



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PATRÍCIA DE ALBUQUERQUE SARMENTO

Avaliação da atividade antidiabética e/ou inibidora sobre os produtos finais da glicação avançada de derivados aminoguanidínicos em ratos diabéticos

MACEIÓ- AL
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PATRÍCIA DE ALBUQUERQUE SARMENTO

Avaliação da atividade antidiabética e/ou inibidora sobre os produtos finais da glicação avançada de derivados aminoguanidínicos em ratos diabéticos

Tese apresentada ao Programa de Pós graduação em Biotecnologia, da Rede Nordeste de Biotecnologia, ponto focal Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior.

MACEIÓ - AL
2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

S246a Sarmento, Patrícia de Albuquerque.
Avaliação da atividade antidiabética e/ou inibidora sobre os produtos finais da glicação avançada de derivados aminoguanidínicos em ratos diabéticos / Patrícia de Albuquerque Sarmento. - 2016
85 f. : il. tabs., graf.

Orientador: João Xavier de Araújo Júnior.
Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2016.

Bibliografia: f. 72-79.
Anexo: f.80-83

1. Aminoguanidina. 2. Diabetes. 3. Antiglicante. 5. Produtos de glicação avançada. I. Título.

CDU: 547.495.9:616.379-008.64

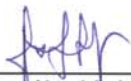
PATRÍCIA DE ALBUQUERQUE SARMENTO

“Avaliação da Atividade Antidiabética e/ou Inibidora Sobre os Produtos Finais da Glicação Avançada de Derivados Aminoguanidínicos em Ratos Diabéticos.”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 22/03/2016.

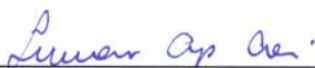
BANCA EXAMINADORA



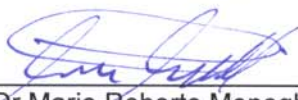
Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior - (Orientador/Presidente),
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Profª. Drª Éurica Adélia Nogueira Ribeiro
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Profª. Drª. Luciana Aparecida Cora
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas - UNCISAL



Prof. Dr Mario Roberto Meneghetti
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

DEDICATÓRIA

À minha família, sentido da minha luta diária.

AGRADECIMENTO

A Deus e a Nossa Senhora por me encherem de ricas bênçãos todos os dias.

À Universidade Federal de Alagoas pelo incentivo a qualificação técnica e docente e ao programa de Pós- Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia pela oportunidade de realização deste doutorado.

Ao professor João Xavier de Araújo Júnior, meu orientador, meu respeito, admiração e gratidão.

À professora Elita Scio Fontes e a todos do Laboratório de Recursos naturais, da Universidade Federal de Juiz de Fora, pelos ensinamentos e colaboração no trabalho.

À Danielle Aragão e a todas as estudantes de Juiz de Fora que se envolveram nesta pesquisa, pela paciência e carinho comigo e pelo empenho e dedicação durante a realização dos experimentos e cuidados com os animais, agradeço muito.

Aos meus pais, Enedino e Nilza e aos meus familiares pelo incentivo e apoio na busca dos meus ideais.

À minha avó, Joana (in memoriam) por ter investido em mim no início da minha vida acadêmica.

Às minhas filhas Anna Lara, hoje com 9 anos e que há 7 anos tem uma mãe que faz mestrado ou doutorado e Clarissa que nasceu há exatos 48 meses, pela inocência, bondade e paciência que tiveram comigo nos momentos de maior tensão.

Ao meu esposo Felipe pelo incentivo na busca do meu doutoramento.

Às minhas colegas de trabalho peço desculpas pelas ausências e agradeço a todas por sempre me incentivarem e entenderem este momento.

Às pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo.

Ao CNPq e a UFAL pelo incentivo financeiro para a realização desta pesquisa.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”. (George Bernard Shaw)

RESUMO

O diabetes leva a complicações vasculares provenientes de alterações bioquímicas geradas a partir do acúmulo dos produtos finais da glicação avançada (AGEs). A aminoguanidina é um anti-AGE em estudos clínicos de fase III, porém seu uso crônico pode levar à nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. Por isso, modificações estruturais foram realizadas na molécula da aminoguanidina, originando dezenove derivados, os quais foram avaliados para a sua ação antidiabética e/ou antiglicante em ratos diabéticos. Para tanto, realizou-se inicialmente o teste de citotoxicidade in vitro pelo ensaio colorimétrico com MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenilterazolium], em macrófagos da linhagem J774A.1. Para avaliação da atividade antiglicante, os AGEs foram produzidos in vitro a partir da junção de glicose com albumina sérica bovina (BSA). Os derivados com melhor resposta in vitro foram submetidos a testes de toxicidade aguda in vivo com concentrações de 2 mg / Kg, 10 mg /Kg e 100 mg /Kg p.o. e, posteriormente, verificou-se o potencial antidiabético e antiglicante em ratos Wistar com diabetes induzida por estreptozotocina (20 mg /kg, i.p.). Após eutanásia, foram retirados coração, rim e fígado dos animais para exames histopatológicos e o sangue para realização do hemograma e dosagens bioquímicas. Os resultados obtidos com o ensaio MTT indicaram que, dezessete dos dezenove derivados, não mostraram qualquer efeito tóxico na concentração de 10 µM, ou seja mantiveram 80% ou mais de células viáveis. No ensaio para atividade antiglicante in vitro, treze desses dezenove derivados conseguiram um percentual acima de 50 % de inibição na formação de produtos finais da glicação avançada na concentração de 2 mg/mL, sendo significativos quando comparados a aminoguanidina, na mesma concentração. Numa escala de doses, de 0,5 a 2,5 mg /mL, com leitura dos percentuais de inibição a cada sete dias por 49 dias, o derivado LQM 13 atingiu até 94,6% de inibição, enquanto que a aminoguanidina inibiu até 74% de AGEs, na concentração de 1,0 mg/mL. Nos estudos in vivo os derivados LQM 3, LQM 13 e LQM 15 não foram tóxicos, ou seja, os animais não perderam peso, nem apresentaram alterações comportamentais, nem bioquímicas ou histológicas que pudessem ser atribuídas ao uso dos derivados. Nos testes para atividade antidiabética e antiglicante, esses três derivados conseguiram reduzir os valores de glicemia em até 65%, sendo significativos quando comparados com a glimepirida (2 mg/kg, p.o.), droga padrão utilizada. Além disso, os níveis de frutossamina e hemoglobina glicada se mantiveram baixos nos grupos tratados com os derivados. A partir disso, foi possível concluir que os derivados estudados apresentam baixa citotoxicidade, têm potencial antiglicante para AGEs-BSA, não foram tóxicos nas concentrações utilizadas e podem reduzir a glicemia e os níveis de frutossamina e hemoglobina glicada em ratos diabéticos. Portanto, estes representam protótipos de fármacos promissores, para que no futuro seja possível ter um produto capaz de reduzir os índices glicêmicos e, ao mesmo tempo ter ação antiglicante, protegendo os indivíduos das complicações macro e microvasculares do diabetes.

Palavras-chaves: aminoguanidina; diabetes; antiglicante; produtos finais da glicação avançada.

ABSTRACT

Diabetes leads to vascular complications arising from biochemical changes generated by accumulation of advanced glycation end-products (AGEs). Aminoguanidine is an anti-AGE in clinical phase III studies, but its chronic use can lead to nephrotoxicity and hepatotoxicity. For this reason, structural changes were made in the aminoguanidine molecule, originating nineteen derivatives, with which were evaluated for their antidiabetic and / or antiglycation effects in diabetic rats. For this purpose, initially was performed the in vitro cytotoxicity assay using the colorimetric assay with MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5 difenilterazolium] in the J774A.1 macrophage cell line. To evaluate the antiglycation activity, AGEs were produced in vitro by combining glucose with bovine serum albumin (BSA). The derivatives with the best outcome in vitro were submitted to acute toxicity tests in vivo at concentrations of 2 mg/kg, 10 mg/kg and 100 mg/kg oral administration and, thereafter the antidiabetic and antiglycation potential were checked in Wistar rats with diabetes induced by streptozotocin (20 mg/kg, i.p.). After euthanasia, heart, kidney and liver were extracted from the animals and submitted to histopathological examination and blood for hemogram and biochemical tests. The outcomes obtained from MTT assay indicated that seventeen out of the nineteen derivatives did not show any toxic effect at the concentration of 10 μ M, which means they kept 80% or more of viable cells. In antiglycation assay for in vitro activity, thirteen of these nineteen derivatives got above 50% of inhibition in the formation of advanced glycation end products in a concentration of 2 mg/ml, and significant when compared to aminoguanidine at the same concentration. In a dose range from 0.5 to 2.5 mg/m, with the reading of inhibition percentage every seven days for 49 days, the derivative LQM 13 reached 94.6% of inhibition, while aminoguanidine inhibited up to 74% of AGEs, at concentration of 1.0 mg/ml. In studies in vivo the derivatives LQM 3, LQM 13 and LQM 15 were non-toxic, that means that the rats did not lose weight, neither showed behavioral, biochemical nor histological changes that could have been related to the use of derivatives. In tests for antidiabetic and antiglycation activity, these three derivatives were able to reduce blood glucose levels by up to 65%, being significant when compared to glimepiride (2 mg/kg, oral administration), the standard drug used. Furthermore, the levels of fructosamine and glycated hemoglobin remained lower in the groups treated with the derivatives. Based on that, it was possible to conclude that the derivatives studied have low cytotoxicity, have the antiglycation potential to AGEs-BSA, they were non-toxic at the concentrations used and can reduce blood glucose, fructosamine levels and glycated hemoglobin in diabetic rats. Thus, they represent promising prototype of drugs, enabling the possibility of having in the future a product capable of reducing glycemia and at the same time having antiglycation action, protecting individuals from macro and microvascular complications of diabetes.

Key words: aminoguanidine; diabetes; antiglycation; advanced glycation end-products.

