



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

ISABELA RIBEIRO DE SÁ GUIMARÃES NOLÊTO

**EFEITO PROTETOR DA METFORMINA NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR
ALENDRONATO EM RATAS NORMOGLICÊMICAS E HIPERGLICÊMICAS**

TERESINA

2019

ISABELA RIBEIRO DE SÁ GUIMARÃES NOLÊTO

**EFEITO PROTETOR DA METFORMINA NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR
ALENDRONATO EM RATAS NORMOGLICÊMICAS E HIPERGLICÊMICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde/Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para aprovação no mestrado em farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. JAND VENES ROLIM MEDEIROS

**TERESINA
2019**

Universidade Federal do Piauí
Serviço de Processamento Técnico
Biblioteca Setorial do CCS

Nolêto, Isabela Ribeiro de Sá Guimarães.
N786e Efeito protetor da metformina na lesão gástrica induzida por alendronato em ratas normoglicêmicas e hiperglicêmicas / Isabela Ribeiro de Sá Guimarães Nolêto. -- Teresina, 2019.
78 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, 2019.
“Orientação: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros.”
Bibliografia

1. AMPK. 2. Bifosfonatos. 3. Metformina. 4. Úlcera gástrica. I. Título.

CDD 615.7

ISABELA RIBEIRO DE SÁ GUIMARÃES NOLÊTO

**EFEITO PROTETOR DA METFORMINA NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR
ALENDRONATO EM RATAS NORMOGLICÊMICAS E HIPERGLICÊMICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde/Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para aprovação no mestrado em farmacologia.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros
Universidade Federal do Piauí – UFPI (Orientador)

Prof. Dr. José Delano Barreto Marinho Filho
Universidade Federal do Piauí – UFPI

Prof. Dr. Moisés Tolentino Bento da Silva
Universidade Federal do Piauí – UFPI

Aos meus pais, minha fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, sempre presente na minha caminhada, por me proporcionar tantas alegrias e ser luz nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Antônio Taniçon e Izabel, por sempre me apoiarem e me darem forças para crescer cada vez mais, são meus exemplos. Por me ajudarem a superar tantos desafios e, acima de tudo, sempre com amor.

Ao meu amor, Raimundo Acássio, que desde a graduação me apoia, aconselha, incentiva e me acalma nos momentos difíceis. Por todo o amor, carinho e compreensão nos dias em que precisei estar longe.

Aos meus irmãos, Saiure e Juarez, por todo o apoio e sorrisos. Ao Vitor e Larissa, que completam nossas vidas e juntos podemos compartilhar tantos momentos de alegria.

Ao meu orientador professor Dr. Jand Venes Rolim Medeiros, por todos os ensinamentos, conselhos e apoio. E aos meus amigos do LAFIDG, pelo acolhimento, ajuda e troca de conhecimento. Com essa equipe pude chegar mais longe.

À minha turma de mestrado, depois de tantos momentos que passamos juntos, agradeço por terem tornado essa etapa mais leve. Agradeço em especial ao meu grupo, Joselma, Raí e Ingredy, no qual os laços se expandiram além da sala de aula.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – PPGFARM/UFPI e à CAPES por todo o suporte e aos membros da banca, professor Dr. José Delano Barreto Marinho Filho e professor Dr. Moisés Tolentino Bento da Silva, por aceitarem o convite e fornecerem suas riquíssimas considerações.

Que corpo é esse que já não se aguenta?

Que resiste ao limiar

Que desaba sobre si

Músculos e ossos

Poros e narinas

Olhos e joelhos

Seios, costas, cataratas

Suas torres de vigia

Que corpo é esse?

Que pulsa, escuta,

Expulsa, abraça

Comporta, contém

O corpo ocupa!

O corpo não é culpa

O corpo, a culpa, o espaço

Que corpo é esse?

Que corpo é esse?

Que protege, reage

Que é origem e passagem

Que corpo é esse que já não se aguenta?

Que se esgota

E não se resgata

Aqui

Por enquanto

É tudo ainda!

Fernando Anitelli

RESUMO

O alendronato (ALD) é um bifosfonato amplamente utilizado no tratamento da osteoporose, contudo apresenta algumas reações adversas, dentre elas o surgimento da úlcera gástrica. Em contrapartida, a metformina (MET) apresenta diversos efeitos benéficos ao organismo, além de ser utilizada na clínica para controle de níveis glicêmicos em pacientes diabéticos, pode também favorecer a cicatrização de feridas epiteliais, por exemplo. O objetivo do estudo foi investigar o efeito gastroprotetor da MET em lesões gástricas induzidas por ALD em ratas normoglicêmicas e hiperglicêmicas. Para isso ratas foram divididas em controle negativo (solução fisiológica, SF 0,9%, v.o); controle positivo (SF 0,9% + ALD 50mg/Kg, v.o), três grupos com MET (MET 10, 30 ou 100mg + ALD 50mg/Kg, v.o), um grupo com inibidor de AMPK (Comp C 1,2mg/Kg + MET 100mg/Kg + ALD 50mg/Kg, v.o), controle negativo diabético (SF 0,9%, v.o), controle positivo diabético (SF 0,9% + ALD 50mg/Kg, v.o) e diabético na melhor dose (MET 100mg/Kg + ALD 50mg/Kg, v.o). O diabetes foi induzido com estreptozotocina (STZ), 130mg/Kg, intraperitoneal, dose única. Os pré-tratamentos foram realizados diariamente durante sete dias e a lesão gástrica foi induzida com ALD 50mg/Kg diariamente, durante quatro dias. Observou-se que a dose de MET 100mg/Kg apresentou melhores resultados que as demais testadas, sendo então selecionada para a execução dos protocolos posteriores. A MET desempenhou efeito gastroprotetor significativo em ensaios de lesão gástrica, tanto em análise macroscópica como microscopia de luz e de força atômica. A MET foi capaz de suprimir fatores ligados à inflamação, como a expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e diminuição dos níveis de MPO, além da redução dos níveis de MDA. Também foi observado manutenção dos níveis basais de colágeno na mucosa gástrica e seu potencial de estímulo à secreção de muco gástrico. Pode-se observar comprometimento da ação gastroprotetora da MET no grupo com a presença de inibidor de AMPK, sugerindo a participação dessa via na sua ação gastroprotetora. Conclui-se que a MET apresenta efeitos tanto de diminuição da resposta inflamatória como proteção mecânica, com o estímulo à produção de muco, o que sugere sua potencial gastroproteção contra lesão por ALD.

Palavras-chave: AMPK; bifosfonatos; metformina; úlcera gástrica.

ABSTRACT

Alendronate (ALD) is a bisphosphonate widely used in the treatment of osteoporosis, but it has some adverse reactions, among them the appearance of gastric ulcer. In contrast, metformin (MET) has several beneficial effects on the organism, besides being used clinically to control glycemic levels in diabetic patients, it may also favor the healing of epithelial wounds, for example. The aim of the study was to investigate the gastroprotective effect of MET on gastric lesions induced by ALD in normoglycemic and hyperglycemic rats. For this, rats were divided into negative control (physiological solution, SF 0.9%, p.o); positive control (SF 0.9% + ALD 50mg / kg, p.o), three groups with MET (MET 10, 30 or 100mg + ALD 50mg / kg, p.o), one group with AMPK inhibitor (Comp C 1.2mg / kg + MET 100mg / kg + ALD 50mg / kg, p.o), diabetic negative control (SF 0.9%, p.o), diabetic positive control (SF 0.9% + ALD 50mg / kg, p.o) and diabetic at the best dose (MET 100mg / kg + ALD 50mg / kg, p.o). Diabetes was induced with streptozotocin (STZ), 130mg / kg, intraperitoneal, single dose. The pre-treatments were performed daily for seven days and the gastric lesion was induced with ALD 50mg / kg daily for four days. It was observed that the dose of MET 100mg / kg presented better results than the others tested, being then selected for the execution of the subsequent protocols. MET had a significant gastroprotective effect in gastric lesion assays, both in macroscopic analysis and in light and atomic force microscopy. MET was able to suppress inflammatory factors such as the expression of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) and decreased MPO levels, in addition to the reduction of MDA levels. Maintenance of basal collagen levels in the gastric mucosa and its potential to stimulate the secretion of gastric mucus were also observed. It can be observed compromised gastroprotective action of MET in the group with the presence of AMPK inhibitor, suggesting the participation of this pathway in its gastroprotective action. It is concluded that MET has effects both of decreased inflammatory response and mechanical protection, with the stimulation of mucus production, which suggests its potential gastroprotection against AML lesion.

Keywords: AMPK; bisphosphonates ; gastric ulcer; metformin.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 - ANATOMIA DO ESTÔMAGO..... | 19 |
| FIGURA 2 - ANATOMIA DA MUCOSA GÁSTRICA..... | 20 |
| FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DA METFORMINA, C ₄ H ₁₁ N ₅ | 27 |
| FIGURA 4 - PAPEL DO AMPK NO CONTROLE DO METABOLISMO ENERGÉTICO DO CORPO..... | 29 |
| FIGURA 5 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA PRIMEIRA E SEGUNDA ETAPA DO ESTUDO..... | 36 |
| FIGURA 6 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA TERCEIRA ETAPA DO ESTUDO..... | 40 |
| FIGURA 7 - EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM MET NO DANO GÁSTRICO INDUZIDO POR ALD EM RATAS NORMOGLICÊMICAS..... | 41 |
| FIGURA 8 - EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM MET NO DANO GÁSTRICO INDUZIDO POR ALD EM RATAS HIPERGLICÊMICAS..... | 42 |
| FIGURA 9 - ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ALD EM RATAS NORMOGLICÊMICAS..... | 44 |
| FIGURA 10 - ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS DA MET EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ALD EM RATAS NORMOGLICÊMICAS.. | 45 |
| FIGURA 11 - ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS DA MET EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ALD EM RATAS HIPERGLICÊMICAS..... | 46 |
| FIGURA 12 - MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM) DO EFEITO PROTETOR DA MET NO DANO GÁSTRICO INDUZIDO POR ALD EM RATAS NORMOGLICÊMICAS | 48 |
| FIGURA 13 - EFEITO DA MET NOS NÍVEIS DE MDA DA MUCOSA GÁSTRICA DE RATAS NORMOGLICÊMICAS COM LESÃO INDUZIDA POR ALD..... | 49 |
| FIGURA 14 - AÇÃO DA MET NA ATIVIDADE DA MPO NA LESÃO INDUZIDA POR ALD DA MUCOSA GÁSTRICA DE RATAS NORMOGLICÊMICAS..... | 50 |
| FIGURA 15 - EFEITO DA MET NOS NÍVEIS DE COLÁGENO DA MUCOSA GÁSTRICA DE RATAS NORMOGLICÊMICAS TRATADAS COM ALD..... | 51 |
| FIGURA 16 - EFEITO DA MET NA EXPRESSÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM ESTÔMAGOS DE RATAS NORMOGLICÊMICAS TRATADAS COM ALD | 52 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 17 - EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM MET NA GASTROPROTEÇÃO ATRAVÉS DA QUANTIFICAÇÃO DE MUCO NO ESTÔMAGO DE RATAS NORMOGLICÊMICAS COM LESÕES INDUZIDAS POR ALD..... | 53 |
| FIGURA 18 - RESUMO GRÁFICO DO EFEITO DA METFORMINA NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ALENDRONATO..... | 60 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 -COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS PARA O PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE DM..... | 34 |
| TABELA 2 – MICROSCOPIA DO EFEITO PROTETOR DA MET NO DANO GÁSTRICO INDUZIDO POR ALD..... | 47 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP – Adenosina Difosfato
- AFM - Microscopia de Força Atômica
- AINEs - Anti-Inflamatórios Não Esteroidais
- ALD - Alendronato
- AMP – Adenosina Monofosfato
- AMPK - Proteína Cinase Ativada Por Adenosina Monofosfato
- ANOVA – Análise de Variância
- ATP – Adenosina Trifosfato
- AVE - Acidente Vascular Encefálico
- BSA – Soro Fetal Bovino
- CaMkkb - Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase- β
- CN – Controle negativo
- CNH – Controle Negativo Hiperglicêmico
- CompC – Composto C
- COX - cicloxigenase
- CP – Controle Positivo
- CPH – Controle Positivo Hiperglicêmico
- DCNT - Doenças Crônicas Não Transmissíveis
- DM - Diabetes *Mellitus*
- ELISA – Ensaio de Imunoabsorbância Ligado a Enzima
- HCl - Ácido Clorídrico
- HTAB - hexadecitrimetilamônio
- IBPs - Inibidores da Bomba de Prótons
- IDF - Federação Internacional de Diabetes
- IL 1 β – Interleucina 1 Beta
- Il 6 - Interleucina 6
- Il 8 – Interleucina 8
- LEC - Líquido Extracelular
- LKB1 – Liver Kinase B 1
- MDA - Malondialdeído
- MET – Metformina
- MET10 – Metformina na dose 10mg/Kg
- MET100 – Metformina na dose 100mg/Kg
- MET30 – Metformina na dose 30mg/Kg
- METmd - Metformina na melhor dose
- METmdH – Metformina na melhor dose Hiperglicêmico
- MPO - Mieloperoxidase
- NF- κ B – *Factor Nuclear Kappa B*
- Nrf2 - *Nuclear Factor Erythroid 2*
- OPD - o-fenileno-diamina

- PGs - prostaglandinas
- Rpm – Rotações Por Minuto
- SF – Solução Fisiológica
- STZ - Estreptozotocina
- SUS – Sistema Único de Saúde
- TGI – Trato Gastrointestinal
- Thr172 - Resíduo De Treonina
- TNF α – Fator de Necrose Tumoral alfa
- US - Estados Unidos
- VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 2.1 FISIOLOGIA DO TRATO GASTROINTESTINAL | 18 |
| 2.2 FISIOPATOLOGIA DA ÚLCERA GÁSTRICA | 21 |
| 2.2.1 Alendronato | 23 |
| 2.3 DIABETES MELLITUS | 25 |
| 2.3.1 Metformina | 26 |
| 2.4 PROTEÍNA CINASE ATIVADA POR ADENOSINA MONOFOSFATO (AMPK) | 28 |
| 2.4.1 Possível papel de AMPK no efeito gastroprotetor da metformina | 30 |
| 3 OBJETIVOS | 32 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 32 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 32 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 33 |
| 4.1 MATERIAIS | 33 |
| 4.2 ANIMAIS | 33 |
| 4.3 EFEITO GASTROPROTETOR DA METFORMINA NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ALENDRONATO | 33 |
| 4.3.1 Análise histopatológica das lesões gástricas | 37 |
| 4.3.2 Análise histológica por microscopia de força atômica (AFM) da mucosa gástrica | 37 |
| 4.4 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS A PARTIR DA MUCOSA GÁSTRICA DE RATAS | 37 |
| 4.4.1 Dosagem de malondialdeído (MDA) | 37 |
| 4.4.2 Atividade de mieloperoxidase (MPO) | 38 |
| 4.5 DOSAGEM DE COLÁGENO TECIDUAL | 38 |
| 4.6 MENSURAÇÃO DE CITOCINAS | 39 |
| 4.7 DETERMINAÇÃO DE MUCO GÁSTRICO | 39 |
| 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 40 |
| 5 RESULTADOS | 41 |
| 5.1 EFEITO DA METFORMINA DO DANO GÁSTRICO INDUZIDO POR ALENDRONATO | 41 |
| 5.2 NÍVEIS DE MDA | 48 |
| 5.3 ATIVIDADE DA MPO NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ALD | 49 |
| 5.4 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DA MET NA DEGRADAÇÃO DE COLÁGENO DA MUCOSA GÁSTRICA CAUSADA POR ALD | 50 |
| 5.5 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DA MET NOS NÍVEIS DE CITOCINAS (TNF- α , IL-1 β , IL-6 E IL-8) DURANTE A LESÃO GÁSTRICA CAUSADA POR ALD | 51 |

| | |
|---|----|
| 5.6 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DA MET PELA DETERMINAÇÃO DE MUCO GÁSTRICO NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ALD | 53 |
| 6 DISCUSSÃO | 54 |
| 7 CONCLUSÃO | 61 |
| REFERÊNCIAS | 62 |
| ANEXO A | 72 |
| ANEXO B | 74 |
| APÊNDICE A | 76 |

1 INTRODUÇÃO

Cresce cada vez mais o consumo de fármacos pela população mundial e para diversos fins o homem manipula substâncias a fim de gerar um efeito no organismo, mas muitas vezes os efeitos desejados são acompanhados dos indesejados (que podem levar ao óbito e/ou hospitalização) (SANTOS; BOING, 2018).

O trato gastrointestinal (TGI) é comumente utilizado como porta de entrada para a maioria dos fármacos, sendo a via oral a mais escolhida mundialmente, tendo em vista que se caracteriza por ser uma via de fácil administração, segura e autoaplicável (SILVA *et al.*, 2017). Como consequência, quando deglutidos, esses fármacos depositam-se no estômago, assim a mucosa gástrica torna-se exposta às diversas substâncias de cunho alimentar ou terapêutico, todas elas exercendo um efeito que pode favorecer ou prejudicar a integridade da mucosa (SILVOSO, 1979; JUSTINA *et al.*, 2016).

Atualmente os maiores agressores da integridade da superfície interna do estômago são medicamentos de uso crônico ou utilizados de forma indiscriminada, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), além de outros agressores como o etanol e a bactéria *Helicobacter pylori*, que por diversos mecanismos danificam a camada protetora de muco e lesionam a parede estomacal (SILVOSO, 1979; ALZHRANI *et al.*, 2014; JUSTINA *et al.*, 2016).

A população idosa destaca-se pelo grande consumo de fármacos, devido a problemas de saúde crônicos ou agudos que vão aumentando a incidência e prevalência com o passar da idade. Como consequência os idosos fazem uso de diversas medicações simultaneamente, a maioria delas administradas por via oral, o que aumenta a exposição do TGI e, conseqüentemente o surgimento de reações adversas (LOPES *et al.*, 2015).

Além disso, o avançar da idade também está diretamente relacionado com o surgimento de problemas ósseos, como a osteoporose e ocorrências de fraturas, para isso a população idosa faz uso de medicamentos para tratar ou prevenir esses problemas. Os bifosfonatos são bastante utilizados nessa questão, destacando o uso do alendronato (ALD), adotado como umas das principais condutas para o tratamento da osteoporose. Porém muitos são seus efeitos adversos, sendo um dos

principais a irritação do TGI, como consequência mais frequente sangramentos e ulcerações da mucosa gástrica (ADACHI *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2017).

Outro fator que proporciona o surgimento de diversos problemas de saúde é a não adoção de hábitos de vida saudáveis, com isso, uma doença crônica bastante observada na população adulta e idosa é o Diabetes *Mellitus* (DM). Além de mudanças alimentares e prática de exercício físico, a metformina (MET) é o fármaco convencionalmente utilizado para controle dos índices glicêmicos, principalmente em pacientes com DM tipo 2. Esse fármaco apresenta diversos benefícios, além de controlar os índices glicêmicos, sua ação já foi comprovada em alguns estudos como facilitador do tratamento de pacientes com síndrome dos ovários policísticos, por exemplo (VIOLLET *et al.*, 2012; BRASIL, 2013).

Outros estudos têm buscado investigar a ação da MET na gastroproteção, comprovando sua ação na prevenção de úlceras gástricas induzidas em ratos diabéticos. Também foi mostrado que esse fármaco possui mecanismo envolvido com a ativação da enzima “proteína cinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK)” na gastroproteção (BARAKA; DIEF, 2011; HARDIE, 2015; HARDIE, 2016).

Porém, são escassos os estudos que avaliaram simultaneamente diversos parâmetros envolvidos na gastroproteção da MET, como a avaliação da superfície da mucosa utilizando microscopia de força atômica (AFM) em conjunto com análise da produção de muco, expressão de citocinas pró-inflamatórias e estudo das vias de atuação, por exemplo. E, principalmente, são escassos os estudos que avaliaram a gastroproteção de substâncias contra a lesão gástrica causada por ALD.

