

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE – MESTRADO

**NATANI RIBEIRO DEMARCO**

**EFEITOS DO CLORIDRATO DE METFORMINA SOBRE ATIVIDADE DA  
COLINESTERASE, SISTEMA ANTIOXIDANTE E AÇÃO MUTAGÊNICA EM *Danio  
rerio* (CYPRINIFORMES: CYPRINIDAE)**

CASCADEL-PR

02/2019

**NATANI RIBEIRO DEMARCO**

**EFEITOS DO CLORIDRATO DE METFORMINA SOBRE ATIVIDADE DA COLINESTERASE, SISTEMA ANTIOXIDANTE E AÇÃO MUTAGÊNICA EM *Danio rerio* (CYPRINIFORMES: CYPRINIDAE)**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa De Pós-Graduação em Biociências e Saúde – Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Fatores que Influenciam a Morfofisiologia Orgânica

ORIENTADOR: Profa. Dra. Ana Tereza Bittencourt Guimarães

COORIENTADORA: Profa. Dra. Luciana Paula Gregio d'Arce Rodrigues

CASCADEL-PR

02/2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ribeiro Demarco, NATANI

EFEITOS DO CLORIDRATO DE METFORMINA SOBRE ATIVIDADE DA COLINESTERASE, SISTEMA ANTIOXIDANTE E AÇÃO MUTAGÊNICA EM *Danio rerio* (CYPRINIFORMES: CYPRINIDAE) / NATANI Ribeiro Demarco; orientador(a), Ana Tereza Bittencourt Guimarães; coorientador(a), Luciana Paula Grégio d'Arce Rodrigues, 2019.

81 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Graduação em Ciências Biológicas Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, 2019.

1. Sistema antioxidante. 2. Mutagenicidade. 3. Cloridrato de metformina. I. Bittencourt Guimarães, Ana Tereza . II. Grégio d'Arce Rodrigues, Luciana Paula. III. Título.



## NATANI RIBEIRO DEMARCO

### **Efeitos do cloridrato de metformina sobre atividade da colinesterase, sistema antioxidante e ação mutagênica em *Danio rerio* (Cypriniformes: Cyprinidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biociências e Saúde, área de concentração Biologia, Processo Saúde-doença e Políticas de Saúde, linha de pesquisa Fatores que Influenciam a Morfofisiologia Orgânica, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

---

Orientador: Prof. Dr. (a) Ana Tereza Bittencourt Guimarães

Universidade Estadual do Oeste do Paraná-Campus de Cascavel (UNIOESTE)

---

Coorientador: Prof. Dr. (a) Luciana Paula Grégio d'Arce Rodrigues

Universidade Estadual do Oeste do Paraná-Campus de Cascavel (UNIOESTE)

---

Prof. Dr. (a) Marina K. Kadowaki

Universidade Estadual do Oeste do Paraná-Campus de Cascavel (UNIOESTE)

---

Prof. Dr. (a) Silvia Romão

Universidade Federal da Fronteira Sul-Campus de Laranjeiras do Sul (UFFS)

Cascavel, 22 de fevereiro de 2019

## AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento será a Deus, pela força concedida nestes dois anos de trabalho, juntamente com minha família, que são meu alicerce em todos os momentos e dificuldades, sempre me dando amor, apoiando, incentivando a adquirir conhecimento e ser uma pessoa melhor. Foi por vocês! Esse trabalho só pôde ser realizado devido ao auxílio não menos importante das minhas duas “mãezonas”: Professora Ana Tereza e Professora Luciana. Quero agradecê-las, em especial, por terem me dado todo o apoio mesmo, em momentos difíceis, sejam eles dentro da universidade ou fora dela, em todo aprendizado e tempo a mim concedidos. Ana, muito obrigada por ter me aceitado nestes dois anos como sua filha/orientanda, pelo seu esforço e dedicação para com todos. Demonstrando sempre amor ao seu trabalho e fazendo-o sempre com bom grado, te admiro muito por isso e serei eternamente grata pelo espaço em sua vida concedido a mim. Lu, acho que não tenho nem como expressar minha gratidão por todos esses anos de companheirismo e amizade. Estando sempre ao meu lado, tratando-me como uma filha também. Muitíssimo obrigada, pelo seu “sim” no meu segundo ano de faculdade, ele foi essencial para que chegasse onde estou e me tornasse a pessoa que hoje sou, te admiro pela mãe que és e pelo seu amor a genética, isso foi essencial para que eu realizasse com tanto carinho todos os trabalhos que realizei. Agradeço também, a toda equipe do laboratório de Mutagênese e do laboratório LInBio, sem eles, com certeza, os resultados para essa pesquisa teriam sido muito mais difíceis. Aos meus amigos e minha “irmã” Mara, que sempre esteve comigo em todos esses anos de UNIOESTE, sempre me ajudando e apoiando, você foi com certeza, peça fundamental para essa conquista, sempre te levarei comigo independente do caminho que levaremos agora. E por fim, a Unioeste e a Capes, pelo espaço e bolsa concedidos.

## RESUMO

DEMARCO, N.R. **Efeitos do cloridrato de metformina sobre atividade da colinesterase, sistema antioxidante e ação mutagênica em *Danio rerio* (cypriniformes: cyprinidae)**. 81 páginas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2019.

O cloridrato de metformina é um medicamento utilizado principalmente no tratamento do Diabetes Mellitus, sendo um composto químico derivado da guanidina. Este produto químico é parcialmente metabolizado no organismo humano e, ao ser eliminado pela urina, atinge os ambientes aquáticos sem que haja sua devida biorremediação. Diante de tal fato, bem como o escasso conhecimento sobre os potenciais efeitos do cloridrato de metformina sobre biomarcadores, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos desta droga sobre os sistemas antioxidante e colinérgico, bem como seu potencial mutagênico por meio do bioindicador *Danio rerio*. Os procedimentos experimentais aqui apresentados foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA-Unioeste). Os animais foram aclimatados em temperatura ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ), pH ( $7,0 \pm 0,5$ ) e oxigenação ( $5,0 \pm 0,5$ ) constantes, por um período de sete dias. Em seguida, em um delineamento inteiramente casualizado, os peixes foram separados em seis grupos expostos a diferentes concentrações (0,25 g/L; 0,5 g/L; 0,75 g/L; 1,25 g/L) do cloridrato de metformina para a determinação da CL50 e efeito agudo do medicamento por um período de 96 horas. Após determinada a concentração não-letal (0,45 g/L), foram separados outros seis grupos (n=10 por grupo): quatro grupos para avaliação do efeito crônico de cloridrato de metformina eutanasiados em diferentes tempos (15, 30, 45 e 60 dias), um grupo controle negativo e um grupo controle positivo (tratados com ciclofosfamida). Ao final dos períodos experimentais, os animais foram anestesiados em eugenol (30 mg/L) e realizada a retirada dos materiais biológicos (músculo e sangue). Na matriz muscular foram realizados estudo da ação do medicamento sobre o sistema antioxidante (Superóxido dismutase - SOD, Catalase - CAT, Lipoperoxidação - LPO e Glutathione transferase - GST), atividade da enzima colinesterase (ChE) e na matriz sanguínea foram avaliadas ações mutagênicas (Teste do Micronúcleo - MN). No período de avaliação aguda até 96h, foi observada a ativação do sistema antioxidante, considerando-se um processo de defesa contra uma alteração metabólica do organismo. Durante a exposição crônica ao cloridrato de metformina, em 15 dias de tratamento os animais apresentaram efeitos citotóxicos, observando-se necrose em seus eritrócitos, bem como ativações do sistema antioxidante, com elevação da atividade enzimática da SOD, CAT e GST. Ao longo do período experimental (30, 45 e 60 dias), foi observada a elevação da frequência de MN, bem como ativação dos sistemas de reparo, mas verificada a adequação do sistema antioxidante de forma similar ao controle, indicando a estabilização do metabolismo diante da exposição ao medicamento. Diante do exposto, considera-se que o cloridrato de metformina tem potencial ação aguda sobre o sistema antioxidante, bem como potencial mutagênico

ao longo de um período de 15 dias de tratamento, havendo uma adequação metabólica após este período até 60 dias de tratamento.

**Palavras-Chaves:** Estresse Oxidativo; Mutagenicidade; *Zebrafish*.

## ABSTRACT

DEMARCO, N.R. **Effects of metformin hydrochloride about cholinesterase activity, antioxidant system and mutagenic action in *Danio rerio* (cypriniformes: cyprinidae)**. 81 páginas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2019.

Metformin hydrochloride is a medicine used primarily in the treatment of Diabetes Mellitus, a chemical compound derived from guanidine. This chemical is partially metabolized in the human organism and eliminated by urine, being incorporated into aquatic environments without its due bioremediation. In view of this fact, as well as the limited knowledge about the potential mutagenic, cholinergic and antioxidant effects of metformin hydrochloride, the objective of this study was to evaluate the effects of metformin hydrochloride on the antioxidant and cholinergic systems, as well as its mutagenic potential of the bioindicator *Danio rerio*. The experimental procedures presented here were approved by the Animal Use Ethics Committee (AUEC-Unioeste). The animals were acclimatized at temperature ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ), pH ( $7.0 \pm 0.5$ ) and oxygenation ( $5.0 \pm 0.5$ ) constants, for a period of seven days. Then, in a completely randomized design, the fishes were separated into six groups exposed to the different concentrations of metformin hydrochloride for the determination of the LC50 and acute effect of the drug for a period of 96 hours. Then, after determining the non-lethal concentration of 0.45 g / L, six other groups (n = 10 per group) were separated: four groups for evaluation of the chronic effect of metformin hydrochloride euthanasia at different times (15, 30, 45 and 60 days), a negative control group and a positive control group (treated with cyclophosphamide). At the end of the experimental periods, the animals were anesthetized in eugenol (30 mg / L) and the biological materials (muscle and blood) were removed. In the muscular matrix, the action of the drug on the antioxidant system (Superoxide dismutase - SOD, Catalase - CAT, Lipoperoxidation - LPO and Glutathione transferase - GST), cholinesterase enzyme activity (ChE) and mutagenic Micronucleus Test - MN). It was noticed that during chronic exposure to metformin hydrochloride, in 15 days of treatment the animals had cytotoxic effects showing levels of necrosis in their erythrocytes. Activations of the antioxidant system were also observed, with elevation of the enzymatic activity of SOD, CAT and GST. Throughout the experimental period (30, 45 and 60 days), chronic effects were observed with elevation of MN frequency, as well as activation of repair systems, such as programmed cell death. Demonstrating the potential antioxidant and mutagenic effects triggered by the drug. Believing to treat a period of adaptation to the use of metformin.

**Key words:** Oxidative stress; Mutagenicity; *Zebrafish*.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Médias e erros padrão das variáveis de qualidade da água. (Pág. 68)

**Tabela 2** – Médias e erros padrão das variáveis referentes ao comprimento dos peixes em centímetro. (Pág. 69)

**Tabela 3** – Médias e erros padrão das variáveis referentes ao peso dos peixes em gramas. (Pág. 69)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1** – Principais defesas endógenas antioxidantes da célula. As defesas antioxidantes estão representadas em retângulos escuros e as enzimas antioxidantes representadas em itálico. EROs: ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), radical hidróxido ( $HO^{\bullet}$ ), lipídios de membrana (LH), radical lipídico ( $L^{\bullet}$ ), radical peróxido ( $LOO^{\bullet}$ ) e lipídeo hidroperóxido (LOOH), óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), álcoois (LOH). Defesas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GSH-Px), glutaciona redutase (GSH-R), glutaciona (GSH), glutaciona dissulfeto (GS-SG),  $\alpha$ -tocoferol ou vitamina E (vit. E), radical de vitamina E (vit. E $^{\bullet}$ ), vitamina C (vit. C), radical de vitamina C (vit. C $^{\bullet}$ ), não radical (R), radical (R $^{\bullet}$ ), S-nitrosoglutaciona (GSNO). (Pág. 27)

**Figura 2** – Conversão de glutaciona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutaciona peroxidase (GSH-Px), glutaciona oxidase (GO) e glutaciona redutase (GR). (Pág. 29)

**Figura 3** – Princípio bioquímico do procedimento de avaliação da atividade da enzima colinesterase. (Pág. 33)

**Figura 4** – Peixe *Danio rerio* (zebrafish). (Pág. 35)

**Figura 5** – Comparação entre o ser humano e diferentes modelos experimentais, como o Zebrafish. (Pág. 35)

**Figura 6** – Delineamento experimental para cálculo da CL50 e experimentação de teste agudo em Zebrafish com cloridrato de metformina. (Pág. 38)

**Figura 7** – Delineamento experimental para experimentação de teste crônico em Zebrafish com cloridrato de metformina (0,45 g/L). (Pág. 39)

**Figura 8** – Princípio bioquímico do procedimento de avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase. (Pág. 41)

**Figura 9** – Princípio bioquímico do procedimento de avaliação da atividade da enzima catalase. (Pág. 41)

**Figura 10** – Princípio bioquímico do procedimento de avaliação da atividade da enzima glutathione s-transferase. (Pág. 42)

**Figura 11** – Princípio bioquímico do procedimento de avaliação da atividade da Reação de lipoperoxidação. (Pág. 43)

**Figura 12** – Princípio bioquímico do procedimento de avaliação da atividade da enzima colinesterase. (Pág. 44)

## 5. ARTIGO

**Figura 1** – A) % de mortalidade de *D. rerio* submetido a diferentes concentrações de Cloridrato de Metformina, em exposição por 96 horas. B) CL50 estimada de cloridrato de metformina para *D. rerio* em relação aos dias de exposição. (Pág. 66)

**Figura 2** – Medianas, intervalos interquartílicos e interpercentílicos das variáveis em *D. rerio*, expostos a 0,25 g/L; 0,5 g/L; 0,75 g/L; 1,25 g/L de Cloridrato de Metformina e os Controles Negativo (CN) e Positivo (CP-MMS), por 96 horas. A- SOD; B- CAT; C- GST; D- LPO; E - frequência de micronúcleos (MN) em células sanguíneas. (Pág. 67)

**Figura 3** – Medianas, intervalos interquartílicos e interpercentílicos das variáveis de qualidade de água (mg/L), em *D. rerio* expostos a 0,45 g/L de Cloridrato de Metformina e Controles Negativo (CN) e Positivo (CP-MMS), por 60 dias. A- Amônia; B- Nitrito. (Pág. 68)

**Figura 4** – Medianas, intervalos interquartílicos e interpercentílicos das variáveis relativas ao sistema antioxidante analisadas em músculo de *D. rerio*, expostos a 0,45 g/L de Cloridrato de Metformina em diferentes tempos: 15 dias; 30 dias; 45 dias; 60 dias; e o Controle Negativo (CN). A- SOD; B- CAT; C- GST; D- LPO. (Pág. 70)

**Figura 5** – Medianas, intervalos interquartílicos e interpercentílicos das variáveis analisadas em 1000 eritrócitos (Mutagenicidade) de *D. rerio* exposto a 0,45 g/L de Cloridrato de Metformina em diferentes tempos: 15 dias; 30 dias; 45 dias; 60 dias; e os Controles Negativo (CN) e Positivo (CP- Ciclofosfamida). A- Necrose; B- MN; C- Núcleo Lobado; D- Broto; E- Binucleada; F- Apoptose. (Pág. 71)

**Figura 6** – Esquema do comportamento do sistema antioxidante e potencial mutagênico nos experimentos agudo (96h) e crônico (60 dias). (Pág. 75)

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AC** – Aberração Cromossômica;
- AMPK** – AMP quinase;
- BHT** – Hidroxitolueno Butilado;
- CAT** – Catalase;
- CEP** – Comitê de Ética em Pesquisa com Animais;
- ChE** – Colinesterase;
- CL50** – Concentração Letal Mediana;
- CN** – Controle Negativo;
- CONAMA** – Conselho Nacional Do Meio Ambiente;
- CP** – Controle Positivo;
- DCCT** – Diabetes Control and Complications Trial;
- DM** – Diabetes Mellitus;
- DM 1** – Diabetes Mellitus tipo 1;
- DM 2** – Diabetes Mellitus tipo 2;
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico;
- DTNB** – Ácido 5,5'-ditil-bis-(2-nitrobenzóico);
- EROs** – Espécies de oxigênio reativo;
- FAO** – *Food and Drug Administration*;
- GSH** – Glutathiona Reduzida;
- GSH-Px** – Glutathiona peroxidase;
- GST** – Glutathiona s-Transferase;
- GR** – Glutathiona reduzida;
- HCl** – Ácido Clorídrico;
- HDL** – Lipoproteínas de Alta Densidade;
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de Hidrogênio;
- IAWR** – Associação Internacional De Armazenamento de Água na Área de Captação no Reno;

**IMC** – Índice de Massa Corpórea;  
**LDL** – Lipoproteínas de Baixa Densidade;  
**LPO** – Lipoperoxidação;  
**MDA** – Malonaldeído;  
**MMS** – Metilmetano Sulfonado;  
**MN** – Micronúcleo;  
**NaOH** – Hidróxido de Sódio;  
**PBS** – Fosfato Salino;  
**SOD** – Superóxido Dismutase;  
**SOP** – Síndrome do Ovário Policístico;  
**TBA** – Ácido Tiobarbitúrico;  
**TBARS** – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico;  
**TCA** – Ácido Tricloroacético;  
**TRIS** – Tris(hidroximetil)aminometano;  
**UKPDS** – United Kingdom Prospective Diabetes Study;  
**UNIOESTE** – Universidade Estadual do Oeste do Paraná;  
**USEPA** – Agência de Proteção Ambiental dos EUA;  
**UV** – Ultra Violeta.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. OBJETIVOS .....	19
2.1 OBJETIVO GERAL .....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
3.1 INDICAÇÃO DE USO DE CLORIDRATO DE METFORMINA .....	20
3.2 MECANISMOS DE AÇÃO DO CLORIDRATO DE METFORMINA .....	22
3.3 AUTOMEDICAÇÃO, DESCARTE E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL.....	23
3.4 EFEITOS SECUNDÁRIOS DO USO DE CLORIDRATO DE METFORMINA .	24
3.4.1 Sistema Antioxidante.....	24
3.4.2 Sistema Colinérgico .....	31
3.4.3 Mutagenicidade .....	33
3.5 MODELOS PARA AVALIAÇÃO DE EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES DE CLORIDRATO DE METFORMINA.....	34
4. METODOLOGIA.....	37
4.1 PERÍODO DE ACLIMATAÇÃO E TROCA DE ÁGUA .....	37
4.2 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO LETAL DE 50% (CL50) E EFEITO AGUDO DO CLORIDRATO DE METFORMINA.....	38
4.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CRÔNICOS DO CLORIDRATO DE METFORMINA .....	39

4.4 ANÁLISE DO SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	40
4.5 ATIVIDADE DA ENZIMA COLINESTERASE .....	43
4.6 AVALIAÇÃO DE MUTAGENICIDADE.....	44
4.7 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA .....	45
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	45
REFERÊNCIAS .....	46
5. ARTIGO.....	58
ANEXOS .....	81

## 1. INTRODUÇÃO

Utilizado clinicamente na Europa e no Egito desde 1970, o cloridrato de metformina foi aprovado para uso pela “*Food and Drug Administration*” (FAO), no final do ano de 1994 (DE PINHO; STORPITS, 2001). Este é um medicamento de uso oral prescrito para pacientes portadores de diabetes tipo 2, doença caracterizada pela elevação do nível de glicose no sangue, promovendo um estado hiperglicêmico; é também prescrito para diabetes tipo 1, que é a deficiência absoluta de insulina, assim como no tratamento da Síndrome de ovários policísticos, que se caracteriza pela irregularidade menstrual e anovulação crônica, entre outros sintomas (DE ANGELIS et al., 2006; KUBA et al., 2006). Outro motivo de procura desta droga se dá em razão do efeito colateral anorexígeno, promovendo a perda de peso (DE PINHO; STORPITS, 2001), sendo capaz de diminuir as taxas de triglicerídeos e colesterol, e diminuição significativa das complicações cardiovasculares em pacientes com sobrepeso (TROVÓ; TIYO, 2014).

Considerando, portanto, que o cloridrato de metformina é um medicamento adquirido em grandes quantidades por se tratar de uma droga de uso contínuo e que não necessita de prescrição médica, bem como ser utilizado muitas vezes sem a devida recomendação médica devido aos seus efeitos colaterais (DE PINHO; STORPITS, 2001), um eficiente modelo de teste para descobertas de efeitos de drogas é o peixe *Zebrafish* (KARI et al., 2007), podendo ser utilizado como alternativa ao uso de roedores ou como teste complementar. Conhecido como peixe zebra ou paulistinha, o *Danio rerio*, pertencente à família dos ciprinídeos, sendo original da Índia. Vivem em habitats como rios, canais de irrigação e lagoas (ZORZETTO; GUIMARÃES, 2013). São animais de fácil manipulação, pequenos, baratos, possuindo uma fisiologia e neuroanatomia paralela aos humanos, sendo evolutivamente conservados e parecidos com espécies de mamíferos, em respostas comportamentais robustas (KALUEFF et al., 2013). Segundo um experimento

realizado por Niemuth et al. (2015), a presença da metformina na água causou 30 vezes mais a indução da expressão gênica de um disruptor endócrino, no fígado de machos do *Zebrafish*, sendo tal fato identificado pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA).