RESUMEN

La diabetes provoca complicaciones vasculares provenientes de alteraciones bioquímicas generadas a partir de la acumulación de los productos finales de la glicación avanzada (AGEs). La aminoguanidina es un anti-AGE en estudios clínicos de fase III, sin embargo su uso crónico puede conducir a la nefrotoxicidad y hepatotoxicidad. Por eso, modificaciones estructurales fueron realizadas en la molécula de la aminoguanidina, originando diecinueve derivados, con los cuales fueron evaluados su acción antidiabética y/o antiglucemiante en ratas diabéticas. Para tal, se realizó inicialmente la prueba de citotoxicidad in vitro a través del ensayo colorimétrico con MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio], que es un macrófago de linaje J774A.1. Para evaluación de la actividad antiglucemiante, los AGEs fueron producidos in vitro a partir de la unión de glucosa con albumina sérica bovina (BSA). Los derivados con mejor respuesta in vitro fueron sometidos a pruebas de toxicidad aguda in vivo con concentraciones de 2 mg/Kg, 10 mg/Kg y 100 mg/Kg p.o. y, posteriormente, se verificó el potencial antidiabético y antiglucemiante en ratas Wistar con diabetes inducida por estreptozotocina (20 mg/kg, i.intrap.). Después de la eutanasia, fueron retirados el corazón, el riñón y el hígado, de las ratas para hacer exámenes histopatológicos, y la sangre para hacer el hemograma y las dosificaciones bioquímicas. Los resultados obtenidos con el ensayo MTT indicaron que, diecisiete de los diecinueve derivados, no mostraron ningún efecto tóxico en la concentración de 10 μ M, o sea mantuvieron 80% o más de células viables. En el ensayo para actividad antiglucemiante in vitro, trece de los diecinueve derivados consiguieron un porcentaje arriba de 50 % de inhibición en la formación de productos finales de la glicación avanzada en la concentración de 2 mg/mL, siendo significativos cuando comparados a la aminoguanidina, en la misma concentración. En una escala de dosificación, de 0,5 a 2,5 mg/mL, con lectura de los porcentajes de inhibición a cada siete días durante 49 días, el derivado LQM 13 alcanzó hasta 94,6% de inhibición, en cuanto que la aminoguanidina inhibió hasta 74% de AGEs, en la concentración de 1,0 mg/mL. En los estudios in vivo los derivados LQM 3, LQM 13 y LQM 15 no fueron tóxicos, o sea, las ratas no perdieron peso, ni presentaron alteraciones de comportamiento, tampoco bioquímicas o histológicas que pudiesen ser atribuidas al uso de los derivados. En las pruebas para actividad antidiabética y antiglucemiante, esos tres derivados consiguieron reducir los valores de glucemia en hasta 65%, siendo significativos cuando comparados con la glimepirida (2 mg/kg, p.o), que es la droga estándar utilizada. Además de eso, los niveles de fructosamina y hemoglobina glucosilada se mantuvieron bajos en los grupos tratados con los derivados. A partir de eso, fue posible concluir que los derivados estudiados presentan baja citotoxicidad, tienen potencial antiglucemiante para AGEs-BSA, no fueron tóxicos en las concentraciones utilizadas y pueden reducir la glucemia y los niveles de fructosamina y hemoglobina glucosilada en ratas diabéticas. Por tanto, estos son prometedores prototipos de fármacos, con los cuales en el futuro será posible obtener un producto capaz de reducir los índices glucémicos y, al mismo tiempo obtener una acción antiglucemiante, protegiendo a los individuos de las complicaciones macro y micro vasculares de la diabetes.

Palabras clave: aminoguanidina; diabetes; antiglucemiante; productos finales de la glicación avanzada.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição do número de pessoas entre 20 e 79 anos vivendo sem o diagnóstico do diabetes_____	16
Figura 2 – Critérios definidos pela Organização Mundial da Saúde, Associação Americana de Diabetes e Sociedade brasileira do Diabetes para diagnóstico do Diabete Mellitus_____	19
Figura 3 – Formação dos AGEs - Reação de Maillard_____	22
Figura 4 - Efeito de AGEs em diferentes sistemas e órgãos_____	24
Figura 5 – Medicamentos orais para o tratamento do Diabetes Mellitus tipo II_____	26
Figura 6 – Estrutura química da Glimepirida_____	27
Figura 7 – Estrutura molecular da aminoguanidina_____	28
Figura 8 - Etapas de realização da pesquisa_____	32
Figura 9 - Retrossíntese do esqueleto base das guanilhidrazonas e das tiossemicarbazonas_____	33
Figura 10 - Etapas da avaliação da atividade antidiabética e antiglicante in vivo_____	37
Figura 11 – Avaliação dos derivados aminoguanidínicos nas concentrações de 10µM, 100 µM e 1000 µM, na redução da viabilidade celular em macrófagos da linhagem J774, pelo ensaio colorimétrico com MTT_____	44
Figura 12 – Inibição da formação de AGEs formados de Glicose – BSA, pelos derivados aminoguanidínicos e seus controles na concentração de 2,0 mg/mL com leitura de 48 horas_____	46
Figura 13 – Inibição da formação de AGEs formados de Glicose – BSA, pelos derivados aminoguanidínicos LQM 3, LQM 13 e LQM 15, nas concentrações de 0,5 mg/mL (A), 1,0 mg/mL (B), 1,5 mg/mL (C), 2,0 mg/mL (D) e 2,5 mg/mL (E) pelo período de 49 dias_____	47
Figura 14 – Valores bioquímicos da função renal dos animais do teste de toxicidade aguda com derivados aminoguanidínicos e controle negativo (N=6)_____	53
Figura 15 – Valores bioquímicos da função hepática dos animais no teste de toxicidade aguda com derivados aminoguanidínicos e controle negativo (N=6)_____	54

Figura 16 – Valores do peso dos órgãos fígado, rim e coração dos ratos Wistar tratados com dose única de derivados aminoguanidínicos e seu controle negativo _____	55
Figura 17 - Análise histopatológica renal da toxicidade aguda dose única, por via oral, dos derivados aminoguanidínicos e o controle negativo _____	58
Figura 18 - Análise histopatológica hepática da toxicidade aguda dose única, por via oral, dos derivados aminoguanidínicos e o controle negativo _____	59
Figura 19 - Análise histopatológica cardíaca da toxicidade aguda dose única, por via oral, dos derivados aminoguanidínicos e o controle negativo _____	60
Figura 20 – Comparação entre a massa corporal inicial (D0) e final (D14) de ratos Wistar tratados com derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles _____	61
Figura 21 – Valores de hemoglobina glicada de ratos Wistar diabéticos tratados por 14 dias com derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles _____	66
Figura 22 – Valores de frutossamina de ratos Wistar tratados por 14 dias com derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles _____	67
Figura 23 – Valores bioquímicos da função renal de ratos Wistar diabéticos e não diabéticos tratados por 14 dias com derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles _____	69
Figura 24 – Valores bioquímicos da função renal hepática de ratos Wistar diabéticos e não diabéticos tratados por 14 dias com derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles _____	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo de ensaios clínicos com drogas que interferem no processo de glicação_____	29
Tabela 2 - Grupos para teste de toxicidade aguda, tratamentos com a concentração e número de ratos Wistar por grupo_____	36
Tabela 3 - Grupos experimentais, indução do diabetes, tratamentos com a concentração e número de ratos Wistar por grupo_____	38
Tabela 4 - Nomenclatura e estruturas químicas dos derivados aminoguanidínicos_____	42
Tabela 5 – Parâmetros de massa corporal, consumo de ração e água dos animais em ratos Wistar (n=6) tratados em dose única com derivados aminoguanidínicos_____	49
Tabela 6 – Parâmetros hematológicos e leucometria obtidos de ratos Wistar (n=6) tratados com dose única de derivados aminoguanidínicos_____	51
Tabela 7 – Parâmetros morfológicos de ratos tratados com derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles por 14 dias_____	62
Tabela 8 – Parâmetros hematológicos e leucometria obtidos de ratos Wistar diabéticos e não diabéticos tratados derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles_____	64
Tabela 9 – Valores de glicemia de ratos Wistar diabéticos e percentual de redução antes e após o tratamento em com derivados aminoguanidínicos e seus controles_____	65
Tabela 10 – Perfil lipídico dos ratos Wistar diabéticos e não diabéticos após tratamento com derivados aminoguanidínicos e seus controles_____	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA - American Diabetes Association

AGEs – Advanced glycation end products

BSA – Albumina sérica bovina

°C – Graus Celsius

CHCM- concentração da hemoglobina corpuscular média

CN – Controle negativo

CND – Controle negativo diabético

CNN – Controle negativo normal

DM – Diabetes Mellitus

DM1 – Diabetes Mellitus tipo 1

DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2

GGT - Gama glutamil transpeptidase

HbA1c – Hemoglobina glicada

HCM - hemoglobina corpuscular média

H₂O - água

HSA - Albumina sérica humana

IL-6 - Interleucina-6

IL-8 - Interleucina-8

LQM – derivado aminoguanidínicos estudado nesta pesquisa

MTT - corante também chamado de 3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide

OMS - Organização Mundial da Saúde

RAGE - Receptor de produtos finais da glicação avançada

SBF – Soro fetal bovino

STZ - estreptozotocina

TGO - transaminase glutâmico-oxalacética sérica, também chamado de AST (aspartato aminotransferase)

TGP - transaminase glutâmico pirúvica, também chamado de alanina aminotransferase (ALT)

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TWEEN 80 - é um tensoativo e emulsionante não iônico.

VCM - volume corpuscular médio

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

RESUMEN

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Diabetes Mellitus	19
2.2 Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs)	21
2.3 Tratamento do Diabetes Mellitus	25
2.3.1 Glimepirida	27
2.4 Anti-AGEs com potenciais terapêuticos	28
3. OBJETIVOS	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Locais do estudo e Etapas da pesquisa	32
4.2 Obtenção das sínteses derivadas da aminoguanidina	32
4.3 Avaliação da Citotoxicidade	33
4.4 Determinação de atividade antiglicante in vitro	34
4.5 Estudo de toxicidade de dose aguda	35
4.6 Ensaio para atividade antiglicante e antidiabética in vivo	37
4.6.1 Animais e grupos experimentais	37
4.6.2 Indução do diabetes	38
4.6.3 Tratamento e Eutanásia	39
4.6.4 Avaliação histológica	40
4.7 Análises estatísticas	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Avaliação da citotoxicidade in vitro	41
5.2 Avaliação de atividade antiglicante in vitro	45
5.3 Estudo de toxicidade de dose aguda	48
5.4 Avaliação da atividade antidiabética e antiglicante in vivo	61

6. CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXO	82

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus é visto como um grupo de doenças metabólicas que se caracteriza por hiperglicemia crônica, devido a defeitos na secreção ou ação da insulina, podendo também ser em ambos (WHO, 2011). A longo prazo, os indivíduos acometidos têm maior risco de complicações, que envolvem as microangiopatias sendo a retinopatia, a nefropatia e a neuropatia diabética e a macroangiopatia que é a arteriosclerose das grandes artérias: artérias cerebrais, coronárias e dos membros inferiores, levando-os a insuficiência renal, cegueira e amputações (ROSA et al., 2014).