Considerando que a população idosa faz uso de múltiplos medicamentos, de forma simultânea, e que problemas ósseos e DM são problemas de saúde comuns nessa população. O presente trabalho mostra-se de extrema relevância para a investigação da ação da metformina na gastroproteção de úlceras induzidas por alendronato em ratas normoglicêmicas e hiperglicêmicas, uma vez que a MET é utilizada comumente para controle dos índices glicêmicos considera-se importante avaliar seu efeito tanto no organismo diabético como não. Destaca-se também a relevância de investigar o papel da MET sobre diversos parâmetros que envolvem gastroproteção.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FISIOLOGIA DO TRATO GASTROINTESTINAL

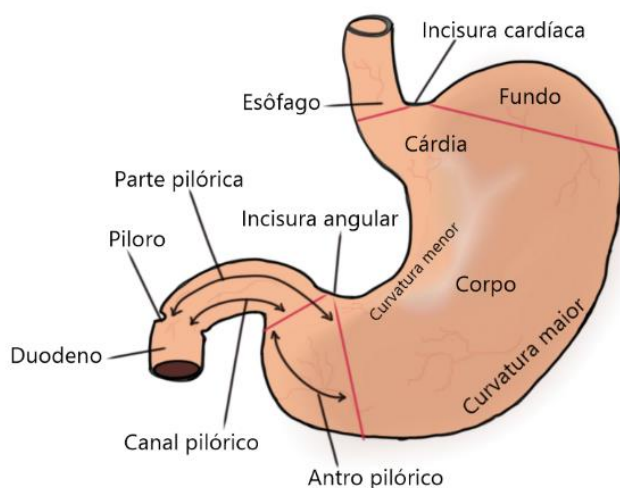
A principal função do TGI é conduzir nutrientes, água e eletrólitos do meio externo para o corpo. O que é ingerido deve sofrer processos para tornar-se absorvível pelo organismo, assim, de forma geral, a atividade do TGI é dividida em quatro fases: digestão, que é a transformação dos alimentos em unidades menores; absorção, que é o transporte de substâncias do lúmen para o líquido extracelular (LEC); motilidade, constituindo-se pelo movimento do que está sendo digerido ao longo do TGI; e secreção, que consiste na transferência de água e íons do LEC para o lúmen entre os epitélios do TGI e liberação das substâncias sintetizadas pelas células epiteliais ali presentes (VAN DE GRAAFF, 1986).

Para desempenhar suas atividades, vários órgãos fazem parte de sua composição, para tanto o TGI é composto por diversas partes: boca, faringe, esôfago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, reto e ânus. E cada parte tem sua função específica. As funções secretoras do TGI são estimuladas, em sua maioria, pela presença do conteúdo ingerido, e cada tipo de alimento, em contato com o epitélio, vai gerar um estímulo secretor diferente, através dos estímulos nervosos entéricos. Assim, existem diversos tipos de glândulas para produzir os diferentes tipos de secreções encontradas no TGI. Os tipos de estímulos que ativam o sistema nervoso entérico podem ser táteis, por irritação química ou distensão das paredes do trato, aumentando, assim, a secreção (VAN DE GRAAFF, 1986).

A estimulação parassimpática também é responsável pelo aumento das secreções no TGI, como das glândulas salivares, esofágicas, gástricas, pancreáticas e glândulas de Brunner no duodeno. Já a estimulação simpática pode estimular levemente o aumento da secreção, contudo, se as estimulações parassimpática ou hormonal já estiverem presentes, a ação conjunta da estimulação simpática irá reduzir a secreção, devido, principalmente à vasoconstrição. Os hormônios gastrointestinais regulam o volume e as características químicas das secreções liberadas pela mucosa no estômago e intestino, com isso, aumentam a produção de suco gástrico e pancreático quando algo ingerido entra no estômago ou duodeno (VAN DE GRAAFF, 1986; PRINZ *et al.*, 1992; PRINZ *et al.*, 1993).

O estômago, órgão oco, composto por musculatura lisa, em forma de anzol ou “J”, situa-se na parte superior esquerda da cavidade abdominal, por baixo do diafragma, e possui uma parte superior, canal que comunica o esôfago com a cárdia; o fundo, porção em forma de abóboda que habitualmente contém gases; o corpo, parte volumosa disposta verticalmente; e o antro, parte inferior disposta horizontalmente, que é finalizada no piloro, comunicando-se ao duodeno (Figura 1) (SARMENTO, 1894; JACKSON, 1949). Seu interior é composto por pregas mucosas, com glândulas secretoras, que secretam muco, bicarbonato de sódio e ácido clorídrico (BROWN *et al.*, 1993).

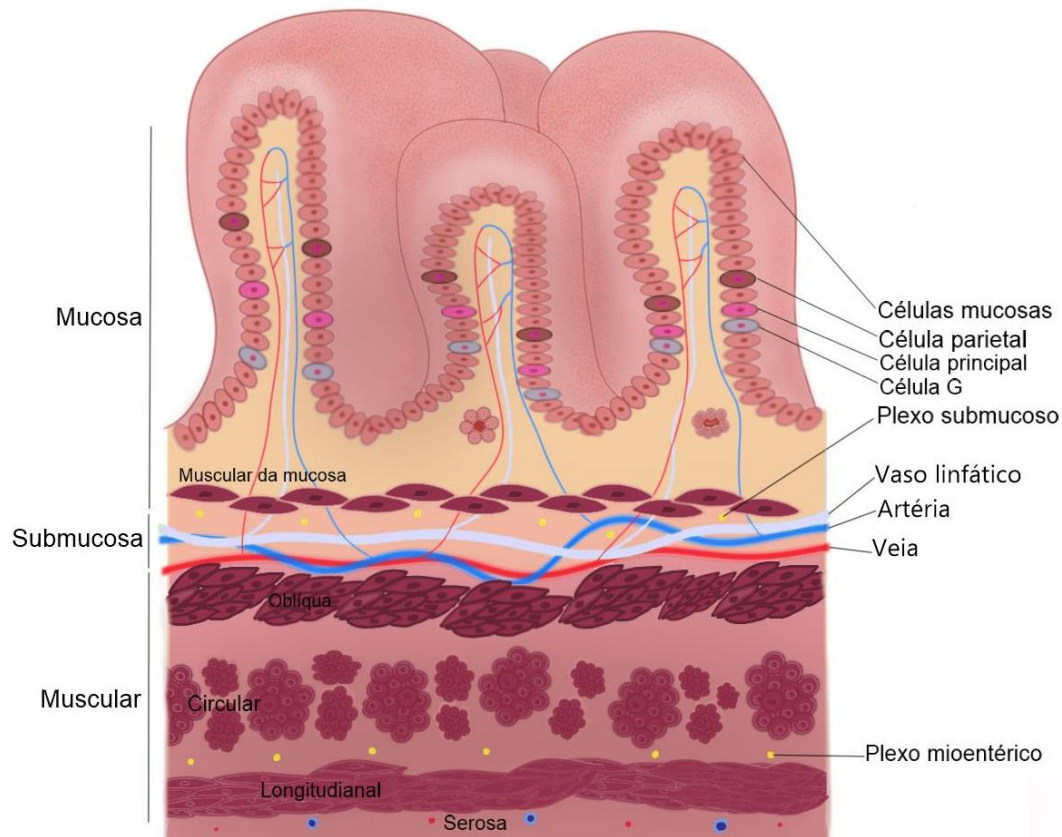
Figura 1 - Anatomia do estômago



Fonte: Autoria própria (2019)

A mucosa gástrica possui constituição celular diferenciada de acordo com a região do estômago. Na parte mais superficial da mucosa pode-se observar a presença de células mucosas superficiais, que liberam muco (BI; KAUNITZ, 2003). Já o corpo e no fundo do estômago possuem a predominância de células parietais (oxínticas, secretoras de ácido clorídrico - HCl), células principais (secretoras de pepsinogênio), células secretoras de somatostatina e células enterocromafins (liberam histamina). O antro é composto pela mucosa pilórica e possui células G, que secretam gastrina (LUCY; YAMADA, 1989; SCHUBERT, 2005) (Figura 2).

Figura 2 - Anatomia da mucosa gástrica



Fonte: Autoria própria (2019)

O muco é espesso e composto por água, eletrólitos e glicoproteínas. Tem a função de lubrificar e proteger a mucosa do TGI, principalmente no estômago. O mesmo é o órgão do sistema digestivo que mais sofre agressão ácida, suas glicoproteínas tamponam pequenas quantidades de ácidos ou bases, e os íons de bicarbonato neutralizam os ácidos (DEKKER *et al.*, 1988).

O ácido clorídrico e a pepsina, secretados pela mucosa gástrica, são seus principais agressores. Em contrapartida, o organismo oferece proteção natural contra tais agentes. Os principais fatores de proteção estão relacionados com a existência de uma camada intacta de células epiteliais gástricas com junções estreitas intercelulares, além da rápida recuperação desta camada após sofrer agressão; há também uma camada protetora de mucina e há a ocorrência de liberação de íons bicarbonato, que juntos contribuem para a diminuição da ação de íons H^+ . Além desses fatores reparadores, há a presença de fatores de crescimento, fatores angiogênicos e prostaglandinas (ROSS; TURNBERG, 1983; BRUNTON, 2010).

Com essas propriedades, o muco protege as paredes gástricas de diversos fatores agressores, como bactérias, AINEs e consumo de etanol. A úlcera gástrica surge quando ocorre um desequilíbrio entre os agentes agressores e os agentes protetores, assim o organismo não consegue reparar as lesões (JUSTINA *et al.*, 2016).

2.2 FISIOPATOLOGIA DA ÚLCERA GÁSTRICA

Estima-se que no período de 2005 a 2015 a incidência e prevalência global de pacientes com úlcera gástrica tenha aumentado em torno de 4,8% (VOS *et al.*, 2015). Já no Brasil, apenas em 2008 estimativas sugeriram que ocorreram 5.714 óbitos em decorrência de úlcera gástrica (OLIVEIRA *et al.*, 2015) e, segundo dados mais atuais do DATASUS, com relação à morbidade hospitalar do Sistema Único de Saúde (SUS), por local de internação no Brasil, apenas no período de janeiro a novembro de 2018 foram registradas 10.692.445 internações devido à úlcera gástrica e duodenal, nas cinco regiões do país. A região Sudeste apresentou o maior número de internações, 4.246.368, já a região Nordeste ocupou a segunda posição, com 2.844.307 internações, e a região Sul obteve o terceiro maior número de internações, com 1.919.639 registros (BRASIL, 2019).

A úlcera péptica é uma doença crônica multifatorial que acomete frequentemente estômago e/ou duodeno, e caracteriza-se pelo surgimento de ulceração da mucosa. Contudo, afeta principalmente as mucosas gástrica e duodenal (JUSTINA *et al.*, 2016; CARSWELL, 1830). Um dos principais agentes etiológicos da úlcera péptica é a bactéria *Helicobacter pylori* (SOSTRES *et al.*, 2015; MARSHALL; WARREN, 1984), além dela, o consumo indiscriminado de AINEs e ácido acetilsalicílico (ASS) também têm papel importante na fisiopatologia dessa doença (SILVOSO, 1979; JUSTINA *et al.*, 2016).

A *H. pylori* é uma bactéria gram negativa que possui forma espiralada e coloniza de forma seletiva o epitélio gástrico e chega a afetar mais da metade da população mundial (MARSHALL; WARREN, 1984; HOOI *et al.*, 2017). A patogênese dessa bactéria depende diretamente das respostas que o epitélio gástrico dá a sua presença. Assim, em muitos indivíduos a *H. pylori* pode causar ulceração da mucosa ou neoplasia, isso também depende de vários aspectos relacionados à bactéria, como sua capacidade de afetar a distribuição das junções epiteliais, a ocorrência de

dano no DNA e outra série de manifestações que afetam as células da mucosa gástrica. Esse microrganismo tem a capacidade de ativar mecanismos de sinalização ou obter acesso ao epitélio por meio de fatores de virulência solúveis (ALZHRANI *et al.*, 2014; SIGAL *et al.*, 2015).

Com relação à influência medicamentosa no surgimento de úlceras gástricas, destaca-se que o abuso medicamentoso também está relacionado com essa patologia, principalmente na população idosa, pelo fato desta consumir grandes quantidades de diversos medicamentos para tratar uma ou mais patologias (a chamada polifarmácia) (JUSTINA *et al.*, 2016). Como evidencia o estudo brasileiro de Ramos e colaboradores (2016) no qual de uma amostra probabilística nacional com $n = 41.433$ idosos, 93% faziam uso crônico de pelo menos um medicamento e 18% da amostra total fazia uso de pelo menos cinco medicamentos.

Se encaixam nesse contexto os AINEs, prescritos ou não que são amplamente utilizados por atuarem contra dor, febre e inflamação, eles atuam por meio do bloqueio das enzimas ciclooxigenases (COX), inibindo a ação das prostaglandinas (PGs), estas por sua vez estão associadas com a manutenção de funções vitais para o organismo, como na produção de muco e ativação do tromboxano A₂ na cascata de coagulação (VANE; BOTTING, 1996). Com isso, o uso indiscriminado de AINEs está fortemente relacionado com a ocorrência de efeitos adversos que atingem a mucosa gástrica e possibilitam o desenvolvimento de úlceras (CARLI *et al.*, 2014).

Já o etilismo contribui para a formação de úlceras gástricas por exercer uma ação agressora na mucosa gástrica, ocasionando hemorragias, lesões necróticas e ulcerações, que favorecem a peroxidação lipídica e formação de radicais livres, promovendo assim o estresse oxidativo. Assim, o uso excessivo de álcool produz prolongados momentos de instabilidade, não favorecendo a recuperação da mucosa e proporcionando quadros de ulceração (ANTONISAMY *et al.*, 2014; CHAUHAN; KANG, 2015).

Em contrapartida às diversas causas do surgimento de lesão gástrica também são vastas as formas de tratamento, aplicando-se desde a terapêutica farmacológica até procedimentos cirúrgicos. A terapêutica farmacológica pode ser por meio de fármacos que buscam reduzir a produção ou ação do suco gástrico (antiácidos, antagonistas dos receptores H₂ ou inibidores da bomba de prótons-

IBPs); fármacos protetores da mucosa (como o quelato de bismuto, o sucralfato e o misoprostol, sendo este último contra indicado durante a gravidez, por proporcionar a ocorrência de aborto); e fármacos para erradicar a bactéria *H. pylori* (antimicrobianos, como o metronidazol, claritromicina ou amoxicilina) em conjunto com IBP ou antagonistas dos receptores H2. Já o tratamento cirúrgico é utilizado como último recurso, sendo indicado em casos de doença refratária ao tratamento farmacológico ou em casos de ocorrência de complicações (SHIN; SACHS, 2008; FISCHBACH *et al.*, 2009; ROHDE; OSVALDT, 2011; SACHS; SCOTT, 2012).

Essa doença pode ocasionar várias complicações, como a ocorrência de hemorragia digestiva, que ocorre em até 80% dos casos de pacientes que fizeram uso prévio e prolongado de AINEs. Contudo, outros tipos de complicações são bastante comuns, como a ocorrência de perfuração ou obstrução de órgão oco, fibrose e estenose da região afetada. Quando é feito tratamento cirúrgico da úlcera gástrica também há possibilidade do surgimento de novas complicações, como gastrite por afluxo de bile, diarreia pós-vagotomia, anemia, má absorção, osteomalacia e osteoporose, obstrução da alça aferente, síndrome de *dumping* e desenvolvimento de carcinoma no resíduo gástrico (BRUZZI *et al.*, 2015).

Como descrito no estudo de Diogo Filho *et al* (2016) o desenvolvimento de câncer gástrico após cirurgia para tratamento de úlcera gástrica pode ser relatado em vários casos de pacientes que foram submetidos a gastrectomia parcial à Billroth II e após pouco mais de duas décadas foram diagnosticados com adenocarcinoma, sendo submetidos à gastrectomia total, casos que não apresentaram bom prognóstico levando a óbito durante período de pós-operatório tardio. Tal complicação pode ser reforçada no estudo de Lagergren; Lindam e Mason (2012) que também identificaram grande taxa de desenvolvimento de câncer gástrico após gastrectomia para tratamento de lesões gástricas. Tais fatos sugerem a busca de novos tratamentos para tal problema, a fim de evitar maiores complicações.

2.2.1 Alendronato

Ao passo que novas formas de tratamento para lesão gástrica são estudadas existem também outros agentes agressores à mucosa que merecem destaque, como é o caso do alendronato. O alendronato sódico é utilizado na prática clínica para prevenção, alívio ou tratamento de doenças ósseas, como osteoporose,

osteopenia e lesões ósseas metastáticas. Caracteriza-se como um bifosfonato que ocupa um papel de inibidor específico da reabsorção óssea pelos osteoclastos. Especificamente, o ALD não interfere no recrutamento ou fixação dos osteoclastos, sua atuação inibe a atividade destes (KAVANAGH *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2017).

Indicado principalmente para o tratamento de osteoporose, em destaque a população idosa, que é a mais acometida por essa patologia, para prevenir fraturas, o ALD assim como outros bifosfonatos apresenta vários benefícios comprovados, como o aumento da densidade mineral óssea e diminuição de complicações pós-cirúrgicas em pacientes submetidos à artroplastia (ADACHI *et al.*, 2001). Contudo, seu uso prolongado pode acarretar no surgimento de diversas complicações como sangramento gastrointestinal superior e inferior (PENG *et al.*, 2014); ocorrência de osteonecrose maxilar (FERREIRA *et al.*, 2017); dispepsia, disfagia, úlcera esofágica e úlcera gastroduodenal (COSTA *et al.*, 2013; NICOLAU *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014; IVERNIZZI; CISARI; CARDA, 2015).

Com relação às úlceras gástricas, o ALD possibilita o surgimento dessa patologia devido a sua ação na mucosa gástrica, levando a alterações caracterizadas por perda de células epiteliais, recrutamento de células inflamatórias, formação de edema e hemorragia intensa. A presença do ALD no TGI também provoca a redução de formação de nitrato e nitrito, metabólitos do óxido nítrico (NO), essencial para a gastroproteção contra esse fármaco (SILVA *et al.*, 2014).

Pesquisas já demonstraram diversos mecanismos envolvidos na gastroproteção contra úlcera induzida por ALD, dentre eles doadores de NO, doadores de sulfeto de hidrogênio (H₂S), diminuição do estresse oxidativo, redução do recrutamento de neutrófilos e ativação da guanilil ciclase solúvel (COSTA *et al.*, 2013; NICOLAU *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2016). Contudo esse problema deve ser amplamente explorado, considerando que o ALD é um fármaco utilizado principalmente pela população idosa, que faz uso de polifarmácia, aumentando assim os riscos de reações indesejáveis que comprometerão a qualidade de vida (COSTA *et al.*, 2013; NICOLAU *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014; IVERNIZZI; CISARI; CARDA, 2015).

2.3 DIABETES MELLITUS

Somado aos problemas ósseos existem outros agravos crônicos não transmissíveis que acometem a população idosa. As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são causadas por vários fatores que se desenvolvem no decorrer da vida. Elas são consideradas um grave problema de saúde pública, e são responsáveis por milhares de mortes a cada ano. O Diabetes *Mellitus* (DM) é uma DCNT que afeta milhões de pessoas no mundo. Hoje, em decorrência do aumento da expectativa de vida, globalização e adoção de péssimos hábitos de vida houve um crescimento da incidência dessa doença na população mundial (BRASIL, 2013; WHO, 2016)

A Federação Internacional de Diabetes (IDF) afirma que, em 2015, um em cada 11 adultos tinham diabetes, o que correspondia a 415 milhões de pessoas no mundo (sendo que metade ainda não diagnosticada). Já no Brasil, no mesmo ano, havia 14,3 milhões de pessoas com diabetes, correspondendo a 9,4% da população brasileira, sendo que 30.900 crianças, de zero a 14 anos, apresentavam diabetes tipo 1, o que causou, ao país, 130.700 mortes e totalizou um gasto de 21,8 bilhões de dólares no ano do estudo. Destaca-se que apenas para o referido país estima-se que em 2040 sejam registrados 23,3 milhões de casos de pessoas com DM.

Dados do Centro Nacional de Prevenção de Doenças Crônicas e Promoção da Saúde dos Estados Unidos (US) estimam que em 2015 30,3 milhões de pessoas no país possuíam diabetes, sendo que em 25,2% dos casos as pessoas possuíam 65 anos ou mais de idade (CDC, 2017).

O DM é caracterizado por quadros de hiperglicemia, que podem ocorrer devido a defeitos na secreção ou ação da insulina (hormônio produzido no pâncreas pelas glândulas beta). Isso ocorre, pois, a função desse hormônio é promover a entrada de glicose para as células do organismo, para então ser utilizada em diversas atividades. Quando a insulina não se liga corretamente ao seu receptor nas células, ocorre o aumento da concentração de glicose no sangue (hiperglicemia) (SBEM, 2016; WHO, 2016).