Ainda há pouca informação sobre a ação deste medicamento como fatores que influenciam a morfofisiologia orgânica das populações, em especial sobre seus efeitos sobre a atividade dos sistemas antioxidante e colinérgico, e seu potencial efeito mutagênico sobre bioindicadores. Desta forma, torna-se extremamente relevante à realização de estudos com estes objetivos. Diante do exposto, a pergunta do presente estudo é: o cloridrato de metformina pode apresentar efeitos deletérios sobre o sistema antioxidante e colinérgico, bem como mutagênico? Com isso, testaremos a hipótese de trabalho de que o cloridrato de metformina é um causador dos possíveis danos sobre os sistemas acima citados, avaliando-se o peixe *Danio rerio*, potencial bioindicador de alterações em organismos vertebrados, que simulam a alteração à saúde humana.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar potenciais efeitos do cloridrato de metformina sobre os sistemas antioxidante e colinérgico, bem como riscos de mutação celular em *Danio rerio*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a concentração letal de 50% (CL50) dos animais expostos ao cloridrato de metformina;
- b) Avaliar os efeitos agudos do cloridrato de metformina sobre o sistema antioxidante e colinérgico, e efeitos mutagênicos de peixes expostos a diferentes concentrações do medicamento;
- c) Avaliar a dinâmica do sistema antioxidante e colinérgico, além dos potenciais efeitos mutagênicos em peixes expostos a uma concentração subletal do cloridrato de metformina em um período crônico de tratamento com o cloridrato de metformina.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 INDICAÇÃO DE USO DE CLORIDRATO DE METFORMINA

O cloridrato de metformina é um composto químico derivado da guanidina, quimicamente denominado de dimetilbiguanidina, extraído da planta medicinal *Galega officinalis* (RODRIGUES NETO et al., 2015). É um produto solúvel em água, apresenta forma cristalina, coloração branca e caráter básico, devido à presença de seus grupamentos amina, o que lhe permite realizar ligações de hidrogênio, explicando sua alta solubilidade e hidrofiliabilidade (DE PINHO; STORPIRTIS, 2001; HERNÁNDEZ, et al., 2015). As principais indicações deste composto são para os tratamentos do Diabetes Mellitus (DM) e da Síndrome do Ovário Policístico (SOP).

O Diabetes Mellitus é uma doença crônica considerada como um grande problema de saúde pública enfrentado no Brasil e principalmente em países desenvolvidos. Esta condição ocupa um percentual de 30% a 40% das causas de mortalidade entre adultos (GUIMARÃES; TAKAYANAGUI, 2002). Estudos demonstram que as maiores causas do aumento desta prevalência são: interação genética, maior taxa de urbanização, aumento da expectativa de vida, industrialização, maior consumo de alimentos hipercalóricos, obesidade, entre outros fatores (FRANCO et al., 1998; GRILLO; GORINI, 2007).

Esta doença acontece devido a fatores metabólicos capazes de elevar os níveis de glicose no sangue, decorrentes de defeitos na secreção de insulina ou na ação da mesma (FERREIRA; CAMPOS, 2014), promovendo a hiperglicemia crônica, decorrente de distúrbios no metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas, oferecendo um risco de mortalidade três vezes maior a seus portadores do que a população em geral (FRANCHI et al., 2012). Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2015/2016), a DM pode ser dividida em duas:

a) diabetes tipo 1 (DM1) - resultado da destruição imunomediada total ou parcial das células beta pancreáticas, sendo autoimune e idiopática, resultando na incapacidade de produzir insulina.

b) diabetes tipo 2 (DM2) – caracterizada pela produção insuficiente de insulina, pelo pâncreas, ou pela incapacidade do organismo de utilizar a insulina produzida. Sendo desencadeada por vários outros tipos de condições (e.g. ambientais ou genéticas), como obesidade, sedentarismo, envelhecimento, dietas ricas em gorduras, diabetes gestacional, entre outras.

Outra doença tratada com o cloridrato de metformina é a Síndrome do Ovário Policístico (SOP), com prevalência de 5% a 10% das mulheres em idade reprodutiva (COSTA et al., 2010). Esta síndrome é caracterizada por alterações no ciclo menstrual, anovulação crônica e hiperandrogenismo clínico, o que pode ocasionar aumento na secreção de andrógenos adrenais e ovarianos ou em uma ação estimuladora da insulina, aumentando significativamente o risco de suas portadoras em adquirirem a DM2, hipertensão arterial sistêmica, obesidade central e de desenvolverem casos de infertilidade (KUBA et al., 2006).

Tal síndrome é decorrente de uma desordem complexa e multigênica, na qual ocorrem aumentos nas expressões de genes, além de anormalidades no eixo hipotálamo-hipófise-ovários, sendo mais recorrente em pessoas que nasceram com baixo peso e possuíram uma menarca precoce (SILVA et al., 2006). Além dos fatores genéticos já citados, fatores ambientais como o estilo de vida são grandes desencadeadores deste tipo de síndrome, como a obesidade, que atinge 50% das mulheres portadoras de SOP. A resistência à insulina e a hiperinsulinemia compensatória, também são fatores que podem estimular o aparecimento desta síndrome (SANTANA et al., 2008).

Outro efeito que promove ainda mais o uso deste medicamento está relacionado a sua capacidade de moderar o apetite. A anorexia e a interferência com a absorção intestinal de glicose são as principais hipóteses de perda de peso corporal (STORPIRTIS; PRESTES, 2001) tornando ainda maior a procura por este medicamento.

### 3.2 MECANISMOS DE AÇÃO DO CLORIDRATO DE METFORMINA

O cloridrato de metformina é um medicamento de uso oral, usado principalmente como tratamento da DM2, em doentes cujo distúrbio não pode ser controlado apenas com dieta e atividades físicas (BASAK et al., 2008; PALOMBA et al., 2005). Esta droga possui propriedades anti-hiperglicêmicas, sendo seu principal mecanismo de ação reduzir a gliconeogênese hepática e aumentar a captação periférica de glicose nos diferentes órgãos, principalmente no fígado e músculos (SARTORI et al., 2009). A gliconeogênese ocorre via supressão da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase, o que leva a diminuição da conversão do lactato e glicerol em glicose (MADIRAJU et al., 2014). Acredita-se que a metformina proporciona alterações nas funções básicas por meio de fosforilação da AMP quinase (AMPK) e da proteína receptora X alfa (LRX $\alpha$ ), localizada no fígado, atuando, respectivamente, sobre a regulação de lipídios e glicose, e da administração dos reguladores de macrófagos locais (CHO et al., 2015). Sua ação sobre o metabolismo lipídico se dá pela inibição da lipólise, o que promove a diminuição dos triglicerídeos plasmáticos e ácidos graxos livres, resultando na diminuição do colesterol total e do LDL, e o aumento do HDL, causando redução de peso em seus usuários (RODRIGUES NETO et al., 2015; MATOS; BRANCHTEIN, 2006).

O uso do cloridrato de metformina para o tratamento de SOP é proposto para a regulação do distúrbio menstrual e correção das desordens metabólicas, sendo muito eficiente na restauração dos ciclos ovulatórios e na regulação dos níveis de testosterona (RODRIGUES NETO et al., 2015). Tal medicamento tem se mostrado competente também para a indução de ovulação em mulheres com baixo índice de massa corpórea (IMC), porém não existem evidências suficientes para o uso deste medicamento para este tipo de tratamento, necessitando de novos estudos que comprovem sua eficácia e segurança (SANTANA et al., 2008).

Apresenta como efeitos colaterais sintomas como diarreia, gosto metálico e náuseas, e é contraindicado em situações de insuficiência cardíaca, doenças crônicas no fígado, insuficiência respiratória e renal, não devendo ser usado por pacientes maiores de 80 anos, etilistas, gestantes e lactantes (ARAÚJO et al., 2000).

### 3.3 AUTOMEDICAÇÃO, DESCARTE E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

No Brasil, cerca de 80 milhões de pessoas são adeptas à automedicação. Em uma pesquisa realizada em Porto Alegre - RS, a maior influência do uso de medicamentos, que não necessitam de prescrição médica, acontece pela influência de amigos que já fizeram a utilização do mesmo (VITOR et al., 2008). Outros problemas relacionados aos medicamentos sem receita seria o horário de administração, quantia e o motivo do uso, pois a maioria dos indivíduos parte do princípio que nenhuma substância é nociva à saúde, tornando a automedicação um problema à saúde individual e coletiva (CHEHUEN NETO et al., 2007).

Um problema mundial enfrentado atualmente é o descarte inadequado dos medicamentos. Em um estudo realizado em vários países, somente na Alemanha foram identificados 36 fármacos diferentes, dentre eles analgésicos, antilipidêmicos, anti-inflamatórios em diversos rios. A consequência direta destes fármacos ao meio ambiente ainda é desconhecida, porém sua presença em água potável é muito preocupante em relação à saúde humana e dos demais seres vivos. Dentre as principais causas de medicamentos descartados de forma errônea estão: a compra de medicamentos além do necessário, amostras grátis distribuídas por laboratórios e gerenciamento inadequado por parte das farmácias (JORGE, 2011). Outro fator que pode influenciar a aquisição de medicamentos sem necessidade é o incentivo da mídia e a facilidade de aquisição dos mesmos (BUENO et al., 2009).

Desta forma, o descarte inadequado pode promover a contaminação ambiental, gerando efeitos sobre duas condições que estão intimamente ligadas: a saúde humana e a ambiental. Este problema vem acontecendo principalmente por causa da grande capacidade de solubilidade, mobilidade aquática e sinergismo que os fármacos podem apresentar, resultando em diversos efeitos, que vão desde toxicidade, mutagenicidade a interrupções endócrinas e atividades antimicrobianas (BRADLEY et al., 2016).

Tanto o cloridrato de metformina quanto seus metabólitos são considerados químicos polares, o que além de facilitar sua solubilidade em água, dificulta sua remoção durante o processo de saneamento. Em uma pesquisa realizada por Scheurer et al. (2012), vários mecanismos foram testados para eliminar este produto da água, porém apenas 56% foi removido com unidades de floculação e filtração.

Em 2013, a Associação Internacional de Armazenamento de Água na Área de Captação no Reno (IAWR), propôs valores limítrofes para compostos antropogênicos, referenciando valores até 100 ng/L. TRAUTWEIN et al. (2014) demonstraram que na maioria de seus pontos de amostragem, a presença de cloridrato de metformina foi 50% superior ao valor estabelecido, demonstrando seu alto potencial de contaminação ambiental. Os mesmos autores ainda mencionaram que mesmo que o cloridrato de metformina apresente efeitos secundários menores em humanos, existem relatos contraditórios citando seus potenciais negativos, como promoção da deficiência de vitamina B12 e aumento da formação de placas amiloides em pacientes diagnosticados com Mal de Alzheimer.

Por ser uma molécula altamente solúvel em água, é facilmente eliminada na urina e nas fezes. No sistema de esgoto urbano, por um processo de biorremediação, este fármaco é transformado em guanilureia. Tanto o cloridrato de metformina, como a guanilureia, são estáveis na água, não sendo passíveis de remediação por técnicas como irradiação por luz UV, ozonização e/ou carvão ativado. Desta forma, quantidades ainda maiores, desses dois compostos, estão sendo cada vez encontrados em ambientes aquáticos (TRAUTWEIN; KÜMMERER, 2011).

### 3.4 EFEITOS SECUNDÁRIOS DO USO DE CLORIDRATO DE METFORMINA

Atualmente, um dos grandes problemas oriundos do excesso de automedicação, ou da exposição excessiva aos medicamentos são os efeitos não sintomáticos. Muitos destes produtos químicos podem promover alterações na dinâmica do sistema antioxidante dos organismos, mudanças na transmissão de neurotransmissores, bem como efeitos cumulativos que podem desencadear ações mutagênicas. Sendo assim, esta revisão abordará estes aspectos a seguir.

#### 3.4.1 Sistema Antioxidante

Usado pela primeira vez de maneira precoce para relatar a química da borracha, o termo estresse oxidativo, só foi empregado de maneira correta a partir

de 1985, relatando a reação de danos oxidativos a órgãos e células (SIES et al., 2017). Este evento desencadeado pelo excesso de radicais livres ou aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) dá-se o nome de estresse oxidativo. O estresse oxidativo é proveniente de desequilíbrios entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, de modo que o sistema pró-oxidante forme espécies reativas de oxigênio, devido à inibição do sistema antioxidante, ou com o aumento no consumo de oxigênio, aumentando significativamente o número de radicais livres (PERES, 1994; NETO et al., 2008).

As EROs são moléculas que podem, ou não, serem radicais livres. Quando as EROs contêm átomos de oxigênio com número ímpar de elétrons, e portanto, elétrons desemparelhados, são chamadas de radicais livres (GARCEZ et al., 2004). Desta forma, quando ocorre a formação de radicais livres *in vivo* por meio da ação catalítica de enzimas durante o processo de transferência de elétrons via metabolismo celular ou fatores exógenos, podem ocorrer danos ou morte celular, além de danos teciduais e produção de agentes tóxicos (BIANCHI; ANTUNES, 1999; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Estes danos oxidativos causados pelos radicais livres são capazes de causar diversas doenças, assim como mutagênese e carcinogênese (BIRBEN et al., 2012; POULSEN et al., 1998). Já as EROs não radiculares são moléculas altamente reativas e tão prejudiciais quanto os radicais livres, porém não apresentam elétrons desemparelhados. O oxigênio pode dar origem a diversas espécies reativas, seja por absorção de energia ou por transferência de elétrons. Outra via de formação de EROs, consiste na redução unieletrônica do oxigênio à água, na qual a entrada de quatro elétrons na molécula de oxigênio promove o aparecimento do radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e do radical hidroxila ( $-OH$ ), intermediários parcialmente reduzidos do oxigênio molecular (PERES, W. 1994; ROVER JÚNIOR et al., 2001).

As principais fontes endógenas geradoras de EROs incluem as mitocôndrias e a atividade de algumas enzimas como: xantina oxidase, citocromo P450- oxidase, monoaminoxidases, as enzimas envolvidas na via de produção de prostaglandinas e tromboxanos e a NADPH-oxidase da membrana plasmática de macrófagos, que produzem uma grande quantidade de EROs em resposta ao estímulo fagocitário (BLAKE; WINYARD, 1995).

O sistema antioxidante é ativado devido ao desequilíbrio entre os níveis dos compostos oxidantes e antioxidantes, causados pelo excesso de radicais livres. Esse desequilíbrio pode promover desde perda das funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, ocasionando danos em células e tecidos, além de poder gerar instabilidade do genoma, aumentando significativamente os níveis de mutações espontâneas nas fitas de DNA, podendo, em longo prazo, ser o desencadeador de processos carcinogênicos (BARBOSA et al., 2010; BIRBEN et al., 2012; SIES et al., 2017).

Os sistemas antioxidantes são responsáveis por diminuir as concentrações de espécies reativas desencadeadas pelo processo de estresse oxidativo, podendo agir de duas formas: via enzimática e via não enzimática, diminuindo ou inibindo a formação de EROs. Este mecanismo ocorre de maneira natural pelo organismo, por meio de processos metabólicos oxidativos, sendo estimulados pela ativação do sistema imune (NETO et al., 2008).

O sistema antioxidante por processo não enzimático é composto por moléculas que neutralizam a ação de espécies reativas, atuando principalmente como quelantes dos radicais livres, sem a participação de enzimas. Dentre as principais moléculas estão: vitamina C; vitamina E; glutathione; melatonina; compostos fenólicos e carotenoides (ROVER JÚNIOR et al., 2001). Já o sistema enzimático é composto por catalase, superóxido dismutase, glutathione transferase, glutathione peroxidase e glutathione redutase, que são as principais enzimas capazes de proteger a célula do estresse oxidativo (GOTH; VITAI, 1995) (Fig. 1).



síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (ROVER JÚNIOR et al., 2001). Para que a constante oxidação da GSH à glutathiona dissulfeto (GSSG) seja mantida, a GSH precisa ser regenerada por meio do ciclo catalítico. Nesse ciclo, estão presentes a ação de três grupos de enzimas: a glutathiona oxidase (GO), a glutathiona peroxidase (GSH-Px) e a glutathiona redutase (GR). As duas primeiras enzimas, GO e GSH-Px, catalisam a oxidação de GSH à GSSG e GR é a responsável pela regeneração de GSH, a partir de GSSG, na presença de NADPH (HUBER; ALMEIDA, 2008) (Fig. 2).

A GSH-Px é uma importante enzima que também auxilia na regulação dos níveis de peróxido de hidrogênio, sendo que a GSH reduz o  $H_2O_2$  a  $H_2O$  em presença da enzima. Encontrada em muitos dos tecidos de origem animal, a GSH-Px, apresenta uma importante característica que é um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado ao restante da enzima. Estudos sugerem que ausência de selênio está associada a alterações no metabolismo celular (HUBER; ALMEIDA, 2008).

Outra enzima que age juntamente com a GSH-Px é a glutathiona redutase (GR). Esta não age diretamente removendo espécies não radicais, porém é a responsável pela redução da GSSG à GSH, ou seja, age mantendo a regeneração da glutathiona em sua forma reduzida (GSH) (ROVER JÚNIOR et al., 2001; HUBER; ALMEIDA, 2008).

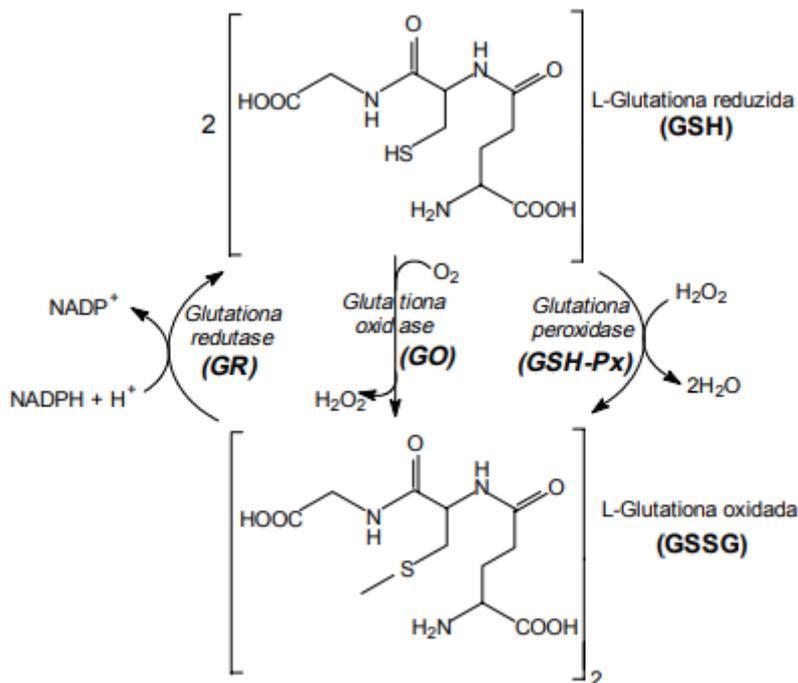


Figura 2 - Conversão de glutatona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GSH-Px), glutatona oxidase (GO) e glutatona redutase (GR) (ROVER JÚNIOR et al., 2001).

Outra atuação do sistema antioxidante é sobre os xenobióticos orgânicos. Estes são geralmente biotransformados por meio do sistema de citocromos P450 (Fase I) e por reações conjugadas (Fase II), as quais produzem derivados hidrofílicos que são rapidamente excretados na urina. A conjugação com a GSH é uma rota extremamente importante de detoxificação de produtos farmacologicamente ativos, sendo que a catálise da GSH é necessariamente realizada pela família de enzimas glutatona transferase (GST) (AWASTHI et al., 1981; LAWRENCE; HEMINGWAY, 2003; BIRBEN et al., 2012). As GST's compreendem uma família de enzimas multifuncionais que catalisam o ataque nucleofílico de GSH a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou átomo de enxofre eletrofílico. Os substratos mais comuns para este tipo de enzima são: aldeídos, cetonas, lactonas e estéres, participando ativamente das etapas do catabolismo de aminoácidos como fenilalanina e tirosina (HUBER et al., 2008). A enzima GST é encontrada em maior concentração no fígado de mamíferos, e torna os produtos da reação de conjugação menos tóxicos e mais solúveis em água, o que

facilita a excreção dos mesmos e, conseqüentemente, auxiliando na prevenção de danos tissulares (LAM et al., 1992; BOUWMAN et al., 1996).

A formação dos conjugados da glutatona/Xenobióticos é denominada como Fase III. Estes conjugados são reconhecidos por transportadores específicos e transferidos para o meio intercelular, na qual são clivados pela ação das enzimas  $\gamma$ -glutamil transpeptidase e dipeptidases. Após várias clivagens, dependendo das características da porção derivada do xenobiótico, o correspondente ácido mercaptúrico será diretamente excretado na urina ou passará por metabolização para ser posteriormente eliminado (HUBER et al., 2008).

Além das enzimas do sistema antioxidante, há reações não enzimáticas desencadeadas por radicais livres. A formação destes radicais está diretamente associada a processos intracelulares, como fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intracelular e síntese de substâncias biológicas importantes, porém seu excesso desencadeia reações como a de peroxidação lipídica, também chamada de lipoperoxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; BROINIZI et al., 2008). A lipoperoxidação consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poliinsaturado para produzir um hidroperóxido lipídico como produto primário inicial. Nos sistemas biológicos, esse processo pode ocorrer principalmente por duas vias: uma via enzimática envolvendo as ciclooxygenases e lipoxigenases na oxigenação dos ácidos graxos poliinsaturado e a via da peroxidação não enzimática, que envolve desde a participação de metais de transição e até radicais livres (LIMA; ABDALLA, 2001).

