, ago. 1998.
- BEYSEL, S. *et al.* The effects of metformin in type 1 diabetes mellitus. *BMC Endocrine Disorders*, v. 18, n. 1, p. 1–6, 2018.
- BIESSELS, G. J. J. *et al.* Phenotyping animal models of diabetic neuropathy: a consensus statement of the diabetic neuropathy study group of the EASD (Neurodiab). *Journal of the Peripheral Nervous System*, v. 19, n. 2, p. 77–87, 2014.
- BOVE, G. Epi-Perineurial Anatomy, Innervation, and Axonal Nociceptive Mechanisms. *Journal of Bodywork and Movement Therapies*, v. 12, n. 3, p. 185–190, 2008.
- BROSSIER, N. M.; CARROLL, S. L. Genetically Engineered Mouse Models Shed New Light on the Pathogenesis of Neurofibromatosis Type I-Related Neoplasms of the Peripheral Nervous System. *Brain Research Bulletin*, v. 88, n. 1, p. 58–71, 2012.
- CARRIEL, V. *et al.* Evaluation of myelin sheath and collagen reorganization pattern in a model of peripheral nerve regeneration using an integrated histochemical approach. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 136, n. 6, p. 709–717, 2011.
- CHEN, D. *et al.* Dual Effects of Metformin on Adipogenic Differentiation of 3T3-L1 Preadipocyte in AMPK-Dependent and Independent Manners. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 6, p. E1547, 2018.
- CHEN, X. *et al.* Activation of AMPK inhibits inflammatory response during hypoxia and reoxygenation through modulating JNK-mediated NF- κ B pathway. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 2018.
- CHENG, Y. *et al.* Activation of AMP-Activated Protein Kinase by Adenine Alleviates TNF-Alpha-Induced Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Plos One*, p. 1–14, 2015.

CHIU, C.-JU.; TAYLOR, A. Dietary hyperglycemia, glycemic index and metabolic retinal diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 30, n. 1, p. 18–53, 2011.

CHUNG, S. S. M.; CHUNG, S. K. Aldose Reductase in Diabetic Microvascular Complications. *Current Drug Targets*, v. 6, n. 4, p. 475–486, 2005.

DAM, P. S. VAN *et al.* Pathogenesis of diabetic neuropathy: Focus on neurovascular mechanisms. *European Journal of Pharmacology*, v. 719, n. 1–3, p. 180–186, 2013.

DEY, I. *et al.* Diabetic Schwann cells suffer from nerve growth factor and neurotrophin-3 underproduction and poor associability with axons. *Glia*, v. 61, n. 12, p. 1990–9, dez. 2013.

EMANUELI, C. *et al.* Paracrine control of vascularization and neurogenesis by neurotrophins. *British Journal of Pharmacology*, v. 140, n. 4, p. 614–619, 2003.

FARMER, K. L.; LI, C.; DOBROWSKY, R. T. Diabetic Peripheral Neuropathy: Should a Chaperone Accompany Our Therapeutic Approach? *Pharmacological Reviews*, v. 64, n. 4, p. 880–900, 2012.

FAZAN, V. P. S. *et al.* Diabetic Peripheral Neuropathies: A Morphometric Overview. *International Journal of Morphology*, v. 28, n. 1, p. 51–64, mar. 2010.

FELDMAN, E. L. *et al.* New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. *Neuron*, v. 93, n. 6, p. 1296–1313, 2017.

FISLTHALER, B.; FLEMING, I. Activation and Signaling by the AMP-Activated Protein Kinase in Endothelial Cells. *Circulation Research*, v. 105, n. 2, p. 114–127, 2009.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.

FREEMAN, O. J. *et al.* Metabolic dysfunction is restricted to the sciatic nerve in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*, v. 65, n. 1, p. 228–238, 2016.

GAUDET, A. D.; POPOVICH, P. G.; RAMER, M. S. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *Journal of neuroinflammation*, v. 8, n. 1, p. 110, jan. 2011.