O diabetes atinge cerca de 346 milhões de pessoas no mundo configurando-se como uma epidemia mundial (OMS, 2011). No Brasil estimam-se um contingente populacional de seis milhões de portadores de diabetes, sendo a associação entre diabetes e hipertensão uma das principais causas de hospitalizações no sistema público de saúde do país (BRASIL, 2015).

Estima-se que as mortes por diabetes duplicarão entre 2005 e 2030. Sendo que mais de 80% das mortes por diabetes ocorrem em países de baixa e média renda (OMS, 2011). Ao contrário de países desenvolvidos, no qual o diabetes atinge as faixas etárias mais altas, ou seja na aposentadoria, nos países em desenvolvimento a faixa etária mais atingida são indivíduos entre 35 e 64 anos (ROSA et al., 2014).

No Brasil a mortalidade por idade e gênero em indivíduos com diabetes foi 57% mais alta que na população em geral (SCHMIDT et al., 2011). E apesar de campanhas e programas governamentais para detecção da doença, ainda é baixo conhecimento da população sobre o diagnóstico antes do surgimento das complicações (BRASIL, 2015). A Federação Internacional do Diabetes afirmou que em 2015 cerca de 5 a milhões de pessoas entre 20 e 27 anos, encontram-se sem diagnóstico no Brasil conforme a figura um.

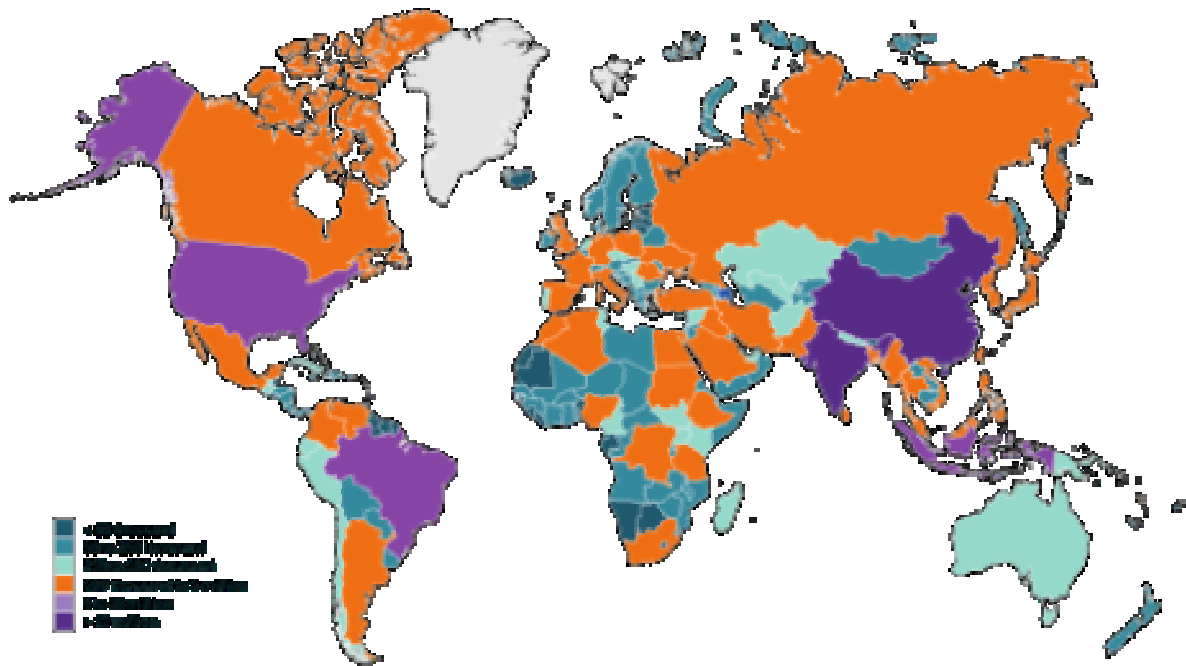


Figura 1 – Distribuição do número de pessoas entre 20 e 79 anos vivendo sem o diagnóstico do diabetes. FONTE: Federação Internacional do Diabetes, 2015.

Entre as teorias que explicam os danos celulares e teciduais que levam as complicações da doença, a formação e acumulação dos produtos de glicação avançada (AGEs do inglês, Advanced Glycation end products) é considerada uma das mais importantes (BARBOSA et al., 2008 CARVALHO et al., 2011).

Os AGEs são um grupo de moléculas heterogêneas produzidas por reações bioquímicas formadas a partir da glicação de natureza não enzimática de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (VENSKE, 2010).

A dieta é considerada a principal fonte exógena de AGEs, os alimentos industrializados, que sofrem tratamento térmico, além dos grelhados e frituras, possuem altos níveis de AGEs (CAI et al., 2012). Há evidências de que esses se somam aos AGEs endógenos, favorecendo o surgimento e a progressão das diversas complicações do diabetes (URIBARRI et al., 2010)

Os efeitos patológicos dos AGEs estão relacionados à capacidade destes compostos de modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas. Por meio da geração de radicais livres, da formação de ligações cruzadas com proteínas ou de interações com receptores celulares. A interação dos AGEs com o seu receptor (RAGE) pode ativar vias de sinalização complexas, que

causam estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios (DELBIN et al., 2012)

Agentes com propriedades anti-AGE estão sendo atualmente investigados. Os medicamentos investigados incluem aminoguanidina, aspirina, OBP 9195, ALT-946, alagebriun também conhecido por ALT-711, metformina e bloqueadores de receptor da angiotensina-II que, embora nenhum deles tenha sido ainda aprovado para indicação específica como anti-AGE, alguns já se encontram em fase pré-clínica e clínica de testes (MONNIER, 2003; HUEBSCHMANN, 2006; ENGELEN et al., 2013).

A aminoguanidina é considerada um desses agentes anti-AGE. Ela se encontra em fase de teste em humanos, pois previne a formação de AGEs ao reagir com produtos iniciais da glicação e demonstrou ser eficaz na melhora da proteinúria, na elasticidade dos vasos, na prevenção da retinopatia diabética e no tratamento de pacientes com nefropatia diabética. Porém, alguns efeitos colaterais são associados ao seu uso crônico e incluem a maior incidência de hepatotoxicidade, glomerulonefrite e a deficiência da vitamina B6, isso têm exigido pesquisas para o estabelecimento de uma dosagem segura para sua utilização terapêutica em portadores de diabetes (HUEBSCHMANN, 2006; CARVALHO et al., 2011).

Ainda são necessários estudos para a elucidação de questões estratégicas relativas à repercussão dos anti-AGEs para a saúde humana, em particular os seus efeitos hepáticos e renais, de modo a estabelecer intervenções eficazes que previnam o surgimento de doenças crônicas ou melhorem a qualidade de vida dos milhões de portadores desses males.

Neste contexto, o processo de descoberta de novos fármacos, atribuição da Química Medicinal, caracteriza-se por sua complexidade, fruto da multiplicidade de fatores que envolvem o planejamento molecular de novas estruturas capazes de apresentarem os efeitos farmacológicos desejados, com biodisponibilidade adequada ao seu emprego terapêutico, seguro e confiável (SILVA, 2013).

O Bioisosterismo é uma estratégia da Química Medicinal utilizada para no planejamento racional de novas drogas, sendo aplicado a uma substância protótipo, como um processo especial de modificação molecular de um átomo ou um grupo de átomos por seu bioisótero, na atividade biológica original apresentada por um fármaco, podendo ter a mesma ação, ou mesmo uma ação antagônica. A indústria farmacêutica obtém sucesso significativo na descoberta de novos análogos

terapêuticos em diversas classes de fármacos a partir da modificação molecular fundamentada no bioisosterismo (BARREIRO, LIMA, 2005; GOÉS et al., 2004).

Com a aplicação do bioisosterismo pode-se analisar a influência da modificação de um átomo ou de um grupo de átomos por seu bioisótero sobre a atividade biológica que o fármaco original apresenta, podendo ser mais ativo, ter ação idêntica ou mesmo antagônica. Focalizando-se na busca por novos agentes terapêuticos, este projeto utilizou dessas estratégias na busca de novos protótipos de fármacos.

Para tanto utilizou-se como ponto de partida a estrutura da aminoguanidina, a qual passou por processos de hibridação molecular e de bioisosterismo, como estratégias de planejamento para tais modificações. Buscando uma alternativa terapêutica eficaz, de baixo custo e principalmente segura para o tratamento do diabetes ou como um potencial inibidor dos produtos finais da glicação avançada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes Mellitus

O Diabetes mellitus (DM) não é uma única doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, resultado de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambas. De acordo com a Associação Americana de Diabetes (American Diabetes Association - ADA) para o diagnóstico de um indivíduo com DM é necessário ter pelo um menos um dos quatro critérios apresentados na figura dois.