O processo de lipoperoxidação pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação. A fase de iniciação representa o início da peroxidação, em que o ácido graxo poliinsaturado sofre ataque de uma espécie que é suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno, formando um radical de carbono. Este radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado. Em meio aeróbio, o radical alquila inicialmente formado se combina com o oxigênio formando o radical peroxila, o qual pode abstrair um hidrogênio alílico de um outro ácido graxo, gerando outro radical de carbono e promovendo a etapa de propagação. A reação do radical peroxila com o átomo de hidrogênio abstraído gera um hidroperóxido lipídico. Já a terceira etapa da reação, a fase de terminação, dá-se pela aniquilação dos radicais

formados originando produtos não radicalares sendo a velocidade do processo de lipoperoxidação limitada pelas fases de iniciação e propagação (LIMA; ABDALLA, 2001).

Todo esse processo faz com que ácidos graxos poli-insaturados sejam capazes de alterar a permeabilidade, fluidez e integridade da membrana celular, podendo levar à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; BROINIZI et al., 2008).

Com isso, as consequências sofridas vão desde perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como enzimas hidrolíticas dos lisossomas e formação de produtos citotóxicos como o malondialdeído, levando até a morte celular (RUSSELL et al., 2003). Desta forma, a reação de lipoperoxidação pode estar associada a mecanismos de envelhecimento, cânceres e a toxicidade de xenobióticos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), além de resistência insulínica no músculo, contribuindo assim, para o desenvolvimento de diabetes (KOPPRASCH et al., 2016), e sendo a principal indicação de ocorrência de estresse oxidativo nas células.

De acordo com os estudos realizados em ratos por Zamin Jr. et al. (2010), altas concentrações de metformina foram capazes de aumentar os níveis de lipoperoxidação no fígado. Já em um experimento realizado por Bojkova et al. (2009), apresentaram níveis mais baixos da reação de lipoperoxidação, quando comparados aos demais grupos de ratos. Mostafa et al. (2016) também apresentou um dado semelhante, no qual os ratos foram induzidos a ter déficit de memória por escopolamina e, conseqüentemente, tendo um aumento significativo de malondialdeído tanto no hipotálamo quanto no córtex, porém quando tratados com duas doses diferentes de metformina houve redução significativa da reação de lipoperoxidação em ambos tecidos.

#### 3.4.2 Sistema Colinérgico

Responsável por funções vitais como de aprendizado, memória, organização cortical do movimento (MESULAM et al., 2002), o sistema de neurotransmissão colinérgica é constituído por acetilcolina, seus receptores e aparato enzimático, o

que em conjunto fazem com que a síntese e a degradação desse neurotransmissor ocorram. A Acetilcolina é um neurotransmissor responsável pelas sinapses do sistema nervoso central, sistema nervoso periférico e na junção neuromuscular (VENTURA et al., 2010). Quando sintetizada, a acetilcolina é transportada e armazenada em vesículas sinápticas, sendo liberada por exocitose e interagindo especificamente com os receptores colinérgicos presentes nas membranas pré e pós-sináptica (FUJII et al., 2008).

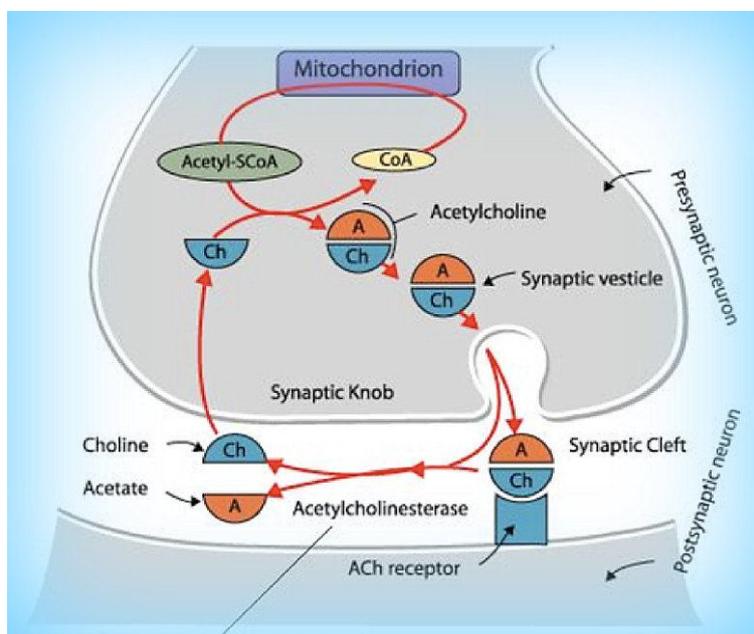
A colinesterase pertence ao grupo das hidrolases, sendo capazes de catalisar a hidrólise dos ésteres em colina (SIQUEIRA et al., 1978). Esta, está presente na fenda sináptica e cliva acetilcolina em grupamentos colina e acetato, os quais são reabsorvidos pela célula (BIRKS, 2006; TALIB, 2014). Existem dois tipos de colinesterases, aquela que possui maior afinidade com a acetilcolina ligada à membrana neural e presentes nas sinapses colinérgicas (Acetilcolinesterase), conhecida como a verdadeira colinesterase, encontrada nos dendritos, pericárdio e axônios dos neurônios colinérgicos (FANTONI; CORTOPASSI, 2002) e as enzimas com alta afinidade para a butirilcolina (Butirilcolinesterase), presente em todos os tecidos (JOSE et al., 2009), agem em baixa velocidade, sendo encontrada em células gliais, no plasma e fígado (FANTONI; CORTOPASSI, 2002).

A hidrólise do substrato de acetilcolina processa-se através da formação do complexo enzima-substrato, a molécula de colina é liberada e a enzima acetilada é formada, sendo rapidamente hidrolisada por ácido acético, e a enzima livre é liberada por meio de reação das colinesterases com os inibidores organofosforados (NUNES, 1996).

Existem dois receptores colinérgicos, o nicotínico, encontrado nos gânglios e na medula adrenal, é constituído de proteínas pentaméricas, formando um canal iônico que é controlado por ligantes, causando rápido aumento da permeabilidade celular ao sódio e cálcio, despolarização e excitação. E os receptores muscarínicos, encontrado nos gânglios e em várias glândulas secretoras (FANTONI; CORTOPASSI, 2002), estes, medeiam os principais efeitos comportamentais associados à acetilcolina, principalmente efeitos sobre vigília, aprendizado e memória recente (ANDRADE, 2002).

De acordo com Ventura et al. (2010), existem também várias doenças relacionadas a disfunção do sistema colinérgico, como a Doença de *Alzheimer*,

Epilepsia, Esquizofrenia, dentre outras. Em um estudo realizado com ratos que sofreram indução a déficit de memória, ou seja, possuíam alta atividade da enzima colinesterase, a metformina não foi capaz de gerar qualquer tipo de alteração, alegando-se que a metformina pode aumentar a geração de amiloides e acelerar o progresso da Doença de *Alzheimer* em pacientes com diabetes tipo II (MOSTAFA et al., 2016). Em um experimento feito por Bhutada et al. (2011), ratos diabéticos tratados com metformina tiveram as atividades de colinesterase diminuídas tanto no córtex, quanto no hipotálamo, quando comparados aos ratos controles diabéticos, demonstrando o efeito de inibição provocado pela administração do medicamento.



**Figura 3** – Princípio bioquímico do procedimento de avaliação da atividade da enzima colinesterase (SOBJAK et al., 2016).

### 3.4.3 Mutagenicidade

Mutações são decorrentes de alterações espontâneas e/ou herdáveis na estrutura do DNA, sendo de grande importância para a variabilidade genética de populações e seres vivos. Porém, acontecendo em curto prazo e de maneira desregulada, são capazes de alterar a fiel transmissão da informação genética (SNUSTAD; SIMMONS, 2015). Porém, apesar destes erros ocorrerem, as células possuem vários mecanismos de segurança a fim de tentar garantir a integridade e estabilidade da molécula de DNA. Estes mecanismos são chamados

de mecanismos de reparo do DNA e podem agir desde correção de nucleotídeos adicionados de forma errônea até formação de dímeros produzidos por outros agentes (IYAMA; WILSON, 2013; ALBERTS et al., 2006).

França (2006) menciona que tais alterações podem ser decorrentes de compostos mutagênicos, e que estes não estão somente relacionados ao câncer, mas também com alterações nas células somáticas e germinativas do indivíduo, podendo acarretar várias doenças hereditárias, cardiovasculares, anemias, distúrbios reprodutivos, neurocomportamentais e várias outras. Muitos destes compostos são encontrados de forma esporádica no meio ambiente, ocasionando mudanças no genoma ou na estrutura do cromossomo, sendo chamadas de alterações aneugênicas e clastogênicas. As alterações aneugênicas são aquelas que geram aneuploidias, alterações na distribuição dos cromossomos durante o processo de divisão celular com perda cromossômica, já as alterações clastogênicas são aquelas que geram quebras na estrutura do cromossomo.

Uma das formas de evidenciar o efeito mutagênico de substâncias é através da visualização de micronúcleos (MN) e de aberrações cromossômicas (AC) (ARAÚJO et al., 2008). Os MN possuem um tamanho menor quando comparado com o núcleo principal, podendo chegar até 1/3 do tamanho deste núcleo (FENECH, 2000). Segundo Holland et al. (2008), o teste do MN pode ser utilizado em diferentes tipos de células, como os eritrócitos, linfócitos e células do epitélio esfoliado, podendo identificar a frequência de mutação presente naquele substrato.

### 3.5 MODELOS PARA AVALIAÇÃO DE EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES DE CLORIDRATO DE METFORMINA

Uma das formas de se estudar os efeitos de produtos químicos em organismos, é por meio de experimentos em espécies animais. Uma das espécies utilizada como modelo experimental é o peixe *Zebrafish* ou Paulistinha, com nome científico *Danio rerio*, sendo muito utilizado em experimentos de genética e pesquisas biomédicas (GERLAI et al., 2000). É também utilizado para identificação de genes relativamente importantes, possuindo baixo custo e facilidade de manutenção (SCHNEIDER et al., 2009).

A espécie *D. rerio* habita pequenos rios e riachos com águas mais calmas e limpas, de pH próximo a 7 e temperaturas entre 27°C e 34°C, com profundidades variando entre 16 cm a 57 cm. Alimentam-se principalmente de mosquitos, larvas e pequenos insetos (ENGESZER *et al.*, 2007) (Fig. 4).



Figura 4 – Peixe *Danio rerio* (zebrafish). (Imagem da internet).

*D. rerio* possui um elevado grau de semelhança com mamíferos, em relação aos mecanismos moleculares do desenvolvimento e fisiologia celular, possuindo uma rápida resposta quando em contato com alguma droga testada. Sendo um animal evolutivamente próximo ao ser humano, por se tratar de um vertebrado, torna-se um eficiente modelo teste (KARI *et al.*, 2007) (Fig. 5).

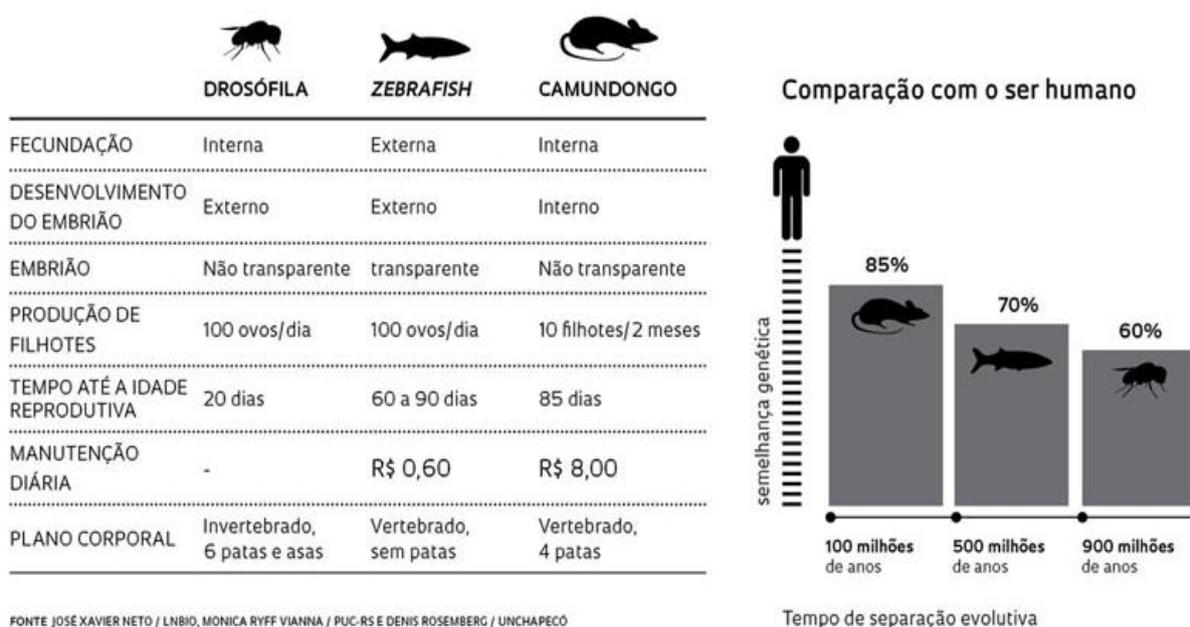


Figura 5 – Comparação entre o ser humano e diferentes modelos experimentais, como o *Zebrafish* (ZORZETTO; GUIMARÃES, 2013).

O *Zebrafish* tem se mostrado um excelente biomonitor de águas, sendo capaz de avaliar o potencial mutagênico (RAMÍREZ; GÁRCÍA, 2005) e genotóxico (VÉLEZ; ROCIO, 2013), e de alterações sobre o sistema colinérgico e oxidante (ROSEMBERG et al., 2010). Como o estudo de Choi et al. (2010), que induziu, por meio de nanopartículas de prata, estresse oxidativo e apoptose em fígado de *Zebrafish* adulto. Já Jin et al. (2010), se utilizou do animal em questão, para observar suas respostas ao estresse oxidativo e expressão gênica de fêmeas expostas ao pesticida “atrazina”. Outro estudo realizado por Bony et al. (2009) também expondo peixes adultos a dois pesticidas diferentes, revelou um potencial genotóxico e mutagênico, por meio dos testes do cometa e micronúcleo em eritrócitos, respectivamente. A exposição destes animais a metais pesados, também foi capaz de demonstrar sua sensibilidade quanto ao sistema colinérgico, apresentando alteração da atividade da acetilcolinesterase e no sistema antioxidante do cérebro de peixes zebras expostos a tais compostos (RICHETTI et al., 2011), todos estes trabalhos apresentando a grande sensibilidade deste peixe quando acondicionado com diferentes substâncias e com respostas a diferentes testes.

## 4. METODOLOGIA

Esta pesquisa foi de caráter experimental com delineamento inteiramente casualizado. A amostra foi constituída por 120 exemplares adultos de peixes *D. rerio*, obtidos de criadouros, sendo transportados dentro de sacos plásticos com oxigenação (GTA em Anexo). Do total de animais, 60 foram utilizados para obtenção da CL50 e efeito agudo do cloridrato de metformina e os demais, utilizados em experimento de avaliação do efeito crônico do cloridrato de metformina. O material biológico coletado foi analisado por meio de técnicas de avaliação de mutagenicidade, de estresse oxidativo e de neurotoxicidade.

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEP) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE).

### 4.1 PERÍODO DE ACLIMATAÇÃO E TROCA DE ÁGUA

Os animais eram machos, adultos, adquiridos de piscicultores devidamente regulamentados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Os aquários para acondicionamento dos animais foram abastecidos com água proveniente do poço artesiano que abastece a UNIOESTE, porém com período de 3 dias de descanso para declorificação. Todos os espécimes foram aclimatados em aquários com aeração e temperaturas constantes ( $24 \pm 0,5$  °C) por no mínimo 7 dias, sendo respeitada a densidade de 1 g de peixe/L de água. O peso corporal dos espécimes da amostra variou entre 0,2 e 1 g, sendo diariamente alimentados com ração comercial com 45% de proteína bruta, duas vezes ao dia, em uma proporção de 5% da biomassa total dos aquários.

Ao longo dos experimentos, toda a água dos aquários foi trocada semanalmente, incluindo os controles, e adicionado novo tratamento a cada aquário. Além de adicionado novo tratamento, a água do controle negativo era redistribuída

em todos os aquários com o intuito de conservar o ambiente já aclimatado aos animais, minimizando a condição de estresse.

#### 4.2 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO LETAL DE 50% (CL50) E EFEITO AGUDO DO CLORIDRATO DE METFORMINA

Para a obtenção da CL50, os peixes foram acondicionados em seis aquários de 10 L (n=10 por aquário). Nos aquários foram administradas as seguintes concentrações de cloridrato de metformina por 96 horas: A – 0,25 g/L; B – 0,5 g/L; C – 0,75 g/L; D – 1,25 g/L; E – Controle negativo (animais apenas aclimatados); F – Controle positivo (animais tratados com 0,2 mg/L de Metilmetano Sulfonado – MMS, um quimioterápico, de acordo com o trabalho de Faßbender; Braunbeck, 2013), utilizado para comparação na análise mutagênica (Fig. 6).

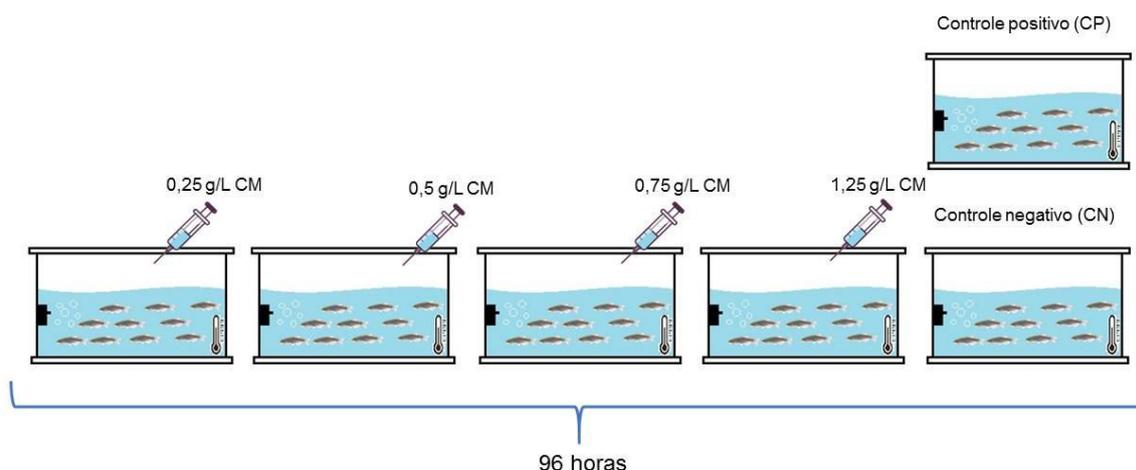


Figura 6 – Delineamento experimental para cálculo da CL50 e experimentação de teste agudo em *Zebrafish* com cloridrato de metformina.

Ao longo do experimento, diariamente foram registradas as frequências de mortalidade por tratamento. O cálculo de CL50 foi estimado de modo não linear, por meio de cálculos de probitos (Probit regression), aplicando-se o método de estimação de Quasi-Newton. A predição da CL50 foi definida por meio da análise de regressão múltipla, a partir das probabilidades previstas (U.S.EPA, 2011).

Após o período experimental, os animais foram anestesiados em eugenol (30 mg/L) e realizada a coleta do músculo e sangue, os quais foram devidamente acondicionados para a realização das análises a seguir descritas.

### 4.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CRÔNICOS DO CLORIDRATO DE METFORMINA

Após obtida a CL50, os demais 60 animais foram pesados e mensurados os comprimentos total e padrão. Após a biometria inicial, estes foram acondicionados em seis aquários de 10 L (n=10 por aquário). Nos aquários foi administrada a concentração subletal de 0,45 g/L de cloridrato de metformina (obtida no experimento anterior), os quais foram subdivididos de acordo com o tempo de exposição ao medicamento: T15: animais expostos por 15 dias; - T30: animais expostos por 30 dias; - T45: animais expostos por 45 dias; - T60: animais expostos por 60 dias. Dois aquários tiveram acondicionados animais considerados como controles: E – Controle negativo (animais apenas aclimatados); F - Controle Positivo (CP): animais expostos a 4 µg/L de ciclofosfamida, um quimioterápico, conforme proposto por Gökçe et al. (2016), utilizado para comparação na análise mutagênica, sendo mantidos por 60 dias (Fig. 7).

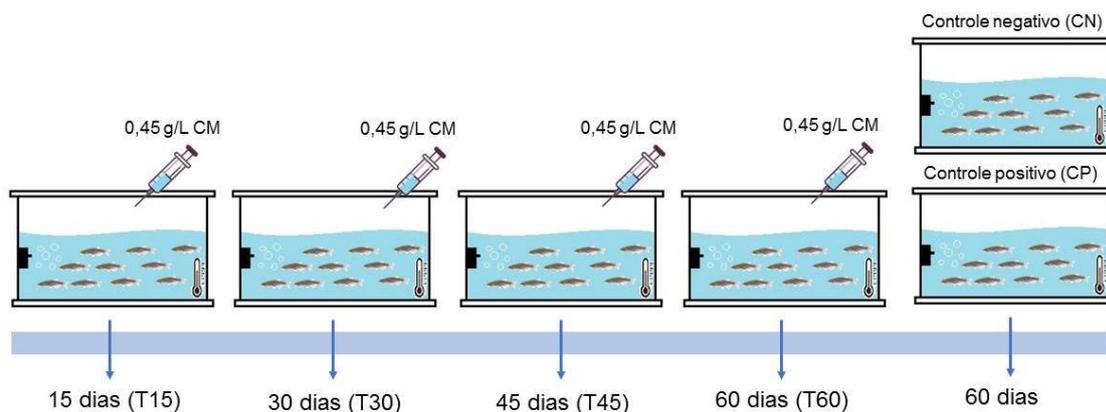


Figura 7 – Delineamento experimental para experimentação de teste crônico em *Zebrafish* com cloridrato de metformina (0,45 g/L).