GONÇALVES, N. P. *et al.* Schwann cell interactions with axons and microvessels in diabetic neuropathy. *Nature Reviews Neurology*, v. 13, n. 3, p. 135–147, 2017.

HAO, G. *et al.* The protective effect of the active components of ERPC on diabetic peripheral neuropathy in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 202, n. October 2016, p. 162–171, 2017.

HARATI, Y. Diabetic Neuropathies: Unanswered Questions. *Neurologic clinics*, v. 25, n. 1, p. 303–317, 2007.

- HASANVAND, A. *et al.* Anti-inflammatory effect of AMPK signaling pathway in rat model of diabetic neuropathy. *Inflammopharmacology*, v. 24, n. 5, p. 207–219, 2016.
- HATTORI, Y. *et al.* Metformin Inhibits Cytokine-Induced Nuclear Factor κ B Activation Via AMP-Activated Protein Kinase Activation in Vascular Endothelial Cells. *Hypertension*, v. 47, n. 6, p. 1183–1189, 2006.
- HEBERT, S. L.; NAIR, K. S. Protein and energy metabolism in type 1 diabetes. *Clinical Nutrition*, v. 29, n. 1, p. 13–17, 2010.
- HUANG, D. *et al.* Macrovascular Complications in Patients with Diabetes and Prediabetes. *BioMed Research International*, 2017.
- IDF. Global Perspective on Diabetes. *Diabetes Voice*, v. 64, n. 4, p. 1–32, 2017. Disponível em: <www.idf.org>.
- IKEDA, M.; OKA, Y. The relationship between nerve conduction velocity and fiber morphology during peripheral nerve regeneration. *Brain and behavior*, v. 2, n. 4, p. 382–90, jul. 2012.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. *IDF Diabetes Atlas*. 8th. ed. [S.l.]: www.diabetesatlas.org, 2017.
- JOLIVALT, C. G. *et al.* Peripheral Neuropathy in Mouse Models of Diabetes. *Current protocols in mouse biology*, v. 6, n. 3, p. 223–55, 2016.
- KANDA, T. Biology of the blood–nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, v. 84, n. 2, p. 208–212, 2013.
- KELLY, B. *et al.* Metformin inhibits the production of reactive oxygen species from NADH: Ubiquinone oxidoreductase to limit induction of interleukin-1 β (IL-1 β) and boosts interleukin-10 (IL-10) in lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 33, p. 20348–20359, 2015.
- KIM, J. *et al.* AMPK activators : mechanisms of action and physiological activities. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 48, n. e224, p. 1–12, 2016.
- KONDYLIS, V. *et al.* The interplay of IKK, NF- κ B and RIPK1 signaling in the regulation of cell death, tissue homeostasis and inflammation. *Immunological Reviews*, v. 277, n. 1, p. 113–127, 2017.
- KUMAR, A.; NEGI, G.; SHARMA, S. S. Suppression of NF- κ B and NF- κ B regulated oxidative stress and neuroinflammation by BAY 11-7082 (I κ B phosphorylation inhibitor) in experimental diabetic neuropathy. *Biochimie*, v. 94, n. 5, p. 1158–1165, 2012.
- KUMAR, A.; SHARMA, S. S. NF- κ B inhibitory action of resveratrol: A probable mechanism of neuroprotection in experimental diabetic neuropathy. *Biochemical and*

Biophysical Research Communications, v. 394, n. 2, p. 360–365, 2010.

LEE, M. *et al.* AMP-activated Protein Kinase Activity Is Critical for Hypoxia-inducible Factor-1 Transcriptional Activity and Its Target Gene Expression under Hypoxic Conditions in DU145 Cells*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 41, p. 39653–39661, 2003.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, v. 51, n. 2, p. 216–226, 2008.

MA, J. *et al.* Metformin attenuates hyperalgesia and allodynia in rats with painful diabetic neuropathy induced by streptozotocin. *European Journal of Pharmacology*, v. 764, p. 599–606, 2015.