Classifica-se o DM em tipo 1 e tipo 2. O diabetes tipo 1, em geral, manifesta-se de forma brusca, principalmente em crianças e adolescentes sem excesso de peso. Ocorre por conta da destruição da célula beta, decorrente de um processo autoimune, isso gera deficiência absoluta de insulina. Esse processo

ocorre principalmente em crianças de 10 a 14 anos, contudo pode ocorrer em outras faixas etárias (BRASIL, 2013; WHO, 2016; CDC, 2017).

Já o DM tipo 2 ocorre de forma insidiosa e tem sintomas mais brandos. Acomete em geral adultos que adotam péssimos hábitos de vida, que geralmente são obesos, e que tem história familiar da referida doença. Destaca-se que esse tipo não se restringe apenas a adultos, o sedentarismo e falta de alimentação saudável tem levado um grande número de crianças e adolescentes a adquiri-la. Nesse caso, há deficiência relativa de insulina (BRASIL, 2013; WHO, 2016; CDC, 2017).

Além desses dois tipos, há ainda, o diabetes gestacional, diagnosticado pela primeira vez durante a gestação, podendo ou não persistir após o parto. Sendo assim, mulheres que apresentam diabetes gestacional devem ser acompanhadas e monitoradas, visando controle e aderência aos tratamentos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

O DM, quando não controlado, pode gerar diversas complicações, que podem até levar à morte. As principais complicações são: doenças cardiovasculares, como riscos de ataque cardíaco e acidente vascular encefálico (AVE); neuropatias; nefropatias, retinopatias, podendo levar à cegueira, e danos nos pés (pé diabético) (MAYO CLINIC, 2018).

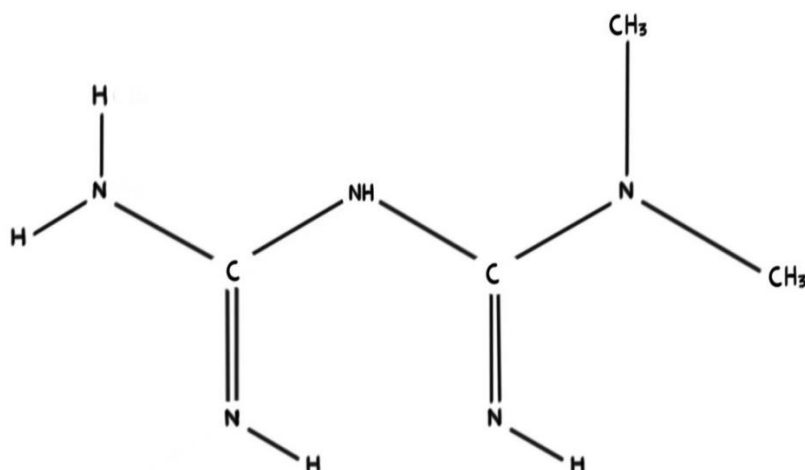
Essa doença vem se destacando devido ao aumento de sua prevalência e está comumente associada à dislipidemia, à hipertensão arterial e à disfunção endotelial. Evidências comprovam que o correto manejo desse problema ainda na atenção básica, da prescrição e orientação dos pacientes a respeito do uso de medicações e mudanças nos hábitos de vida, evita fortemente às hospitalizações decorrentes de diabetes, consequentemente diminui drasticamente as mortes por complicações cardiovasculares e cerebrovasculares (CDC, 2017).

2.3.1 Metformina

A metformina (1, 1-dimetilbiguanida) (SCHEEN, 1996) (Figura 3) é um agente anti-hiperglicêmico da classe das biguanidas, utilizado amplamente em todo o mundo como droga de primeira escolha em pacientes com DM tipo 2. Seu principal efeito constitui a diminuição da produção hepática de glicose, por meio da inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. Esse fármaco promove a ativação

de AMPK que, conseqüentemente irá inibir a gliconeogênese hepática (VIOLLET *et al.*, 2012).

Figura 3 - Estrutura química da metformina, C₄H₁₁N₅



Fonte: Adaptado de Scheen (1996)

A síntese desse composto é feita a partir da planta *Galega officinalis*, utilizada desde a Europa medieval na medicina popular para o tratamento de diabetes. Em 1995 foi aprovado nos Estados Unidos da América (EUA) o uso da MET para tratamento de DM e em 2002 tornou-se um medicamento genérico. Sua administração se dá por via oral, com absorção completa após seis horas de ingestão e tem baixa ligação às proteínas plasmáticas. Sua meia-vida está entre 4 e 8.7 horas, possui eliminação renal e não sofre significativa biotransformação (VIOLLET; FORETZ, 2013).

O efeito adverso ao uso de MET que ocorre com mais frequência é a intolerância gastrointestinal, além de anorexia, náuseas, distensão abdominal, diarreia e gosto metálico na boca, contudo tendem a desaparecer no decorrer do tratamento. Em tratamentos mais duradouros pode surgir a deficiência de vitamina B12 e mais raramente pode ocorrer acidose láctica. Em contrapartida, seu uso contribui para a diminuição do risco de complicações diabéticas, micro e macrovasculares (TING *et al.*, 2006; BRASIL, 2010).

O risco da ocorrência de acidose láctica é muito baixo, constituindo um vantajoso risco-benefício quando levado em conta seus efeitos vantajosos no sistema cardiovascular, renal e benefícios de sobrevivência. A ação benéfica da

MET no sistema cardiovascular ocorre principalmente pela ativação de AMPK e consequentemente preservação da função endotelial por diminuição do estresse oxidativo. Já na síndrome dos ovários policísticos, o tratamento com MET contribui com a ovulação, regulação do ciclo menstrual e redução dos níveis androgênicos no sangue, além de diminuir os riscos de aborto. Na clínica, seu uso é indicado como primeira escolha quando há contraindicação do uso de contraceptivo oral. Já os efeitos antitumorais da MET envolvem diversos mecanismos dependentes ou não da via de AMPK, como na inibição da proliferação celular em células de mieloma por meio de indução de autofagia e parada do ciclo celular. Além disso, por ativar AMPK desencadeia também diminuição da hiperglicemia, da resistência à insulina e hiperinsulinemia (GOTLIEB *et al.*, 2008; SASAKI *et al.*, 2009; FRID *et al.*, 2010; KRAVCHUK *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2018).

2.4 PROTEÍNA CINASE ATIVADA POR ADENOSINA MONOFOSFATO (AMPK)

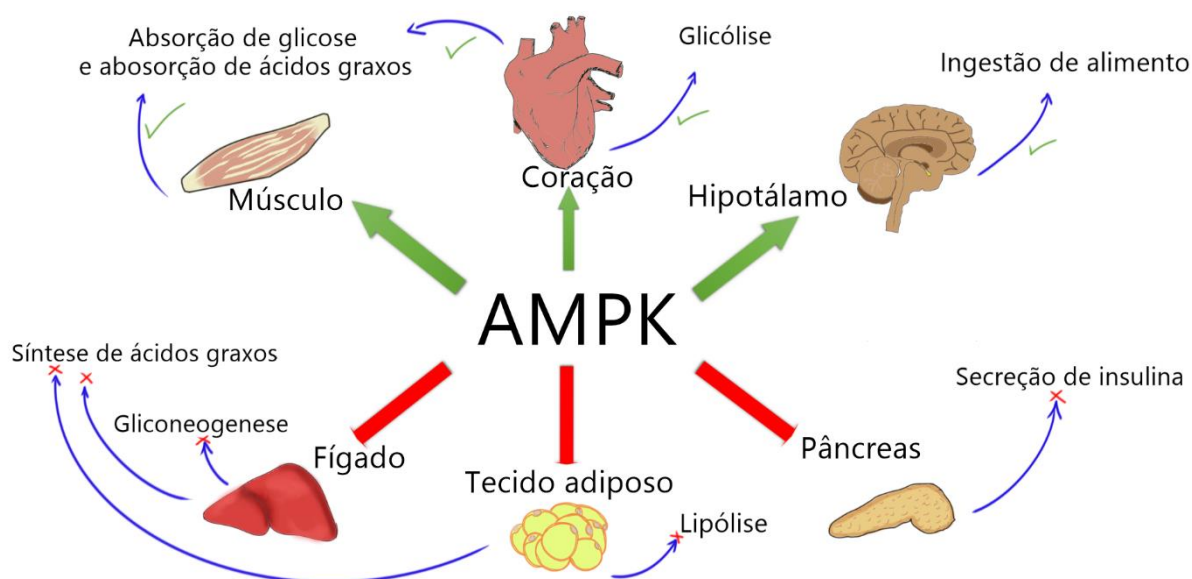
Naturalmente a AMPK é expressa em células de organismos eucariotos e desempenha um papel de sensor dos níveis de energia celular, pois ela é ativada quando ocorre aumento das concentrações de AMP:ATP (adenosina monofosfato: adenosina trifosfato) ou ADP:ATP (adenosina trifosfato:adenosina difosfato), que se manifestam quando há comprometimento energético celular. Ou seja, ela é responsável por regular os padrões energéticos necessários ao bom funcionamento do organismo, a AMPK restaura a homeostase energética ativando vias catabólicas alternativas de formação de ATP, que, durante o estresse metabólico apresenta aumento do consumo ou diminuição da produção, esta por sua vez ocorre através da quebra de glicose e lipídios (HARDIE, 2015; HERZIG; SHAW, 2018).

Estruturalmente a AMPK constitui-se de um complexo heterodímero composto por uma subunidade α catalisadora e subunidades reguladoras β e γ . Nos seres humanos existem as subunidades α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2 e γ_3 que se combinam podendo criar doze complexos distintos de AMPK (HERZIG; SHAW, 2018).

Os principais estímulos capazes de ativar AMPK são aqueles que interferem na geração catabólica de ATP, como baixos níveis de glicose, isquemia e hipóxia. Ela também pode ser ativada por estímulos que levam ao consumo de ATP, como durante a contração muscular (HARDIE, 2011). Em mamíferos, a AMPK é

ativada por três mecanismos, que são a promoção da fosforilação do resíduo de treonina (Thr172), inibição da desfosforilação de Thr172 e ativação alostérica. (HARDIE; ASHFORD, 2014). Esse mecanismo tripartite ocorre, como já mencionado, com mudanças no estado de energia celular, o deslocamento de ATP por ADP ou AMP em um ou mais sítios da subunidade AMPK- γ provoca uma mudança conformacional no complexo heterodímero, que irá promover fosforilação ou inibir a desfosforilação de Thr172, causando um aumento significativo da quinase. A ligação de AMP ativa a quinase fosforilada em grandes proporções, destaca-se que a quinase LKB1 ocupa um importante papel no aumento da fosforilação de Thr172, que não ocorre em células tumorais sem LKB1. O aumento de cálcio intracelular pode levar à fosforilação catalisada de Thr172 através de CaMKK β , que pode atuar independente de AMP ou ADP (Figura 4) (HARDIE, 2013).

Figura 4 - Papel do AMPK no controle do metabolismo energético do corpo



Fonte: Autoria própria (2019).

Por estar envolvida no equilíbrio energético de todo o corpo, atua estimulando a geração de energia através da absorção de glicose, oxidação de ácidos graxos e ingestão de alimentos, além de inibir as vias de gasto energético, por meio da inibição de processos como a síntese de ácidos graxos, gliconeogênese, lipólise e secreção de insulina (COUGHLAN *et al.*, 2014; HARDIE, 2015) (Figura 4). Devido a isso, a AMPK é um importante alvo farmacológico para o

tratamento de distúrbios metabólicos, como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (HARDIE, 2015).

Muitos estudos buscam o desenvolvimento de fármacos ativadores ou inibidores de AMPK, vários ativadores são produtos vegetais naturais ou são derivados de produtos naturais, como a MET e salicilato, drogas amplamente utilizadas e que apresentam ótimos resultados (HARDIE, 2016).

2.4.1 Possível papel de AMPK no efeito gastroprotetor da metformina

A MET é conhecida por sua ação anti-hiperglicemiante e por atuar ativando a AMPK. Contudo ela apresenta outras diversas ações benéficas ao organismo. No TGI a MET pode atuar inibindo a secreção de grelina por aumento da fosforilação de AMPK, sem causar morte celular. Isso explica o papel desse fármaco na diminuição da ingestão calórica e indução de sensação de plenitude após refeições, apoiando assim seu papel na perda de peso, visto que a grelina é um hormônio que tem papel de estimular a ingestão de alimentos (GAGNON; SHEPPARD; ANINI, 2013).

A MET, por meio da ativação de AMPK, promove significativa resposta angiogênica no processo cicatricial de úlceras gástricas. Além disso, a ativação de AMPK reduz a secreção gástrica, conferindo ação protetora da mucosa, e induz o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A angiogênese é um componente essencial no processo de cicatrização da úlcera gástrica, pois é através dela que ocorre o fornecimento de oxigênio e nutrientes para o local da lesão, já o VEGF classifica-se como fator proangiogênico e regula a angiogênese. O favorecimento desse processo é extremamente importante, principalmente em pacientes diabéticos acometidos com úlcera gástrica, pois as desordens causadas pela DM dificultam o processo cicatricial de feridas (BARAKA; DIEF, 2011).

Por esses fatores, o uso da MET pode ser indicado em pacientes não diabéticos, devido à baixa toxicidade desse fármaco e a sua capacidade de não provocar efeitos adversos hipoglicêmicos graves (AMBRISH *et al.*, 2009). Ela também reduz o estresse oxidativo e ativação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e IL-8 e ativação de macrófagos, pode inibir a via de sinalização de NF- κ B e estimular a expressão de Nrf2 por um processo dependente de AMPK (HONNAPPA; KESAVAN, 2016).

Assim, levando em conta que a MET é o medicamento de primeira escolha para pacientes com DM tipo 2 e considerando seu papel no favorecimento da cicatrização, sugere-se que o uso da MET seja benéfico em pacientes com úlcera gástrica (BARAKA; DIEF, 2011).

Sendo assim, ao levar em conta todo o contexto de envelhecimento populacional, aumento de agravos crônicos não transmissíveis e ocorrência de reações adversas a medicamentos, torna-se relevante o estudo de novas opções para o tratamento de problemas já existentes.

Estudar novas aplicações para a metformina possibilita avanços tanto para a comunidade acadêmica como para a indústria farmacêutica, tal fato afeta direta e positivamente a população mundial, uma vez que novas aplicações terapêuticas da metformina possibilitam o uso de um fármaco com poucos efeitos indesejáveis, de fácil aquisição e que já é utilizado consideravelmente em todo o mundo (considerando que grande parcela da população do mesmo possui DM). Com isso, destaca-se o relevante interesse em avaliar a atividade da MET em condições de lesão gástrica causadas pelo ALD, de forma a contribuir para a melhoria do tratamento dessa patologia que é responsável por milhares de internações a cada ano.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação da metformina na proteção da mucosa gástrica em modelo de úlcera gástrica induzida por alendronato em ratas normoglicêmicas e hiperglicêmicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o efeito da metformina sobre os parâmetros macroscópicos e histopatológicos em modelo de úlcera gástrica induzida por alendronato em ratas normais e diabéticas induzidas por estreptozotocina;
- Investigar a ação de AMPK no efeito gastroprotetor da metformina em modelo de úlcera gástrica induzida por alendronato;
- Analisar o efeito da metformina sobre parâmetros antioxidantes gástricos: níveis de MDA e MPO;
- Avaliar a ação da metformina na expressão de citocinas pró-inflamatórias, secreção de muco e produção de colágeno na mucosa gástrica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

A Metformina, Estreptozotocina e Composto C foram adquiridos pela Cayman Chemical (Michigan, EUA), já a Nicotinamida (NA) e o Alendronato foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) (Apêndice A) e os outros produtos utilizados foram obtidos a partir de fornecedores comerciais padrão.

4.2 ANIMAIS

As ratas da linhagem *Wistar*, pesando entre 180 e 200 g, foram obtidas do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram acondicionados em gaiolas, em um ambiente com temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ num ciclo de 12h claro/12h escuro, com acesso livre a água e ração padrão. No momento precedente aos procedimentos experimentais, os animais foram submetidos a um jejum alimentar de 12 horas com livre acesso a água potável. Todos os protocolos, procedimentos e tratamentos com animais utilizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animal da Universidade Federal do Piauí (Protocolo nº 474/18) (Anexo B).

4.3 EFEITO GASTROPROTETOR DA METFORMINA NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ALENDRONATO

Para a determinação da curva dose resposta (primeira etapa) do efeito da MET em lesões gástricas foram utilizados cinco grupos de animais, sendo um controle negativo (CN), que recebeu apenas solução salina, SF 0,9%; um controle positivo (CP), que recebeu pré-tratamento com SF 0,9%; e os demais grupos (MET10, MET30 e MET100) receberam como pré-tratamento a MET em diferentes doses (10, 30, 100mg/Kg, respectivamente, dissolvida em SF 0,9%), todas as administrações foram via oral (v.o). Os pré-tratamentos foram feitos uma vez ao dia, durante sete dias, sendo inserido a partir do quarto dia o ALD (50mg/Kg dissolvido em SF 0,9%, pH 7,0, v.o) administrado 30 minutos após a administração de SF 0,9% ou MET, até o fim dos sete dias (com exceção do grupo CN que recebeu apenas SF 0,9%). No sétimo dia de tratamento, decorridos 4h após a administração de ALD, os animais foram eutanasiados e seus estômagos foram removidos, seguindo o

protocolo adaptado de SILVA *et al.*, (2014). O dano gástrico foi mensurado utilizando o programa planimétrico computacional Image J® Software. Assim obteve-se a curva dose resposta e escolheu-se aquela dose de MET que apresentou melhor efeito gastroprotetor.

Após escolhida a melhor dose a ser utilizada nos demais protocolos, deu-se início ao estudo do efeito gastroprotetor da MET em ratas normoglicêmicas e hiperglicêmicas. Com isso foram compostos sete novos grupos: CN, CP, METmd (receberam metformina na melhor dose), CompC (receberam metformina na melhor dose e inibidor de AMPK – Composto C, com base nos estudos de Baraka e Dief, 2011, e Hasanvand *et al.*, 2016), CNH (controle negativo hiperglicêmico), CPH (controle positivo hiperglicêmico) e METmdH (hiperglicêmicos que receberam metformina na melhor dose) (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição dos grupos para o protocolo de indução de DM

| Grupo | Indução de DM com NA 230mg/Kg + STZ 130mg/Kg; i.p | Pré-tratamento | Indução de lesão com ALD 50mg/Kg |
|--------------|--|--|---|
| CN | Não | SF 0,9%; v.o | Não |
| CP | Não | SF 0,9%; v.o | Sim |
| METmd | Não | MET na melhor dose; v.o | Sim |
| CompC | Não | Composto C 1,2mg/Kg; i.p + METmelhor dose; v.o | Sim |
| CNH | Sim | SF 0,9% | Não |
| CPH | Sim | SF 0,9% | Sim |
| METmdH | Sim | MET na melhor dose; v.o | Sim |

Fonte: Autoria própria (2019).