Após os tempos experimentais descritos anteriormente, os animais foram novamente pesados e anestesiados em água contendo 30mg de eugenol por litro, de acordo com a metodologia sugerida por Honczaryk e Inoue (2009), e posteriormente tiveram seus comprimentos padrão e total mensurados. Em seguida, ainda anestesiados, ocorreu à coleta de sangue para posterior realização do teste do MN, através da secção da nadadeira caudal. Além da retirada de sangue, também foi retirado o músculo caudal, com auxílio de bisturi, para a realização das análises relativas ao sistema antioxidante e atividade da colinesterase.

Após a coleta de material, os animais foram eutanasiados por saturação de eugenol e descartados dentro de um saco em lixo hospitalar para fim apropriado.

#### 4.4 ANÁLISE DO SISTEMA ANTIOXIDANTE

O músculo de cada animal, de ambos experimentos descritos anteriormente, foi acondicionado em microtubo, contendo 1 mL de Tampão TRIS HCl pH 7,4, e congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até realização das análises descritas a seguir:

**Preparação das amostras:** Primeiramente as amostras foram descongeladas em gelo moído por pelo menos duas horas, e em seguida homogeneizadas em solução tampão TRIS HCl pH 7,4 por 5 minutos. O material foi centrifugado à 13.680 g, a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 10 minutos, e o sobrenadante acondicionado em um novo microtubo e novamente congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Quantificação de proteína:** A quantificação de proteína das amostras foi determinada pelo método de Bradford, utilizando albumina de soro bovino como padrão (BRADFORD, 1976). As amostras foram analisadas por meio de espectrofotometria em microplaca, utilizando comprimento de onda de 595 nm. Todas as amostras foram posteriormente normalizadas em  $1\text{ mg de proteína.mL}^{-1}$ .

**Superóxido dismutase:** A dosagem desta enzima seguiu o protocolo proposto por Crouch et al., (1981), cujo princípio consiste em quantificar o azul de tetrazolium (NBT). Foram adicionados  $100\ \mu\text{l}$  de etanol 100% em  $300\ \mu\text{l}$  das amostras normalizadas, e centrifugadas a 13.680 g, a  $4^{\circ}\text{C}$ , por 10 minutos. Em microplaca de 96 poços, foram pipetados  $30\ \mu\text{l}$  do sobrenadante da amostra em triplicata, para o branco forma pipetados  $30\ \mu\text{l}$  de etanol 25% em tampão Tris-HCl 200 mM, e  $100\ \mu\text{l}$  da solução de hidroxilamina. A mensuração da absorbância foi realizada em 560 nm, por 90 minutos, em intervalos de 1 minuto. A expressão da unidade de SOD foi dada a atividade da enzima capaz de inibir em 50% a oxidação do NBT. $\text{mg}^{-1}$  de proteína (Fig. 8).

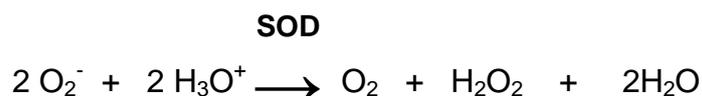


Figura 8 – Princípio bioquímico do procedimento de avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase.

**Catalase:** O processo de dosagem da enzima catalase aconteceu de acordo com o protocolo proposto por Aebi et al., (1984), que tem como princípio a dismutação do peróxido, cujo coeficiente de extinção molar é de  $40 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . 3  $\mu\text{L}$  das amostras normalizadas foram pipetadas em microplacas para leitura em espectrofotometria em ultravioleta, e adicionados 297  $\mu\text{l}$  do sistema de reação (2,5 ml de Tampão Tris-HCl 1,0 M, EDTA 5,0 mM, pH 8,0; 47,32 ml de água deionizada e 70  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Posteriormente, a absorbância foi mensurada a 240 nm, por 2 minutos em intervalos de 10 segundos. A unidade foi expressa em  $\text{mmol de H}_2\text{O}_2 \text{ degradado}.\text{min}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$  (Fig. 9).

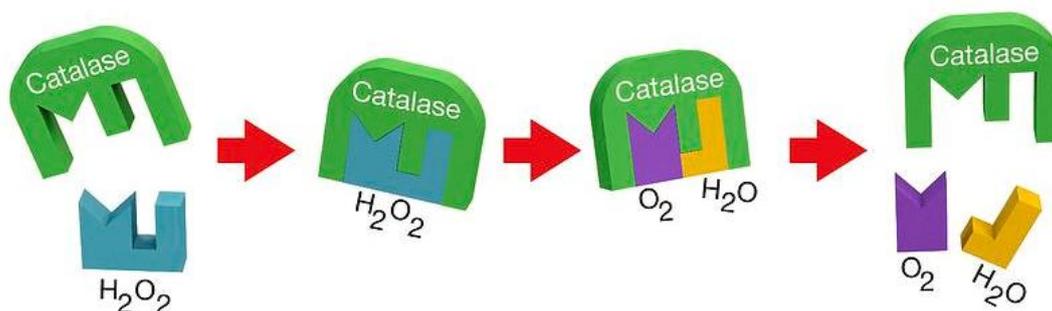


Figura 9 – Princípio bioquímico do procedimento de avaliação da atividade da enzima catalase. (Disponível em: <<https://fineartamerica.com/featured/action-of-catalase-on-hydrogen-peroxide-mikkel-juul-jensen.html>>. Acesso em: 01 mai. 2019).

**Glutathione S-transferase:** O princípio da análise da atividade da Glutathione transferase (GST) é de que a enzima catalisa a conjugação da glutathione reduzida (GSH) com o substrato sintético CDNB (HABIG et al., 1974). 20  $\mu\text{L}$  das amostras normalizadas/branco foram pipetados em triplicata, e adicionados 20  $\mu\text{l}$  de tampão fosfato de potássio e 180  $\mu\text{l}$  do sistema de reação (0,94 mM CDNB/GSH), em temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ). A mensuração da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 340 nm, por 5 minutos em intervalos de 30 segundos. A unidade foi expressa em  $\text{nmol de tioéter formado}.\text{min}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$  (Fig. 10).

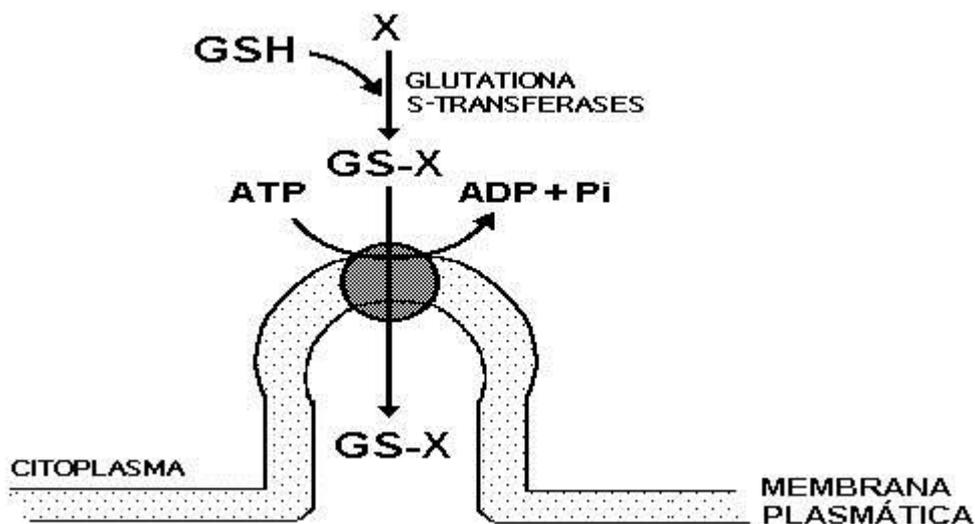


Figura 10 – Princípio bioquímico do procedimento de avaliação da atividade da enzima glutatona s-transferase (SOBJAK et al., 2016).

**Lipoperoxidação:** Para a quantificação indireta dos peróxidos, o protocolo seguido foi o de Buege e Aust (1978). Para a preparação da amostra, um meio contendo alíquota de 0,33 mg/mL de proteína, foi adicionado a um meio contendo ácido tricloroacético 6,7% (TCA) com volume final de 180  $\mu$ L e agitada em vórtex. Em seguida, o material foi acondicionado em banho de gelo por 5 minutos e centrifugado por 5 minutos a 13.680 g a 4 °C. Foram pipetados 40  $\mu$ L do sobrenadante e concentrações-padrão de Malonaldeído (MDA), em triplicata, a meio de reação contendo 21,42 mM de TBA, 17,86 mM de NaOH, 0,73 M de TCA, 0,032 mM de BHT, etanol 3% em PBS. A leitura da reação foi realizada à 22°C, após 60 minutos de incubação a 60°C, em uma absorvância de 535 nm. A peroxidação lipídica foi estimada a partir das concentrações-padrão de MDA e os resultados foram expressos como nmol de MDA.mg de proteína<sup>-1</sup> (Fig. 11).

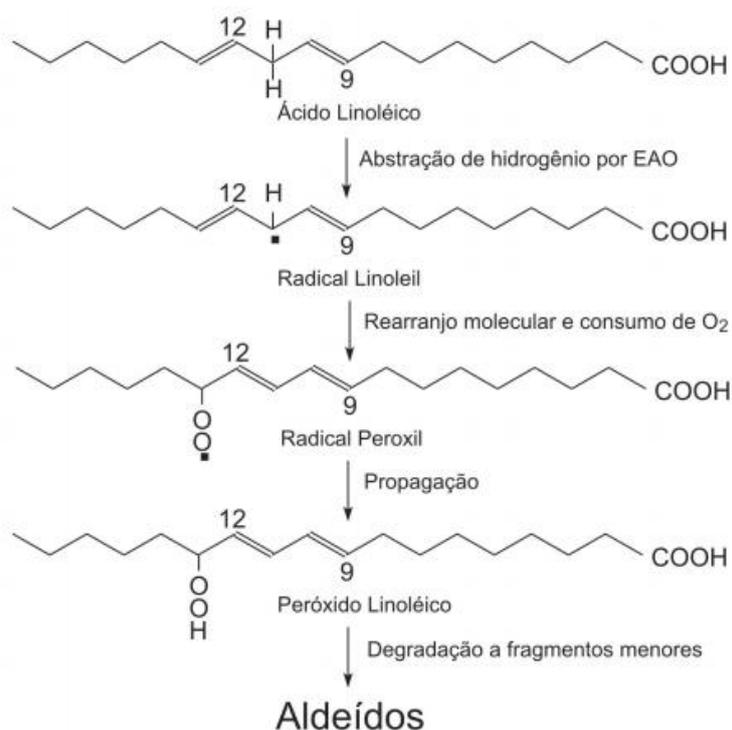


Figura 11 – Princípio bioquímico do procedimento de avaliação da atividade da Reação de lipoperoxidação. (Disponível em: [https://biblioteca.unilasalle.edu.br/docs\\_online/artigos/revista\\_la\\_salle/Aguardando\\_liberacao\\_direitos\\_autorais/2009\\_v14\\_n2/pmbock.pdf](https://biblioteca.unilasalle.edu.br/docs_online/artigos/revista_la_salle/Aguardando_liberacao_direitos_autorais/2009_v14_n2/pmbock.pdf)). Acesso em: 01 mai. 2019).

#### 4.5 ATIVIDADE DA ENZIMA COLINESTERASE

Com finalidade de determinar a atividade enzimática da colinesterase foram utilizadas as amostras normalizadas, aplicando-se a técnica de Ellman (ELLMAN et al., 1961) adaptado para microplaca por Herbert et al. (1995). A acetilcolina (ATC) foi utilizada como substrato a uma concentração de 9  $\mu\text{M}$  e o ácido 5,5'-ditil-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB), como reagente de cor. A leitura de absorvância foi realizada em um comprimento de onda de 405 nm. A atividade das ChE foi expressa em nmol acetilcolina hidrolisada.min<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup> (Fig. 12). Esta parte do trabalho foi realizada, porém não apresentada no artigo científico devido a uma melhor coerência de explicação dos dados.

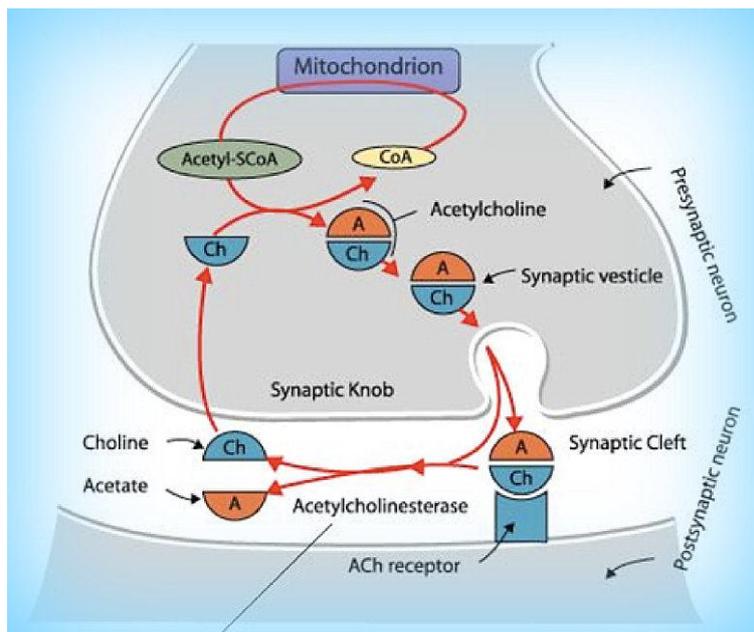


Figura 12 – Princípio bioquímico do procedimento de avaliação da atividade da enzima colinesterase (SOBJAK et al., 2016).

#### 4.6 AVALIAÇÃO DE MUTAGENICIDADE

Para o teste do micronúcleo seguimos o protocolo para confecção de lâminas de acordo com o proposto por Hoofman e de Raat (1982) com adaptações. Após a anestesia do animal, o sangue foi retirado por meio da remoção da nadadeira caudal com o auxílio de um bisturi. Após este procedimento, o sangue foi gotejado em uma lâmina e realizado o esfregaço, confeccionando-se uma lâmina para cada animal. Em seguida, as lâminas foram mantidas em secagem por 24 horas, posteriormente fixadas em metanol absoluto por 10 minutos e mais 24 horas de secagem à temperatura ambiente. As mesmas foram então coradas por 10 minutos com solução Giemsa diluída com tampão fosfato 0,06M (pH 6,8) na proporção de 1 mL de corante para 20 mL de tampão, lavadas em água destilada e postas novamente para secagem. Foram analisados 1000 eritrócitos por lâmina, em microscópio de luz em aumento de 1000x para a contagem de MN, e sempre comparados estatisticamente aos controles negativo (baixo potencial mutagênico) e controle positivo (quimioterápico, ou seja, alto potencial mutagênico).

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA

Com o intuito de garantir que a qualidade da água não pudesse ter interferido nos resultados encontrados, um terceiro experimento com as mesmas condições e manipulações de trocas de água, peixes e tempos foi realizado. A avaliação da água era realizada duas vezes por semana, sendo avaliados o pH, por meio de um pHmetro e as contrações de oxigênio dissolvido, com o auxílio de um oxímetro.

Para as avaliações das concentrações de amônia e nitrito, foram utilizados kits específicos (ALFAKIT®). Após realizada a coleta das amostras de água dos aquários, as mesmas eram pipetadas em microplacas e adicionados os reagentes específicos para cada composto, presentes nos kits, sendo realizada a leitura, por meio de espectrofotômetro, em comprimentos de onda de 620 nm e 490 nm, respectivamente.

#### 4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para cada experimento (avaliação aguda e crônica), para todas as variáveis respostas analisadas, foram construídos gráficos “*violin plot*” com o intuito de visualização dos dados para remoção de “*outliers*”, em seguida foram testados os dados de normalidade e homocedasticidade. Após testados os pressupostos, os grupos foram comparados por meio do teste de Kruskal Wallis ou pelo teste de ANOVA e, em caso de significância estatística ( $p < 0,05$ ), realizado o teste de acompanhamento de Dunn com auxílio do pacote `Dunn.test` ou teste de Tukey, respectivamente, por meio do programa estatístico R (R Core Team, 2017).

## REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, n. 1, p. 121-126, 1984.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular**. 2º edição. Porto Alegre: Artmed, 2006. 866 p.

ANDRADE, Silvia Franco. **Manual de Terapêutica Veterinária-Terceira Edição**. Editora Roca, 2008.

ARAÚJO, C.S.T.; CORROQUÉ, N.A.; LEME, D.M.; FERNANDES, T.C.C.; CARITÁ, R.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Avaliação da atividade mutagênica do efluente final de uma refinaria do estado de São Paulo após recebimento das águas servidas pela indústria. **Holos Environment**, v. 8, n. 2, p. 1-5, 2008.

ARAÚJO, L.M.B.; BRITTO, M.M.; DA CRUZ, P.; THOMAZ, R. Tratamento do diabetes *mellitus* do tipo 2: novas opções. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, n. 6, p. 509-518, 2000.

AWASTHI, Y.C.; GARG, H.S.; DAO, D.D.; PARTRIDGE, C.A.; SRIVASTAVA, S.K. Enzymatic conjugation of erythrocyte glutathione with 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene: the fate of glutathione conjugate in erythrocytes and the effect of glutathione depletion on hemoglobin. **Blood**, v. 58, n. 4, p. 733-738, 1981.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.D.C.G.; DE PAULA, S.O, MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. nutr**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BASAK, S.C.; KUMAR, K.S.; RAMALINGAM, M. Design and release characteristics of sustained release tablet containing metformin HCl. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 477-483, 2008.

BETTI, C.; DAVINI, T.; GIANNESI, L.; LOPRIENO, N.; BARALE, R. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 307, n. 1, p. 323-333, 1994.

BHUTADA, P.; MUNDHADA, Y.; BANSOD, K.; TAWARI, S.; PATIL, S.; DIXIT, P.; MUNDHADA, D. Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of berberine ameliorating memory dysfunction in rat model of streptozotocin-induced diabetes. **Behavioural brain research**, v. 220, n. 1, p. 30-41, 2011.

BIANCHI, M.D.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr**, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.

BIRBEN, E.; SAHINER, U.M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9, 2012.

BIRKS, J.S. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **The Cochrane Library**, v.1, n.1, p. 1-91, 2006.

BLAKE, D.; WINYARD, P. G.; Immunopharmacology of Free Radical Species, Academic Press, New York, p. 301, 1995.

BOCK, P.M.; PERALTA, J.S., 2009. Disponível em: [https://biblioteca.unilasalle.edu.br/docs\\_online/artigos/revista\\_la\\_salle/Aguardando\\_liberacao\\_direitos\\_autorais/2009\\_v14\\_n2/pmbock.pdf](https://biblioteca.unilasalle.edu.br/docs_online/artigos/revista_la_salle/Aguardando_liberacao_direitos_autorais/2009_v14_n2/pmbock.pdf). Acesso em: 01 mai. 2019.

BOJKOVA, B.; ORENDAS, P.; GARAJOVA, M.; KASSAYOVA, M.; KUTNA, V.; AHLERSOVA, E.; AHLERS, I. Metformin in chemically-induced mammary carcinogenesis in rats. **Neoplasma**, v. 56, n. 3, p. 269, 2009.

BONY, S.; GAILLARD, I.; DEVAUX, A. Genotoxicity assessment of two vineyard pesticides in zebrafish. **International Journal of Environmental and Analytical Chemistry**, v. 90, n. 3-6, p. 421-428, 2010.

BOUWMAN, T.; COMMANDEUR, J.N.; VERMEULEN, N.P. Structure-activity relationships for chemical and glutathione S-transferase-catalysed glutathione conjugation reactions of a series of 2-substituted 1-chloro-4-nitrobenzenes. **Biochemical Journal**, v. 320, n. 2, p. 531-540, 1996.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, P.M.; JOURNEY, C.A.; BUTTON, D.T.; CARLISLE, D.M.; CLARK, J.M.; MAHLER, B.J.; VANMETRE, P.C. Metformin and other pharmaceuticals widespread in wadeable streams of the southeastern United States. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 3, n. 6, p. 243-249, 2016.

BROINIZI, P.R.B.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.D.; SILVA, A.M.D.O, TORRES, R.P.; AZEREDO, H.M.C.; ALVES, R.E.; MANCINI-FILHO, J. Propriedades antioxidantes em subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poliinsaturados em ratos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 773-781, 2008.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 52, n. 1, p. 302-310, 1978.

BUENO, C.S.; WEBER, D.; DE OLIVEIRA, K.R. Farmácia caseira e descarte de medicamentos no bairro Luiz Fogliatto do município de Ijuí-RS. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, v. 30, n. 2, p. 203-210, 2009.

CATANEO, A.C.; CHAMMA, K.L.; FERREIRA, L.C.; DÉSTRO, G.F.G.; DE SOUSA, D.C.F. Atividade de superóxido dismutase em plantas de soja (*Glycine max* L.) cultivadas sob estresse oxidativo causado por herbicida. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 4, n. 2, p. 23-31, 2005.

CHEHUEN NETO, J.A.; SIRIMARCO, M.T.; CHOI, C.M.K.; BARRETO, A.U.; SOUZA, J.B. Automedicação entre Estudantes de Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora. **HU Revista**, v. 32, n. 3, p. 59-64, 2007.

CHO, K.; CHUNG, J.Y.; CHO, S.K.; SHIN, H.W.; JANG, I.J.; PARK, J.W.; CHO, J.Y. Antihyperglycemic mechanism of metformin occurs via the AMPK/LXR $\alpha$ /POMC pathway. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2015.