MAGNANI, P. *et al.* Regulation of glucose transport in cultured Schwann cells. *Journal of the peripheral nervous system: JPNS*, v. 3, n. 1, p. 28–36, 1998.

MAO-YING, Q.-L. *et al.* The Anti-Diabetic Drug Metformin Protects against Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in a Mouse Model. *PLoS ONE*, v. 9, n. 6, p. e100701, 23 jun. 2014.

MELEMEDJIAN, O. K. *et al.* Targeting adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) in preclinical models reveals a potential mechanism for the treatment of neuropathic pain. *Molecular pain*, v. 7, n. 70, p. 1–14, jan. 2011.

MELLO, A. DE S.; QUINCOZES-SANTOS, A.; FUNCHAL, C. Correlation Between Hyperglycemia and CNS Cells, Focusing on the Glial Activity. *Revista Neurociências*, v. 20, n. 2, p. 294–301, 2012.

MENG, H. *et al.* Effect of Metformin on Glycemic Control in Patients with Type 1 Diabetes: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, v. 34, n. 4, 2018.

MIZISIN, A. P.; WEERASURIYA, A. Homeostatic regulation of the endoneurial microenvironment during development, aging and in response to trauma, disease and toxic insult. *Acta Neuropathologica*, v. 121, n. 3, p. 291–312, mar. 2011.

MOUSTAFA, P. E. *et al.* Liraglutide ameliorated peripheral neuropathy in diabetic rats: Involvement of oxidative stress, inflammation and extracellular matrix remodeling. *Journal of Neurochemistry*, 2018.

NADEAU, S. *et al.* Functional recovery after peripheral nerve injury is dependent on the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF: implications for neuropathic pain. *The Journal of Neuroscience*, v. 31, n. 35, p. 12533–42, 31 ago. 2011.

NEAL, J. M. *et al.* Upper Extremity. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, v. 34, n. 2, p. 134–170, 2009.

NEGI, G.; SHARMA, S. S. Inhibition of I κ B Kinase (IKK) Protects Against Peripheral Nerve Dysfunction of Experimental Diabetes. *Molecular Neurobiology*, v. 51, n. 2, p.

591–598, 2015.

NGUYEN, D. V.; SHAW, L. C.; GRANT, M. B. Inflammation in the pathogenesis of microvascular complications in diabetes. *Frontiers in Endocrinology*, v. 3, p. 1–7, 2012.

NOWICKI, M. *et al.* Altered Sciatic Nerve Fiber Morphology and Endoneural Microvessels in Mouse Models Relevant for Obesity, Peripheral Diabetic Polyneuropathy, and the Metabolic Syndrome. *Journal of Neuroscience Research*, v. 90, n. 1, p. 122–131, 2012.

NUKADA, H. *et al.* Increased susceptibility to ischemia and macrophage activation in STZ-diabetic rat nerve. *Brain Research*, v. 1373, p. 172–182, 2011.

OLIVEIRA, W. H. DE *et al.* Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice. *Brain Research*, v. 1644, p. 149–160, 2016.

OLVER, T. D. *et al.* Exercise training enhances insulin-stimulated nerve arterial vasodilation in rats with insulin-treated experimental diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 306, n. 12, p. 941–950, 2014.

OŠIŃA, K. *et al.* Modifications of expression of genes and proteins involved in DNA repair and nitric oxide metabolism by carbatonides [disodium-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridine- 3,5-bis (carbonyloxyacetate) derivatives] in intact and diabetic rats. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, v. 68, n. 13, p. 212–227, 2017.

PEDROSA, H. C. Neuropatia diabética periférica. In: TAMBASCIA, M.; MINICUCCI, W. J.; NETTO, A. P. (Org.). *e-book 2.0 Diabetes na Prática Clínica*. 3ª edição ed. [S.l.]: Sociedade Brasileira de Diabetes, 2014. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/ebook/main-page#home>>.

PEIXOTO, C. A. *et al.* AMPK activation: Role in the signaling pathways of neuroinflammation and neurodegeneration. *Experimental Neurology*, v. 298, p. 31–41, 2017.