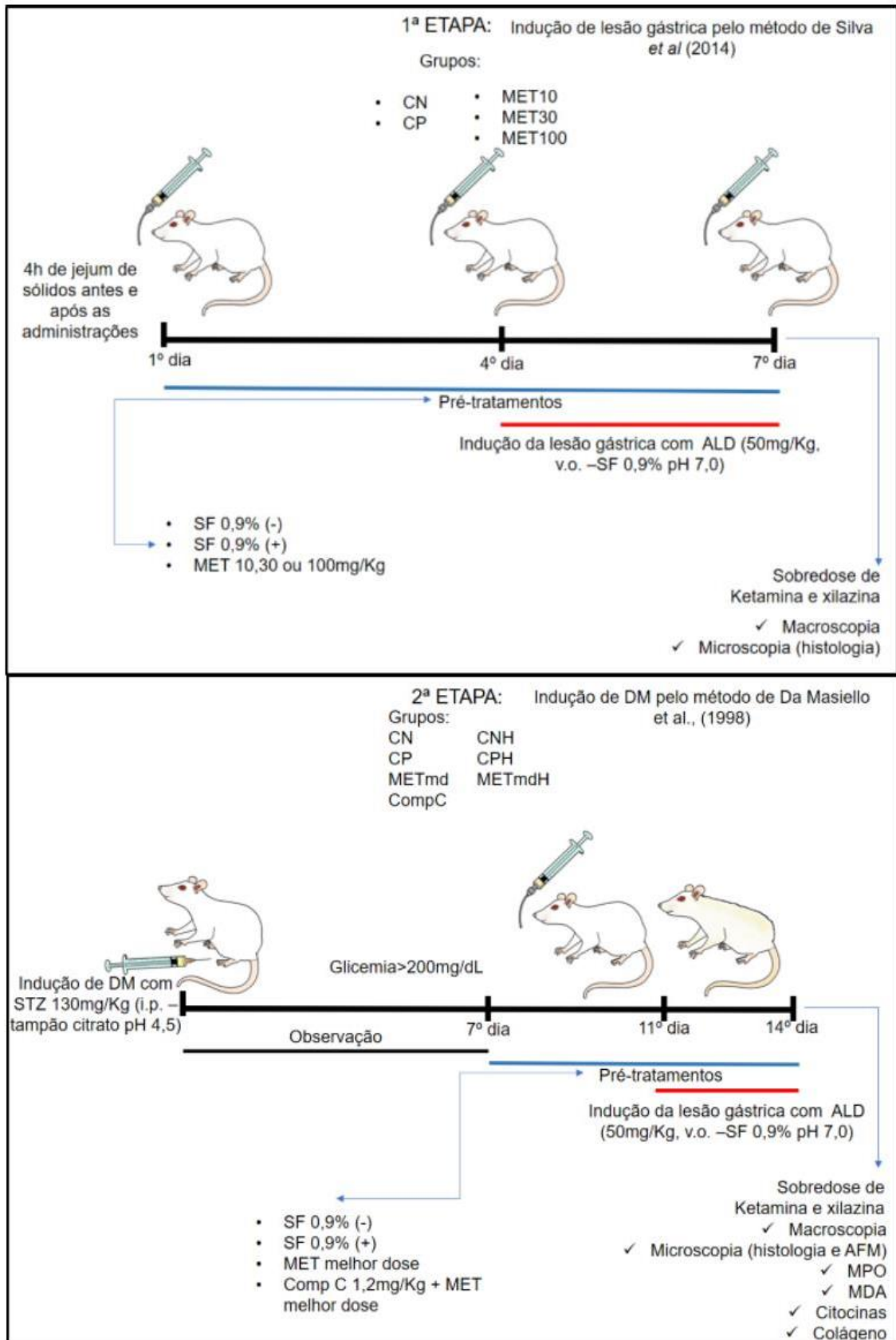
Para a realização do protocolo de indução de DM foi utilizado o método de DA MASIELLO *et al.*, (1998) (segunda etapa). Assim, para o protocolo de indução de diabetes todos os grupos (Tabela 1) foram submetidos a jejum de 12 horas, pesados e submetidos à análise da glicose sérica, por meio de sangue venoso

caudal utilizando o aparelho glicosímetro ACCU-CHECK® Softclix. Após isso três grupos (CNH, CPH e METmdH) receberam como citoprotetor a nicotinamida (230mg/Kg, i.p, diluída em água destilada) e 15 minutos após receberam estreptozotocina (130mg/Kg, i.p, diluída em tampão citrato 0,1M pH 4,5), os demais grupos (CN, CP, METmd e CompC) receberam apenas SF 0,9% pela mesma via de administração.

Após a indução, os animais que foram induzidos DM receberam, durante 48 horas, solução glicosada a 10% para livre ingestão, a fim de evitar quadros de hipoglicemia severa. A dosagem de glicose se repetiu numa frequência de duas vezes ao dia, assim, no sétimo dia após a indução os animais que obtiverem níveis de glicose acima de 200mg/dL foram considerados diabéticos. Com a confirmação de indução de DM deu-se início aos pré-tratamentos, como descrito no protocolo de obtenção da curva dose resposta. Assim, dos grupos hiperglicêmicos, um deles recebeu pré-tratamento com MET na melhor dose e os demais receberam apenas SF 0,9% (CNH e CPH). Para os grupos normoglicêmicos administrou-se SF 0,9% como pré-tratamento dos grupos CN e CP, para os outros dois grupos normoglicêmicos (METmd e CompC) foi administrado respectivamente MET na melhor dose em um, já no outro administrou-se 1,2mg/Kg de Comp C (i.p), para investigação do envolvimento de AMPK no efeito gastroprotetor da MET, e meia hora após MET na melhor dose (v.o).

A partir do quarto dia de pré-tratamento os animais receberam alendronato (50mg/kg, v.o) 30 minutos após a administração de SF 0,9%, MET ou Comp C+MET. Os animais permaneceram com seus tratamentos até o sétimo dia após a confirmação de diabetes. Decorridos 4h após a administração de ALD no sétimo dia, os animais foram eutanasiados e seus estômagos retirados e fotografados para análise das lesões utilizando o Image J® Software (MEDEIROS, 2009). As amostras foram então colocadas imediatamente em solução fixadora formalina 10% para posterior análises histológicas. Também foram estocadas amostras a -80 °C para análise de MDA (MIHARA; UCHIYMA, 1978), MPO (BRADLEY *et al.*, 1982), colágeno (LOPEZ DE LEON; ROJKIND, 1985) e níveis de citocinas (CUNHA *et al.*, 1993). O desenvolver dos protocolos de indução de DM e lesão gástrica pode ser observado na figura 5.

Figura 5 - Delimitação experimental da primeira e segunda etapa do estudo



Fonte: Autoria própria (2019)

4.3.1 Análise histopatológica das lesões gástricas

O estudo histopatológico foi realizado por meio de amostras dos estômagos fixadas em solução de formol tamponado a 10%, onde permaneceram até o momento do processamento. A preparação das lâminas, o material biológico foi seccionado e embebido em parafina, para a realização de cortes de cinco micrometros, assim foram transferidos para as lâminas e corados com hematoxilina-eosina para a análise no microscópio óptico. A análise das amostras foi feita de acordo com os critérios de LAINE e WEINSTEIN (1988), no qual foi avaliado a perda de células epiteliais (escores de 0-3), edema na superfície da mucosa (escores de 0-4), hemorragia (escores de 0-4) e infiltração de células inflamatórias (escores de 0-3), sendo 14 o escore máximo. Destaca-se que a avaliação histopatológica foi realizada por meio de um estudo cego, no qual a análise foi realizada sem o conhecimento dos tratamentos realizados.

4.3.2 Análise histológica por microscopia de força atômica (AFM) da mucosa gástrica

A análise por AFM da mucosa gástrica das ratas dos grupos CN, CP, METmd e CompC foi feita a partir de secções de 5µm do tecido gástrico fixado em parafina. Em seguida, as amostras foram desparafinizadas com xilol e álcool etílico em concentrações decrescentes e fixadas nas lâminas sem passar pelo processo de coloração. Logo após as amostras foram analisadas em TT-AFM (AFM, Workshop, EUA) em modo vibratório (*tapping mode*) com cantilevers ACT-20 (359 kHz), AppNAo, USA. Em seguida, as amostras foram processadas usando o software Gwyddion 2.4 e foram geradas imagens de AFM de 50x50µm (256x256 pixels).

4.4 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS A PARTIR DA MUCOSA GÁSTRICA DE RATAS

4.4.1 Dosagem de malondialdeído (MDA)

Foi utilizado o método de MIHARA e UCHIYAMA (1978) para determinação dos níveis de malondialdeído na mucosa gástrica, com base na reação com ácido tiobarbitúrico, uma vez que o MDA é um produto da peroxidação lipídica e pode ser utilizado como indicador de estresse oxidativo. Assim, após a

reação do homogênio com o ácido tiobarbitúrico a solução tende a ficar com uma coloração mais rosa quanto mais houver a presença de MDA. Para isso, utilizou-se fragmentos da mucosa gástrica homogeneizados com KCl gelado 1,15% para o preparo de 10% do homogenato. Posteriormente, 500 µL do homogenato foi pipetado em tubo de centrífuga de 10ml, com 3ml de H₃PO₄ a 1% e 1ml de solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0,6%). Em seguida, os tubos foram aquecidos durante 45 minutos em água fervente (100°C) e logo após resfriado em água gelada. Após esse processo, foi adicionado 4ml de n-butanol e o conteúdo foi misturado no “vortex” para homogeneizar os tubos durante 40 segundos. Posteriormente foram centrifugados a 1200 rpm por 10 minutos. A absorbância da camada orgânica foi mensurada em 520 e 535 nm. Os resultados obtidos foram expressos em nmol/g de tecido.

4.4.2 Atividade de mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase é uma enzima produzida pelo neutrófilos, uma vez que estas são as primeiras células de defesa a chegarem no local da lesão e lá liberam grandes quantidades de MPO, utiliza-se a MPO como marcador da migração neutrofílica. Para a determinação da MPO foi seguido o modelo de BRADLEY, CHRISTENSEN e ROTHSTEIN (1982), no qual, as amostras das mucosas gástricas das ratas foram homogeneizadas em tampão de potássio (50mM, pH 6,0) com 0,5% de hexadecitrimetilamônio (HTAB), utilizando 1ml para cada 100mg de tecido. Após homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas a 4500 rpm durante 20 minutos. A atividade da MPO foi testada com a substância suspensa, com absorbância a 450 nm, utilizando o dicloridrato de o-dianisidina e 1% de peróxido de hidrogênio. Os resultados foram expressos em unidades por mg de tecido (UMPO/mg de tecido).

4.5 DOSAGEM DE COLÁGENO TECIDUAL

A dosagem de colágeno serve como marcador de fibrose induzida por oxidantes, para isso utilizou-se conteúdo de colágeno gástrico que foi analisado pelo método de Lopez De Leon e Rojkind (1985). Tal método baseia-se na ligação seletiva dos corantes Sirius Red e Fast Green FCF aos componentes de colágeno ou não colágeno, respectivamente. Para isso as amostras de tecidos foram cortadas com lâmina e fixadas imediatamente em formalina 10% em tampão fosfato 0,1mM

(pH 7,2) em parafina e seccionadas com 15µm de espessura. Os corantes foram eluídos prontamente e ao mesmo tempo utilizando NaOH-metanol a 0,1M (1:1). Por fim, foi feita leitura das absorvâncias a 540 e 605 nm para a determinação de colágeno e proteína, respectivamente.

4.6 MENSURAÇÃO DE CITOCINAS

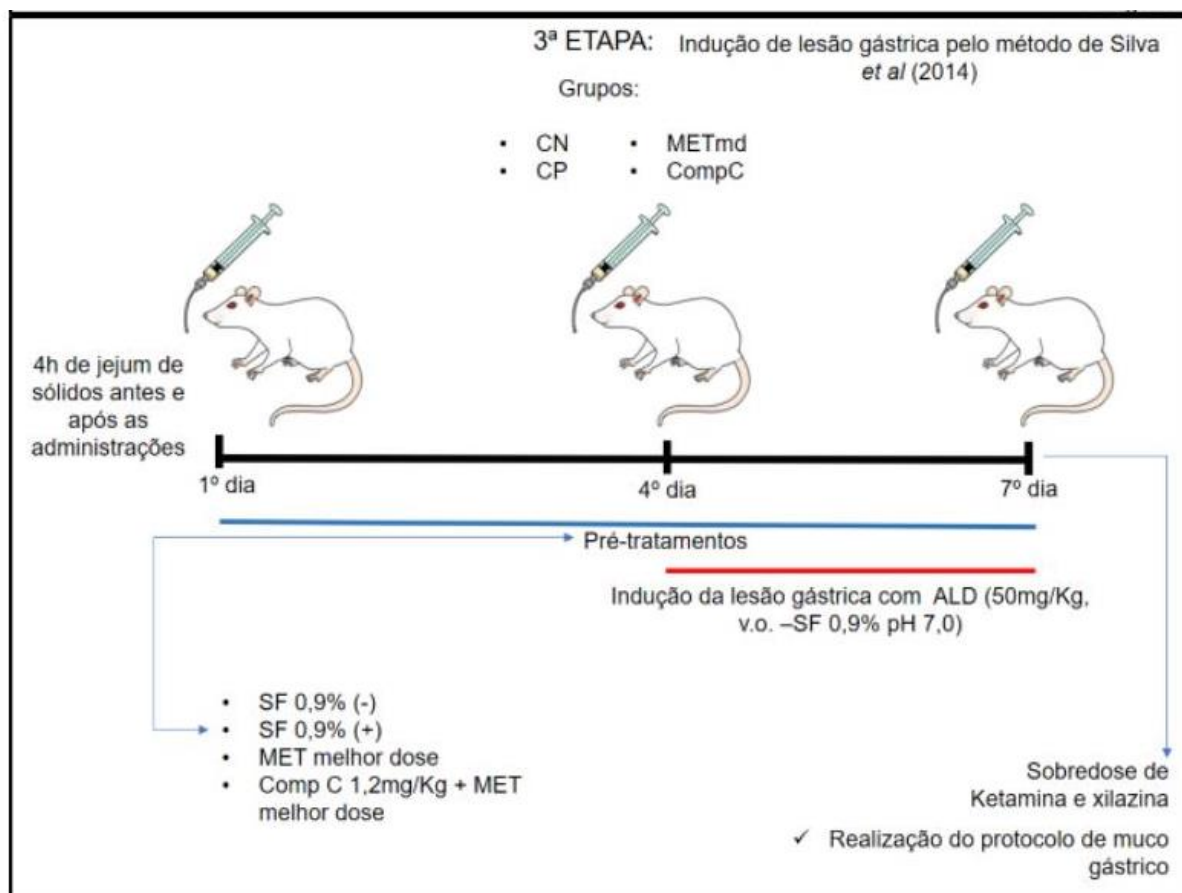
A realização do teste de ELISA (ensaio de imunoabsorbância enzimática) torna possível a detecção de anticorpos específicos de interesse, para isso foram utilizadas placas de microtitulação com anticorpos policlonais para as citocinas TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), IL-1B (interleucina 1B), IL-6 ou IL-8 (4µg/ml, DuoSet ELISA Development Kit R&D Systems). Posteriormente foram adicionadas as amostras em duplicata e em várias diluições, incubadas por 24 horas a 4°C. Após esse tempo, as placas foram lavadas com tampão (fosfato 0,01 M, NaCl 0,05 M, Tween 20 a 0,1% e pH 7,2) para posterior adição dos seus respectivos anticorpos policlonais, biotinizados de ovelha (diluído 1:1000 com tampão contendo 1% de albumina sérica bovina, BSA). Foram então reincubadas durante 1 hora e lavadas para a adição de 50µL de peroxidase de avidina conjugada de raiz-forte, diluída de 1: 5000. Quinze minutos após foi adicionado o reagente o-fenileno-diamina (OPD, 40µg/ poço) e incubadas a 37°C durante um período de 15 a 20 minutos. A reação enzimática foi interrompida com H₂SO₄ e a absorvância foi medida a 490 nm. Os valores foram expressos em picogramas de citocinas por mililitro (pg/ml).

4.7 DETERMINAÇÃO DE MUCO GÁSTRICO

O Alcian Blue é um corante de coloração azul que se liga às mucinas, então quando maior for a quantidade de muco no estômago, mais azul a solução ficará. Para determinação de muco repetiu-se o protocolo de indução de lesão gástrica por ALD (terceira etapa) apenas nos grupos normoglicêmicos controle positivo, controle negativo, tratado com MET e tratado com Comp C + MET. Assim, após a eutanásia, os estômagos foram retirados e transferidos para solução de Alcian Blue 1% (0,16 M de sacarose em 0,05 M acetato de sódio, pH 5,8). Removeu-se o excesso de corante do tecido por meio de lavagem com 0,25 M de sacarose, então extraiu-se o complexo muco-corante e o tecido foi colocado em solução 0,5M de MgCl₂ por 2 horas. Após esse tempo o extrato do corante foi misturado com éter

dietílico e centrifugado a 1400g por 10 min para leitura de absorvância a 598 nm. A quantidade de Alcian Blue extraída ($\mu\text{g/g}$ de tecido) foi calculada utilizando uma curva padrão (CORNE *et al.*, 1974) (Figura 6).

Figura 6 - Delineamento experimental da terceira etapa do estudo



Fonte: Autoria própria (2019)

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

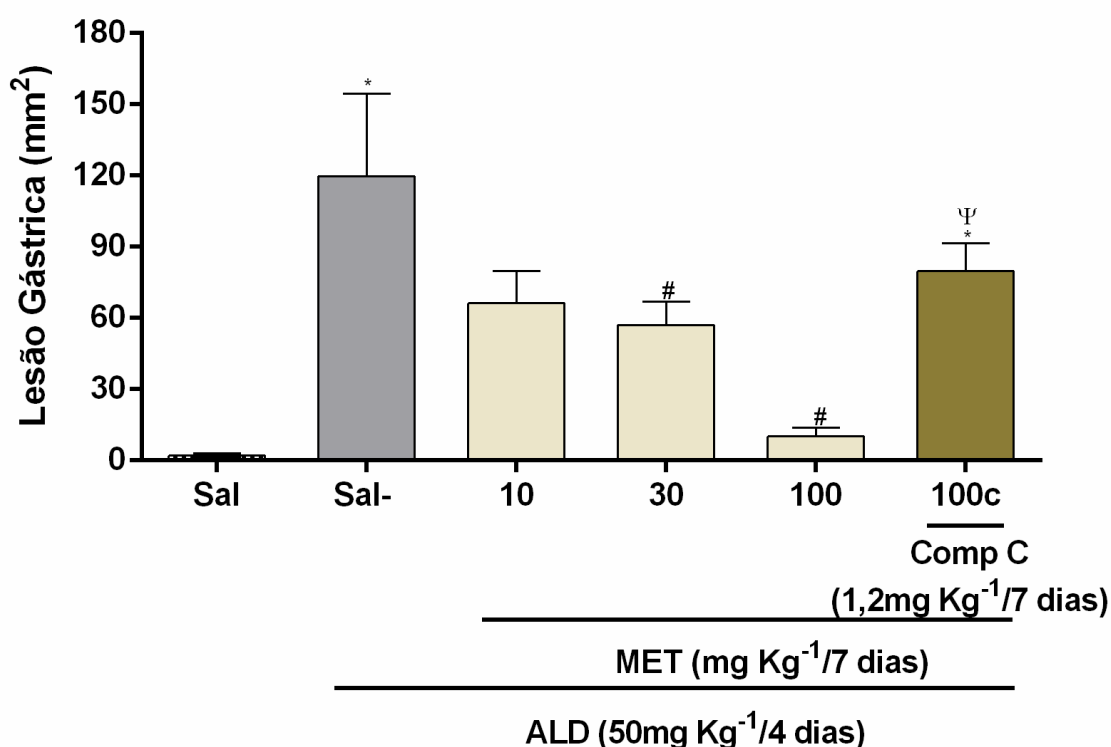
Os dados obtidos foram expressos como a média \pm erro padrão da média. Para comparação de dois grupos foi utilizado o teste *T de Student* para dados não pareados. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e teste de *Student-Newman-Keuls*. As análises histológicas foram realizadas pelo teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* e teste de *Dunn* (para comparação múltipla). Para tanto utilizou-se o *Software GraphPad Prims* versão 6.0.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DA METFORMINA DO DANO GÁSTRICO INDUZIDO POR ALENDRONATO

Neste estudo, os resultados demonstraram que o pré-tratamento com MET (100mg/Kg) administrada por gavagem preveniu os danos causados à mucosa gástrica pela exposição ao ALD de forma eficaz quando comparado às doses de 10 e 30mg/Kg, sendo então a dose de 100mg/Kg indicada para os demais protocolos. A MET 100mg/Kg reduziu os danos gástricos causados pelo ALD tanto em ratas normoglicêmicas como em ratas hiperglicêmicas (Figura 7 e 8).