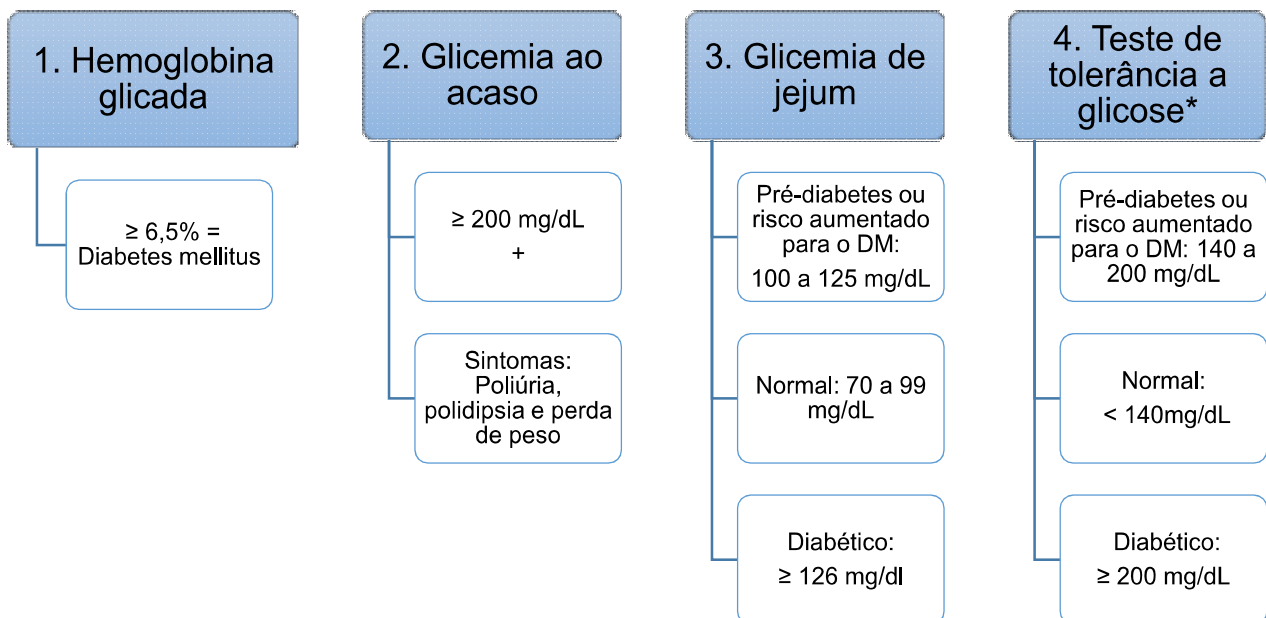


Figura 2 – Critérios definidos pela Organização Mundial da Saúde, Associação Americana de Diabetes e Sociedade Brasileira do Diabetes para diagnóstico do Diabetes Mellitus.

*consiste na glicemia duas horas após a ingestão de glicose anidra (dextrosol)

O diabetes é basicamente classificado, de acordo com a etiologia, em quatro classes clínicas: Diabetes mellitus tipo 1, Diabetes mellitus tipo 2, Diabetes mellitus gestacional e outros tipos específicos de Diabetes (ADA, 2013; ABD, 2015).

O diabetes tipo 1 está presente em 5 a 10% dos casos de diabetes. É uma doença autoimune, na qual ocorre uma degeneração progressiva das células β pancreáticas, mediada por células como linfócitos T e macrófagos. O indivíduo fica com deficiência na ação e ou produção de insulina, levando a uma dependência de injeções de insulina exógena (FERREIRA et al., 2011). Os indivíduos com esta forma

de DM necessitam do monitoramento constante, pois apresentam níveis variáveis de deficiência de insulina no decorrer do dia podendo levá-lo a consequências fatais agudas, tais como, a hiperglicemia, a cetoacidose ou a síndrome hiperosmolar não cetótica. (PASQUALOTTO et al., 2012; ABD, 2015).

O diabetes tipo 2 prevalece em 90% a 95% dos casos e se caracteriza pelo declínio da função das células β pancreáticas, sendo causado por duas condições: a resistência à insulina e a disfunção na secreção de insulina. Este tipo de diabetes está associado ao sedentarismo, a má alimentação, que tem como consequência obesidade, hipertensão arterial e dislipidemia, as quais ocasionam, frequentemente, doenças cardiovasculares e neuropatias (LEON, MADONNA, 2015).

O tratamento para o diabetes tipo 2 necessita de uma modificação de rotina diária, com mudança para uma ingestão alimentar hipocalórica e com restrição de açúcar, além de realização de atividade física visando a diminuição na concentração de glicose sanguínea. Associado a isto, quando o indivíduo não responde ao tratamento não medicamentoso, deve este ser associado a terapêutica medicamentosa com os antidiabéticos orais (PASQUALOTTO et al., 2012).

Já a diabetes gestacional, ocorre em cerca de 7% de todas as gestações e é determinada pela diminuição da tolerância a glicose durante o período gestacional. Este fator está associado à gravidez que ocorre em uma idade mais avançada, maior paridade, maior peso pré gestacional e índice de massa corporal (IMC) elevados, história de diabetes em parentes de primeiro grau e um histórico de diabetes gestacional. Após o parto os níveis de glicose retornam aos seus valores de normalidade (ADA, 2013; KAMPMANN et al., 2015).

Na categoria de “outros tipos de diabetes” estão uma série de condições que podem levar o indivíduo a apresentar os sintomas do diabetes, tais como: defeitos genéticos da função das células β , conhecido como MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young), o qual acomete pessoas com menos de 25 anos, porém diferencia-se do diabetes tipo 1 por não apresentar dependência de insulina; outros defeitos genéticos; endocrinopatias; doenças que atacam diretamente o pâncreas exócrino, tais como pancreatite, neoplasias, fibrose cística etc, além de alguns tipos de drogas que levam quimicamente a esta condição (FERREIRA et al., 2011; ADA, 2013).

Os sintomas de complicações agudas do diabetes são: poliúria, polidipsia, polifagia, emagrecimento e perda da força, mais comuns antes do diagnóstico e

presentes principalmente em diabéticos do tipo 1. Contudo, em grande parte dos casos, os portadores de diabetes tipo 2 são assintomáticos no início da doença, podendo evoluir sem praticamente nenhum sintoma por muitos anos, apresentando apenas hiperglicemia de jejum ou pós-prandial (PASQUALOTTO et al., 2012).

Essa hiperglicemia crônica pode levar, a longo prazo, a uma série de complicações de ordem vascular, que levam a disfunção, dano ou falência de vários órgãos. Muitos diabéticos só descobrem ser portadores da doença quando complicações macro ou microvascular surgem. Estudos mostram que das pessoas com diabetes, 46,5% desconheciam o fato de serem portadores desta doença (BRASIL, 2013).

A doença macrovascular causa aterosclerose acelerada entre os diabéticos, resultando em aumento do risco de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e gangrena de extremidades inferiores, enquanto que os efeitos das doenças microvasculares são mais evidentes na retina, rins e nervos periféricos. Entre as teorias que explicam essas complicações nos indivíduos diabéticos, a principal delas, responsável por elucidar esses danos celulares e teciduais observados, é a formação dos produtos finais da glicação avançada, ou simplesmente AGEs (BARBOSA et al., 2008; NENNA et al., 2015).

2.2 PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs)

Os AGEs são resultantes de ligações não enzimáticas entre açúcares redutores, seus produtos de oxidação ou lipídios oxidativos com grupos amino de proteínas ou ácidos nucleicos, formando dentro de algumas horas a base de Schiff que é instável. Esse tipo de reação é conhecida como glicosilação não-enzimática ou glicação (BARBOSA, OLIVEIRA, SEARA, 2009; HEGAB et al., 2012).

Este produto ao longo de semanas, sofre um processo bioquímico lento de reações complexas como, a reorganização, desidratação e condensação formando um composto mais estável chamado de produtos de Amadori, que ainda é reversível. Nesse estágio, se houver uma diminuição dos níveis glicêmicos, o processo pode ser interrompido e não há a formação de AGEs (MUTHENNA et al., 2012).

Ao longo de meses e anos, na permanência da hiperglicemia, os produtos de Amadori sofrem novas alterações estruturais para, finalmente, tornarem-se altamente estáveis formando o AGE (Figura três). Todo esse processo é chamado de

Reação de Maillard, que foi descoberta mesmo antes de haver correlação com qualquer complicação do diabetes (KERBAUY, 2008; YAMAGISHI, 2011).

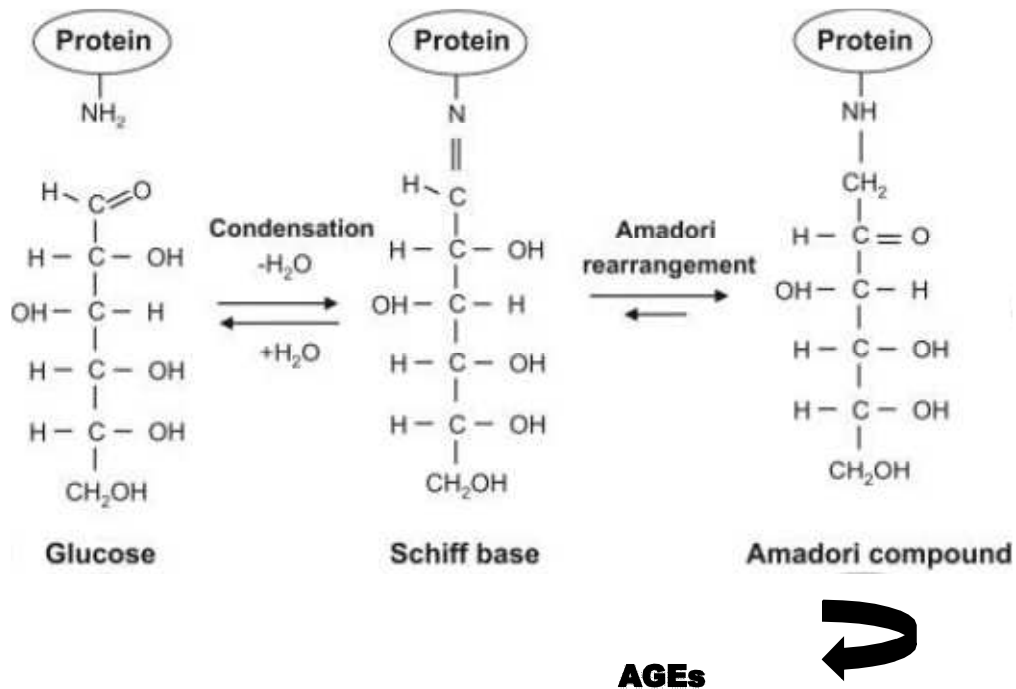


Figura 3 – Formação dos AGEs - Reação de Maillard. FONTE: adaptado de STIRBAN, GAWLOWSKI, RODEN, 2014.