CHOI, J.E.; KIM, S.; AHN, J.H.; YOUN, P.; KANG, J.S.; PARK, K.; RYU, D.Y. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 2, p. 151-159, 2010.

COSTA, E.C.; SOARES, E.M.M.; LEMOS, T.M.A.M.; MARANHÃO, T.M.D.O.; AZEVEDO, G.D. Índices de obesidade central e fatores de risco cardiovascular na síndrome dos ovários policísticos. **Arq Bras Cardiol**, v. 94, n. 5, p. 633-8, 2010.

CROUCH, R.K.; GANDY, S.E.; KIMSEY, G.; GALBRAITH, R.A.; GALBRAITH, G.M.P.; BUSE, M.G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30, n. 3, p. 235-241, 1981.

DE ANGELIS, K.; PUREZA, D.Y.D.; FLORES, L.J.; RODRIGUES, B.; MELO, K.F.; SCHAAN, B.D.; IRIGOYEN, M.C. Efeitos fisiológicos do treinamento físico em pacientes portadores de diabetes tipo 1. **Arq. bras. endocrinol. metab**, v. 50, n. 6, p. 1005-1013, 2006.

DE PINHO, J.J.R.G.; STORPIRTIS, S. Estudo comparativo “in vitro” das propriedades biofarmacotécnicas de comprimidos de cloridrato de metformina comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 1, p. 95-105, 2001.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

ENGESZER, R.E. et al. *Zebrafish* in the wild: a review of natural history and new notes from the field. **Zebrafish**, v. 4, n. 1, p. 21-40, 2007.

FAßBENDER, C.; BRAUNBECK, T. Reproductive and genotoxic effects in zebrafish after chronic exposure to methyl methanesulfonate in a multigeneration study. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 5, p. 825-837, 2013.

FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S.R.G. Anestesia em cães e gatos. **Anestesia em cães e gatos**, 2002.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1, p. 81-95, 2000.

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

FERREIRA, I.C.; ABREU, R. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, p. 32-39, 2007.

FERREIRA, V.A.; CAMPOS, S.M.B. Avanços farmacológicos no tratamento do diabetes tipo 2. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, Vol. 8, n. 3, p. 72-78, 2014.

FERREIRA, E. B., CAVALCANTI, P. P., NOGUEIRA, D. A. ExpDes.pt: Experimental Designs package (Portuguese). R package version 1.1.2. 2013.

FRANÇA, D.D. **Avaliação da atividade mutagênica de águas superficiais utilizadas para abastecimento público após o tratamento na bacia dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá.** 2006. 109f. Dissertação-Universidade de São Paulo em Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 2006.

FRANCHI, K.M.B.; MONTEIRO, L.Z.; DE ALMEIDA, S.B.; PINHEIRO, M.H.N.P.; MEDEIROS, A.I.A.; MONTENEGRO, R.M.; JÚNIOR, R.M.M. Capacidade funcional e atividade física de idosos com diabetes tipo 2. **Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde**, v. 13, n. 3, p. 158-166, 2012.

FRANCO, L.J.; MAMERI, C.; PAGLIARO, H.; IOCHIDA, L. C.; GOLDENBERG, P. Diabetes como causa básica ou associada de morte no Estado de São Paulo, Brazil, 1992. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 3, p. 237-245, 1998.

FUJII, T.; TAKADA-TAKATORI, Y.; KAWASHIMA, K. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy. **Journal of pharmacological sciences**, v. 106, n. 2, p. 186-192, 2008.

GARCEZ, M. et al. Radicais livre e espécies reativas. In: Salvador, N.; Henriques, J.A.P. (Orgs.). **Radicaís livres e a resposta celular ao estresse oxidativo.** Canoas: ULBRA, 2004. 204p.

GERLAI, R.; LAHAV, M.; GUO, S.; ROSENTHAL, A. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v. 67, n. 4, p. 773-782, 2000.

GÖKÇE, B.; MUŞMULA, O.; ÜÇÜNCÜ, S.İ. Assessment of Genotoxicity of Methyl Parathion in Zebrafish by Use of the Micronucleus Test. **International Journal of New Technology and Research**, v. 2, n. 5, p. 49-51, 2016.

GÓTH, L.; VITAI, M. Hungarian hereditary acatalasemia and hypocatalasemia are not associated with chronic hemolysis. **Clinica chimica acta**, v. 233, n. 1, p. 75-79, 1995.

GÓTH, L.; RASS, P.; PÁY, A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. **Molecular Diagnosis**, v. 8, n. 3, p. 141-149, 2004.

GUIMARÃES, F.P.M.; TAKAYANAGUI, A.M.M. Orientações recebidas do serviço de saúde por pacientes para o tratamento do portador de diabetes *mellitus* tipo 2. **Rev. nutr**, v. 15, n.1, p. 37-44, 2002.

GRILLO, M.F.F.; GORINI, M.I.P.C. Caracterização de pessoas com diabetes *mellitus* tipo 2. **Revista brasileira de enfermagem**, v. 60, n. 1, p. 49-54, 2007.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.MC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1990. p. 1-85.

HERBERT, A.; GUILHERMINO, L.; DA SILVA DE ASSIS, H.C.; HANSEN, P.D. Acetylcholinesterase activity in aquatic organisms as pollution biomarker. **Z Angewandte Zoo**, v. 3, p. 1-15, 1995.

HERNÁNDEZ, B.; PFLÜGER, F.; KRUGLIK, S.G.; COHEN, R.; GHOMI, M. Protonation–deprotonation and structural dynamics of antidiabetic drug metformin. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 114, n.1, p. 42-48, 2015.

HOOFTMAN, R.N.; DE RAAT, W.K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, v. 104, n. 1-3, p. 147–152, 1982.

HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S.; FENECH, M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 659, n. 1, p. 93-108, 2008.

HONCZARYK, A.; INOUE, L.A.K.A. Anesthesia in pirarucu by eugenol sprays in the gills. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 577-579, 2009.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, Â. D. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, 2008.

IYAMA, T.; WILSON, D.M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. **DNA repair**, v. 12, n. 8, p. 620-636, 2013.

JIN, Y.; ZHANG, X.; SHU, L.; CHEN, L.; SUN, L.; QIAN, H.; FU, Z. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female *zebrafish* (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 78, n. 7, p. 846-852, 2010.

JORGE, W.S.J. Descarte de medicamentos. **Pharmacia Brasileira**, v. 82, n. 82, p. 14-16, 2011.

JORGE JOÃO, W.S. Descarte de medicamentos. **Pharmacia Brasileira**, v. 82, n. 82, p. 14-16, 2011.

JOSE, A.S.; FRANCISCATO, C.; SONEGO, F.; FIGUEIRO, M.; THIESEN, F.V.; GARCIA, S.C.; PEREIRA, M.E. Sensitivity of young rats to nicotine exposure: Physiological and biochemical parameters. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 1, p. 242-247, 2009.

KARI, G.; RODECK, U.; DICKER, A.P. *Zebrafish*: an emerging model system for human disease and drug discovery. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 82, n. 1, p. 70-80, 2007.

KALUEFF, A.V.; GEBHARDT, M.; STEWART, A.M.; CACHAT, J.M.; BRIMMER, M.; CHAWLA, J. S.; GAIKWAD, S. Towards a comprehensive catalog of *zebrafish* behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70-86, 2013.

KOPPRASCH, S.; SRIRANGAN, D.; BERGMANN, S.; GRAESSLER, J.; SCHWARZ, P.E.; BORNSTEIN, S.R. Association between systemic oxidative stress and insulin resistance/sensitivity indices—the PREDIAS study. **Clinical endocrinology**, v. 84, n. 1, p. 48-54, 2016.

KUBA, V.M.; CAVALIERI, P.M.; FARIA JUNIOR, R.; CAETANO, R.; COELI, C.M.; ATHAYDE, A. Resistência insulínica e perfil metabólico em pacientes com síndrome dos ovários policísticos de peso normal e sobrepeso/obesidade. **Arq. bras. endocrinol. metab.**, v. 50, n. 6, p. 1026-1033, 2006.

LAM, B.K.; XU, K.; ATKINS, M.B.; AUSTEN, K.F. Leukotriene C4 uses a probenecid-sensitive export carrier that does not recognize leukotriene B4. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 23, p. 11598-11602, 1992.

LAWRENCE, A.J.; HEMINGWAY, K.L. Effects of pollution on fish. **UK. P**, p. 144-153, 2003.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

MADIRAJU, A.K.; ERION, D.M.; RAHIMI, Y.; ZHANG, X.M.; BRADDOCK, D.T.; ALBRIGHT, R.A.; JURCZAK, M.J. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. **Nature**, v. 510, n. 7506, p. 542, 2014.

MATOS, M.C.G.; BRANCHTEIN, L. O uso de antidiabéticos orais no paciente com diabetes mellitus e doença cardíaca. **Revista da sociedade de cardiologia do RS**, v. 1, n. 8, p. 1-4, 2006.

MESULAM, M.M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSEN, E.G.; LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **neuroscience**, v. 110, n. 4, p. 627-639, 2002.

MOSTAFA, D.K.; ISMAIL, C.A.; GHAREEB, D.A. Differential metformin dose-dependent effects on cognition in rats: role of Akt. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 13, p. 2513-2524, 2016.

NETO, A.; FERREIRA, J.M.; RIVERA, R.J.B.; CALVI, R.G.; RAFFA, M.F.; DONADON, C. C.; MELO, P.D.S. Níveis comparativos de estresse oxidativo em camundongos em duas situações do limite orgânico: overreaching induzido por treinamento de natação e câncer. **Rev. bras. med. esporte**, v. 14, n. 6, p. 548-552, 2008.

NIEMUTH, N.J.; JORDAN, R.; CRAGO, J.; BLANKSMA, C.; JOHNSON, R.; KLAPER, R.D. Metformin exposure at environmentally relevant concentrations causes potential endocrine disruption in adult male fish. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 34, n. 2, p. 291-296, 2015.

NUNES, G.S. Determinação de pesticidas utilizando biossensores a base de enzimas colinesterases: Uma revisão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 6, 1996.

PALOMBA, S.; ORIO JR, F.; FALBO, A.; MANGUSO, F.; RUSSO, T.; CASCELLA, T.; ZULLO, F. Prospective parallel randomized, double-blind, double-dummy controlled clinical trial comparing clomiphene citrate and metformin as the first-line treatment for ovulation induction in nonobese anovulatory women with polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 7, p. 4068-4074, 2005.

PERES, W. 1994. Radicais Livres em níveis biológicos. Ed. Educat: Pelotas. pp. 86.

POULSEN, H.E.; PRIEME, H.; LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European Journal of Cancer Prevention - Oxford**, v.7, n.1, p.9-16, 1998.

RAMÍREZ, O.A.B.; GARCÍA, F.P. Genotoxic damage in zebra fish (*Danio rerio*) by arsenic in waters from Zimapan, Hidalgo, Mexico. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 291-295, 2005.

RICHETTI, S.K.; ROSEMBERG, D.B.; VENTURA-LIMA, J.; MONSERRAT, J.M.; BOGO, M.R.; BONAN, C.D. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 1, p. 116-122, 2011.

RODRIGUES NETO, E.M.; MARQUES, L.A.R.V.; FERREIRA, M.A.D.; LOBO, P.L.D.; JUNIOR, F.J.G.; CAMARÃO, G.C.; DE MORAES, M.E.A. Metformina: uma revisão da literatura. **Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 2, p. 355-362, 2015.

ROSEMBERG, D.B.; DA ROCHA, R.F.; RICO, E.P.; ZANOTTO-FILHO, A.L.F.E.U.; DIAS, R.D.; BOGO, M. R.; SOUZA, D.O. Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain. **Neuroscience**, v. 171, n. 3, p. 683-692, 2010.

RUSSELL, A.P.; GASTALDI, G.; BOBBIONI-HARSCH, E.; ARBOIT, P.; GOBELET, C.; DÉRIAZ, O.; GIACOBINO, J.P. Lipid peroxidation in skeletal muscle of obese as compared to endurance-trained humans: a case of good vs. bad lipids?. **FEBS letters**, v. 551, n. 1-3, p. 104-106, 2003.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P.; KUBOTA, L.T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, 2001.

SAITO, Y.; YOSHIDA, Y.; NIKI, E. Cholesterol is more susceptible to oxidation than linoleates in cultured cells under oxidative stress induced by selenium deficiency and free radicals. **FEBS letters**, v. 581, n. 22, p. 4349-4354, 2007

SANTANA, L.F.; FERRIANI, R.A.; SÁ, M F.S.D.; REIS, R.M.D. Tratamento da infertilidade em mulheres com síndrome dos ovários policísticos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 4, p. 201-209, 2008.

SARTORI, E.R.; SUAREZ, W.T.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação condutométrica de cloridrato de metformina em formulações farmacêuticas empregando nitrato de prata como titulante. **Quim. Nova**, v. 32, n. 7, p. 1947-1950, 2009.

SCHEURER, M.; MICHEL, A.; BRAUCH, H.J.; RUCK, W.; SACHER, F. Occurrence and fate of the antidiabetic drug metformin and its metabolite guanylurea in the environment and during drinking water treatment. **Water research**, v. 46, n. 15, p. 4790-4802, 2012.

SCHNEIDER, A.C.R.; DOS SANTO, J.L.; PORAWSKI, M.; SCHAEFER, P.G.; MAURER, R.L.; MATTE, U.; DA SILVEIRA, T.R.. Implementação de um Novo Modelo de Experimentação Animal-Zebrafish. **Rev. HCPA**, v. 29, n. 2, p. 100-103, 2009.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R DE. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-13, 2004.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D.P. Oxidative stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 22-25, 2017.

SILVA, R.D.C.; PARDINI, D.P.; KATER, C.E. Síndrome dos ovários policísticos, síndrome metabólica, risco cardiovascular e o papel dos agentes sensibilizadores da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 281-290, 2006.

SIQUEIRA, M.E.P.B.; FERNÍCOLA, N.A.G.G.; BORGES, E.L. Determinação de níveis normais de colinesterase plasmática e eritrocitária. **Revista de Saúde Pública**, v. 12, p. 340-344, 1978.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. **Principles of Genetics, Binder Ready Version**. John Wiley & Sons, 2015.

SOBJAK, T.M. *Atividade do sistema antioxidante e efeitos neurotóxicos em larvas de Rhamdia quelen em exposição aguda ao glifosato*. 2016. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel-PR.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes sociedade brasileira de diabetes**. 2015/2016. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/profissionais/images/docs/DIRETRIZES-SBD-2015-2016.pdf>. Acesso em: 20/04/2017-16:14h.

TALIB, L.L. **Biomarcadores na doença de Alzheimer: GSK3B e PLA2 na resposta aos inibidores de colinesterase**. 2014. Tese (Programa de Psiquiatria) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

TRAUTWEIN, C.; KÜMMERER, K.. Incomplete aerobic degradation of the antidiabetic drug Metformin and identification of the bacterial dead-end transformation product Guanylurea. **Chemosphere**, v. 85, n. 5, p. 765-773, 2011.

TRAUTWEIN, C.; BERSET, J.D.; WOLSCHKE, H.; KÜMMERER, K. Occurrence of the antidiabetic drug Metformin and its ultimate transformation product Guanylurea in several compartments of the aquatic cycle. **Environment international**, v. 70, n. 1, p. 203-212, 2014.

TROVÓ, K.T.; TIYO, R. Uso de metformina no tratamento da infertilidade em mulheres que apresentam síndrome dos ovários policísticos. **Revista UNINGÁ Review**, v. 20, n. 2, p. 43-47, 2014.

U.S.EPA. Highlights of the Exposure Factors Handbook (Final Report). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/R-10/030, 2011.

VÉLEZ, C.; ROCIO, P. **Uso de biomarcadores de genotoxicidade e histopatológicos para avaliação de toxicidade de vermiculita expandida magnética e vermiculita expandida em peixes Danio rerio**. 2013. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

VENTURA, A.L.; ABREU, P.A.; FREITAS, R.C.; SATHLER, P.C.; LOUREIRO, N.; CASTRO, H.C. Sistema colinérgico&58; revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo Colinergic system&58; revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. **Archives of Clinical Psychiatry**, v. 37, n. 2, p. 66-72, 2010.

VITOR, R.S.; LOPES, C.P.; MENEZES, H.S.; KERKHOFF, C.E. Padrão de consumo de medicamentos sem prescrição médica na cidade de Porto Alegre, RS. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 1, p. 737-743, 2008.

WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION, 2019. Disponível em: <http://www.worthington-biochem.com/SODBE/default.html>. Acesso em: 01 mai. 2019.

ZAMIN JR, I.; MATTOS, A.A.D.; MATTOS, Â.Z.D.; CORAL, G.; SANTOS, D.; RHODEN, C. The vitamin E reduces liver lipoperoxidation and fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 47, n. 1, p. 86-92, 2010.

ZORZETTO, R.; GUIMARÃES, M. Um peixe modelo. In: São Paulo: Revista Pesquisa FAPESP, 2013, p. 16-21.

1 **5. ARTIGO**

2 *A ser encaminhado para a revista Chemosphere*

3  
4 **Efeitos do cloridrato de metformina sobre o sistema antioxidante e ação mutagênica em**  
5 ***Danio rerio* (Cypriniformes: Cyprinidae)**  
6

7 Natani Ribeiro Demarco<sup>1\*</sup>, Camila Maria Toigo de Oliveira<sup>2</sup>, Luciana Gregório D'Arce<sup>3</sup>, Ana Tereza  
8 Bittencourt Guimarães<sup>1</sup>

9 <sup>1</sup> Biosciences and Health Postgraduate Program, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Cascavel  
10 – PR.

11 <sup>2</sup> Conservation and Management of Natural Resources Postgraduate Program, Universidade Estadual  
12 do Oeste do Paraná. Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário, Cascavel - PR, 85819-110

13 <sup>3</sup> Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Cascavel – PR.

14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  

---

<sup>1</sup> \* [nnaat@hotmail.com](mailto:nnaat@hotmail.com); Phone number: +55 (44) 99957-5232; Permanent address: Rua Arquitetura, 935, Cascavel-PR, 85819-230.

27 **ABSTRACT**

28 Metformin hydrochloride is an oral medication prescribed for patients with diabetes, little is  
29 known about its mutagens and antioxidants potential, that can be detected through the  
30 evaluation of biological models such as *Danio rerio*. Thus, the objective of this study was to  
31 test the potential acute and chronic effects of metformin hydrochloride on the antioxidant and  
32 mutagenic system in the bioindicator *D. rerio*. The animals were acclimatized at temperature,  
33 pH and constants oxygenation, for a period of seven days. Then, the fishes were separated  
34 into six groups exposed to different concentrations for determination of the LC50 over a 96  
35 hour period. In another experiment, six groups of ten animals were separated: four groups for  
36 evaluation of the chronic effect of 0.45 g/L of metformin hydrochloride up to 60 days. A  
37 negative control group and a positive control, the methylmethane sulfonate (MMS), group  
38 were present in both experiments. The antioxidant system of the muscle samples was  
39 evaluated by: Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione transferase (GST),  
40 and Lipoperoxidation reaction (LPO). The mutagenicity was performed in the blood samples  
41 by means of the Micronucleus Test, analyzing: micronucleus frequency, necrosis, fragmented  
42 nucleus, bud, lobed nucleus and binucleate cells. With this, the presence of oxidative stress  
43 and cellular damage, together with the activation of the antioxidant system, can be visualized  
44 up to 45 days of treatment, with a stabilization of the physiological system in 60 days. What is  
45 believed to be from a physiological adaptation to the use of metformin hydrochloride.

46

47 *Keywords:* Zebrafish; Metformin; Oxidative stress; Micronucleus.

48

49

## 50 1. Introdução

51

52 O cloridrato de metformina é um medicamento derivado da guanidina, prescrito para  
53 o tratamento de diabetes mellitus e ovário policístico (Witters, 2001). Quando somente a  
54 mudança no estilo de vida não é suficiente para o controle dos níveis de glicose, são indicadas  
55 doses diárias de cloridrato de metformina, entre 500 e 2500 mg (Korolkovas, 1995). Esse  
56 medicamento é capaz de diminuir a produção de glicose basal, suprimindo a gliconeogênese e  
57 a glicogenólise no fígado, fazendo com que ocorra uma maior captação de glicose do tecido  
58 muscular (Bodmer et al., 2008), diminuindo, assim, as taxas de triglicerídeos e colesterol,  
59 bem como a diminuição significativa das complicações cardiovasculares em pacientes com  
60 sobrepeso (Trovó; Tiyo, 2014).

61 Com o aumento do número de casos de diabetes tipo 2, principalmente nos países  
62 desenvolvidos, tem ocorrido o aumento do uso de tal medicamento. Pouco é conhecido sobre  
63 as consequências da utilização deste medicamento em períodos prolongados em experimentos  
64 *in vivo* (Martin-Montalvo et al., 2013) e, em especial, a saúde humana. Um eficiente modelo  
65 de teste para descobertas de doenças e efeitos de drogas em humanos é o peixe *Danio rerio*,  
66 conhecido como *Zebrafish* (Kari et al., 2007). Este modelo biológico é muito utilizado em  
67 experimentos de genética e pesquisas biomédicas (Gerlai et al., 2000), fazendo deste, um  
68 competente modelo devido suas similaridades genéticas, celulares, anatômicas e fisiológicas  
69 aos mamíferos, tornando-o um ótimo bioindicador para a exploração também da toxicologia,  
70 sendo essa, uma ciência fortemente envolvida na compreensão da etiologia de doenças  
71 humanas (Tanguay, 2018).