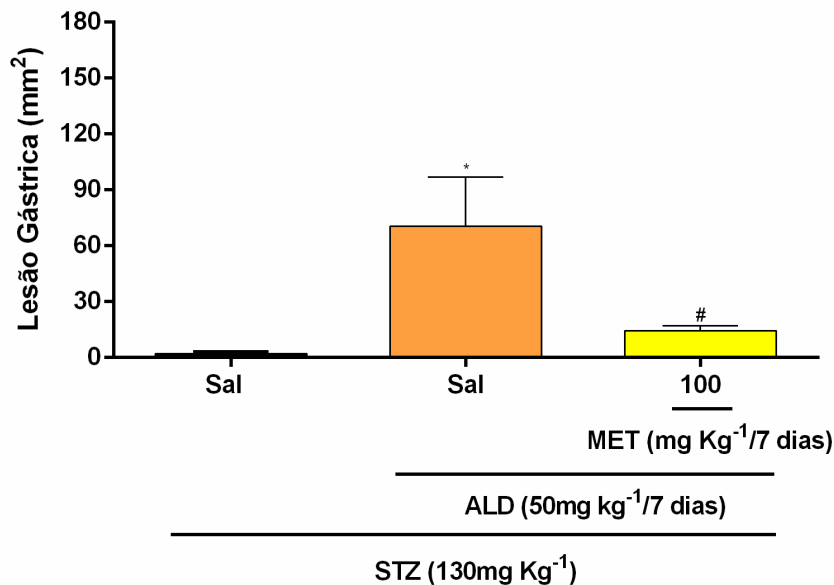
Figura 7 - Efeito do pré-tratamento com MET no dano gástrico induzido por ALD em ratas normoglicêmicas



Legenda: (Após quatro dias de administração com ALD observou-se o resultado de danos intensos na mucosa gástricas dos animais normoglicêmicos) O tratamento com MET (100mg/Kg) durante sete dias levou a uma significativa (#p<0,05) melhora dos danos observados na macroscopia. As lesões gástricas macroscópicas foram determinadas 4h após a administração de ALD (no quarto dia). Os dados são

expressos em \pm S.E.M com 7-8 ratas por grupo. *P<0,05 vs. grupo salina (CN), Ψ P<0,05 vs. grupo MET100, utilizou-se os testes de *one-way ANOVA* e *Newman-keuls*.

Figura 8 - Efeito do pré-tratamento com MET no dano gástrico induzido por ALD em ratas hiperglicêmicas



Legenda: (Após quatro dias de administração com ALD observou-se o resultado de danos intensos na mucosa gástricas dos animais hiperglicêmicos) O tratamento com MET (100mg/Kg) durante sete dias levou a uma significativa (#p<0,05) melhora dos danos observados na macroscopia. As lesões gástricas macroscópicas foram determinadas 4h após a administração de ALD (no quarto dia). Os dados são expressos em \pm S.E.M com 4-5 ratas por grupo. *P<0,05 vs. grupo salina (CN). Utilizou-se os testes de *one-way ANOVA* e *Newman-keuls*.

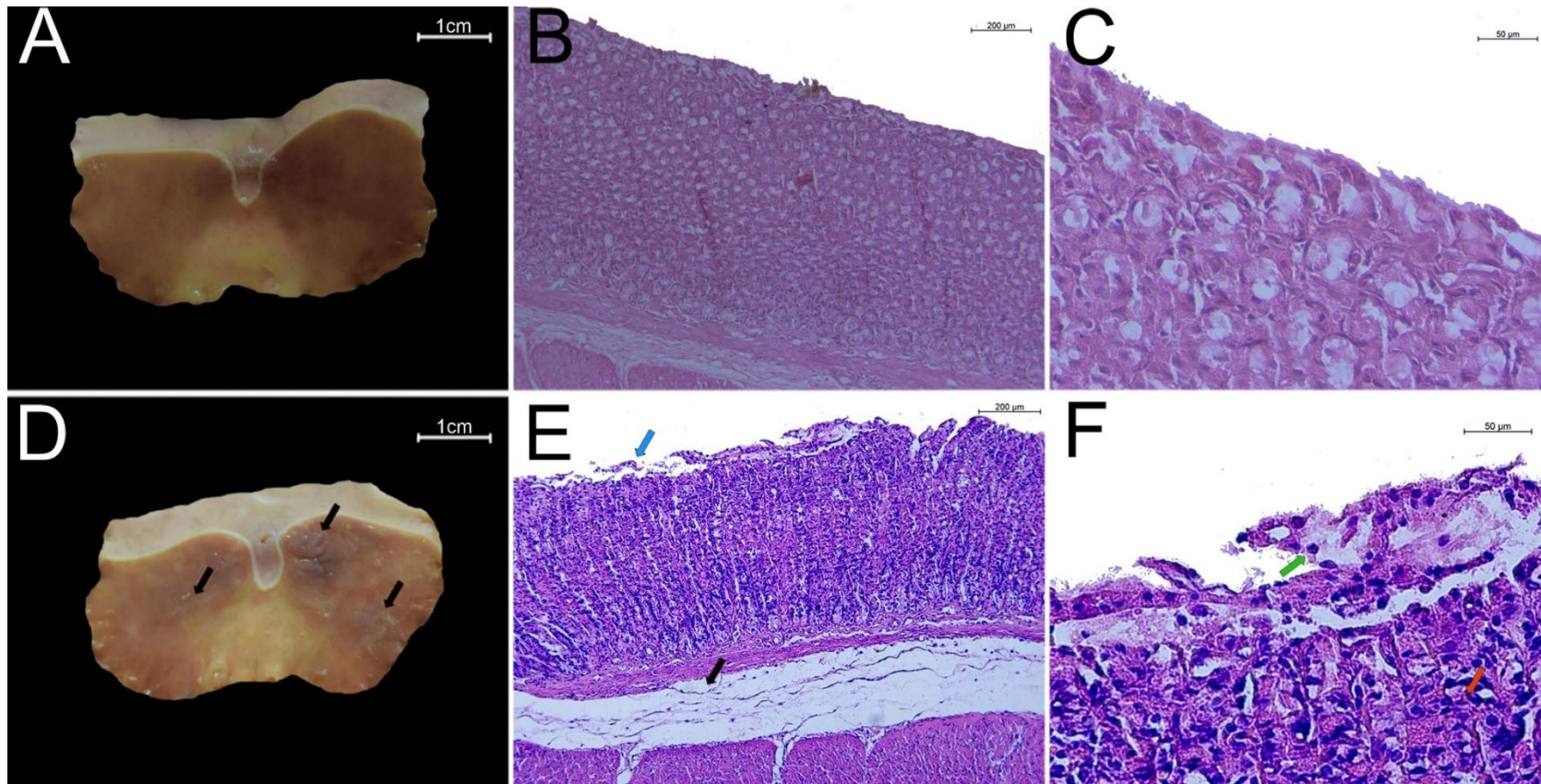
Foi possível observar danos por toda a extensão do órgão, principalmente na superfície epitelial, também foi possível observar a deposição de restos celulares, característicos de lesão gástrica induzida por alendronato (Figuras 9, 10 e 11).

Os resultados das análises microscópicas indicaram que a administração de ALD induziu alterações na região gástrica de ratas normoglicêmicas e hiperglicêmicas, que foram evidenciadas por hemorragia intensa (seta vermelha), perda de células epiteliais (seta azul), edema e presença (seta preta) de células inflamatórias (seta verde) (Figura 9, 10 e 11). Em contrapartida, as ratas pré tratadas

com MET (grupo MET100) apresentaram diminuição dessas alterações na mucosa gástrica, em níveis macroscópicos como microscópicos, tanto para o grupo normoglicêmico como para o grupo hiperglicêmico. No entanto, no grupo CompC (pré tratado com o Composto C e MET) pode-se observar reversão da gastroproteção induzida por MET (Figuras 9, 10, 11 e Tabela 2).

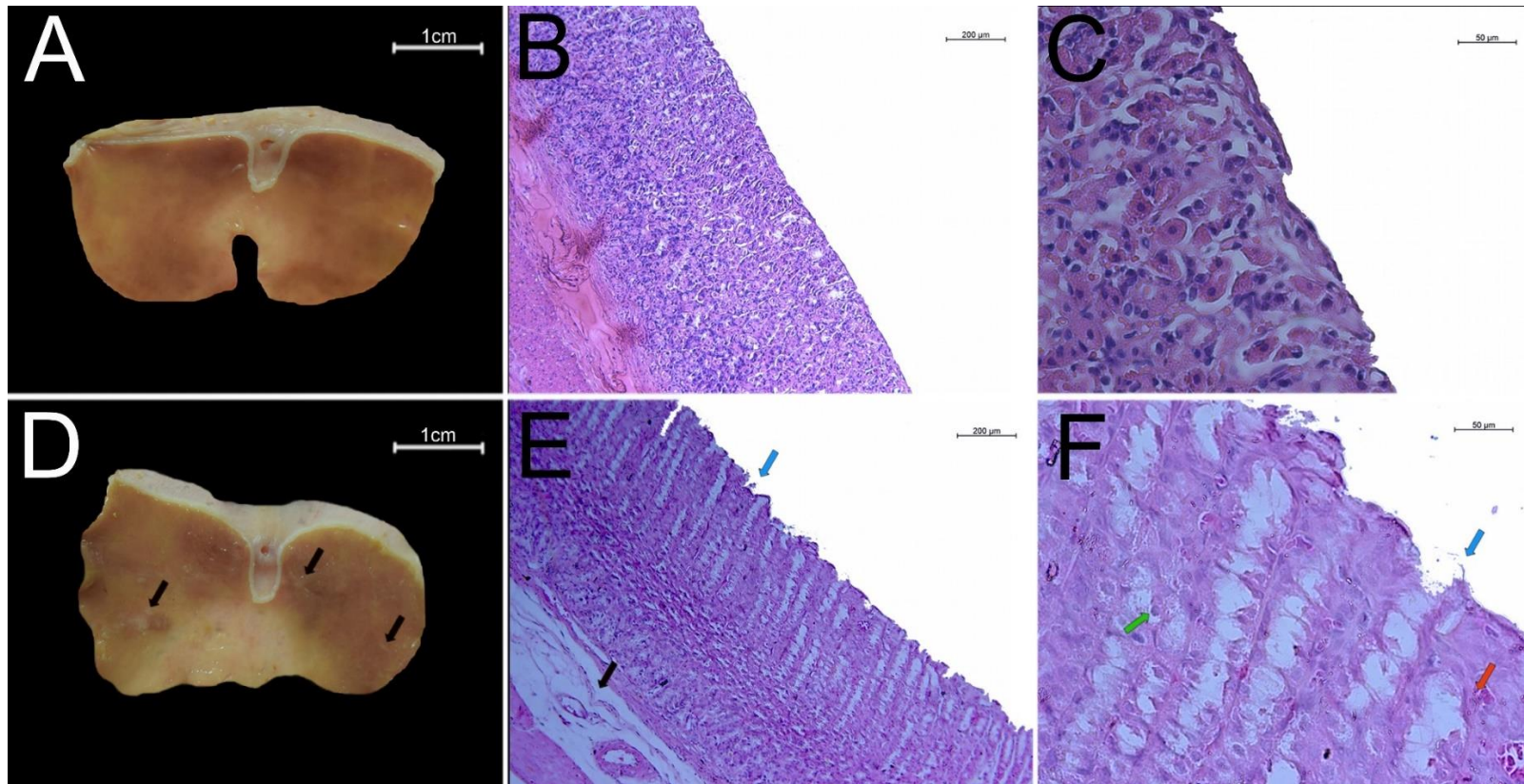
A análise histológica por AFM confirmou os resultados macroscópicos e de microscopia óptica. Na análise de AFM evidenciou-se no grupo controle positivo (tratado com ALD) uma forte destruição das camadas submucosas e fibras de colágeno, perda do epitélio e pregas (setas amarelas), quando comparado com o controle negativo. Em contrapartida observou-se recuperação da integridade do epitélio e dos tecidos conjuntivos da mucosa gástrica do grupo MET100 (pré tratado com MET e induzido lesão por ALD), podendo ser observado maior integridade das pregas (setas azuis) e diminuição das áreas mais escuras (representativas de maior profundidade da lesão), contudo, a ação da MET foi interrompida pelo Comp C, como pode ser observado na figura 12, onde percebeu-se desconfiguração das pregas (seta verde) e prejuízo à integridade do epitélio (seta amarela).

Figura 9 - Alterações macroscópicas e microscópicas em lesões gástricas induzidas por ALD em ratas normoglicêmicas



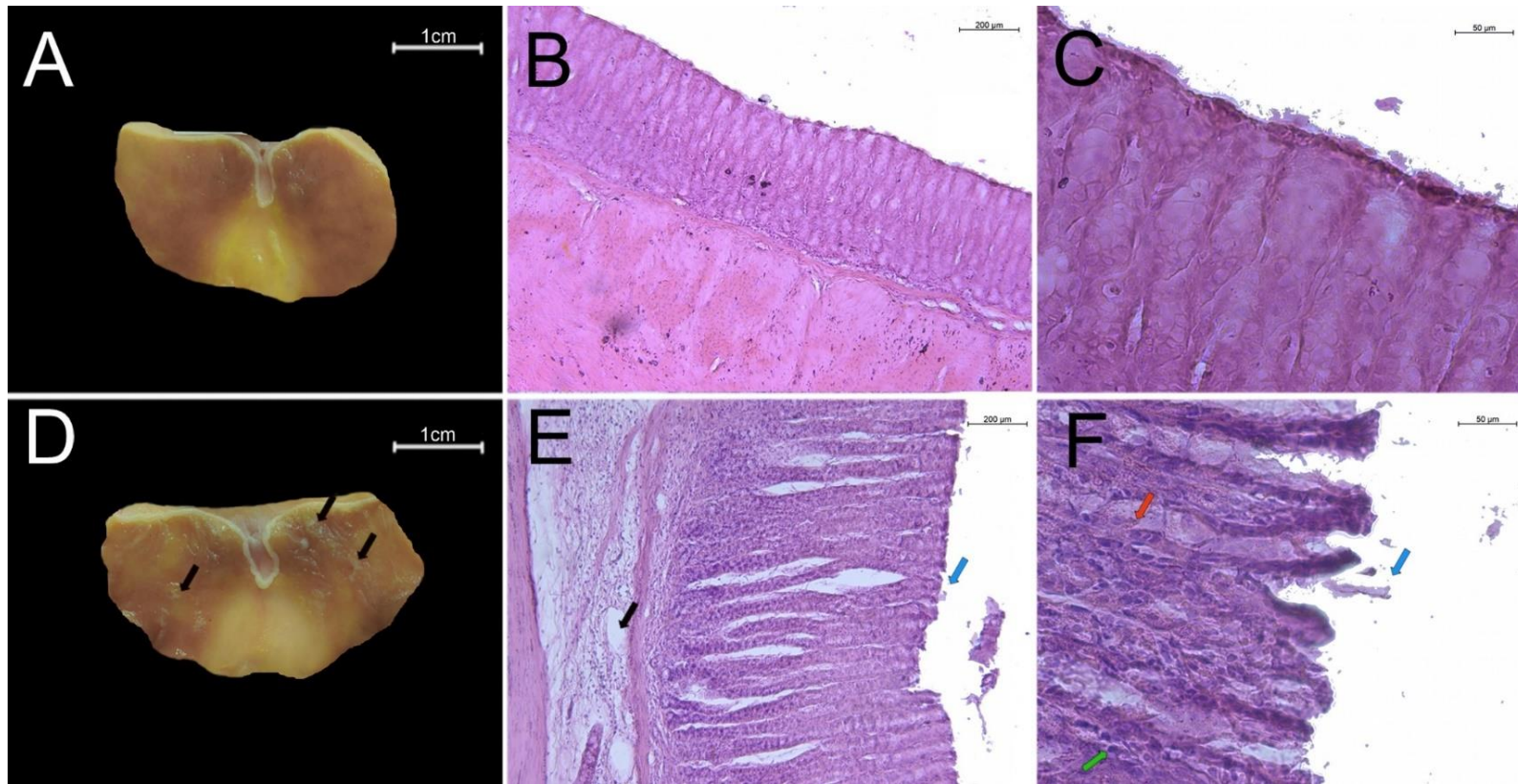
Legenda: (A - B - C) Grupo controle negativo (CN – salina v.o) evidenciando a integridade da mucosa gástrica. (D) Grupo controle positivo (CP: ALD 50mg/Kg v.o), demonstra evidência de danos generalizados no epitélio e superfície luminal com recobrimento de restos celulares (indicado pelas setas pretas). (E - F) A microscopia indica evidência de perda celular epitelial, edema, hemorragia e infiltrado inflamatório (indicados por seta azul, preta, vermelha e verde respectivamente) causados pela administração de ALD. Escalas de 1cm, 200µm e 50µm para imagens macroscópicas, microscópicas (10x) e microscópicas (40x), respectivamente.

Figura 10 - Alterações macroscópicas e microscópicas da MET em lesões gástricas induzidas por ALD em ratas normoglicêmicas



Legenda: (A - B - C) Grupo MET100 - o tratamento com MET (100mg/Kg v.o) levou à redução das lesões macro e microscópicas induzidas por ALD em ratas normoglicêmicas. (D - E - F) Grupo CompC - houve comprometimento da função gastroprotetora de MET quando administrada na presença do inibidor de AMPK, Comp C, evidenciado por presença de lesões macroscópicas (indicadas pelas setas pretas) e comprometimento microscópico evidenciado por perda epitelial, edema, hemorragia e infiltrado inflamatório (indicados pela seta azul, preta, vermelha e verde respectivamente). Escalas de 1cm, 200µm e 50µm para imagens macroscópicas, microscópicas (10x) e microscópicas (40x), respectivamente.

Figura 11 - Alterações macroscópicas e microscópicas da MET em lesões gástricas induzidas por ALD em ratas hiperglicêmicas



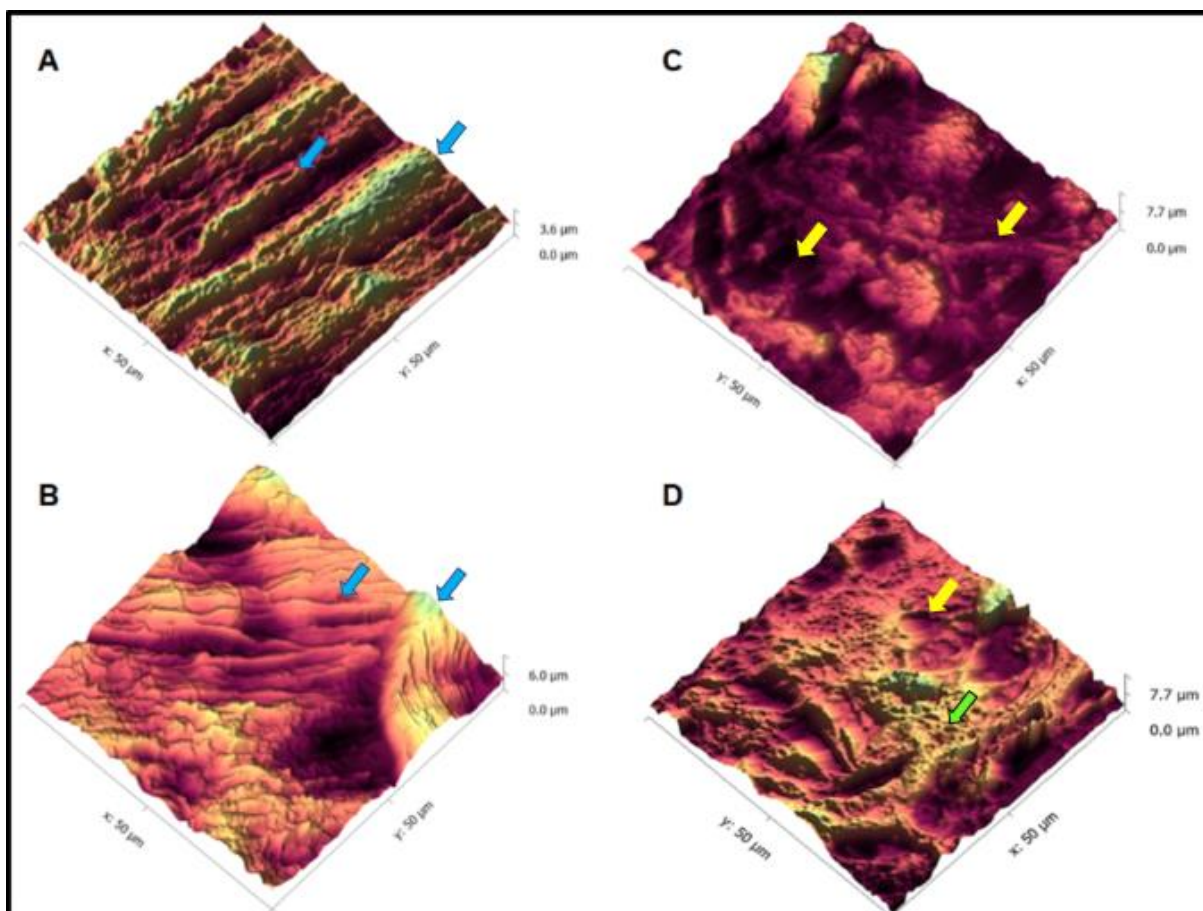
Legenda: (A - B - C) Grupo MET100H - o tratamento com MET (100mg/Kg v.o) levou à redução das lesões macro e microscópicas induzidas por ALD em ratas hiperglicêmicas. (D) Grupo controle positivo hiperglicêmico (ALD 50mg/Kg v.o), apresentou danos generalizados no epitélio e superfície luminal com recobrimento de restos celulares (indicado pelas setas pretas). (E - F) A microscopia indica perda celular epitelial, edema, hemorragia e infiltrado inflamatório (indicados por seta azul, preta, vermelha e verde respectivamente) causados pela administração de ALD. Escalas de 1cm, 200µm e 50µm para imagens macroscópicas, microscópicas (10x) e microscópicas (40x), respectivamente.