Um exemplo de produtos de Amadori é a hemoglobina glicada (HbA1c) e a fructosamina que são marcadores úteis para monitoramento do controle glicêmico, para observação da glicação da hemoglobina com a glicose e da albumina com glicose, respectivamente. Nem fructosamina, nem HbA1c são AGEs. No entanto, estes produtos de Amadori são capazes de sofrer outras reações que eventualmente levam à formação dos AGEs. Essas proteínas, quando glicadas, diminuem a sua função na corrente sanguínea (BARLOVIC, SORO-PAAVONEN, JANDELEIT-DAHM, 2011)

Pode-se afirmar que uma grande quantidade de AGEs já advém ao organismo da ingestão de alimentos industrializados, os quais foram submetidos a altas temperaturas e baixa umidade, ou seja, alimentos fritos, grelhados ou assados a cerca de 230°C , mesmo que durante um curto período de tempo. Os níveis de AGEs desse tipo de alimento é muito mais elevado, quando comparado com alimentos cozidos em meio líquido (GOLDBERG et al., 2004).

Com o hábito do tabagismo, os AGEs são produzidos e volatilizados pela combustão do fumo, sendo absorvidos nos pulmões, podendo também interagir com proteínas séricas (STIRBAN, GAWLOWSKI, RODEN, 2014).

Esses podem ser chamados de AGEs exógenos, os quais se somam no organismo aos AGEs endógenos, que tem ação no meio intra ou extracelular, causando danos irreversíveis as células, favorecendo a progressão das diversas complicações do diabetes. (BARBOSA, OLIVEIRA, SEARA, 2009).

Até então achava-se que os AGEs eram responsáveis apenas pelas complicações do diabetes, recentemente descobriu-se que os AGEs levam a resistência à insulina e conseqüentemente agem também na formação do diabetes, devido a sua atuação nas células β pancreáticas (CAI et al., 2012).

A literatura reconhece três mecanismos de danos causado pelos AGEs às células, são eles:

- Modificação de estruturas intracelulares: com a formação dos AGEs dentro do espaço intracelular, pode haver alterações genômicas, devido a interação com nucleotídeo, histonas ou proteínas envolvidas na transcrição gênica.
- Interação com proteínas da matriz extracelular e membranas basais: neste caso há o comprometimento da conformação geométrica das proteínas da matriz, diminuição da solubilidade e digestibilidade enzimática, levando a anormalidades estruturais e funcionais irreversíveis. Propicia alterações na membrana basal, além de levar a diminuição da adesão das células endoteliais à matriz.
- Modificação de proteínas e lipídeos sanguíneos: proteínas circulantes modificadas por AGEs podem se ligar e ativar os receptores de AGEs (por exemplo, o receptor RAGE), alterando, assim, a produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, que por sua vez causam danos nos tecidos.

Ou seja, as altas concentrações plasmáticas de glicose, características do diabetes, levam a um aumento na geração de radicais livres, na formação de ligações cruzadas com proteínas ou nas interações com receptores celulares com os AGEs que promovem, respectivamente, estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios, tais como TNF- α , IL-6, e IL- β (BARLOVIC, SORO-PAAVONEN, JANDELEIT-DAHM, 2011; STIRBAN,

GAWLOWSKI, RODEN, 2014). Por essas características, os AGEs agem com efeitos fisiopatológicos em todos os órgãos e sistemas do indivíduo, como pode ser visualizado na figura quatro.

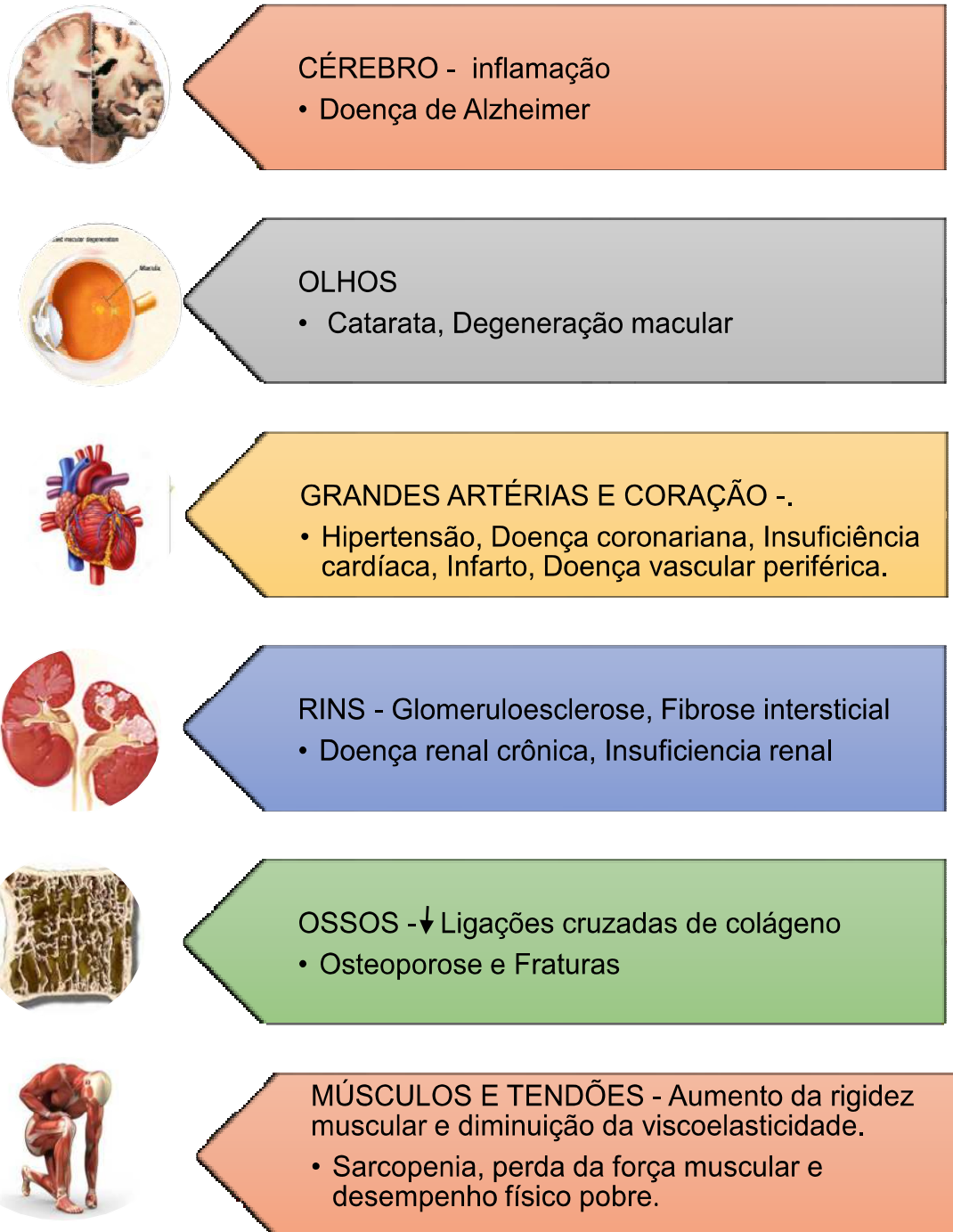


FIGURA 4 - Efeito de AGEs em diferentes sistemas e órgãos. Fonte: baseado no artigo de HEGAB et al, 2012

Um crescente corpo de evidências tem mostrado que há possibilidade de inibição dos AGEs, quer seja com um agente inibidor da formação da glicação, quer seja quebrando as ligações cruzadas entre as moléculas. Além dos medicamentos, suplementos e terapias dietéticas estão sendo conduzidos com esta finalidade. Uma vez que alterar o método de cozimento (por exemplo, com a redução da temperatura, aumento da umidade e diminuição do pH) é altamente eficaz em influenciar a quantidade de AGEs contida nos alimentos (URIBARRI et al., 2010), isso pode representar uma intervenção simples, significativa e econômica na diminuição de AGEs circulantes.

Vários estudos concluíram que a restrição dietética de AGEs na alimentação foi acompanhada por uma queda nos AGEs circulantes, além de uma diminuição dos marcadores de estresse oxidativo, inflamação, disfunção endotelial e resistência à insulina em pacientes com diabetes mellitus, insuficiência renal, bem como em pessoas saudáveis (BIRLOUEZ-ARAGON et al., 2010; URIBARRI et al., 2011).

Além disso, a possibilidade de associação de um anti-AGE a terapia medicamentosa do diabetes traria benefícios aos usuários.

2.3 Tratamento medicamentoso do Diabete Mellitus

Quando a associação entre mudança no estilo de vida, com aumento da atividade física e dieta adequada não surtem efeito por si só, na redução dos índices glicêmicos, é necessário o uso de medicamentos ou a combinação de medicamentos orais com insulina para o tratamento do diabetes.

Atualmente, os portadores de diabetes tipo II têm o tratamento com o objetivo de manter a glicemia dentro de parâmetros próximo a normalidade e a hemoglobina glicada com valores < 7%. Para isso, o tratamento é preconizado com o uso de antidiabéticos orais conforme exemplifica a figura cinco (SBD, 2015). O uso de antiglicantes não é uma prática na conduta clínica do manejo desses pacientes.

Medicamento	Mecanismo de ação	Redução glicemia de jejum (mg/dL)	Redução de HbA1c (%)	Efeitos colaterais
SULFONILUREIAS				
Clorpropamida Glibenclamida Glipizida Gliclazida Gliclazida MR Glimepirida	Aumento da secreção de insulina.	60-70	1,5-2	Hipoglicemia e ganho ponderal.
METIGLINIDAS				
Repaglinida Nateglinida	Aumento da secreção de insulina.	20-30	1-1,5	Hipoglicemia e ganho ponderal discreto.
BIGUANIDAS				
Metformina	Reduz a produção hepática de glicose com menor ação sensibilizadora da ação insulínica.	60-70	1,5-2	Desconforto abdominal, diarreia.
INIBIDORES DA ALFAGLICOSIDASE				
Acarbose	Retardo da absorção de carboidratos.	20-30	0,5-0,8	Meteorismo, flatulência e diarreia.
GLITAZONAS				
Pioglitazona	Aumento da sensibilidade à insulina em músculo, adipócito e hepatócito (sensibilizadores da insulina).	35-65*	0,5-1,4*	Retenção hídrica, anemia, ganho ponderal, insuficiência cardíaca e fraturas.