72 Visto como um dos mecanismos mais comuns em uma condição tóxica, o estresse  
73 oxidativo é considerado como uma série ativações enzimáticas e reações que levam a  
74 diminuição do estado homeostático da célula. Este estado é consequência da elevação de  
75 espécies reativas ao oxigênio (EROS) e do aumento de moléculas oxidadas (Samet; Wages,  
76 2018). O aumento de tais moléculas desencadeia em reações de lipoperoxidação, além de  
77 infligir danos às biomoléculas de DNA (Czarny et al., 2018), levando a instabilidade  
78 genômica, promovendo desde danos oxidativos a mutações, e podendo desencadear até  
79 processos carcinogênicos (Fayh et al., 2018).

80 Como já referido, há pouca informação ainda existente sobre os potenciais efeitos do  
81 cloridrato de metformina, sobre sistemas biológicos de um modelo experimental, simulando  
82 possíveis alterações a saúde, decorrente de diferentes concentrações em exposição aguda e

83 concentração não-letal em exposição crônica do medicamento. Desta forma, torna-se  
84 importante a realização de estudos com este escopo, sendo que o objetivo do presente trabalho  
85 foi avaliar os potenciais efeitos do medicamento cloridrato de metformina sobre o sistema  
86 antioxidante, bem como o sistema colinérgico e mutagênico por meio da avaliação do  
87 bioindicador *Danio rerio*.

88

## 89 **2. Metodologia**

90

### 91 *2.1 Aclimação e procedimentos experimentais*

92 A amostra foi constituída por 120 exemplares machos, adultos, de peixes *D. rerio*  
93 obtidos de piscicultores devidamente regulamentados pelo Instituto Brasileiro do Meio  
94 Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), distribuídos em um delineamento  
95 inteiramente casualizado. Destes, 60 foram utilizados para obtenção da CL50 e efeito agudo e  
96 os demais foram utilizados em experimento de avaliação do efeito crônico do cloridrato de  
97 metformina. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEP)  
98 da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE).

99 Todos os animais foram aclimatados em aquários com aeração e temperaturas  
100 constantes ( $24 \pm 0,5$  °C) por no mínimo sete dias, sendo respeitada a densidade de 1 g de  
101 peixe.L<sup>-1</sup> de água. Os animais foram alimentados com ração comercial com 45% de proteína  
102 bruta, duas vezes ao dia, recebendo 5% da biomassa total dos aquários.

103 No experimento de avaliação do efeito crônico, a água total dos aquários foi trocada  
104 semanalmente em todos os recipientes, incluindo os controles, e adicionados novos  
105 tratamentos a cada aquário, caracterizando em experimentos de pressão (Gotelli; Ellison,  
106 2011). Além de adicionado novo tratamento, a água do controle negativo era redistribuída em  
107 todos os aquários com o intuito de conservar o ambiente cujo animal estava acondicionado,  
108 reduzindo assim o estresse do procedimento. Todos os aquários eram abastecidos com água  
109 proveniente do poço artesiano que abastece a Universidade.

110 De acordo com Tincani et al. (2017), experimentos em ecotoxicologia que avaliem  
111 biomarcadores e que não apresentem replicação verdadeira (ou seja, vários animais por  
112 aquário) apresentam resultados equivalentes e com o mesmo valor de erro tipo I e tipo II que  
113 um experimento com replicação (ou seja, um animal por aquário).

114 Com o intuito de garantir a qualidade da água ao longo das experimentações, foram  
115 realizadas avaliações da água em um experimento paralelo e com as mesmas condições. As

116 avaliações foram realizadas duas vezes por semana, sendo avaliados o pH e as contrações de  
117 oxigênio dissolvido, por meio de um pHmetro e de um oxímetro, respectivamente, e avaliadas  
118 as concentrações de amônia e nitrito. Para as avaliações das concentrações de amônia e  
119 nitrito, foram utilizados kits específicos (ALFAKIT<sup>®</sup>), adaptados para microplacas, sendo  
120 realizadas as leituras por meio de espectrofotômetro, em comprimentos de onda de 620 nm e  
121 490 nm, respectivamente.

122

## 123 *2.2 Avaliação da concentração letal de 50% (CL50) e efeito agudo do cloridrato de* 124 *metformina*

125 Para a obtenção da CL50, os peixes foram acondicionados em seis aquários de 10 L  
126 (n=10 por aquário). Nos aquários foram administradas as seguintes concentrações de  
127 cloridrato de metformina por 96 horas: A – 0,25 g/L; B – 0,5 g/L; C – 0,75 g/L; D – 1,25 g/L  
128 e mais dois aquários utilizados como controles: E – Controle negativo (animais apenas  
129 aclimatados); F – Controle positivo (animais tratados com 0,2 mg/L de Metilmetano  
130 Sulfonado – MMS, um quimioterápico, de acordo com o trabalho de Faßbender; Braunbeck,  
131 2013), utilizado para comparação na análise mutagênica. Ao longo do experimento,  
132 diariamente foram registradas as frequências de mortalidade por tratamento. O cálculo de  
133 CL50 foi estimado de modo não linear, por meio de cálculos de probitos (Probit regression),  
134 aplicando-se o método de estimação de Quasi-Newton. A predição da CL50 foi definida por  
135 meio da análise de regressão múltipla, a partir das probabilidades previstas (U.S.EPA, 2011).  
136 Após o período experimental, os animais foram anestesiados em eugenol (30 mg/L) e  
137 realizada a coleta do músculo e sangue, sendo este material biológico devidamente  
138 acondicionado para a realização das análises de atividade do sistema antioxidante e efeitos  
139 mutagênicos.

140

## 141 *2.3 Avaliação dos efeitos crônicos do cloridrato de metformina*

142 Após obtida a CL50, foram mensurados os comprimentos total e padrão, dos demais  
143 animais, e os mesmos foram pesados tanto no período inicial do tratamento, quanto no  
144 momento que antecedia a eutanásia, sendo acondicionados em quatro aquários de 10 L (n=10  
145 por aquário) após a pesagem inicial. Nos aquários foi administrada a concentração subletal de  
146 0,45 g/L de cloridrato de metformina (obtida no experimento anterior), os quais foram  
147 subdivididos de acordo com o tempo de exposição ao medicamento: T15: exposição por 15  
148 dias; - T30: exposição por 30 dias; - T45: exposição por 45 dias; - T60: exposição por 60 dias.

149 Mais dois aquários tiveram animais acondicionados e considerados como controles, foram  
150 mantidos por 60 dias: E – Controle negativo (animais apenas aclimatados); F - Controle  
151 Positivo (CP): animais expostos a 4 µg/L de ciclofosfamida, um quimioterápico, conforme  
152 proposto por Gökçe et al. (2016), utilizado para comparação na análise mutagênica.

153 Nos tempos experimentais descritos anteriormente, os animais foram anestesiados  
154 em água contendo 30mg de eugenol por litro, de acordo com a metodologia sugerida por  
155 Honczaryk e Inoue (2009) e novamente pesados. Em seguida, ainda anestesiados, ocorreu à  
156 coleta de sangue para posterior realização do teste do MN, através da secção da nadadeira  
157 caudal. Também foi retirado o músculo caudal, com auxílio de bisturi, para a realização das  
158 análises relativas ao sistema antioxidante. Após a coleta de material, os animais foram  
159 eutanasiados por saturação de eugenol, de acordo com a mesma metodologia citada acima e  
160 descartados dentro de um saco em lixo hospitalar para fim apropriado.

161

## 162 *2.4 Análises laboratoriais*

163

### 164 2.4.1 Preparo das amostras

165 O músculo de cada animal, de ambos experimentos descritos anteriormente, foi  
166 acondicionado em microtubo, contendo 1 mL de Tampão TRIS HCl pH 7,4, e congelados a -  
167 20°C até realização das análises descritas a seguir:

168 As amostras foram descongeladas em gelo moído por pelo menos duas horas, e em  
169 seguida homogeneizadas em solução tampão TRIS HCl pH 7,4 por 5 minutos. O material foi  
170 centrifugado à 13.680 g, a 4°C, durante 10 minutos, e o sobrenadante acondicionado em um  
171 novo microtubo e novamente congelado a -20°C. A quantificação de proteína das amostras foi  
172 determinada pelo método de Bradford, utilizando albumina de soro bovino como padrão  
173 (Bradford, 1976). As amostras foram analisadas por meio de espectrofotometria em  
174 microplaca, utilizando comprimento de onda de 595 nm. Todas as amostras foram  
175 posteriormente normalizadas em 1 mg de proteína.mL<sup>-1</sup>.

176

### 177 2.4.2 Análise do sistema antioxidante

178 A dosagem da enzima superóxido dismutase seguiu o protocolo proposto por Crouch  
179 et al., (1981), cujo princípio consiste em quantificar o azul de tetrazolium (NBT). Foram  
180 adicionados 100 µl de etanol 100% em 300 µl das amostras normalizadas, e centrifugadas a  
181 13.680 g, a 4°C, por 10 minutos. Em microplaca de 96 poços, foram pipetados 30 µl do

182 sobrenadante da amostra em triplicata, para o branco foram pipetados 30  $\mu\text{L}$  de etanol 25% em  
183 tampão Tris-HCl 200 mM, e 100  $\mu\text{L}$  da solução de hidroxilamina. A mensuração da  
184 absorvância foi realizada em 560 nm, por 90 minutos, em intervalos de 1 minuto. A expressão  
185 da unidade de SOD foi dada a atividade da enzima capaz de inibir em 50% a oxidação do  
186 NBT. $\text{mg}^{-1}$  de proteína.

187 O processo de dosagem da enzima catalase aconteceu de acordo com o protocolo  
188 proposto por Aebi et al., (1984), que tem como princípio a dismutação do peróxido, cujo  
189 coeficiente de extinção molar é de  $40 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . 3  $\mu\text{L}$  das amostras normalizadas foram  
190 pipetadas em microplacas para leitura em espectrofotometria em ultravioleta, e adicionados  
191 297  $\mu\text{L}$  do sistema de reação (2,5 ml de Tampão Tris-HCl 1,0 M, EDTA 5,0 mM, pH 8,0;  
192 47,32 ml de água deionizada e 70  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Posteriormente, a absorvância foi mensurada a  
193 240 nm, por 2 minutos em intervalos de 10 segundos. A unidade foi expressa em mmol de  
194  $\text{H}_2\text{O}_2$  degradado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$  de proteína $^{-1}$ .

195 O princípio da análise da atividade da Glutathione transferase (GST) é de que a enzima  
196 catalisa a conjugação da glutathione reduzida (GSH) com o substrato sintético CDNB (Habig et  
197 al., 1974). 20  $\mu\text{L}$  das amostras normalizadas/branco foram pipetados em triplicata, e  
198 adicionados 20  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio e 180  $\mu\text{L}$  do sistema de reação (0,94 mM  
199 CDNB/GSH), em temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ). A mensuração da absorvância foi realizada  
200 em comprimento de onda de 340 nm, por 5 minutos em intervalos de 30 segundos. A unidade  
201 foi expressa em nmol de tioéter formado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$  de proteína $^{-1}$ .

202 Para a quantificação indireta dos peróxidos, o protocolo seguido foi o de Buege e Aust  
203 (1978). Para a preparação da amostra, um meio contendo alíquota de 0,33 mg/mL de proteína  
204 da mesma, foi adicionado a um meio contendo ácido tricloroacético 6,7% (TCA) com volume  
205 final de 180  $\mu\text{L}$  e agitada em vórtex. Em seguida, o material foi acondicionado em banho de  
206 gelo por 5 minutos e centrifugado por 5 minutos a 13.680 g a  $4^\circ\text{C}$ . Foram pipetados 40  $\mu\text{L}$  do  
207 sobrenadante e concentrações-padrão de Malonaldeído (MDA), em triplicata, a meio de  
208 reação contendo 21,42 mM de TBA, 17,86 mM de NaOH, 0,73 M de TCA, 0,032 mM de  
209 BHT, etanol 3% em PBS. A leitura da reação foi realizada à  $22^\circ\text{C}$ , após 60 minutos de  
210 incubação a  $60^\circ\text{C}$ , em uma absorvância de 535 nm. A peroxidação lipídica foi estimada a  
211 partir das concentrações-padrão de MDA e os resultados foram expressos como nmol de  
212 MDA. $\text{mg}$  de proteína $^{-1}$ .

### 213 2.4.3 Avaliação de mutagenicidade

214 Para o teste do micronúcleo seguimos o protocolo para confecção de lâminas de  
215 acordo com o proposto por Hoofman e de Raat (1982) com adaptações. O sangue retirado de  
216 cada espécime foi gotejado em uma lâmina e realizado o esfregaço, uma por animal. As  
217 lâminas foram mantidas em secagem por 24 horas, posteriormente fixadas em metanol  
218 absoluto por 10 minutos e mais 24 horas de secagem à temperatura ambiente. As mesmas  
219 foram então coradas por 10 minutos com solução Giemsa diluída com tampão fosfato 0,06M  
220 (pH 6,8) na proporção de 1 mL de corante para 20 mL de tampão, lavadas em água destilada e  
221 postas novamente para secagem. Foram analisados 1000 eritrócitos por lâmina, em  
222 microscópio de luz em aumento de 1000x para a contagem de MN, sempre comparados  
223 estatisticamente aos controles negativo (baixo potencial de mutagênico) e positivo  
224 (quimioterápico, ou seja, alto potencial mutagênico).

225

### 226 2.5 Análises estatísticas

227 Para cada experimento (avaliação aguda e crônica), para todas as variáveis respostas  
228 analisadas, foram construídos gráficos “*violin plot*” com o intuito de visualização dos dados  
229 para remoção de “*outliers*”, em seguida foram testados os dados de normalidade e  
230 homocedasticidade. Após testados os pressupostos, os grupos foram comparados por meio do  
231 teste de Kruskal Wallis ou pelo teste de ANOVA e, em caso de significância estatística  
232 ( $p < 0,05$ ), realizado o teste de acompanhamento de Dunn com auxílio do pacote *Dunn.test* ou  
233 teste de Tukey, respectivamente, por meio do programa estatístico R (R Core Team, 2017).

234

235

## 236 3. Resultados

### 237 3.1 CL50 e exposição aguda ao cloridrato de metformina

238

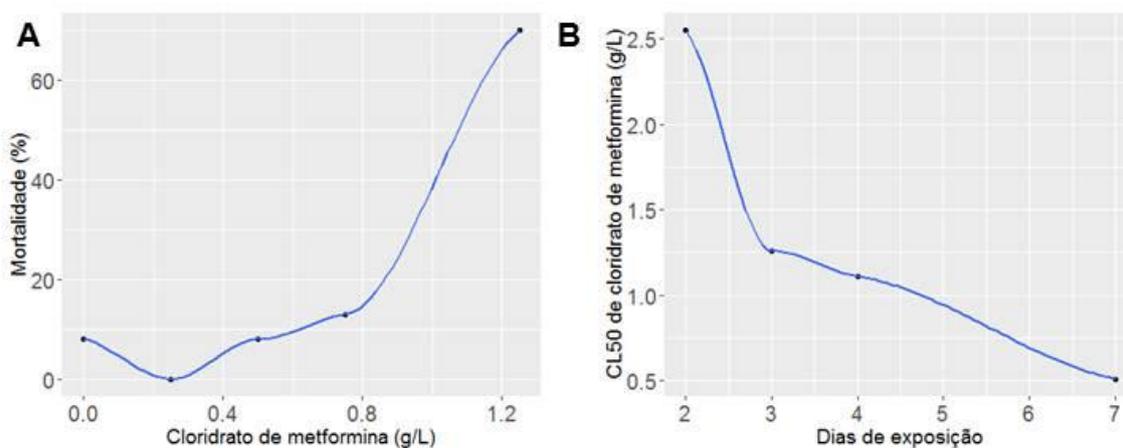
#### 239 3.1.1 Concentração letal de 50% (CL50)

240 Foi verificado que os grupos expostos a 0,25 g/L (0%), 0,5 g/L (8%) e controle  
241 negativo (8%) não apresentaram diferenças estatísticas significativas quanto à mortalidade  
242 ( $p > 0,05$ ), observando-se diferenças a partir da concentração de 0,75 g/L (13%) e 1,25 g/L  
243 (70%) ( $p < 0,05$ ).

244 A partir dos dados observados, aplicação do método de estimação e expressando os  
245 resultados em um modelo polinomial de segunda ordem, foi possível estimar que a  
246 concentração letal de 50% dos indivíduos (CL50) foi de 1,15 g/L em 96 horas (Fig. 1A).

247 O mesmo cálculo de CL50 foi também realizado para 48 e 72 h, definindo-se os  
 248 valores de 2,55 e 1,26 g/L, respectivamente. Estes dados foram avaliados por meio de análise  
 249 de regressão, definindo-se um modelo exponencial negativo (Fig. 1B). A partir do presente  
 250 modelo, foi possível inferir que o valor de CL50 para sete dias de exposição é de 0,51 g/L de  
 251 cloridrato de metformina. O cálculo deste valor foi necessário uma vez que o mesmo teria que  
 252 ser repostado semanalmente no experimento de exposição crônica, sendo definido uma  
 253 concentração não-letal de 0,45 g/L de cloridrato de metformina.

254



255

256 Figura 1. A) % de mortalidade de *D. rerio* submetido a diferentes concentrações de Cloridrato  
 257 de Metformina, em exposição por 96 horas. B) CL50 estimada de cloridrato de metformina  
 258 para *D. rerio* em relação aos dias de exposição.

259

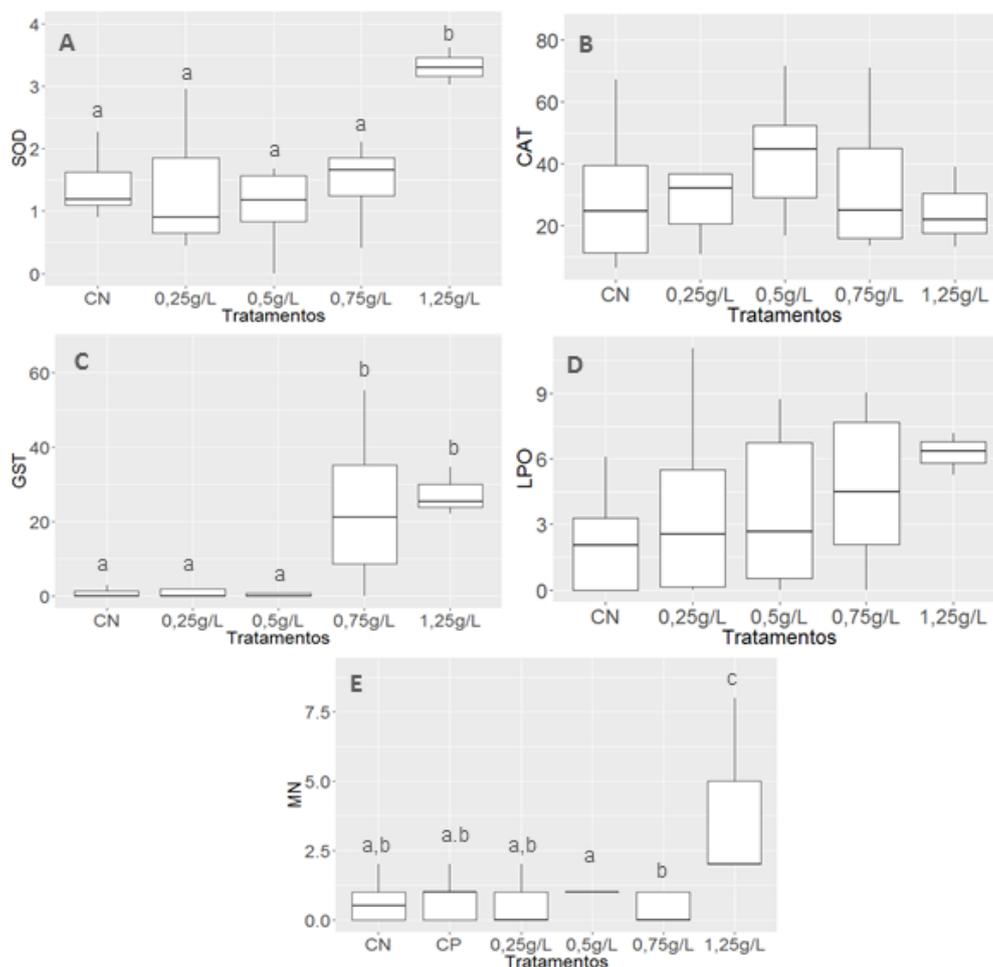
### 260 3.1.2 Sistema antioxidante

261 Ao observar os resultados encontrados no experimento agudo (96h), pode-se avaliar  
 262 que houve elevação gradual da atividade da enzima SOD ( $H=9,589$ ;  $p=0,047$ ; Fig. 2A)  
 263 apresentando diferença estatística do tratamento de maior concentração (1,25g) em relação  
 264 aos demais tratamentos, mas sem alteração da atividade da CAT ( $H=4,584$ ;  $p=0,333$ ; Fig. 2B).  
 265 Foi também constatada elevação gradual da atividade da enzima GST, sendo observado  
 266 principalmente a partir de 0,75 g/L de exposição ao medicamento, sendo que os tratamentos  
 267 de 0,75 g/L e 1,25 g/L apresentaram atividade de GST estatisticamente mais elevada do que o  
 268 grupo controle negativo ( $H=18,487$ ;  $p<0,001$ ; Fig. 2C). A formação de MDA, decorrente da  
 269 reação de lipoperoxidação, também foi elevada, estando possivelmente relacionada ao  
 270 aumento da concentração de exposição de cloridrato de metformina, bem como elevação da  
 271 atividade da SOD. Contudo, as diferenças estatísticas não foram significativas em relação ao  
 272 controle negativo ( $H=5,131$ ;  $p=0,274$ ; Fig. 2D).