Tabela 2 – Microscopia do efeito protetor da MET no dano gástrico induzido por ALD

| Grupo | Dano Hemorrágico (escore 0-4) | Edema (escore 0-4) | Perda de células epiteliais (escore 0-3) | Células inflamatórias (escore 0-3) | Total (escore 0-14) |
|----------------|--------------------------------------|---------------------------|---|---|----------------------------|
| CN | 0 (0-1) | 0 (0-1) | 1 (0-1) | 1 (0-1) | 2 (0-4) |
| CP | 2 (1-4)* | 3 (2-4)* | 3 (1-3)* | 3 (2-3)* | 11 (6-14) |
| MET100 | 1 (0-2)# | 0 (0-3)# | 0 (0-1)# | 1 (1-2)# | 2 (1-8) |
| CompC | 3 (2-3) ^ψ | 3,5(3-4) ^ψ | 2 (1-3) ^ψ | 2 (2-3) ^ψ | 10,5 (8-13) |
| CPH | 3 (1-4)* | 4 (3-4)* | 2,5 (2-3)* | 3 (2-3)* | 12,5 (8-14) |
| MET100H | 2 (1-2) | 2 (1-2) ^δ | 1 (1-2) ^δ | 1 (1-2) ^δ | 6 (4-8) |

Legenda: Os dados estão expressos em medianas com seus escores mínimos e máximos indicados entre parênteses. Utilizou-se n de 4-7 ratas por grupo e foram usados os testes não paramétricos de Kruskal – Wallis e Dunn para múltiplas comparações. *p<0,05, quando comparado com o grupo controle negativo (CN); #p<0,05, quando comparado com o grupo controle positivo (CP), ^ψp<0,05 quando comparado com o grupo MET100 e ^δp<0,05 quando comparado com o grupo CPH. CN (controle negativo), CP (controle positivo), MET100 (normoglicêmico; metformina 100mg/Kg, v.o + alendronato 50mg/Kg, v.o), CompC (composto C 1,2mg/Kg, i.p + metformina 100mg/Kg, v.o + alendronato 50mg/Kg, v.o), CPH (controle positivo hiperglicêmico) e MET100H (hiperglicêmico; metformina 100mg/Kg, v.o + alendronato 50mg/Kg, v.o).

Figura 12 - Microscopia de força atômica (AFM) do efeito protetor da MET no dano gástrico induzido por ALD em ratas normoglicêmicas



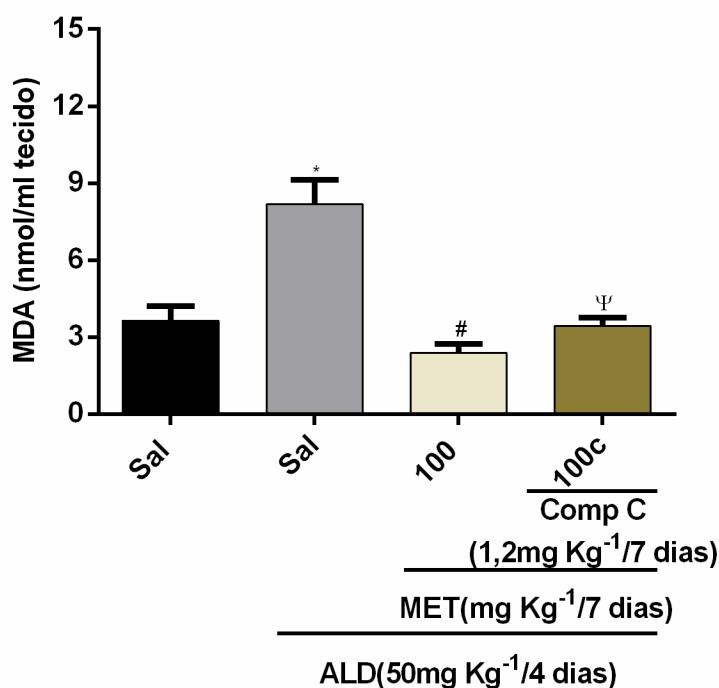
Legenda: Análise histológica por microscopia de força atômica (AFM) da mucosa gástrica de ratas normoglicêmicas em modelo de lesão gástrica induzida por ALD. **A** – CN (solução salina, v.o), **B** – MET100 (MET 100mg/Kg + ALD 50mg/Kg, v.o), **C** – CP (ALD 50mg/Kg, v.o), **D** – CompC (Composto C 1,2mg/Kg + MET 100mg/Kg + ALD 50mg/Kg, v.o).

5.2 NÍVEIS DE MDA

O tratamento com ALD aumentou de forma significativa as concentrações de MDA (* $p < 0,05$) ($8,18 \pm 0,36$ nmol/ml de tecido) no tecido gástrico das ratas, quando comparado aos animais do grupo controle que receberam apenas tratamento com salina ($3,64 \pm 0,25$ nmol/ml de tecido). Já a MET conseguiu reverter o aumento dos níveis de MDA causados pela administração de ALD (# $p < 0,05$) ($2,38 \pm 0,16$ nmol/ml de tecido). O inibidor da via de AMPK (Comp C) proporcionou um aumento

significativo ($\Psi p < 0,05$) ($3,42 \pm 0,12$ nmol/ml de tecido) de MDA quando comparado com o grupo MET100 como mostrado na figura 13:

Figura 13 - Efeito da MET nos níveis de MDA da mucosa gástrica de ratas normoglicêmicas com lesão induzida por ALD



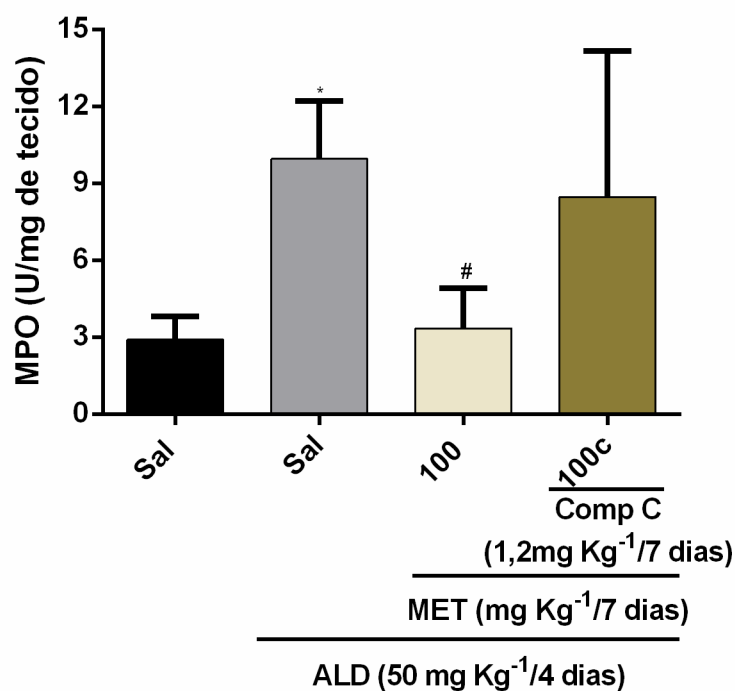
Legenda: (A administração de ALD levou ao aumento dos níveis de MDA no tecido gástrico de ratas normoglicêmicas, contudo, no grupo MET100 houve prevenção significativa desse efeito ($\#p < 0,05$), se comparado com o grupo que recebeu apenas ALD, CP. Por outro lado, no grupo que recebeu o Comp C não houve melhora desse parâmetro.) Os resultados são expressos com média \pm S.E.M com 5-7 ratas por grupo. * $P < 0,05$ vs. grupo controle negativo, $\Psi p < 0,05$ vs. grupo MET100, utilizou-se análise de variância e teste de *Newman-keuls* para a avaliação.

5.3 ATIVIDADE DA MPO NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ALD

Foi observado que a atividade de MPO foi maior para o grupo controle positivo ($9,96 \pm 1,00$ U/mg de tecido), quando comparado com o grupo controle negativo, que apresentou menor atividade de MPO ($2,90 \pm 0,45$ U/mg de tecido), e do grupo MET100, que apresentou atividade reduzida ($3,33 \pm 0,70$ U/mg de tecido). Já no grupo que recebeu Comp C pode-se observar comprometimento da função

gastroprotetora da MET evidenciado por níveis mais elevados de MPO ($8,47 \pm 2,84$ U/mg de tecido) (Figura 14).

Figura 14 - Ação da MET na atividade da MPO na lesão induzida por ALD da mucosa gástrica de ratas normoglicêmicas



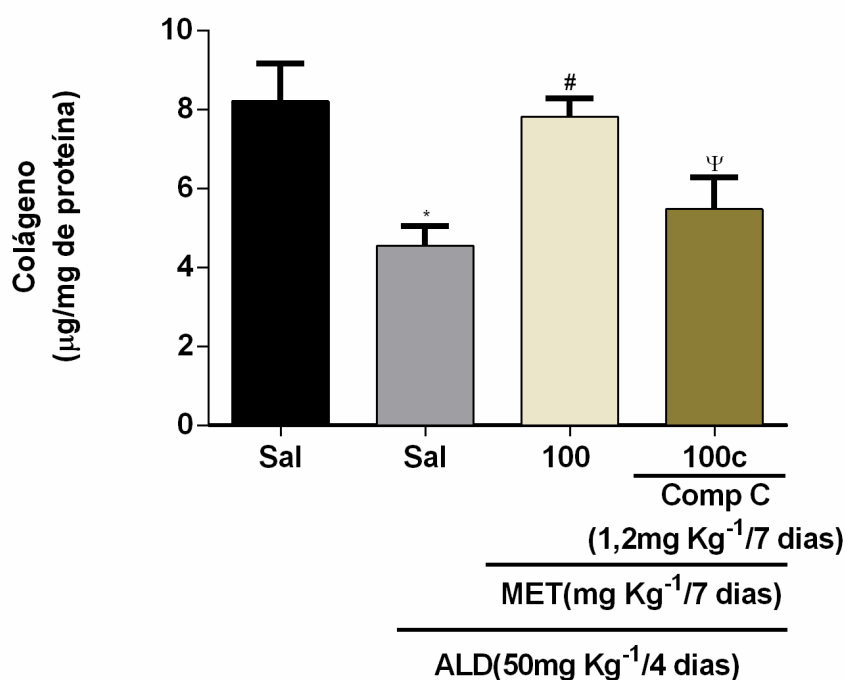
Legenda: (O tratamento com MET levou à redução da atividade da MPO alterada pela ação do ALD na mucosa de ratas normoglicêmicas) Os resultados são expressos com média \pm S.E.M com 4-5 ratas por grupo. * $P < 0,05$ vs. grupo controle negativo, # $p < 0,05$ vs. grupo controle positivo, utilizou-se análise de variância e teste de *Newman-keuls* para a avaliação.

5.4 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DA MET NA DEGRADAÇÃO DE COLÁGENO DA MUCOSA GÁSTRICA CAUSADA POR ALD

Ao investigar a presença de colágeno nas mucosas gástricas lesionadas ou não, observou-se que os grupos controle positivo e Comp C apresentaram diminuição significativa (* $p < 0,05$ e $\Psi p < 0,05$, respectivamente) de colágeno ($4,55 \pm 0,49 \mu\text{g/mg}$ de proteína e $5,47 \pm 0,81 \mu\text{g/mg}$ de proteína, respectivamente) se comparado com o grupo que recebeu apenas salina e com o grupo MET100 ($8,21 \pm 0,95 \mu\text{g/mg}$ de proteína e $7,82 \pm 0,46 \mu\text{g/mg}$ de proteína, respectivamente),

mostrando a capacidade da metformina de induzir o reparo tecidual, evidenciado por altos níveis de colágeno se comparado com o grupo que recebeu apenas ALD. (Figura 15).

Figura 15 - Efeito da MET nos níveis de colágeno da mucosa gástrica de ratas normoglicêmicas tratadas com ALD



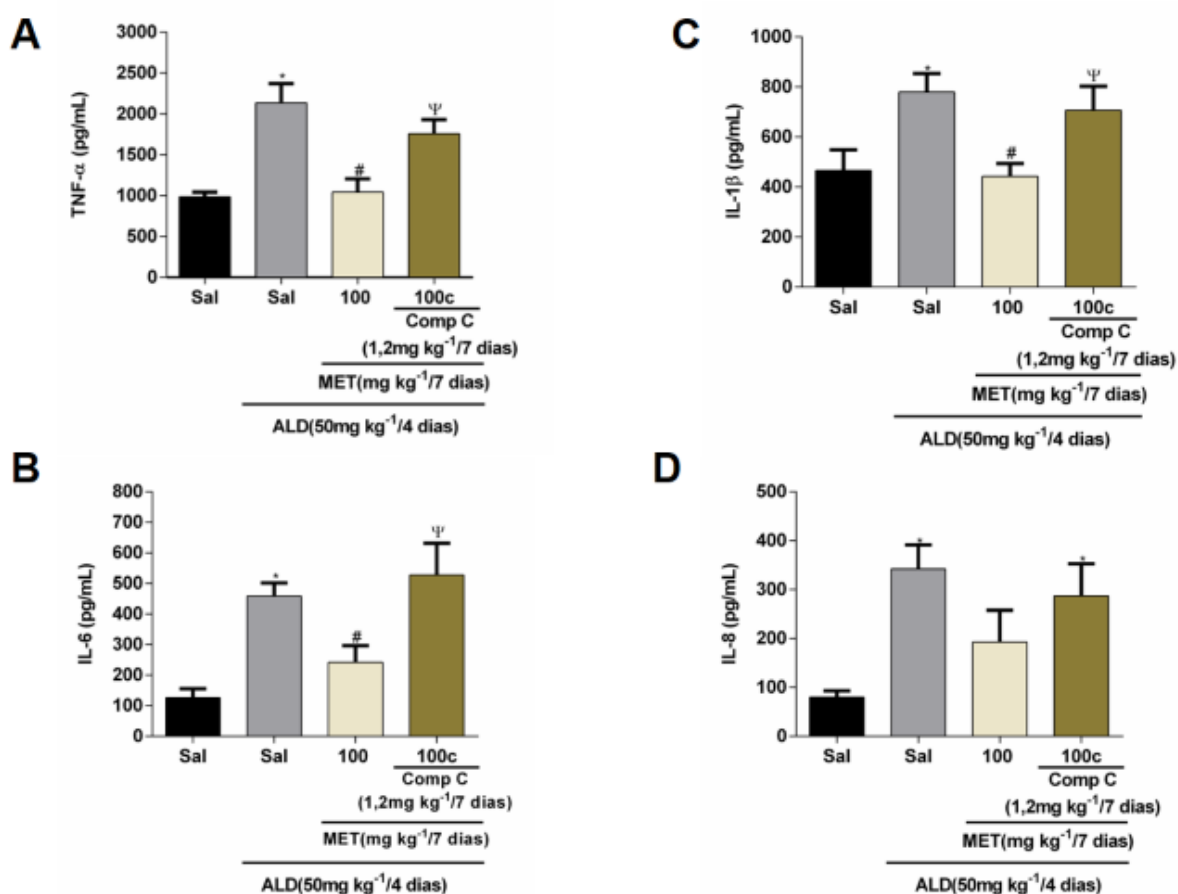
Legenda: (O tratamento com MET levou ao aumento de colágeno alterado pela ação do ALD na mucosa de ratas normoglicêmicas) Os resultados são expressos com média \pm S.E.M com 5 ratas por grupo. * $P < 0,05$ vs. grupo controle negativo, # $p < 0,05$ vs. grupo controle positivo e $\Psi p < 0,05$ vs. grupo MET100, utilizou-se o teste de Bonferroni para múltiplas comparações e o teste t para comparação entre dois grupos.

5.5 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DA MET NOS NÍVEIS DE CITOCINAS (TNF- α , IL-1 β , IL-6 E IL-8) DURANTE A LESÃO GÁSTRICA CAUSADA POR ALD

Houve uma intensa expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 nos grupos controle positivo ($2137 \pm 235,1$ pg/mL, $779,3 \pm 74,68$ pg/mL, $459,3 \pm 42,32$ pg/mL e $342,2 \pm 49,30$ pg/mL, respectivamente) e Comp C ($1759 \pm 171,1$ pg/mL, $707,4 \pm 95,29$ pg/mL, $527,4 \pm 104,5$ pg/mL e $287,4 \pm 65,36$ pg/mL, respectivamente),

significativamente maior que os grupos controle negativo ($986,5 \pm 56,74\text{pg/mL}$, $466,1 \pm 82,74\text{pg/mL}$, $126,1 \pm 29,84\text{pg/mL}$ e $80,12 \pm 12,87\text{pg/mL}$, respectivamente) e MET100 ($1044 \pm 160,9\text{pg/mL}$, $442,6 \pm 51,58\text{pg/mL}$, $242,6 \pm 53,49\text{pg/mL}$ e $192,8 \pm 65,11\text{pg/mL}$, respectivamente) ($*p<0,05$ e $\Psi p<0,05$, respectivamente). A MET demonstrou reduzir de forma significativa os níveis de interleucinas pró-inflamatórias, com exceção da IL-8 que não apresentou redução com significância estatística. Os resultados demonstram que a MET reduz os níveis de TNF- α ($\#p<0,05$), IL-1 β ($\#p<0,05$) e IL-6 ($\#p<0,05$) que são elevados na presença de dano gástrico causado por ALD (Figura 16).

Figura 16 - Efeito da MET na expressão de citocinas pró-inflamatórias em estômagos de ratas normoglicêmicas tratadas com ALD



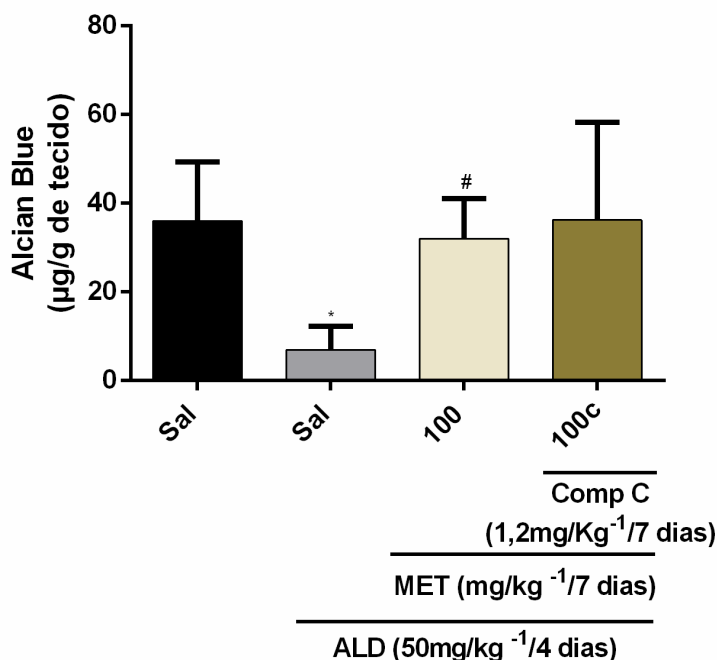
Legenda: (O pré-tratamento com MET reduziu de forma expressiva os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6; A, B e C, respectivamente). O grupo controle negativo foi tratado apenas com salina. Os resultados são expressos com média \pm S.E.M com 5 ratas por grupo. $*P<0,05$ vs. grupo CN, $\#p<0,05$ vs. grupo CP, $\Psi p<0,05$ vs. grupo

MET100. Utilizou-se o teste de Bonferroni para múltiplas comparações e o teste *t* para comparação entre dois grupos.