Figura 5 – Medicamentos orais para o tratamento do Diabetes Mellitus tipo II

* Reduções médias da glicemia de jejum e da HbA1c para monoterapia. No caso de terapia combinada, pode ocorrer efeito sinérgico, com potencialização da redução dos níveis glicêmicos. Adaptado de: Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2014-2015

2.3.1 Glimpirida

A glimepirida escolhida como padrão antidiabético deste estudo é uma droga do grupo das sulfonilureias. Elas são assim chamadas por possuírem em comum na sua estrutura química um grupamento composto por ácido sulfônico e ureia (figura seis). As sulfonilureias podem ser classificadas em convencionais ou modernas e de acordo com a duração da ação. Dessa forma, a glimepirida é classificada como moderna e de duração longa por apresentar cadeias mais complexas, o que facilita a interação com os receptores específicos (KALRA et al., 2015) Evidências a partir da literatura sugerem que as sulfonilureias são prescritas para até 20% dos pacientes que iniciam tratamento, quer como monoterapia ou em combinação, para o tratamento de diabetes mellitus tipo II (DESAI et al., 2012).

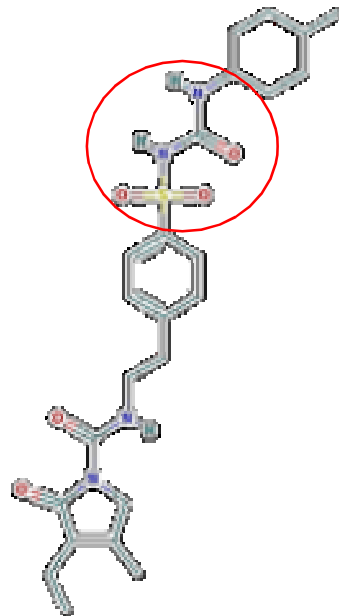


Figura 6 – Estrutura química da Glimepirida.

FONTE: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imagefly.cgi?cid=3476&width=500&height=500>

A glimepirida é um o secretagogo de insulina, portanto ela é indicada apenas para indivíduos que possuam certa reserva pancreática do hormônio. Desenvolve uma ação hipoglicemiante rápida e mais prolongada durante todo o dia. É capaz de reduzir tanto os índices glicêmicos em 20-40 mg/dL, como a hemoglobina glicada em 1,5 a 2%. Após a administração oral, a glimepirida é completamente absorvida (100%) após 1 hora e sua absorção não é alterada pela ingestão de alimentos. O tempo requerido para o fármaco alcançar o efeito máximo é cerca de

duas a três horas (BONFILIO, 2011; DEACON, LEOVITZ, 2016). Contudo, por seu potente efeito na secreção de insulina, induzem a insulinemia e conseqüentemente ao desenvolvimento de hipoglicemia (MORI, 2007).

2.4 Anti-AGEs com potenciais terapêuticos

Atualmente os fármacos existentes possuem ações isoladas ou são antidiabéticos, tais como os inibidores da alfa-glicosidade, biguanidas, glitazonas, sulfonilureas e metiglinidas como foram apresentados na figura quatro (OLIVEIRA, 2010) ou tem potencial para inibição dos produtos finais da glicação avançada, tais como, OBP 9195, ALT-946 e alagebriun também conhecido por ALT-711, além de alguns antioxidantes que também fazem o mesmo papel (MONIER, 2003; NENNA, 2015).

A literatura apresenta a glimepirida e a metformina com capacidade para diminuir os efeitos tóxicos dos produtos de glicação avançada (AGEs), sugerindo uma possível ação anti-oxidante e conseqüentemente efeito pró-vascular (NENNA, 2015; KALRA et al., 2015)

A aminoguanidina (figura sete), molécula base para as sínteses alvo deste estudo também é considerada um desses agentes anti-AGE. Ela é amplamente estudada in vitro e em modelos experimentais para diabetes, tendo mostrado ação na prevenção da deterioração da estrutura do sistema cardiovascular e das principais complicações a longo prazo, tais como nefropatia, retinopatia e neuropatia.

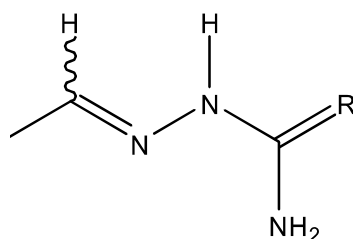


Figura 7 – Estrutura molecular da aminoguanidina.

Para a maioria dos anti-AGEs estudados, o mecanismo de inibição da glicação de proteínas e sua ação na prevenção das complicações diabéticas, ainda é difícil de ser esclarecido. Apesar da maioria das substâncias serem utilizadas exclusivamente em configurações pré-clínicas, algumas já se encontram em fase clínica. Nenna et al. (2015), apresenta uma revisão dos estudos clínicos com os fármacos ou protótipos de fármacos tidos como anti-AGEs (Tabela 1).

Tabela 1 – Resumo de ensaios clínicos com drogas que interferem no processo de glicação.

AUTOR	DROGA	DURAÇÃO DO TRATAMENTO	EFEITO
Bolton et al. (2004)	Aminoguanidina	2-4 anos	Sem efeitos benéficos na progressão de nefropatia. Modesta atenuação de complicações da diabetes mellitus.
Freedman et al. (1999)	Aminoguanidina	Não disponível	Estudo interrompido devido à falta de eficácia e segurança.
Williams et al. (2007)	Piridoxina	6 meses	Redução benéfica dos valores da creatinina sérica.
Rabbani et al. (2009)	Tiamina	3 meses	Redução benéfica na excreção urinária de albumina.
Fraser et al. (2012)	Benfotiamina	2 anos	Não ocorreram alterações na função do nervo periférico ou marcadores inflamatórios
Alkhalaf et al. (2010)	Benfotiamina	3 meses	Não ocorreu alteração na excreção de albumina ou lesão molecular.
Alkhalaf et al. (2012)	Benfotiamina	3 meses	Não houve nenhum benefício clínico. Nenhuma alteração nos marcadores de disfunção endotelial e inflamatórios.
Zieman et al. (2007)	Alagebriun	2,5 meses	Aumento benéfico na função endotelial arterial. Pode reduzir a rigidez endotelial.
Oudegeest-Sander et al. (2013)	Alagebriun	1 ano	Não causa alterações vasculares. Não potencializa o efeito do treinamento físico

Adaptado de Nenna et al. (2015).

Como foi visto é possível corroborar com Engelen, Stehouwer, Schalkwijk (2013) que após ampla revisão concluíram que, a evidência clínica atual para inibir a formação e/ou ação dos AGEs, ainda é fraca e pouco convincente. Podendo-se assim afirmar que até o momento não há medicamentos anti-AGE que consigam proteger em sua totalidade os indivíduos dos efeitos deletérios dos AGEs no organismo.

Em vista disto, e também tendo em conta as desvantagens e as limitações dos atuais inibidores de glicação conhecidos, continua a ser altamente necessário o desenvolvimento de inibidores eficazes, seguros e com potencial real de inibição da glicação de proteínas para o tratamento do diabetes e das complicações de saúde relacionadas com a ação dos AGEs. Assim, aproveitando o potencial da aminoguanidina foram realizadas modificações moleculares, com técnicas do bioisosterismo e da hibridação molecular (BARREIRO, LIMA, 2005), para um melhoramento no efeito anti-AGEs, potencializando assim, a sua ação, sem ocasionar nos indivíduos os efeitos deletérios apresentados nos estudos anteriores.

Nesse contexto, o presente estudo objetiva avaliar 19 compostos derivados da aminoguanidina, verificando sua potencial atividade antidiabética, ou seja capaz de reduzir os índices glicêmicos, além de serem capazes de inibir a formação dos produtos finais da glicação avançada e conseqüentemente as complicações do diabetes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antidiabético e/ou inibidor dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) de derivados aminoguanidínicos em ratos diabéticos.

3.1.1 Objetivos Específicos

- Realizar teste de citotoxicidade, nos dezenove derivados aminoguanidínicos, pelo ensaio calorimétrico do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolium]
- Avaliar atividade antiglicante in vitro;
- Avaliar a toxicidade aguda in vivo dos derivados aminoguanidínicos;
- Realizar teste para atividade antidiabética e antiglicante in vivo;
- Avaliar o efeito do tratamento agudo com os derivados sobre o hemograma e os níveis de glicose, hemoglobina glicada, frutossamina, triglicerídeos, colesterol total, HDL-colesterol, TGO, TGP, GGT, além de ureia e creatinina em ratos diabéticos e seus respectivos controles;
- Realizar o estudo histológico do fígado, rim e coração dos ratos diabéticos e seus respectivos controles.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Antes da realização dos experimentos inerentes a esta pesquisa, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora e aprovado com o número 029/2013 (ANEXO I).

4.1 Locais do estudo e Etapas da pesquisa

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais no Instituto de Química e Biotecnologia; Laboratório de Biologia Celular, Núcleo de Pesquisa Multidisciplinar da Universidade Federal de Alagoas; Laboratório de Tecnologia e Controle de Qualidade e Laboratório de Recursos Naturais da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Para a realização dos estudos de verificação do potencial antidiabético e antiglicante dos derivados aminoguanidínicos seguiu-se as etapas abaixo (ver figura oito).