PREMKUMAR, L. S.; PABBIDI, R. M. Diabetic Peripheral Neuropathy: Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v. 67, n. 2, p. 373–383, 2013.

QIN, J. *et al.* Concentrated growth factor increases Schwann cell proliferation and neurotrophic factor secretion and promotes functional nerve recovery in vivo. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 37, n. 2, p. 493–500, 2016.

RAMASAMY, R.; GOLDBERG, I. J. Aldose reductase and cardiovascular diseases, creating human-like diabetic complications in an experimental model. *Circulation Research*, v. 106, n. 9, p. 1449–1458, 2010.

ROY CHOWDHURY, S. K. *et al.* Impaired adenosine monophosphate-activated protein kinase signalling in dorsal root ganglia neurons is linked to mitochondrial

dysfunction and peripheral neuropathy in diabetes. *Brain*, v. 135, n. 6, p. 1751–1766, 2012.

RUITER, G. C. W. DE *et al.* Designing ideal conduits for peripheral nerve repair. *Neurosurgical Focus*, v. 88, n. 1, p. 58–71, 2009.

SALMINEN, A.; HYTTINEN, J. M. T.; KAARNIRANTA, K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: Impact on healthspan and lifespan. *Journal of Molecular Medicine*, v. 89, n. 7, p. 667–676, 2011.

SANDIREDDY, R. *et al.* Neuroinflammation and Oxidative Stress in Diabetic Neuropathy: Futuristic Strategies Based on These Targets. *International Journal of Endocrinology*, 2014.

SANTOMAURO JÚNIOR, A. C. *et al.* Metformina e AMPK: Um Antigo Fármaco e Uma Nova Enzima no Contexto da Síndrome Metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 52, n. 1, p. 120–125, 2008.

SCHAAN, B. D. O papel da proteína quinase C no desenvolvimento das complicações vasculares do diabetes mellitus. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 47, n. 6, p. 654–662, 2003.

SCHREIBER, A. K. Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. *World Journal of Diabetes*, v. 6, n. 3, p. 432, 2015.

SHAMASH, S.; REICHERT, F.; ROTSHENKER, S. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor- α , interleukin-1 α , and interleukin-1 β . *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 22, n. 8, p. 3052–60, 15 abr. 2002.

SHI, X. *et al.* Beneficial effect of TNF- α inhibition on diabetic peripheral neuropathy. *Journal of neuroinflammation*, v. 10, n. 1, p. 69, 2013.

SHIMIZU, F. *et al.* Advanced glycation end-products induce basement membrane hypertrophy in endoneurial microvessels and disrupt the blood-nerve barrier by stimulating the release of TGF- β and vascular endothelial growth factor (VEGF) by pericytes. *Diabetologia*, v. 54, n. 6, p. 1517–1526, 2011.

SINGH, R.; KISHORE, L.; KAUR, N. Diabetic peripheral neuropathy: current perspective and future directions. *Pharmacological Research*, v. 80, p. 21–35, 2014.

SKOPLJAK, A. *et al.* Assessment of Diabetic Polyneuropathy and Plantar Pressure in Patients with Diabetes Mellitus in Prevention of Diabetic Foot. *Medical Archives*, v. 68, n. 6, p. 389–393, 2014.

SMIESZEK, A. *et al.* Antioxidant and Anti-Senescence Effect of Metformin on Mouse Olfactory Ensheathing Cells (mOECs) May Be Associated with Increased Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels — An Ex Vivo Study. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 4, p. 1–19, 2017.

SOSKIĆ, S. S. *et al.* 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.

SUGIMOTO, K.; YASUJIMA, M.; YAGIHASHI, S. Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Current pharmaceutical design*, v. 14, n. 10, p. 953–61, 2008.

TOMLINSON, D. R.; GARDINER, N. J. Glucose neurotoxicity. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 9, p. 36–45, 2008.