5.6 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DA MET PELA DETERMINAÇÃO DE MUCO GÁSTRICO NA LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ALD

A lesão ocasionada por ALD diminuiu de forma significativa a quantidade de muco aderido à mucosa gástrica em comparação ao grupo salina. Observou-se que a MET reverteu o efeito do ALD. Com isso, pode-se evidenciar que a MET afeta os níveis de muco aderido no estômago em comparação ao grupo tratado apenas com ALD. Contudo no grupo Comp C pode-se observar comprometimento da atividade da gastroprotetora da MET evidenciado por níveis alterados de muco aderido à mucosa (Figura 17).

Figura 17 - Efeito do pré-tratamento com MET na gastroproteção através da quantificação de muco no estômago de ratas normoglicêmicas com lesões induzidas por ALD



Legenda: Os resultados são expressos com média \pm S.E.M com 4-6 ratas por grupo. * $P < 0,05$ vs. grupo controle negativo, # $p < 0,05$ vs. grupo controle positivo, utilizou-se análise de variância e teste de *Newman-keuls* para a avaliação.

6 DISCUSSÃO

Com o aumento da expectativa de vida da população mundial vem crescendo também a incidência e prevalência de agravos crônicos, fazendo com que cada vez mais haja a necessidade do consumo de fármacos entre idosos e conseqüentemente a maior ocorrência de reações adversas a esses medicamentos. (SANTOS; BOING, 2018). Tal fato leva a uma constante busca por fármacos que substituam opções terapêuticas mais agressivas ou que minimizem os danos causados por elas.

Dentre esses agravos crônicos destaca-se a osteoporose, distúrbio ósseo que desencadeia desmineralização óssea. Atualmente, o tratamento de primeira escolha para a osteoporose se faz pelo uso de bifosfonatos, como o ALD. Apesar de seus benefícios, quando usado de forma crônica, o ALD desencadeia algumas reações adversas. Como exemplo, pode-se observar o surgimento de dano ulcerativo no trato gastrointestinal, que é um fator comprometedor do tratamento para a osteoporose, ao levar em conta que o mesmo possui um efeito lesivo local e nocivo para a mucosa gástrica (KAVANAGH et al., 2006; FERREIRA et al., 2017).

Em contraste a MET é uma biguanida utilizada como anti-hiperglicemiante no tratamento de DM tipo 2 e apresenta mínimas reações adversas. Além de seus efeitos anti-diabéticos, a MET apresenta outros benefícios, como seu uso no tratamento da síndrome de ovários policísticos e ação antitumoral. Por não causar hipoglicemia severa, a MET pode ser usada tanto por indivíduos hiperglicêmicos como por indivíduos normoglicêmicos, o que favorece ainda mais sua aplicação no tratamento de outras patologias (GOTLIEB et al., 2008; SASAKI et al., 2009; FRID et al., 2010; BARAKA; DIEF, 2011; KRAVCHUCK et al., 2011; ZHANG et al., 2011).

O presente estudo evidenciou que a MET apresenta efeitos gastroprotetores contra lesão causada por ALD tanto em ratas normoglicêmicas como em ratas hiperglicêmicas. Tais achados vão de acordo com o estudo de Baraka e Dief (2011) que demonstrou o papel gastroprotetor da MET contra lesões induzidas por indometacina. Apesar de serem medicações diferentes, ambas têm forte característica de desenvolvimento de lesão gástrica e ambas foram revertidas pela ação da MET.

Como sugerido na literatura científica, uma via de importante participação na ação da MET é a via de AMPK. Sugere-se que a MET atua ativando a via de AMPK e consequentemente produzindo efeitos benéficos ao organismo (HARDIE, 2016). O presente estudo investigou a participação dessa via por meio da utilização de uma substância inibidora da via de AMPK, o Composto C, e de acordo com os resultados pode-se sugerir, em consonância com estudos prévios, que a MET atua ativando AMPK uma vez que animais aqui tratados com o Composto C apresentaram comprometimento na gastroproteção induzida por MET (Figura 5). Como no estudo de Zhao *et al* (2017), que sugeriu que a MET ativa a referida via e promove efeitos favoráveis à reconstrução do tecido lesionado. Sugere-se que por ativar AMPK, a MET desencadeia a ativação da autofagia, mecanismo importante evidenciado em estudos que avaliam a ação da MET no câncer, por exemplo (LIBBY *et al.*, 2009; VALVERDE; NODA, FIGUEREDO, 2016).

Comumente a MET é administrada por via oral, na forma de comprimidos de 500mg. O presente estudo analisou a curva dose resposta da MET e observou que das três doses utilizadas (10, 30 e 100mg/Kg) a dose de 100mg/Kg apresentou resultados significativos na redução do dano gástrico induzida por ALD. Esses achados evidenciam o potencial efeito gastroprotetor da mesma, uma vez que se comparado a estudos anteriores, o presente estudo obteve resultados significativos com doses relativamente baixas (AMBRISH *et al.*, 2009; MORSY *et al.*, 2010; BARAKA; DIEF, 2011; FARD *et al.*, 2011). Tais dados são favoráveis uma vez que a dose que obteve melhores resultados encontra-se dentro da janela terapêutica da MET, aumentando a segurança do tratamento (COLE; BARNEY, 1987).

No presente estudo, as análises macroscópicas e microscópicas evidenciam a potencial ação do ALD de causar dano gástrico significativo tanto no corpo quanto no antro do estômago de ratas normoglicêmicas e hiperglicêmicas. Destaca-se que o efeito lesivo do ALD foi semelhante estatisticamente ao comparar os danos gástricos induzidos em ambos os estados glicêmicos. Essas lesões se caracterizam por grande perda epitelial e acúmulo de células mortas, que conferem o aspecto esbranquiçado (dado principalmente pelo acúmulo de fibrina), na lesão da mucosa, o que leva ao aumento do infiltrado inflamatório, dano hemorrágico e edema. Tais dados corroboram com outros estudos, que descreveram lesões semelhantes causadas por ALD na mucosa gástrica de roedores (SILVA *et al.*, 2014; CARVALHO

et al., 2016). Sabe-se que o acúmulo de neutrófilos e surgimento de edema estão diretamente relacionados ao surgimento de ulcerações e, apesar de o ALD não ter seu mecanismo de ação totalmente elucidado, atribui-se que sua ação lesiva esteja também relacionada com esses fatores (WALLACE *et al.*, 1990).

Na presença de lesões gástrica, vale ressaltar a ação do colágeno, que desempenha um importante papel para a integridade das células epiteliais da mucosa gástrica quando exposta a substâncias lesivas. Assim, grande quantidade de colágeno proporciona resistência contra a progressão de lesões, destacando que no processo de cicatrização dessas lesões há um aumento significativo de colágeno tipo I e III (YANG *et al.*, 2017).

No presente estudo pode-se observar por meio e AFM que o grupo controle positivo (tratado com ALD) apresentou maior descamação de colágeno e destruição da mucosa gástrica, podendo ser observado uma superfície irregular, sem pregas e repleta de pontos mais profundos (setas amarelas), se comparado com o grupo tratado com MET, que apresentou sua mucosa com maior conservação das estruturas da superfície epitelial. Tal efeito foi revertido pela ação do Composto C no grupo tratado com ambos (MET e Composto C). A utilização de tal método para avaliar o comprometimento do epitélio gástrico pode ser reforçada pelo estudo de Abdon e colaboradores (2014), que evidenciou por AFM a extensa descamação de colágeno em lesão gástrica induzida por etanol.

A participação do colágeno no processo cicatricial das lesões também foi analisada por meio de dosagem (Figura 10), no qual evidenciou-se que nos grupos controle positivo e grupo Comp C houve menor concentração de colágeno, caracterizando um estado de inflamação intenso, tendo em vista que o colágeno representa um importante fator de reparo tecidual, assim a sua diminuição representa comprometimento da restauração tecidual (ABDON *et al.*, 2014). Em contrapartida tal estado pode ser evitado pela ação da metformina, que proporcionou concentrações mais próximas às basais indicando a preservação da integridade da mucosa e bom reparo tecidual, assim como no estudo de Ambrish e colaboradores (2009).

Somado a esses fatores, a lesão tecidual promove peroxidação lipídica da membrana celular e desencadeia desordens na estrutura e função da mesma. Assim, para avaliar a ação de radicais livres no organismo pode-se avaliar os

produtos da peroxidação lipídica, como o MDA (YAGI, 1987; ANTUNES *et al.*, 2008). O presente estudo evidenciou o aumento nos níveis de MDA de amostras de estômago de ratas tratadas com ALD, o que indica o aumento da peroxidação lipídica causada pela lesão induzida por ele, em contrapartida a MET diminuiu significativamente os níveis de MDA, o que reforça seu efeito gastroprotetor. Assim como no estudo de Carvalho *et al* (2016) e Silva *et al* (2014) no qual também evidenciaram aumento de MDA em decorrência da lesão gástrica causada por ALD. A capacidade da MET de causar diminuição dos níveis de MDA também foi mencionada no estudo de Ohira e colaboradores (2014) que evidenciou tal evento em organismos com DM tipo 2, e no estudo de Abd-Elsameea; Moustaf; Mohamed (2014) que sugeriu o efeito da MET contra o estresse oxidativo ao observar diminuição dos níveis de MDA em ratos submetidos à isquemia cerebral.

Outra consequência do estímulo lesivo na mucosa gástrica é o recrutamento de neutrófilos como resposta da imunidade inata, tais células de defesa apresentam no interior de seus lisossomos a enzima MPO, liberada no citoplasma após os neutrófilos serem desgranulados em consequência dos estímulos lesivos no tecido (KRAWISZ *et al.*, 1984), com isso a MPO pode ser utilizada como marcador para migração neutrofílica. Nosso estudo evidenciou elevados níveis de MPO no grupo tratado com ALD (controle positivo) e níveis reduzidos no grupo que recebeu MET (grupo MET100), demonstrando assim que a possível ação gastroprotetora da MET ocorra também por meio da inibição da migração neutrofílica para o local lesionado. Também pode-se observar níveis de MPO alterados no grupo que recebeu inibidor de AMPK (Composto C), ressaltando e sugerindo a participação dessa via na ação gastroprotetora da MET, contudo pode-se sugerir o possível envolvimento de outras vias de atuação da MET na redução dos níveis de MPO, uma vez que houve variação entre os níveis de MPO dos animais do grupo Comp C. Tais achados corroboram com o estudo de Baraka e Dief (2011), que evidenciaram níveis reduzidos de MPO nos grupos que receberam tratamento contra lesão gástrica. E com outros estudos que evidenciam o potencial do ALD de elevar os níveis de MPO (AMAGASE *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2016).

O presente estudo também avaliou a participação da MET na expressão de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, para avaliar sua capacidade de reduzir a resposta inflamatória. Foi observado que a MET conseguiu reverter

significativamente a expressão de TNF- α , IL-1 β e IL-6, sugerindo então sua atividade no controle da resposta inflamatória, assim como em outros estudos que evidenciaram a ação da MET contra a inflamação (HYUN *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2014). O presente estudo indicou também a capacidade da MET de reduzir a expressão de IL-8, uma citocina envolvida na quimiotaxia dos neutrófilos, que mesmo sem significância estatística indicou supressão da mesma. Para reforçar tal achado, pode ser citado o estudo de Takemura e colaboradores (2007) que evidenciou que a MET suprime a expressão de IL-8, isso implica na diminuição da quimiotaxia dos neutrófilos e conseqüentemente suprime a resposta inflamatória.

Na determinação da ação da MET na produção de muco gástrico ficou evidente que a mesma esteve diretamente ligada à produção do mesmo, conferindo maior proteção à mucosa do que no grupo tratado com ALD (controle positivo) e com relação ao grupo Comp C, no qual destaca-se o possível envolvimento de outras vias de ação não elucidadas da MET com relação à sua influência na produção de muco gástrico, além do envolvimento da ativação de AMPK (uma vez que pode-se observar níveis diferentes de Alcian Blue dentre os animais do grupo que recebeu o inibidor de AMPK). O muco desempenha importante papel na proteção do epitélio gástrico pois é responsável por barrar radicais livres além de promover proteção mecânica, por ser composto basicamente por água e glicoproteínas, possuindo viscosidade e elasticidade. O Alcian Blue é um corante que se liga às mucinas gástricas e é utilizado para avaliar a proteção gástrica causada pelo muco (CORNE; MORRISSEY; WOODS, 1974). Os resultados do presente estudo mostraram que o ALD diminui drasticamente a secreção de muco o que conseqüentemente torna a mucosa desprotegida (CARVALHO *et al.*, 2016), em contrapartida a MET estimula a manutenção dos níveis fisiológicos de muco, sugere-se então que tal mecanismo também esteja relacionado com seu papel gastroprotetor.

Em resumo pode-se sugerir que a MET desempenha ação gastroprotetora evidenciada pela diminuição da incidência de lesões na mucosa gástrica, diminuição de edema, dano hemorrágico e infiltrado inflamatório, além de manter os níveis de muco nas concentrações basais. Ela também promove diminuição da peroxidação lipídica, diminuição da secreção de citocinas pró inflamatórias e diminuição do processo inflamatório evidenciado pela sua capacidade de manter o colágeno em

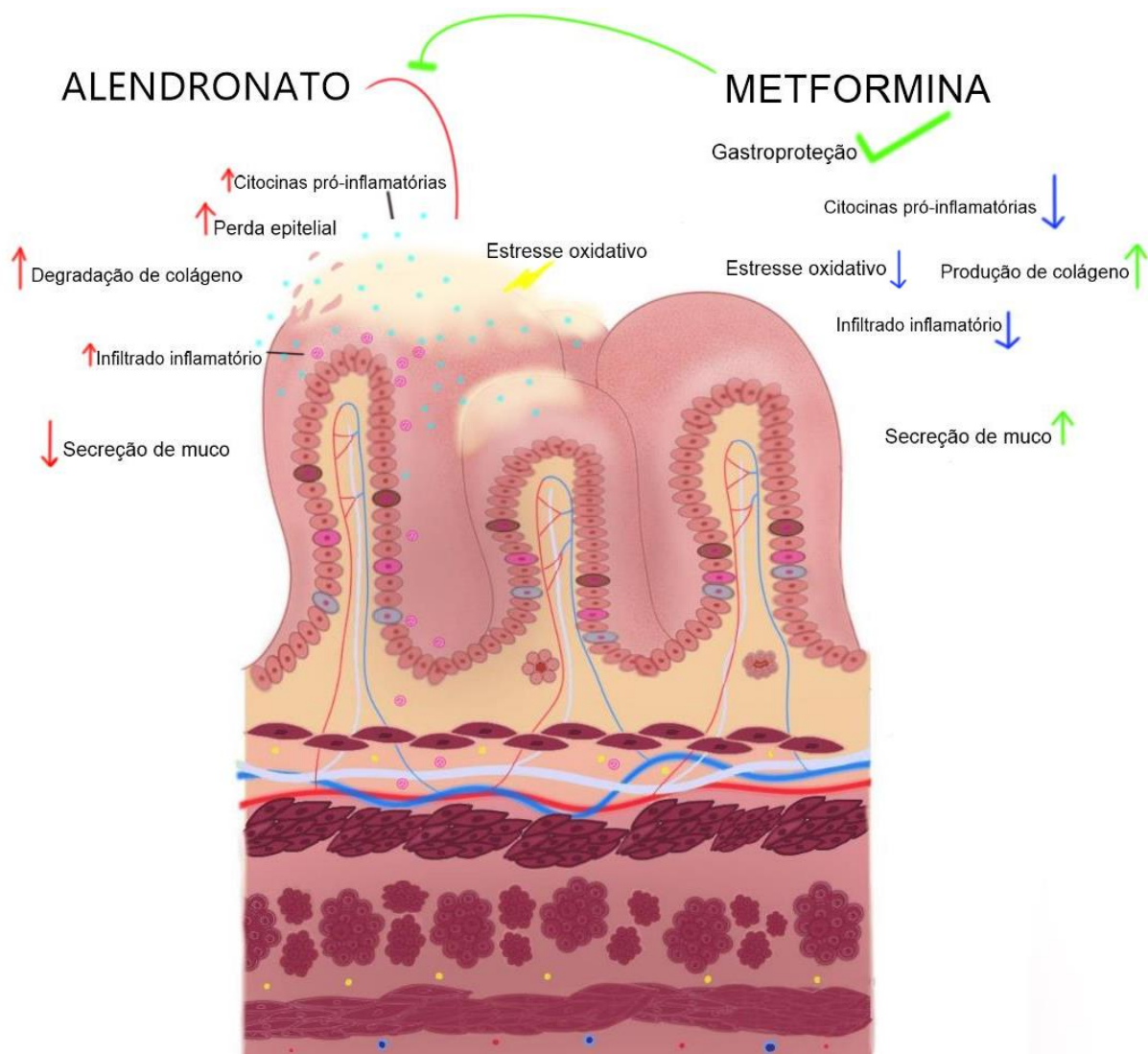
concentrações basais. Sugere-se ainda que tais achados estejam envolvidos com a via de AMPK uma vez que houve interferência na atividade gastroprotetora da MET quando na presença do composto C.

Tais achados são relevantes em diversos aspectos, tanto para a população, como para a comunidade acadêmica e indústria farmacêutica, uma vez que a metformina, um fármaco de fácil aquisição, se destaca como uma forte opção para o tratamento de diversas patologias, além de DM, proporcionando bons resultados com mínimos efeitos indesejados.

Pretende-se ainda realizar ensaios de *Western blot* para investigação da atividade de MET na via de AMPK e mTOR, a fim de melhor elucidar suas vias de atuação no efeito gastroprotetor. Espera-se que os resultados do presente estudo abram maiores caminhos e possibilitem a realização de novas pesquisas com relação às lesões gástricas causadas por alendronato, uma vez que esse problema torna-se um agravante para a manutenção da boa qualidade de vida da população idosa.

Segundo os resultados do presente estudo, sugere-se o seguinte esquema do efeito gastroprotetor da metformina na lesão induzida por alendronato (Figura 18):

Figura 18 – Resumo gráfico do efeito da metformina na lesão gástrica induzida por alendronato



Fonte: Autoria própria (2019)

7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a metformina desempenhou efeito gastroprotetor em lesões gástricas causadas por alendronato em ratas normoglicêmicas e hiperglicêmicas. Com a realização da análise histopatológica da mucosa gástrica evidenciou-se diminuição de edema, diminuição de infiltrado inflamatório, bem como de perda epitelial e dano hemorrágico causados pela administração de alendronato, tal efeito pode ser reforçado por meio de AFM. Observou-se que a metformina é capaz de reduzir MDA, expressão de citocinas pró-inflamatórias e migração neutrofílica, além de manter concentrações basais de muco e colágeno gástrico. Tais achados sugerem que a metformina pode ser usada como potente gastroprotetor, assim o presente estudo poderá proporcionar futuras pesquisas a fim de melhor desvendar seus mecanismos de ação, tornando-se uma grande aliada tanto para a população como para a comunidade acadêmica e indústria farmacêutica.

REFERÊNCIAS

ABD-ELSAMEEA, A.A; MOUSTAF, A.A; MOHAMED, A.M. Modulation of the oxidative stress by metformin in the cerebrum of rats exposed to global cerebral ischemia and ischemia/reperfusion. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** v.18, p. 2387-2392, 2014.

ABDON, A.P.V. *et al.* Ethanol-induced gastric injury: microscopic analysis of the protective effect of frutalin. **Int J Pept Res Ther.** v.20, p.325-332, 2014.

ADACHI, J.D. *et al.* Two-year effects of alendronate on bone mineral density and vertebral fracture in patients receiving glucocorticoids. **Arthritis & Rheumatism.** v. 44, n. 1, p. 202-211, 2001.

ALZHRANI, S. *et al.* Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. **World Journal of Gastroenterology.** v. 20, n. 36, p. 12767-12780. 2014.

AMAGASE, K. *et al.* Gastric ulcerogenic and healing impairment effects of risedronate, a nitrogen-containing bisphosphonate in rats. Comparasion with alendronate and minodronate. **Journal of Physiology and Pharmacology.** v.62, n.6, p.609-18, 2011.

AMBRISH, C. *et al.* Influence of oral anti-diabetic agents on wound healing in euglycemic male Wistar rats. **Pharmacologyonline.** v. 1, p. 476-483, 2009.