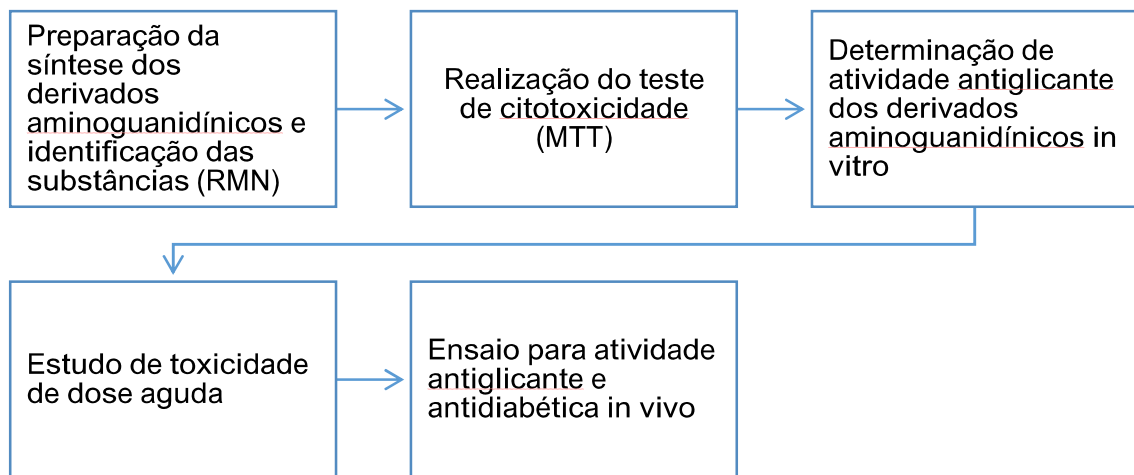


Figura 8: Etapas de realização da pesquisa.

4.2 Obtenção das sínteses derivadas da aminoguanidina

As sínteses utilizadas neste estudo partiram de trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, incluindo a síntese e avaliação farmacológica de derivados amidínicos. Com isso obteve-se a síntese de guanilhidrazonas e tiossemicarbonas,

também chamados de derivados aminoguanidínicos (ARAÚJO-JÚNIOR, 2006; SCHMITT, 2006; ARAÚJO-JÚNIOR, 2007; BENDERITTER, 2007).

A obtenção dos protótipos foi planejada variando-se duas regiões, a partir do esqueleto base das guanilhidrazonas e das tiossemicarbazonas aromáticas. A síntese foi realizada utilizando-se quantidades equimolares de aldeídos aromáticos e cloridrato de aminoguanidina, para obtenção das guanilhidrazonas, e com a tiossemicarbazida, para a obtenção das tiossemicarbazonas (Figura nove).

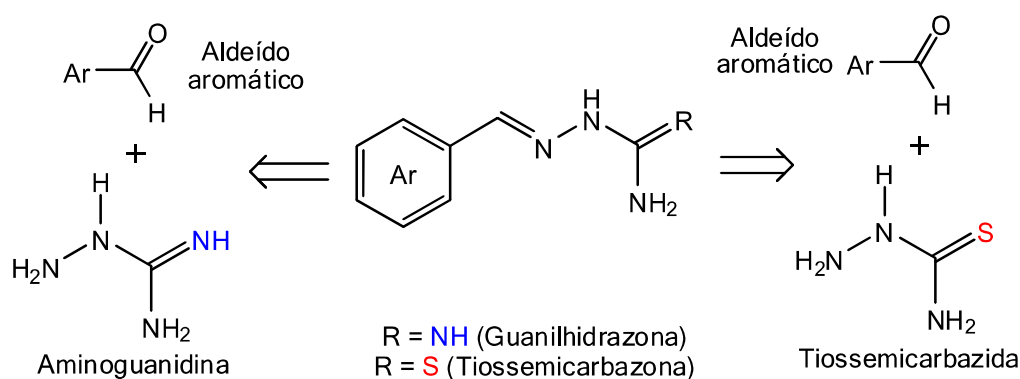


Figura 9 - Retrossíntese do esqueleto base das guanilhidrazonas e das tiossemicarbazonas.

Neste estudo foram utilizados os 19 derivados guanilhidrazônicos para os testes *in vitro* de citotoxicidade (MTT) e de avaliação antiglicante *in vitro*. Os estudos de atividade antidiabética *in vivo* foram realizados com as sínteses com melhor atividade antiglicante *in vitro*.

4.3 Avaliação da Citotoxicidade

Para avaliar um possível efeito citotóxico dos derivados aminoguanidínicos foi utilizado o ensaio colorimétrico com MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenilterazolium], em macrófagos da linhagem J774 A.1. Esses macrófagos foram mantidos em meio de cultivo RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino (SBF), 0,1% do antibiótico gentamicina e 1% L-glutamina, a 37 °C e 5% de CO₂.

Neste ensaio foram utilizadas placas de 96 poços, as quais foram adicionados 200 μL de uma suspensão em uma concentração de $1,5 \times 10^5$ células. Em seguida tais células foram expostas aos derivados aminoguanidínicos nas

concentrações de 10 μM , 100 μM ou 1000 μM , sendo posteriormente mantidos em estufa umedecida por um período de 24 h.

Após este intervalo foi adicionado em cada poço 22,5 μL de MTT (5 mg/mL) dissolvidos em PBS e mantidos por 4 h em incubação a 37 °C e 5% CO_2 . O sobrenadante foi então descartado e colocado em cada poço da placa de cultura 150 μL de solução de DMSO. As células que apresentam integridade mitocondrial, ou seja, continuam viáveis, metabolizam o MTT através da enzima succinato-desidrogenase, a um sal violáceo insolúvel em meio aquoso e solúvel em DMSO, chamado formazam. Após 15 min de incubação à temperatura ambiente, as soluções resultantes são levadas ao espectrofotômetro e realizada a leitura no comprimento de onda de 540 nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicata. A porcentagem de células viáveis foi determinada em relação aos controles utilizando a seguinte fórmula (MARTINS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2015):

$$(\text{Absorção das células tratadas} / \text{absorvância de células não tratadas}) \times 100$$

4.4 Determinação de atividade antiglicante in vitro

A realização do teste para determinação do potencial antiglicante de uma substância consiste em produzir o AGE, a partir da junção do BSA mais um açúcar que pode ser ribose, frutose ou glicose.

Precedendo os testes com os derivados aminoguanidínicos foram necessários alguns estudos visando a padronização da técnica tendo em vista que a literatura apresenta diversas formas de produção de AGEs in vitro (BEAULIEU et al., 2010; JHAUMEER-LAULLOO et al., 2012; PEREZ GUTIERREZ et al., 2012; SÉRO et al., 2013).

Os testes para atividade antiglicante in vitro foram realizados em placas estéreis de 96 poços. Antes de iniciar os testes todos os materiais, incluindo todas as soluções, tampão e amostras foram submetidos à luz ultravioleta por 15 minutos, em capela de fluxo laminar. Local onde ocorreu o preparo das placas. Além disso, para a realização do teste todos os reagentes e as amostras foram esterilizadas por filtração através de filtros de membrana 0,2 μm .

Acrescentou-se em cada poço as seguintes soluções nesta ordem:

- 75 μL de azida sódica 8 g/L;
- 37,5 μL de glicose 800 mM;

- 75 µL Amostra;
- 75 µL de BSA 40 mg/mL.

Tendo como variação o branco que continha:

- 150 µL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7.4;
- 75 µL de azida sódica 8 g/L
- 75 µL de BSA 40 mg/mL.

Utilizou-se o controle negativo da fluorescência:

- 125 µL de tampão fosfato 100 mM, pH 7.4
- 75 µL de azida sódica 8g/L

E o controle da técnica que segue o padrão sem a amostra a ser analisada. Como controles positivos utilizou-se a amnoguanidina e a quercetina a 2 mg/mL, bem como as amostras testadas que foram os 19 derivados amnoguanidínicos.

As placas quando prontas foram levadas, imediatamente, para estufa a 37°C, protegida com folha de papel alumínio, por 48 horas até início das leituras. Não podendo ser manipulada até então. A formação de AGEs foi medida por um espectrofotômetro de fluorescência, com excitação em 350 nm e emissão em 450 nm (BOUSOVÁ et al., 2005; AHMAD AHMED, 2006; BEAULIEU et al., 2010).

Os resultados foram apresentados em porcentagem de inibição e calculada a partir da seguinte equação (SUN et al, 2010):

$$\% \text{ de inibição} = [1 - (\text{fluorescência da solução com inibidores} / \text{fluorescência da solução sem inibidores})] \times 100\%$$

4.5 Estudo de toxicidade de dose aguda

Os estudos de toxicidade aguda são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração (ANVISA, 2013). Esse estudo foi realizado com os derivados que tiveram um bom resultado para atividade antiglicante in vitro.

A toxicidade aguda foi realizada com os derivados LQM 3, LQM 13 e LQM 15 nas concentrações de 2 mg/kg, 10 mg/kg e 100 mg/kg de peso do animal, sendo tratados por via oral (gavagem) com dose única. Este teste foi conduzido seguindo as diretrizes do Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança

farmacológica, necessários ao desenvolvimento de medicamentos, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, de 31 de janeiro de 2013.

Os animais foram separados em dez grupos conforme tabela dois, com seis animais cada. Cada animal recebeu 1 ml da amostra, na concentração específica do seu grupo, solubilizada em Twen 80, o qual é inerte e não causa alterações no princípio ativo a ser testado, além do controle negativo que recebeu apenas H₂O.

Tabela 2 - Grupos para teste de toxicidade aguda, tratamentos com a concentração e número de ratos Wistar por grupo.

Grupo	Tratamento	N
Controle negativo	Água	6
LQM03/2	Derivado LQM03 com 2 mg/kg de peso	6
LQM03/10	Derivado LQM03 com 10 mg/kg de peso	6
LQM03/100	Derivado LQM03 com 100 mg/kg de peso	6
LQM13/2	Derivado LQM13 com 2 mg/kg de peso	6
LQM13/10	Derivado LQM13 com 10 mg/kg de peso	6
LQM13/100	Derivado LQM13 com 100 mg/kg de peso	6
LQM15/2	Derivado LQM15 com 2 mg/kg de peso	6
LQM15/10	Derivado LQM15 com 10 mg/kg de peso	6
LQM15/100	Derivado LQM15 com 100 mg/kg de peso	6
Total de animais =		60

No primeiro dia, os animais foram acompanhados em busca de sinais tóxicos gerais e de mortalidade, aos 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após administração da dose única (BRITO, 1994).