UGRENOVIĆ, S. *et al.* Morphometric analysis of the diameter and g-ratio of the myelinated nerve fibers of the human sciatic nerve during the aging process. *Anatomical Science International*, v. 91, n. 3, p. 238–245, 2016.

VINCENT, A. M.; BROWNLEE, M.; RUSSELL, J. W. Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Annals of the New York Academic Science*, v. 959, p. 368–383, 2002.

WANG, L. *et al.* Therapeutic benefit of extended thymosin β 4 treatment is independent of blood glucose level in mice with diabetic peripheral neuropathy. *Journal of Diabetes Research*, v. 2015, p. 1–13, 2015.

WANG, S. *et al.* Negative Regulation of TRPA1 by AMP-activated Protein Kinase in Primary Sensory Neurons as a Potential Mechanism of Painful Diabetic Neuropathy. *Diabetes*, v. 67, n. 1, p. 98–109, 2018.

WEERASURIYA, A.; MIZISIN, A. P. The Blood-Nerve Barrier: Structure and Functional Significance. *Methods in molecular biology*. [S.l.: s.n.], 2011. v. 686. p. 149–173.

WHO. *Diabetes*. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>>.

WILLIAMSON, J. R. *et al.* Hyperglycemic Pseudohypoxia and Diabetic Complications. *Diabetes*, v. 42, n. June 1993, p. 801–813, 1993.

YAO, L. *et al.* Controlling dispersion of axonal regeneration using a multichannel collagen nerve conduit. *Biomaterials*, v. 31, n. 22, p. 5789–5797, 2010.

YEGIYANTS, S. *et al.* Traumatic peripheral nerve injury: a wartime review. *The Journal of Craniofacial Surgery*, v. 21, n. 4, p. 998–1001, jul. 2010.

ZHANG, H. H. *et al.* Promoted interaction of nuclear factor- κ B with demethylated purinergic P2X3 receptor gene contributes to neuropathic pain in rats with diabetes. *Diabetes*, v. 64, n. 12, p. 4272–4284, 2015.

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

ZHU, T. *et al.* Toll-like receptor 4 and tumor necrosis factor-alpha as diagnostic biomarkers for diabetic peripheral neuropathy. *Neuroscience Letters*, v. 585, p. 28–32, 2015.

ZYCHOWSKA, M. *et al.* Mechanisms and pharmacology of diabetic neuropathy – experimental and clinical studies. *Pharmacological Reports*, v. 65, n. 6, p. 1601–1610, 2013.

ANEXO – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

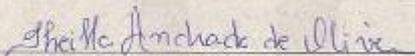
Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DA METFORMINA SOBRE OS PROCESSOS DE NEUROINFLAMAÇÃO, NEURODEGENERAÇÃO E COGNIÇÃO EM MODELO DE ENCEFALOPATIA DIABÉTICA" Protocolado sob nº 81/2015 pela pesquisadora **CHRISTINA ALVES PEIXOTO** Está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 02/02/2016. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até fevereiro de 2020.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Camundongo <i>Swiss webster</i>	242 (machos)
TOTAL	242

We certify that project "AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DA METFORMINA SOBRE OS PROCESSOS DE NEUROINFLAMAÇÃO, NEURODEGENERAÇÃO E COGNIÇÃO EM MODELO DE ENCEFALOPATIA DIABÉTICA" (CEUA Protocol nº 81/2015), coordinated by **CHRISTINA ALVES PEIXOTO** is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz on 02/02/2016. In present version this project is licensed and valid until February 2020.

Recife (PE, BRAZIL) 02 february 2016


 Dr^a Sheilla Andrade de Oliveira
 Coordenadora CEUA/CPqAM
 Dr^a Sheilla Andrade de Oliveira
 Coordenadora da Comissão de Ética
 no Uso de Animais – CEUA
 Mat. SIAPE 1554975
 e-mail: sheilla@cpqam.fiocruz.br
 CPqAM/Fiocruz

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária – Campus da UFPE
 Recife - PE - CEP. 50.670-420
 Telefone: (81) 2101-2500/2101-2500 Fax: (81) 3453-1911