### 273 3.1.3 Ação mutagênica

274 Em relação à ação mutagênica da exposição aguda de cloridrato de metformina, foi  
 275 possível verificar uma maior frequência de danos a molécula de DNA, sendo o aumento na  
 276 frequência de MN observado principalmente na concentração de 1,25 g/L do medicamento  
 277 quando comparado ao controle negativo (H=11,814; p=0,037; Fig. 2E).

278



279  
 280 Figura 2 – Medianas, intervalos interquartílicos e interpercentílicos das variáveis em *D. rerio*,  
 281 expostos a 0,25 g/L; 0,5 g/L; 0,75 g/L; 1,25 g/L de Cloridrato de Metformina e os Controles  
 282 Negativo (CN) e Positivo (CP-MMS), por 96 horas. A- SOD; B- CAT; C- GST; D- LPO; E -  
 283 frequência de micronúcleos (MN) em células sanguíneas.

284

285

### 286 3.2 Exposição crônica ao cloridrato de metformina

#### 287 3.2.1 Qualidade da água

288 Quanto à qualidade da água, foi possível verificar que ao longo do experimento não  
 289 houve diferenças estatísticas significativas de pH (F=0,989; p=0,435) e OD (H=0,534;  
 290 p=0,749) entre os tratamentos, permanecendo em valores considerados adequados para o

291 acondicionamento de *D. rerio* (Tab. 1). Contudo, foi verificada diferença estatística na  
 292 avaliação de amônia, indicando elevação significativa dos valores nos tempos de 15, 30, 45 e  
 293 60 dias de exposição ao cloridrato de metformina quando comparados com os controles  
 294 negativo e positivo (H=28,74;  $p < 0,0001$ ; Fig. 3A). Já para o nitrito, não se pode observar  
 295 resultados significativos (H=8,567;  $p = 0,127$ ; Fig. 3B), indicando a similaridade dos  
 296 tratamentos com o controle negativo.

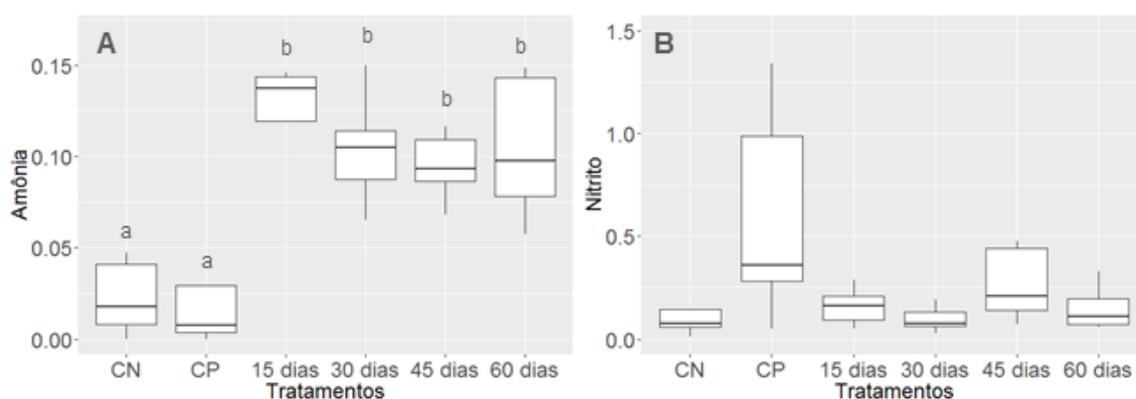
297

298 Tabela 1 – Médias e erros padrão das variáveis de qualidade da água.

Tratamentos	Ph	O2 Dissolvido (mg/L)
<b>CN</b>	7,87 ± 0,02	7,90 ± 0,10
<b>CP</b>	7,89 ± 0,02	8,12 ± 0,11
<b>15 dias</b>	7,87 ± 0,03	7,82 ± 0,32
<b>30 dias</b>	7,91 ± 0,02	7,87 ± 0,20
<b>45 dias</b>	7,90 ± 0,02	7,84 ± 0,13
<b>60 dias</b>	7,91 ± 0,01	7,91 ± 0,10
<b>p-valor</b>	0,435	0,749

299 \*CN: Controle negativo; CP: Controle positivo.

300



301

302 Figura 3 – Medianas, intervalos interquartílicos e interpercentílicos das variáveis de qualidade  
 303 de água (mg/L), em *D. rerio* expostos a 0,45 g/L de Cloridrato de Metformina e Controles  
 304 Negativo (CN) e Positivo (CP-MMS), por 60 dias. A- Amônia; B- Nitrito.

305

306

### 307 3.2.2 Comprimento e peso dos animais

308 Ao observar o comprimento total (H=42,389;  $p = 0,202$ ; Tab. 2) e padrão (H=42,803;  
 309  $p = 0,182$ ; Tab. 2) dos animais, pode-se observar que não houve diferença estatística entre os  
 310 tratamentos ( $p > 0,05$ ), para nenhuma das variáveis relacionadas a comprimento. Já em relação  
 311 a variável peso, quando comparado os tratamentos, não há diferença estatística referente a  
 312 peso inicial (H=55,813;  $p = 0,406$ ; Tab. 3) e peso final (H=46,743;  $p = 0,400$ ; Tab. 3), porém ao

313 realizar a comparação entre o peso inicial e final de todos os animais, pode-se observar uma  
314 perda de peso significativa dos mesmos ( $V=909,5$ ;  $p= 0,008$ ; Tab. 3).

315

316 Tabela 2 – Médias e erros padrão das variáveis referentes ao comprimento dos peixes em centímetro.

<b>Tratamentos</b>	<b>Comprimento total</b>	<b>Comprimento padrão</b>
<b>CN</b>	3,57 ± 0,29	2,96 ± 0,27
<b>CP</b>	3,42 ± 0,30	2,71 ± 0,22
<b>15 dias</b>	3,18 ± 0,30	2,63 ± 0,30
<b>30 dias</b>	3,37 ± 0,40	2,77 ± 0,49
<b>45 dias</b>	3,32 ± 0,66	2,72 ± 0,54
<b>60 dias</b>	3,33 ± 0,32	2,64 ± 0,31
<b>p-valor</b>	0,182	0,202

317 \*CN: Controle negativo; CP: Controle positivo.

318

319 Tabela 3 – Médias e erros padrão das variáveis referentes ao peso dos peixes em gramas.

<b>Tratamentos</b>	<b>Peso inicial</b>	<b>Peso final</b>	<b>(Peso final – Peso inicial)</b>
<b>CN</b>	0,57 ± 0,26	0,44 ± 0,11	-0,14
<b>CP</b>	0,39 ± 0,11	0,34 ± 0,06	-0,05
<b>15 dias</b>	0,35 ± 0,12	0,33 ± 0,13	-0,02
<b>30 dias</b>	0,47 ± 0,27	0,40 ± 0,22	-0,07
<b>45 dias</b>	0,42 ± 0,24	0,40 ± 0,26	-0,02
<b>60 dias</b>	0,38 ± 0,13	0,23 ± 0,07	-0,16
<b>p valor</b>	0,406	0,400	0,008

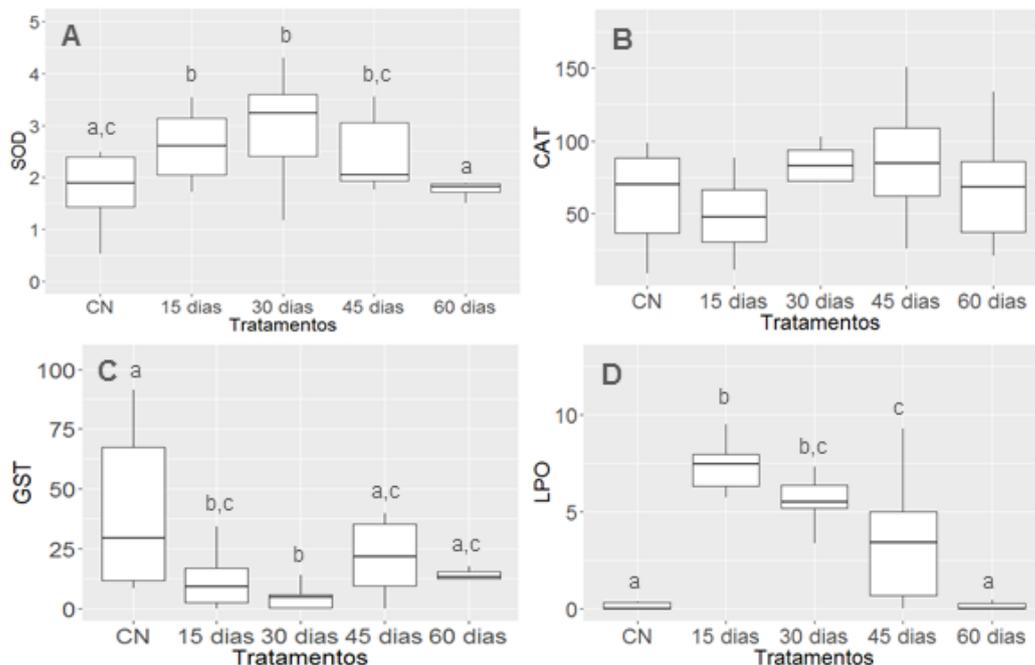
320 \*CN: Controle negativo; CP: Controle positivo.

321

### 322 3.2.3 Sistema antioxidante

323 Foi possível observar elevação significativa dos valores de atividade de SOD  
324 ( $H=12,067$ ;  $p=0,016$ ) entre os animais expostos ao cloridrato de metformina e os animais do  
325 grupo CN, por um período de 30 dias (Fig. 4A). Não foi observada diferença estatística  
326 significativa em relação à atividade de CAT, quando realizada a comparação entre os grupos  
327 ( $F=5,566$ ;  $p=0,234$ ) (Fig. 4B). Em relação à GST, foi verificada a redução significativa de sua  
328 atividade em 15 e 30 dias de exposição ao medicamento quando comparadas ao controle  
329 negativo ( $H=16,565$ ;  $p=0,002$ ; Fig. 4C). Nesta análise foi observado que a reação de LPO se  
330 manteve elevada nos três primeiros períodos de tratamento (15, 30 e 45 dias) apresentando  
331 diferenças significativas quando comparado aos valores observados em CN ( $H=29,457$ ;  
332  $p<0,0001$ ; Fig. 4D).

333

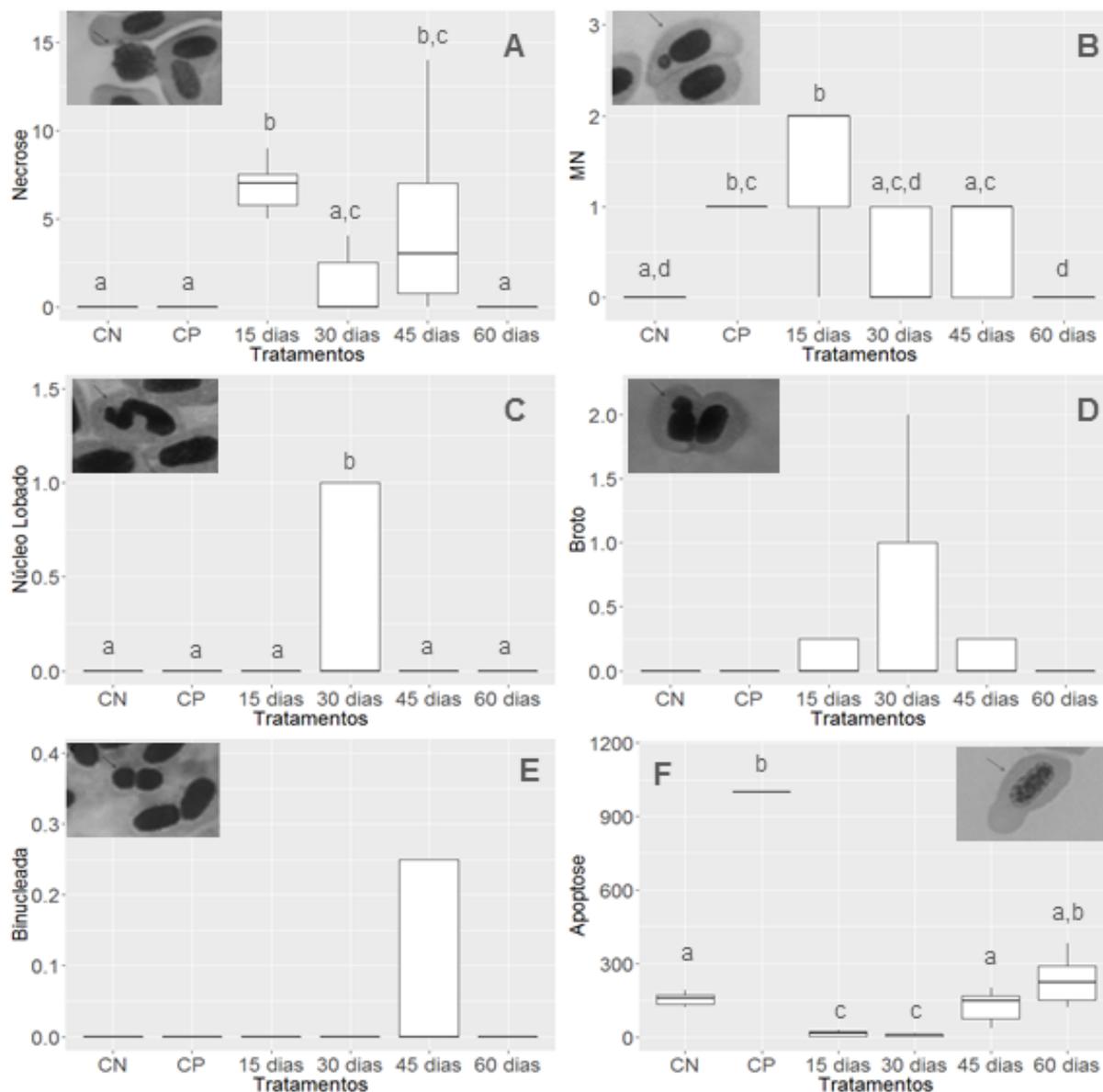


334  
 335 Figura 4 – Medianas, intervalos interquartílicos e interpercentílicos das variáveis relativas ao  
 336 sistema antioxidante analisadas em músculo de *D. rerio*, expostos a 0,45 g/L de Cloridrato de  
 337 Metformina em diferentes tempos: 15 dias; 30 dias; 45 dias; 60 dias; e o Controle Negativo  
 338 (CN). A- SOD; B- CAT; C- GST; D- LPO.

339

### 340 3.2.5 Ação mutagênica

341 Foi observado um aumento significativo no número de células em necrose  
 342 ( $H=24,505$ ;  $p<0,001$ ; Fig. 5A) e na frequência de MN ( $H=18,251$ ;  $p=0,002$ ; Fig. 5B) no  
 343 período de 15 dias em relação aos demais tratamentos, sendo estes estatisticamente diferentes  
 344 de CN. Em 30 e 45 dias de tratamento, houve mais evidências do potencial mutagênico do  
 345 cloridrato de metformina, observando-se maior frequência de anomalias celulares do tipo  
 346 núcleo lobado ( $H=12,536$ ;  $p=0,028$ ; Fig. 5C), apresentando diferenças estatísticas, em relação  
 347 ao CN, no período de 30 e 45 dias. Células com broto ( $H=5,768$ ;  $p=0,329$ ; Fig. 5D) e células  
 348 binucleadas ( $H=5,441$ ;  $p=0,364$ ; Fig. 5E) não apresentaram diferenças estatísticas  
 349 significativas. Aos 60 dias, pôde ser visto um aumento da frequência de apoptose celular em  
 350 relação aos demais grupos, porém com frequências estatisticamente iguais ao CN, diferindo-  
 351 se apenas do período de 15 e 30 dias de exposição ao medicamento ( $H=40,808$ ;  $p<0,001$ ; Fig.  
 352 5F).



353

354 Figura 5 – Medianas, intervalos interquartílicos e interpercentílicos das variáveis analisadas  
 355 em 1000 eritrócitos (Mutagenicidade) de *D. rerio* exposto a 0,45 g/L de Cloridrato de  
 356 Metformina em diferentes tempos: 15 dias; 30 dias; 45 dias; 60 dias; e os Controles Negativo  
 357 (CN) e Positivo (CP- Ciclofosfamida). A- Necrose; B- MN; C- Núcleo Lobado; D- Broto; E-  
 358 Binucleada; F- Apoptose.

359

360

#### 4. Discussão

361

362

363

364

365

Nos últimos 20 anos, o sequenciamento genômico e perfis de expressão gênica, demonstraram a correlação existente entre o *zebrafish* e mamíferos, sendo relevante e crescente a utilização de tal modelo para pesquisas toxicológicas voltadas à saúde humana (Tanguay, 2018). No intuito de observar os efeitos de doses de fármacos sobre a saúde humana, no presente estudo foram utilizadas as concentrações entre 0,25 g/L e 1,25 g/L de cloridrato de

366 metformina para testes de CL50, e posterior utilização de uma concentração subletal de 0,45  
367 g/L para avaliação de efeitos crônicos utilizando este modelo animal.

368 Uma das principais interferências em experimentos desta natureza e com espécies  
369 aquáticas está relacionada à qualidade da água. Os presentes resultados indicam que o  
370 protocolo utilizado para renovação de água foi adequado para a manutenção das variáveis pH  
371 e OD, que segundo Harper et al. (2016), cujo estudo é referente a qualidade de água específica  
372 para *zebrafish*, os valores adequados são de pH entre 6,8 e 8,5 e oxigênio dissolvido (OD)  
373 superiores a 4 mg/L. Contudo, os mesmos autores mencionaram que os valores de amônia  
374 (NH<sub>3</sub>) e nitrito (NO<sub>2</sub>) devem ser próximos a zero. Para nitrito, não foi observada nenhuma  
375 diferença quando comparados os tratamentos. Mas para amônia foi verificada a elevação  
376 quando comparada ao controle negativo, possivelmente decorrente da administração do  
377 fármaco em água. Os efeitos esperados no animal são quando há elevação dos valores de  
378 amônia são: redução da produção e absorção de glicose e acidose láctica em função da  
379 oxidação de glicose na via glicose anaeróbica (Chang et al., 2002; Bodmer et al., 2008;  
380 Lalau, 2018; Qi et al., 2018).

381 Ao longo da exposição aguda ao medicamento, observou-se a ativação do sistema  
382 antioxidante de maneira dose dependente, sendo principalmente representado pelo aumento da  
383 atividade da enzima SOD, elevação de GST, redução tênue da atividade da CAT e aumento na  
384 reação da LPO (apesar de não significativa). Os mesmos comportamentos de ativação do  
385 sistema antioxidante, bem como elevação da reação de lipoperoxidação, também foram  
386 observados no período inicial do tratamento crônico (15 e 30 dias), assim como aumento de  
387 células em estado de necrose, seguido de uma estabilização do sistema de forma similar aos  
388 espécimes do grupo controle. Em cultivo celular, durante um período de 24 a 36 horas, o  
389 cloridrato de metformina promoveu o aumento da concentração de espécies reativas ao  
390 oxigênio (EROs), o que gerou o estresse oxidativo e, por conseguinte, o efeito  
391 quimiossensibilizante deste medicamento, atenuando assim, os efeitos citotóxicos (Wandee et  
392 al., 2019), o que pode ser corroborado pelos dados apresentados no presente estudo, por meio  
393 da observação do aumento das enzimas antioxidantes e de células em necrose.

394 Outro fato que corrobora com os presentes resultados está associado à reação de  
395 lipoperoxidação. A LPO é uma das principais reações decorrentes da ativação do sistema  
396 antioxidante, sendo que o aumento dos produtos desta reação (eg. MDA) já foram observados  
397 em estudos com ratos portadores de esteatose hepática não alcoólica induzida por dieta e  
398 tratados com o cloridrato de metformina por três meses (Zamin Jr. et al., 2010). Estes autores

399 demonstraram o comportamento longitudinal das reações de lipoperoxidação, indicando a  
400 elevação em um período até 45 dias de tratamento seguido pelo decaimento em um período de  
401 60 dias, igualando-se a uma condição estável similar ao do grupo controle. A redução da  
402 reação de LPO observada corrobora também com os dados apresentados por Bojkova et al.  
403 (2009), na qual ratos com indução de carcinomas mamários foram tratados com metformina  
404 durante 18 semanas. Vale ressaltar que Zamin Jr. et al. (2010) e Bojkova et al. (2009)  
405 demonstraram a perda de peso corporal associada ao uso de metformina quando comparados  
406 aos controles, assim como também apresentado no presente estudo.

407         As reações de LPO são um dos principais mecanismos de lesão celular relativo ao  
408 estresse oxidativo. De acordo com Ji e Fu (1992), a elevação da reação de LPO está associada  
409 ao aumento de atividade das enzimas SOD e CAT. Em nossos resultados, pudemos observar,  
410 um aumento da atividade da SOD dose dependente no experimento agudo, bem como uma  
411 elevação da mesma até o período de 30 dias, sendo diretamente relacionada à reação de LPO.  
412 A SOD é a primeira enzima do sistema antioxidante, geralmente encontrada em quantidades  
413 elevadas nas células de mamíferos e agindo como uma das primeiras nas reações de defesa do  
414 organismo (Schneider; Oliveira, 2004; Ighodaro; Akinloye, 2018). O aumento da atividade da  
415 SOD descrito em nosso estudo, com peixes *D. rerio* tratados com metformina por até 30 dias,  
416 também foi descrito em um experimento realizado com ratos diabéticos, na qual a metformina  
417 era administrada uma vez ao dia, durante 28 dias (Zubaidah et al., 2018). Zou et al. (2004)  
418 também demonstraram a maior expressão de proteínas responsáveis pela expressão da enzima  
419 SOD em camundongos tratados por três dias com metformina.