ANTONISAMY, P. *et al.* Gastroprotective effect of nymphayol isolated from *Nymphaea stellate* (Willd.) flowers: contribution of antioxidant, antiinflammatory and anti-apoptotic activities. **Chemico Biological Interactions.** v. 224, p. 157–163. 2014.

ANTUNES, M.V. *et al.* Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Rev Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** v. 44, n.2, p.279-287, 2008.

BARAKA, A. M; DIEF, M. M. Role of activation of 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase in gastric ulcer healing in diabetic rats. **Pharmacology.** v. 88, p. 275-283, 2011.

BI, L.C.; KAUNITZ, J.D. Gastroduodenal mucosal defense: an integrated protective response. **Curr Opin Gastroenterol,** v.19, p. 526–532, 2003.

BRADLEY, P. P; CHRISTENSEN, R. D; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**. v. 60, n. 3, p. 618-622, 1982.
BRASIL. Cadernos de atenção básica: estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica – diabetes *mellitus*. Ministério da Saúde. Brasília, 2013.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, v. 2, 852p, 2010.

_____. DATASUS. **Morbidade hospitalar do SUS por local de internação, Brasil – internações segundo região, período: jan-nov/2018**. Ministério da Saúde. Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). 2017. Disponível em: < <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def> > Acesso em: 31 jan 2019.

BROWN, J.F; KEATES, A.C; HANSON, P.J; WHITTLE, J.R. Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. **American Physiological Society**. p.418-22, 1993.

BRUNTON, L. et al. **Farmacoterapia da acidez gástrica, úlceras pépticas e doença do refluxo gastroesofágico**. 11^a Ed. Rio de Janeiro. 2010

BRUZZI, M. et al. Single anastomosis or mini-gastric bypass: long-term results and quality of life after a 5-year follow-up. **Surgery for Obesity and Related Diseases**. v. 11, n.2, p. 321–326, 2015.

CARLI, D.M. *et al.* Peptic ulcer frequency differences related to h. pylori or aines. **Arq Gastroenterol**. v. 52, n. 1, p. 46-49, 2014.

CARSWELL, R. Na inquiry on the chemical solution or digestion of the coats of the stomach after death, with some observations on softening, erosion and perforation of the stomach in man and animals. **Journal Hebdomadaire de Médecine**. p-282-311, 1830.

CARVALHO, N. S. *et al.* Protective Effects of simvastatin against alendronate-induced gastric mucosal injury in rats. **Dig Dis Sci**. v. 61, p. 400-409, 2016.

CDC - DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **National diabetes statistics report, 2017. Estimates of diabetes and its burden in the United States**. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. Division of Diabetes Translation, 2017.

CHAUHAN, A. K; KANG, S. C. Therapeutic potential and mechanism of thymol action against ethanol-induced gastric mucosal injury in rat model. **Alcohol**. v. 49, p. 739-745. 2015.

COLE, C.H; BARNEY, E.E. Safeguards and therapeutic window: a group treatment strategy for adult incest survivors. **American Journal of Orthopsychiatry**. v. 57, n. 4, p. 601-609, 1987.

CORNE, S. J.; MORRISSEY, S. M.; WOODS, R. J. Proceedings: a method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **J Physiol**, v. 242, n.2, p. 116-117, 1974.

COSTA, N. R. D. *et al.* Role of soluble guanylate cyclase activation in the gastroprotective effect of the HO-1/CO pathway against alendronate-induced gastric damage in rats. **European Journal of Pharmacology**. v. 700, p. 51-59, 2013.

COUGHLAN, K. A; VALENTINE, R. J; SAHA, A. K. AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**. v. 7, p. 241-253, 2014.

CUNHA, F. Q. *et al.* Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **Eur J Pharmacol**, v. 238, n. 1, p. 47–52, 1993.

DEKKER, J; VAN BEURDEN-LAMERS, M.O; STROUS, G.J. Biosynthesis of gastric mucus glycoprotein of the rat. **The Journal of Biology Chemistry**. v.264, n.18, p.10431-7, 1989.

DIOGO FILHO, A. *et al.* Câncer de coto gástrico após gastrectomia por úlcera péptica gastroduodenal. **ABCD Bras Cir Dig**. v. 29, n. 1, p. 65-69. 2016.

FARD, A.A. *et al.* The effects of combined adiponectin-metformin on glucose and lipids levels in mice and acute toxicity and anti-ulcerogenic activity of adiponectin against ethanol-induced gastric mucosal injuries in rat. **Molecules**. v.16, p.9534-9552, 2011.

FERREIRA, G. E. *et al.* Uso de bisfosfonatos em idosos: complicações e condutas em odontologia. **Revista Intercâmbio**. v. 10, p. 137-253, 2017.

FISCHBACH, W. et al. Helicobacter pylori and gastroduodenal ulcer disease. **Dtsch Arztebl Int.** v. 106, p. 801-808, 2009.

FRID, A. et al. Novel assay of metformin levels in patients with type 2 diabetes and varying levels of renal function: clinical recommendations. **Diabetes Care.** v. 33, p. 1291–1293, 2010.

GAGNON, J; SHEPPARD, E; ANINI, Y. Metformin directly inhibits ghrelin secretion through AMP-activated protein kinase in rat primary gastric cells. **Diabetes, Obesity and Metabolism.** v. 15, p. 276-279, 2013.

GOTLIEB, W.H. In vitro metformin anti-neoplastic activity in epithelial ovarian cancer. **Gynecol Oncol.** v.110, p.246–250, 2008.

GUNDEWAR, S. et al. Activation of AMP-activated protein kinase by metformin improves left ventricular function and survival in heart failure. **Circ Res.** v.104, p. 403–411, 2009.

HARDIE, D. G. AMPK: a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer. **Diabetes.** v. 62, p. 2165-2172, 2013.

HARDIE, D. G. AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. **Current Opinion in Cell Biology.** v. 33, p. 1-7, 2015.

HARDIE, D. G. Regulation of AMP-activated protein Kinase by natural and synthetic activators. **Acta Pharmaceutica Sinica B.** v. 1, p.1-19, 2016.

HARDIE, D. G; ASHFORD, M. L. J. AMPK: regulation energy balance at the cellular and whole body levels. **Physiology.** v. 29, p. 99-107, 2014.

HARDIE, D.G. AMP-activated protein kinase – an energy sensor that regulates all aspects of cell function. **Genes & Development.** v. 25, p. 1895-1908, 2011.

Hasanvand, A. et al. Anti-inflammatory effect of AMPK signaling pathway in rat model of diabetic neuropathy. **Inflammopharmacol.** v.24, p. 207-219, 2016.

HERZIG, S; SHAW, R. J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 19, n. 2, p. 121-135, 2018.

HONNAPPA, C. G; KESAVAN, U. M. A concise review on advances in development of small molecule anti-inflammatory therapeutics emphasizing AMPK: an emerging target. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**. v. 29, n. 4, p. 562-571, 2016.

HOOI, J.K.Y. *et al.* Global prevalence of helicobacter pylori infection: systematic review and meta-analysis. **Gastroenterology**. v. 153, p. 420-429, 2017.

HYUN, B. *et al.* Metformin down-regulates TNF-alfa secretion via suppression of scavenger receptors in macrophages. **Immune Network**. v.13, n.4, p.123-132, 2013.

IDF – INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Atlas do diabetes 2015: atualização**. Adaptado pela Sociedade Brasileira de Diabetes. 7 ed, 2015.
Disponível em: < <http://www.diabetes.org.br/images/2015/atlas-idf-2015.pdf> >
Acesso em: 05 out 2017.

IVERNIZZI, M; CISARI, C; CARDA, S. The potential impact of new effervescent alendronate formulation on compliance and persistence in osteoporosis treatment. **Aging Clim Exp Res**. v. 27, p. 107-113, 2015.

JACKSON, R.G. Anatomy of the vagus nerves in the region of the lower esophagus and the stomach. **The Anatomical Record**. v. 103, n. 1, p. 1-18, 1949.

JUSTINA, E. Y. D; LOPES, N. B. S; LOLI, T. N; GOTO, V. R. *et al.* Levantamento de dados de internações por úlcera gástrica e duodenal na 8ª regional de saúde de Francisco Beltrão. **Biosaúde**. v. 18, n. 1, p. 21-26. 2016.

KAVANAGH, K. L. *et al.* The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. **PNAS**. v. 103, n. 20, p. 7829-7834, 2006.

KRAVCHUK, E. *et al.* The Effect of Metformin on the Myocardial Tolerance to Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat Model of Diabetes Mellitus Type II. **Exp Diabetes Res**. v. 2011, p. 1-5, 2011.

KRAWISZ, J. E., SHARON, P., STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of

inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**. v. 87, n. 6, p. 1344-1350, 1984.

LAGERGREN, J; LINDAM, A; MASON, R.M. Gastric stump câncer after distal gastrectomy for benign gastric ulcer in a population-based study. **International Journal of Cancer**. v. 131, v. 6, p. 1-5, 2012.

LAINE, L.; WEINSTEIN, W.M. Histology of alcoholic hemorrhagic "gastritis": a prospective evaluation. **Gastroenterology**., v. 94, p. 1254-1262, 1988.

LIBBY, G. *et al.* New users of metformin are at low risk of incident câncer: a cohort study among people with type 2 diabetes. **Diabetes Care Publish Ahead of Print**. p.1-13, 2009.

LOPES, A. C. F. *et al.* Prevalência de alterações gustativas em idosos em uso crônico de fármacos. **Geriatr Gerontol Aging**. v. 9, n. 4, p. 132-137, 2015.

LÓPEZ-DE LÉON, A; KOJKING, M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalina-fixed paraffin-embedded sections. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. v.33, n. 8, p. 737-743, 1985.

LUCEY, M. R., YAMADA, T. Biochemistry and physiology of gastrointestinal somatostatin. *Dig. Dis. Sci*, v. 34, n. 3, p. 5S-13S, 1989.

MARSHALL, B; WARREN, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of pacientes with gastrites and peptic ulceration. **The Lancet**. v. 323, n. 8390, p. 1311-1315, 1984.

MASIELLO, P. *et al.* Development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. **Diabetes**. v. 47, p. 224-229, 1998.

MAYO CLINIC. Diabetes: overview. 2018. Disponível em: < <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/diabetes/symptoms-causes/syc-20371444> Acesso em: 06 dez 2018.

MEDEIROS, J.V.R. *et al.* Hydrogen Sulfide Prevents Ethanol-Induced Gastric Damage in Mice: Role of ATP-Sensitive Potassium Channels and Capsaicin-Sensitive Primary Afferent Neurons. **ASPET**. v. 330, n. 3, p. 764-770, 2009.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal. Biochem**. v. 86, p. 271–278, 1978.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Gestação de alto risco: manual técnico**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Brasília, 5ed, 2010.

MORSY, M.A; ASHOUR, O.M; FOUAD, A.A; ABDEL-GABER, S.A. Gastroprotetive effects of the insulin sensitizers rosiglitazone and metformin against indomethacin-induced gastric ulcer in Type 2 diabetic rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v.37, p.173-7, 2010.

NICOLAU, L. A. D. *et al.* The hydrogen sulfide donor, Lawesson's reagent, prevents alendronate-induced gastric damage in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 46, p. 708-714, 2013.

OHIRA, M. *et al.* Metformin reduces circulating malondialdehyde-modified low-density lipoprotein in type 2 diabetes mellitus. **Clin Invest Med**. v.37, n.4, p.243-251, 2014.

OLIVEIRA, A. F. *et al.* Estimativa da prevalência e da mortalidade por complicações da úlcera péptica, Brasil, 2008: uma proposta metodológica. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 24, n. 1, p. 383-394, 2015.

PENG, Y.L. *et al.* Alendronate, a bisphosphonate, increased upper and lower gastrointestinal bleeding: risk factor analysis from a Nationwide population-based study. **Osteoporos Int**. v.25, p.1617-1623, 2014.

PRINZ, C. *et al.* Acid secretion the H,K ATPase os stomach. **The Yale Journal of Biology and Medicina**. v.65, p.577-596, 1992.

PRINZ, C. *et al.* Histamine secretion from rat enterochromaffinlike cells. **Gastroenterology**. v. 105, p.449-461, 1993.

RAMOS, L.R. *et al.* Polifarmácia e polimorbidade em idosos no Brasil: um desafio em saúde pública. **Ver Saúde Pública**. v.50, n.2, p. 1-9, 2016.

ROHDE, L.; OSVALDT, A. Rotinas em Cirurgia digestiva. Porto Alegre RS, Artmed, p. 125, 2011.

ROSS, I.N; TURNBERG, L.A. Studies of the mucus-bicarbonate barrier on rat fundic mucosa: the effects of luminal pH and a stable prostaglandina analogue. **Gut**. v.24, p.1030-3, 1983.

SACHS, G; SCOTT, D. R. Helicobacter pylori: Eradication or Preservation. **Med Rep.** v. 4, p.7, 2012.

SANTOS, G.A.S; BOING, A.C. Mortalidade e internações hospitalares por intoxicações e reações adversas a medicamentos no Brasil: análise de 2000 a 2014. **Cad. Saúde Pública.** v. 34, n.6, p. 1-14, 2018.

SARMENTO, G.M. A dilatação do estômago. Escola Médico-Cirúrgica do Porto [Dissertação inaugural], 1894.

SASAKI, H. *et al.* Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase. **Circulation.** v.119, p. 2568–2577, 2009.

SBEM - SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. **O que é diabetes?** 2016. Disponível em: < <http://www.endocrino.org.br/o-que-e-diabetes/> > Acesso em: 05 out 2017.

SCHEEN, A.J. Clinical pharmacokinetics of metformin. **Clinical Pharmacokinetics.** v. 30, n. 5, p. 359-371, 1996.

SCHUBERT, M.L., PEURA, D.A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology.** v. 134, n. 7, p. 1842-1860, 2008.

SHIN, J. M; SACHS, G. Pharmacology of proton pump inhibitors. **Curr Gastroenterol Rep.** v.10, p. 528-534, 2008.

SIGAL, M. *et al.* Helicobacter pylori activates and expands lgr5+ stem cells through direct colonization of the gastric glands. **Gastroenterology.** v. 148, n. 7, p. 1392-1404, 2015.

SILVA, A.G *et al.* Adesão de pacientes ao tratamento com antineoplásicos orais: fatores influentes. **Revista Baiana de Enfermagem.** v. 31, n. 1, p. 1-12, 2017.

SILVA, R. O. *et al.* Alendronate induces gastric damage by reducing nitric oxide synthase expression and NO/cGMP/KATP signaling pathway. **Nitric Oxide.** v. 40, p. 22-30, 2014.

SILVOSO, G.R. Incidence of gastric lesions in patients with rheumatic disease on chronic aspirin therapy. **Annals of Internal Medicine**. v. 91, n.4, p. 517-520, 1979.

SOSTRES, C. *et al.* Peptic ulcer bleeding risk. The role of helicobacter pylori infection in NSAID/Low-Dose Aspirin users. **The American Journal of Gastroenterology**. v. 110, n. 5, p-684-689, 2015.

TAKEMURA, T. *et al.* Metformin suppresses interleukin (IL)-1beta-induced IL-8 production, aromatase activation, and proliferation of endometrial stromal cells. **J Clin Endocrinol Metab**. v.92, n.8, p.3213-8, 2007.

TING, R. Z. Risk factors of vitamin B12 deficiency in patients receiving metformin. **Archives Internal Medicine**. v. 166, n. 18, p. 1975-1979, 2006.

VALVERDE, C.A.V; NODA, M.F; FIGUEREDO, I.G. Nuevas evidencias del uso de la metformina en el tratamiento del cáncer. **Revista Cubana de Endocrinología**. v.27, n. 3, p.80-90, 2016.

VAN DE GRAAFF, K.M. Anatomy and physiology of the gastrointestinal tract. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. v.5, n.1, p.11-16, 1986.

VANE, J.R; BOTTING, R.M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **Scandinavian Journal of Rheumatology**. v. 25, n. 102, p. 9-21, 1996.

VIOLLET, B. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. **Clinical Science**. v. 22, 253-270, 2012.

VIOLLET, B; FORETZ, M. Revisiting the mechanisms of metformin action in the liver. **Annales d'Endocrinologie**. v. 74, p. 123-129, 2013.

VOS, T. *et al.* (Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015'. **The Lancet**. v. 388, n. 10053, p. 1545-1602, 2015.

WALLACE, J.L., KEENAN, C.M., GRANGER, D.N. Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil dependent process. **Am J Physiol**. v. 259, n. 3, p. G462-G467, 1990.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global report on diabetes**. 2016.

XU, X; DU, C; ZHENG, Q; PENG, L; SUN, Y. Effect of metformin on sérum interleukin-6 levels in polycystic ovary syndrome: a systematic review. **BMC Women's Health**. v. 14, n. 93, p.4-7, 2014.

YAGI, K. Lipid peroxides and human diseases. **Chemistry and Physics of Lipids**. v.45, p. 337-351, 1987.

YANG, R.Q; M, H; HUANG, L.Y; SU, P.Z; LU, M. Effects of hydrotalcite combined with esomeprazole on gastric ulcer healing quality: a clinical observation study. **World Journal of Gastroenterology**. v.23, n. 7, p. 1268-1277, 2017.

ZHANG, C.X. *et al.* Metformin attenuates ventricular hypertrophy by activating the AMP-activated protein kinase-endothelial nitric oxide synthase pathway in rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. v. 38, p. 55–62, 2011.

ZHAO, P. *et al.* Anti-aging pharmacology in cutaneous wound healing: effects of metformin, resveratrol, and rapamycin by local application. **Aging Cell**. v.16, p.1083-1093, 2017.

WANG, Y. *et al.* Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**. V. 37, n. 63, p. 1-2, 2018.

ANEXO A

Carta de submissão do artigo com os dados referentes à pesquisa realizada

Fwd: Submission Confirmation for Alendronate-induced gastric damage in normoglycemic and hyperglycemic rats is reversed by metformin

Jand-Venes Rolim Medeiros

Ter, 19/02/2019 16:28

Para: Isabela Nolêto -

----- Forwarded message -----

From: **The European Journal of Pharmacology** <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Date: ter, 19 de fev de 2019 às 16:27

Subject: Submission Confirmation for Alendronate-induced gastric damage in normoglycemic and hyperglycemic rats is reversed by metformin

To: <jandvenes@ufpi.edu.br>

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Jand Rolim Medeiros,

Your submission entitled "Alendronate-induced gastric damage in normoglycemic and hyperglycemic rats is reversed by metformin"(Research Paper) has been received by journal European Journal of Pharmacology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/ejp/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

European Journal of Pharmacology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

ANEXO B

Parecer do comitê de ética em experimentação animal



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



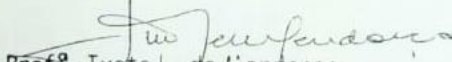
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail_ ceepi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Efeito da metformina na lesão gástrica, hepática e renal induzida por alendronato em ratos normais e diabéticos*", registrada nº 474/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. JAND VENES ROLIM MEDEIROS do Departamento de Farmacologia - Campus Ministro Reis Veloso/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **15/06/2018**.

| | |
|-------------------------|------------------------------------|
| Finalidade | () Ensino () Pesquisa Científica |
| Vigência da Autorização | Agosto/2018 à Dezembro/ 2023 |
| Espécie/Linhagem/raça | Rato heterogênico/ wistar |
| Nº de Animais | 406 |
| Peso/ Idade | 180-200g/ 8 semanas |
| Sexo | Fêmeas |
| Origem | Biotério Central da UFPI. |

Teresina, 15 de Junho de 2018.


Prof.^a Ivete L. de Mendonça
Comite de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

APÊNDICE A
Fármacos utilizados no estudo, informações gerais

Apêndice A – Fármacos utilizados, informações gerais – Brasil - 2019

| FÁRMACO | Fornecedor | Concentração | Aplicabilidade no estudo |
|-----------------|---------------------------------------|---------------------|---|
| Metformina | Cayman Chemical (Michigan, EUA) | Substância pura | Proteção gástrica contra lesão induzida por alendronato |
| Streptozotocina | Cayman Chemical (Michigan, EUA) | 95% de pureza | Indução de DM por citotoxicidade seletiva às células β pancreáticas |
| Composto C | Cayman Chemical (Michigan, EUA) | Substância pura | Inibidor de AMPK |
| Nicotinamida | Sigma-Aldrich | Substância pura | Citoproteção às demais células do organismo durante indução de DM |
| Alendronato | Sigma-Aldrich | Substância pura | Indução de lesão gástrica |

Fonte: Autoria própria (2019)