420         No presente estudo foi observada uma tênue elevação da atividade da CAT em  
421 concentrações de 0,5 g/L em exposição aguda, com posterior redução, assemelhando-se a  
422 atividade enzimática observada no controle negativo. Apesar do presente resultado ser pouco  
423 conclusivo, parece que tal contradição também é apresentada na literatura específica sobre o  
424 assunto. Em um estudo realizado por Kurhaluk et al. (2018), em um modelo de carcinogênese  
425 mamária com dieta rica em gordura em ratos, com administração de cloridrato de metformina  
426 12 dias antes e 16 dias após a aplicação do carcinógeno, o medicamento foi capaz de diminuir  
427 os níveis de estresse oxidativo. Já em um estudo *in vitro* realizado por De Queiroz et al.  
428 (2015), em células cancerosas MCF-7 tratadas com cloridrato de metformina por até 72 horas,  
429 relataram a ativação do sistema antioxidante (SOD e CAT), juntamente com parada do ciclo  
430 celular e apoptose, corroborando com os resultados do presente estudo.

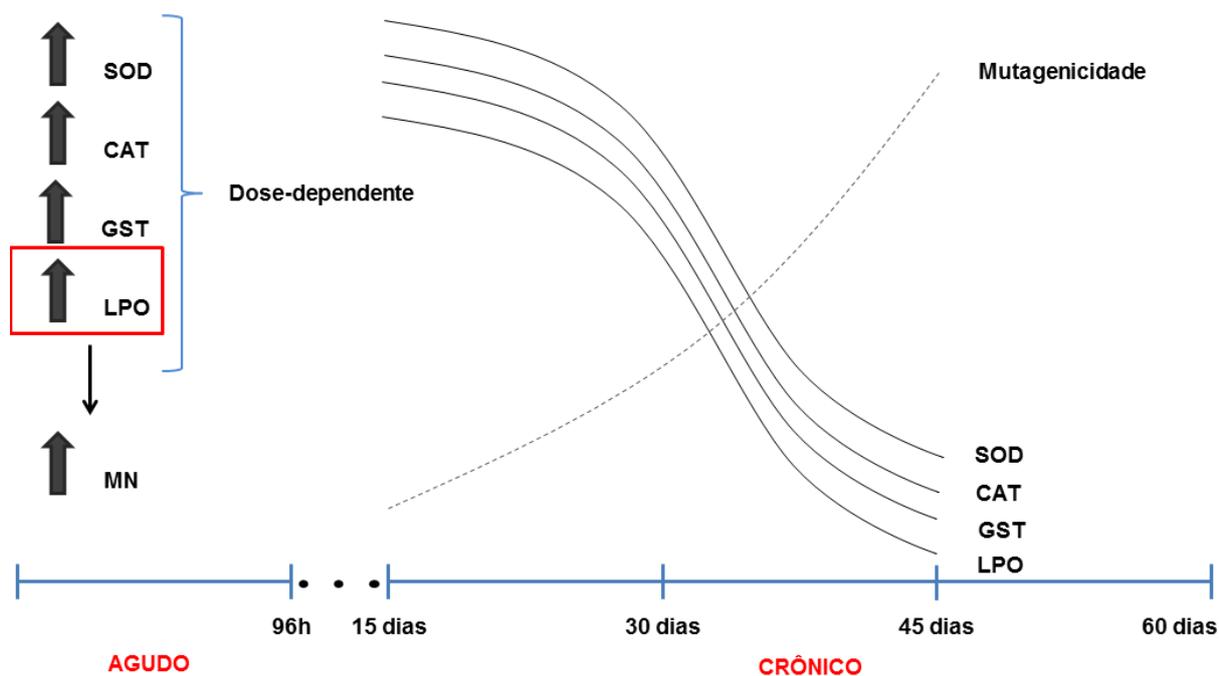
431 Ainda em avaliação do sistema antioxidante, foi observado um aumento gradual de  
432 GST, em função das doses administradas em período agudo. Sua atividade manteve-se  
433 elevada no período crônico de 45 dias, já quando SOD e CAT começavam a apresentar queda  
434 de sua atividade. Tal fato pode ter resultado em uma consequente diminuição da reação de  
435 lipoperoxidação e das taxas de mutação celular, após 45 dias devido à queda de compostos  
436 considerados tóxicos a célula, desempenhando seu papel de detoxificação a exposição de  
437 xenobióticos (Van der oost et al., 2003). Em um estudo realizado com ratos diabéticos, na  
438 qual eram administrados 100 mg/kg de cloridrato de metformina por dia, em 30 dias, houve  
439 um aumento significativo da atividade de GST, quando comparados aos ratos controle  
440 diabéticos (Tripathi; Chandra, 2009). Há relatos do aumento significativo da atividade de  
441 GST quando peixes são expostos a sedimentos coletados de locais poluídos ou de peixes  
442 presentes em locais impactados (Almeida et al., 2005; Camargo; Martinez, 2006), porém de  
443 acordo com Gallagher et al. (2001), a atividade de GST aumentada pode estar associada a um  
444 processo adaptativo à presença de compostos xenobióticos.

445 Possivelmente, a presença do cloridrato de metformina pode ter sido capaz de induzir  
446 a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, como mencionado por Wandee  
447 et al. (2019). As EROs são produzidas naturalmente pelo organismo, muitas vezes sendo  
448 necessárias para que ocorra a ativação do sistema imunológico, mas também se elevando em  
449 situações de intoxicações com drogas (Schneider; Oliveira, 2004). As EROs possuem alta  
450 reatividade por outras biomoléculas, principalmente lipídios e proteínas de membranas, sendo  
451 o principal mecanismo de lesão do estresse oxidativo. Além de gerar diversos danos a  
452 proteínas e ao DNA, o mecanismo de estresse oxidativo desestabiliza a membrana celular e  
453 sua permeabilidade, dando acesso de moléculas reativas à dupla fita (Schneider; Oliveira,  
454 2004; Ighodaro; Akinloye, 2018). Tal fato, permite, a interpretação sobre nossos resultados de  
455 que o aumento na frequência de mutações celulares, observado principalmente na exposição  
456 aguda da concentração mais elevada de cloridrato de metformina (1,25 g/L), bem como nos  
457 períodos iniciais do experimento crônico (15 dias), pode estar associado ao aumento de  
458 reações de lipoperoxidação. Além disso, o aumento de estresse oxidativo pode também elevar  
459 as concentrações de  $Ca^{+2}$  intracelular, aumentando o número de endonucleases, o que causa,  
460 consequentemente, um aumento ainda maior das quebras de fitas de DNA, o que pode ser  
461 observado pelo aumento do número de MN e/ou aberrações cromossômicas (Peres, 1994;  
462 Barreiros et al., 2006; Ferreira et al., 2011). Wandee et al. (2019) afirma ainda, que o aumento  
463 de EROs e a sobrecarga de  $Ca^{2+}$ , desencadeado pelo aumento do estresse oxidativo, causa

464 uma desregulação do sistema redox de GSH e, conseqüentemente, uma disfunção  
 465 mitocondrial, resultando assim, no aumento de morte celular programada, quando comparados  
 466 aos grupos controles.

467 Entretanto aos 60 dias, observa-se uma redução de todos os parâmetros antioxidantes,  
 468 juntamente com a redução de mutações celulares e da reação de lipoperoxidação, indicando,  
 469 possivelmente, uma redução no número de EROS e radicais livres, possuindo uma taxa mais  
 470 elevada, apenas de células em apoptose. Sendo assim, no período de 60 dias, já pode ser  
 471 notada uma estabilidade no metabolismo celular do animal, igualando-se aos animais do  
 472 grupo controle negativo. Os dados aqui apresentados corroboram a discussão de um efeito de  
 473 adaptação fisiológica dos organismos tratados com cloridrato de metformina, apresentada por  
 474 Martin-Montalvo et al. (2013). Neste estudo relata-se a redução do estresse oxidativo e o  
 475 aumento das defesas antioxidantes em modelos *in vivo* em longo prazo, contudo sem  
 476 compreenderem os processos exatos e, portanto, encorajam a realização de estudos sobre este  
 477 tema. Em síntese, podemos propor o seguinte comportamento em seres tratados com 0.45 g/L  
 478 de cloridrato de metformina (Fig. 6).

479



480

481 Figura 6 – Esquema do comportamento do sistema antioxidante e potencial mutagênico nos  
 482 experimentos agudo (96h) e crônico (60 dias).

483

484 Acredita-se que os dados aqui obtidos, apresentaram uma resposta de adaptação no  
 485 metabolismo celular a curto e médio prazo em organismos tratados com cloridrato de

486 metformina. Porém, o presente estudo ainda levanta a questão sobre até que ponto essa  
487 adaptação decorrente do tratamento não seria prejudicial aos organismos saudáveis. O  
488 excesso deste princípio químico pode promover um efeito deletério tanto à saúde humana  
489 como a saúde ambiental, uma vez que este medicamento é permanentemente encontrado em  
490 dejetos, não sendo passível de remoção durante o tratamento de esgoto e sendo descartado  
491 diretamente em ambientes aquáticos (Jorge, 2011; Trautwein; Kümmerer, 2011; Scheurer et  
492 al., 2012).

493 Com isso, infere-se que novos estudos de experimentos crônicos *in vivo*, testando tais  
494 fatos devem ser realizados, em especial no que remete a ativação gênica das enzimas do  
495 sistema antioxidante. A obtenção destas respostas, tanto para avaliação do efeito do cloridrato  
496 de metformina quanto para qualquer outro medicamento recomendado para o uso do diabetes  
497 e ovário policístico, em especial em pequenas doses também encontradas no ambiente, pode  
498 ser a garantia de manutenção da qualidade da saúde humana e da saúde ambiental.

499

## 500 **5. Conclusão**

501 Com isso, conclui-se que o cloridrato de metformina foi capaz de ativar o sistema  
502 antioxidante nos períodos iniciais do tratamento, desencadeando reações como a de  
503 lipoperoxidação, a médio prazo, e danos mutagênicos, como o aumento de MN e aberrações  
504 cromossômicas, além do aparecimento de morte celular. Porém, tais danos foram evidentes  
505 apenas nos primeiros 45 dias de tratamento, retornando as condições normais da célula,  
506 quando comparados ao controle negativo. Sugerindo um processo de adaptação fisiológica ao  
507 uso do medicamento, porém incentivando a realização de novos experimentos *in vivo* de  
508 longo prazo, que possam garantir a segurança do mesmo.

509

## 510 **Referências**

511

512 Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. In *Methods in enzymology*. 105, 121-126.

513 Almeida, J.S., Meletti, P.C., Martinez, C.B.R., 2005. Acute effects of sediments taken from  
514 an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish  
515 *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 140, 356-363.

516 Barreiros, A.L.B.S., David, J. M., David, J.P.D.L., 2006. Estresse oxidativo: relação entre  
517 geração de espécies reativas e defesa do organismo, 29(1), 113-123.

- 518 Bodmer, M., et al., 2008. Metformin, sulfonylureas or other antidiabetic drugs and the risk of  
519 lactic acidosis or hypoglycemia: a nested case-control analysis. *Diabetes care*, 31(11), 2086-  
520 2091.
- 521 Bojkova, B. et al., 2009. Metformin in chemically-induced mammary carcinogenesis in  
522 rats. *Neoplasma*, 56(3), 269-274.
- 523 Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram  
524 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical*  
525 *biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- 526 Bradley, P.M. et al., 2016. Metformin and other pharmaceuticals widespread in wadeable  
527 streams of the southeastern United States. *Environmental Science & Technology Letters*, 3(6),  
528 243-249.
- 529 Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology*, 52,  
530 302-310.
- 531 Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R., 2006. Biochemical and physiological biomarkers in  
532 *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environ.*  
533 *Toxicol. Pharmacol*, 21, 61-69.
- 534 Chang, C.T. et al., 2002. Metformin-associated lactic acidosis: case reports and literature  
535 review. *Journal of nephrology*, 15(4), 398-402.
- 536 Cheeseman, K.H., 1993. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Molecular Aspects of*  
537 *Medicine*, 14(3), 191-197.
- 538 Crouch, R.K. et al., 1981. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic  
539 drugs. *Diabetes*, 30(3), 235-241.
- 540 Czarny, P. et al., 2018. The interplay between inflammation, oxidative stress, DNA damage,  
541 DNA repair and mitochondrial dysfunction in depression. *Progress in Neuro-*  
542 *Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 80, 309–321.
- 543 De Pinho, J.J.R.G., Storpirtis, S., 2001. Estudo comparativo “in vitro” das propriedades  
544 biofarmacotécnicas de comprimidos de cloridrato de metformina comercializados no  
545 Brasil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(1), 95-105.
- 546 De Queiroz, E.A., 2015. Metformin reduces the Walker-256 tumor development in obese-  
547 MSG rats via AMPK and FOXO3a. *Life sciences*, 121, 78-87.
- 548 Faßbender, C., Braunbeck, T., 2013. Reproductive and genotoxic effects in zebrafish after  
549 chronic exposure to methyl methanesulfonate in a multigeneration  
550 study. *Ecotoxicology*, 22(5), 825-837.

- 551 Fayh, A.P.T. et al., 2018. Induction chemotherapy reduces extracellular heat shock protein 72  
552 levels, inflammation, lipoperoxidation and changes insulin sensitivity in children and  
553 adolescents newly diagnosed with acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*, 9(47), 28784-  
554 28795.
- 555 Ferreira, A.L.A., 2011. Síndrome metabólica: atualização de critérios diagnósticos e impacto  
556 do estresse oxidativo na patogênese. *Rev Bras Clin Med*, 9(1), 54-61.
- 557 Gallagher, E.P., Gross, T.S., Sheehy, K.M., 2001. Decreased glutathione S-transferase  
558 expression and activity and altered sex steroids in lake Apopka brown bullheads (*Ameiurus*  
559 *nebulosus*). *Aquat. Toxicol.*, 55, 223-237.
- 560 Gerlai, R. et al., 2000. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model  
561 to study alcohol effects. *Pharmacology biochemistry and behavior*, 67(4), 773-782.
- 562 Gokce, B., Musmula, O., Ucuncu, S.İ., 2016. Assessment of Genotoxicity of Methyl  
563 Parathion in Zebrafish by Use of the Micronucleus Test. *International Journal of New*  
564 *Technology and Research*, 2(5), 49-51.
- 565 Gotelli, N.J., Ellison, A.M., 2011. *Princípios de estatística em ecologia*. Porto Alegre:  
566 Artmed, pp. 528.
- 567 Guimarães, F.P.D.M., Takayanagui, A.M.M., 2002. Orientações recebidas do serviço de  
568 saúde por pacientes para o tratamento do portador de diabetes mellitus tipo 2. *Revista de*  
569 *Nutrição*, 15(1), 37-44.
- 570 Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases the first enzymatic  
571 step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- 572 Harper, C., Lawrence, C., 2016. *The laboratory zebrafish*. Crc Press.
- 573 Honczaryk, A., Inoue, L.A.K.A., 2009. Anesthesia in pirarucu by eugenol sprays in the  
574 gills. *Ciência Rural*, 39(2), 577-579.
- 575 Hooftman, R.N., De Raat, W.K., 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the  
576 peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl  
577 methanesulphonate. *Mutation Research Letters*, 104(1-3), 147-152.
- 578 Ighodaro, O.M., Akinloye, O.A., 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase  
579 (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the  
580 entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287-293.
- 581 Ji LL., Fu R., 1992. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive  
582 exercise and hydroperoxide. *J Appl Physiol*, 72, 549-554.
- 583 Jorge, W.S.J., 2011. Descarte de medicamentos. *Pharmacia Brasileira*, 82(82), 14-16.

- 584 Kari, G., Rodeck, U., Dicker, A.P., 2007. Zebrafish: an emerging model system for human  
585 disease and drug discovery. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 82(1), 70-80.
- 586 Korolkovas, A., 1995. *Dicionário Terapêutico*. Rio de Janeiro: Guanabara. pp.12.01-12.27
- 587 Kurhaluk, N., Bojková, B., Winklewski, P.J., 2018. Liver antioxidant and aerobic status  
588 improves after metformin and melatonin administration in a rat model of high-fat diet and  
589 mammary carcinogenesis. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 96(8), 790-797.
- 590 Lalau, J-D., 2018. Metformin and Lactic Acidosis. *Mitochondrial Dysfunction Caused by*  
591 *Drugs and Environmental Toxicants*, 37, 559-561.
- 592 Martin-Montalvo, A. et al., 2013. Metformin improves healthspan and lifespan in  
593 mice. *Nature communications*, 4, 2192-2201.
- 594 Martinez, C.B.R. (2006). *Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da*  
595 *água. Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil*. Maringá: ABRAPOA, 43-62.
- 596 Peres, W. 1994. *Radicais Livres em níveis biológicos*. Ed. Educat: Pelotas. pp. 86.
- 597 Qi, H. et al., 2018. Acute renal metabolic effect of metformin assessed with hyperpolarised  
598 MRI in rats. *Diabetologia*, 61(2), 445-454.
- 599 Saliu, J.A. et al., 2016. Effect of dietary supplementation of Padauk (*Pterocarpus soyauxii*)  
600 leaf on high fat diet/streptozotocin induced diabetes in rats' brain and platelets. *Biomedicine*  
601 *& Pharmacotherapy*, 84, 1194-1201.
- 602 Samet, J.M., Wages, P.A., 2018. Oxidative stress from environmental exposures. *Current*  
603 *Opinion in Toxicology*, 7, 60–66.
- 604 Schneider, C.D., Oliveira, Á.R.D., 2004. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos  
605 de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*.  
606 São Paulo, BR. 10(4), 308-313.
- 607 Scheurer, M. et al., 2012. Occurrence and fate of the antidiabetic drug metformin and its  
608 metabolite guanyurea in the environment and during drinking water treatment. *Water*  
609 *research*, 46(15), 4790-4802.
- 610 Sena, P. et al., 2018. Metformin Induces Apoptosis and Alters Cellular Responses to  
611 Oxidative Stress in Ht29 Colon Cancer Cells: Preliminary Findings. *International journal of*  
612 *molecular sciences*, 19(5), 1478-1494.
- 613 Tanguay, R.L., 2018. The Rise of Zebrafish as a Model for Toxicology. *Toxicological*  
614 *Sciences*, 163(1), 3-4.
- 615 Tincani, F.H. et al., 2017. Pseudoreplicação e uso de biomarcadores em bioensaios  
616 ecotoxicológicos. *Environmental toxicology and chemistry* , 36(10), 2868-2874.

- 617 Torquata Trovó, K.A.M.I.L.A., Tiyo, R., 2014. Uso de metformina no tratamento da  
618 infertilidade em mulheres que apresentam síndrome dos ovários policísticos. *Uningá*  
619 *Review*, 20(2), 43-47.
- 620 Trautwein, C., Kümmerer, K., 2011. Incomplete aerobic degradation of the antidiabetic drug  
621 Metformin and identification of the bacterial dead-end transformation product  
622 Guanylurea. *Chemosphere*, 85(5), 765-773.
- 623 Tripathi, U.N., Chandra, D., 2009. Diabetes induced oxidative stress: A comparative study on  
624 protective role of *Momordica charantia* and metformin. *Pharmacognosy Research*, 1(5), 299-  
625 306.
- 626 U.S.Epa. Highlights of the Exposure Factors Handbook (Final Report). U.S. Environmental  
627 Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/R-10/030, 2011.
- 628 Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers  
629 in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13, 149-157.
- 630 Wandee, J. et al., 2019. Metformin sensitizes cholangiocarcinoma cell to cisplatin-induced  
631 cytotoxicity through oxidative stress mediated mitochondrial pathway. *Life sciences*, 217,  
632 155-163.
- 633 Witters, L.A., 2001. The blooming of the French lilac. *The Journal of clinical*  
634 *investigation*, 108(8), 1105-1107.
- 635 Zamin Jr, I. et al., 2010. The vitamin E reduces liver lipoperoxidation and fibrosis in a model  
636 of nonalcoholic steatohepatitis. *Arquivos de gastroenterologia*, 47(1), 86-92.
- 637 Zou, M.H. et al., 2004. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic  
638 drug metformin in vivo: role of mitochondrial reactive nitrogen species. *Journal of Biological*  
639 *Chemistry*, 279, 43940-43951.
- 640 Zubaidah, E. et al., 2018. Comparison of in vivo antidiabetes activity of snake fruit  
641 Kombucha, black tea Kombucha and metformin. *Biocatalysis and Agricultural*  
642 *Biotechnology*, 17, 465-469.

## ANEXOS

### Anexo 1- Parecer comitê de ética.



#### Autorização

O protocolo intitulado "Efeitos do cloridrato de metformina sobre os sistemas antioxidante e colinérgico, e ação genotóxica em *Danio rerio* (Cypriniformes: Cyprinidae)", sob a responsabilidade de **Luciana Paula Grégio d'Arce Rodrigues** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 22/09/2017.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/10/2017 - 23/01/2019
Espécie/instituição	Peixe: <i>Danio rerio</i>
N. de animais	120
Peso/dose	1g/Adulto
Sexo	Não identificado
Origem	Criadouros particulares da cidade de Cascavel-PR.

Cascavel, 26/09/2017

**Prof. Dr. Dirceu Baumgartner**  
Vice Coordenador do CEUA  
Portaria nº 3730/2016 - GRE