A avaliação clínica observou os seguintes parâmetros: modificações na pele, pelos, olhos, mucosas, alterações respiratórias, circulatórias e do sistema nervoso central ou seja, alterações no estado consciente e disposição, no sistema motor, no tônus muscular, no sistema nervoso central (tremores, convulsão e sedação) e no sistema nervoso autônomo (lacrimejamento, salivação e respiração). Nos 14 dias subsequentes, além desses parâmetros, os animais foram monitorados observando a variação de massa corporal do animal e o consumo de água e ração.

O monitoramento do consumo de água e ração foi realizado por meio de aferições diárias, com seus respectivos registros em fichas de consumo animal. O consumo da ração foi calculado considerando-se a ração fornecida, e as sobras das rações nos comedouros, sendo então pesada. O mesmo foi realizado para o registro do consumo diário de água, utilizando-se bebedouros individuais volumetricamente graduados.

Após esse período realizou-se a eutanásia para observação histológica de rim, fígado e coração, além de hemograma completo e parâmetros bioquímicos de avaliação dos perfis lipídico, proteico e de hepato e nefrotoxicidade.

4.6 Ensaio para atividade antiglicante e antidiabética in vivo

A avaliação da atividade antiglicante e antidiabética deu-se a partir do esquema a seguir (figura dez):

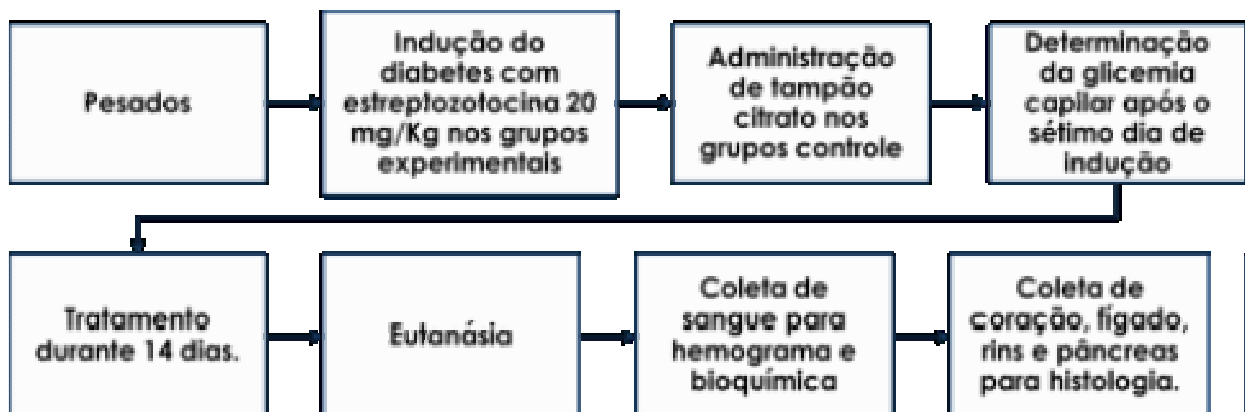


Figura 10: Etapas da avaliação da atividade antidiabética e antiglicante in vivo.

4.6.1 Animais e grupos experimentais

Os ensaios in vivo foram realizados respeitando-se os Princípios Éticos em Experimentação Animal, com ratos (*Rattus norvegicus albinus* - linhagem Wistar), adultos, machos, com idade de dois meses adquiridos no Biotério Central da UFJF e transferidos para o biotério setorial do Laboratório de Recursos Naturais. Os animais

ficaram em observação por 15 dias antes do ensaio, para verificação das condições clínicas e a identificação de variáveis que pudessem influenciar no experimento.

Os animais foram alojados em estantes apropriadas, mantidos em gaiolas de polipropileno, sendo uma gaiola por grupo, forradas com serragem, em fotoperíodo de 12 horas de claro e escuro, ruídos mínimos, temperatura ambiente $21 \pm 1^\circ\text{C}$, mantida por ar condicionado. A alimentação e a ingestão de água foram monitoradas diariamente. Utilizou-se ração comercial (ração padrão para roedores - Nuvital, Nuvilab, Brasil).

Após pesagem foram separados pelo método probabilístico de escolhas aleatórias em onze grupos, identificados a partir da terapêutica, conforme tabela três.

Tabela 3 - Grupos experimentais, indução do diabetes, tratamentos com a concentração e número de ratos Wistar por grupo.

Grupo	Diabetes	Tratamento	N
GLI	Sim	Glimepirida	6
CND	Sim	Água	6
Amino D	Sim	Aminoguanidina 2 mg/kg de peso	6
LQM03D	Sim	Derivado LQM03 com 2 mg/kg	5
LQM13D	Sim	Derivado LQM13 com 2 mg/kg	5
LQM15D	Sim	Derivado LQM15 com 2 mg/kg	5
CNN	Não	Água	6
Amino N	Não	Aminoguanidina 2 mg/kg de peso	6
LQM03N	Não	Derivado LQM03 com 2 mg/kg	5
LQM13N	Não	Derivado LQM13 com 2 mg/kg	5
LQM15N	Não	Derivado LQM15 com 2 mg/kg	5
Total de animais =			60

4.6.2 Indução do diabetes

Após marcação dos animais (conforme preconizado pelo Colegiado Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), os animais foram pesados individualmente, afim de determinar o cálculo de estreptozotocina a ser injetada em cada animal.

A indução do quadro diabetogênico ocorreu através de uma injeção intravenosa na veia caudal, de estreptozotocina (20 mg/kg) diluída em 120 μ L tampão citrato 0,1M, pH 4,5, em ratos submetidos previamente a jejum alimentar de 16 horas. Os animais utilizados como controles negativos da indução (animais normais) receberam apenas o tampão citrato 0,1M, pH 4,5. Após 7 dias da indução, a glicemia de jejum foi medida para confirmação do quadro diabetogênico (DELFINO et al., 2002; MYTHILI et al., 2004; FRODE, MEDEIROS, 2008). A estreptozotocina foi escolhida por ser um agente químico com citotoxicidade específica para as células beta. Essa droga causa insuficiência insulínica primária do pâncreas, provocando uma resposta trifásica nos níveis glicêmicos durante as primeiras horas da administração, seguida do estabelecimento de diabetes permanente nas 24 horas subsequentes (LETTO et al., 2003).

Animais que receberam estreptozotocina durante a indução e apresentarem glicemias de jejum acima de 150 mg/dl foram considerados diabéticos e utilizados no estudo, portanto o estudo foi conduzido com animais com diabetes moderada (AMDCC, 2003). As dosagens de glicemia foram realizadas na veia caudal e manteve-se jejum alimentar prévio de 8 horas.

4.6.3 Tratamento e Eutanásia

Durante 14 dias os animais foram tratados com os respectivos tratamentos, por meio de gavagem e monitorados quanto ao comportamento, variação de peso corporal, a ingesta alimentar e o consumo de água. Durante o tratamento dois animais foram a óbito sendo um do grupo LQM 13 normal e outro do LQM 13 diabético. Não é possível afirmar que foi devido a ingestão do derivado. Como a gavagem possui risco, pode ter acontecido por erro de trajeto durante a administração.

Após esse período, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma associação entre Xilasina (10 mg/kg) e Cetamina (90 mg/kg) (CONCEA, 2013) e eutanasiado por exsanguinação com toracotomia e punção cardíaca para coleta de 4 a 5 ml de sangue para análises bioquímicas, de hemograma, hemoglobina glicada, frutossamina, para avaliação da atividade antiglicante in vivo e outros exames para verificação da função renal, hepática e taxas de colesterol.

4.6.4 Avaliação histológica

Os órgãos vitais (coração, rim e fígado) foram coletados, pesados e avaliados macroscopicamente. Para o cálculo da massa desses órgãos considerou-se o valor relativo, conforme equação a seguir:

- Massa relativa = (massa dos órgãos / massa corporal) X 100

Após foram acondicionados em formaldeído 10% (v/v) visando o preparo de lâminas histológicas. Os fragmentos foram processados de acordo com as técnicas de rotina para inclusão em blocos de parafina, cortados em micrótomo a 3-4 micrômetros e corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (H.E.). Avaliou-se as lâminas. Os órgãos descritos acima foram avaliados junto a uma patologista, Ana Paula Fernandes Barbosa, Professora da Universidade Federal de Alagoas, quanto à presença ou não de alterações histopatológicas.

4.7 Análises estatísticas

Para auxiliar a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0. Os resultados foram expressos em média±erro padrão. As diferenças foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Dunnett. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dezenove derivados da aminoguanidina referentes a esta pesquisa foram identificados pela sigla LQM, seguidos de um número conforme apresentados na tabela quatro. Eles foram sintetizados pelo grupo de pesquisa e submetidos a pesquisa *in vitro* para toxicidade frente a células tumorais e toxicidade celular em macrófagos (FRANÇA et al., 2016). Este trabalho foi responsável por avaliar as atividades antiglicante e antidiabética dos mesmos. Com eles foram realizados todos os testes *in vitro* apresentados a seguir e para os testes *in vivo* utilizou-se o LQM 3, LQM 13 e LQM 15.

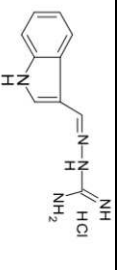
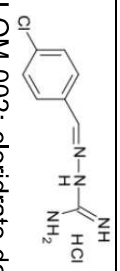
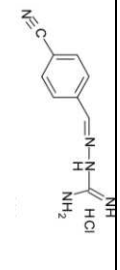
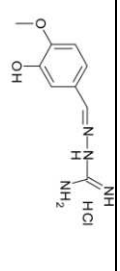
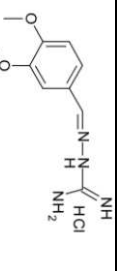
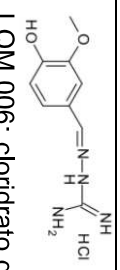
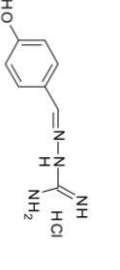
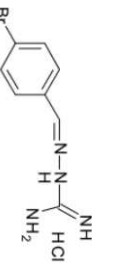
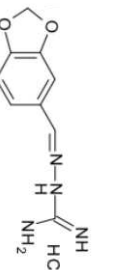
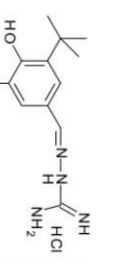
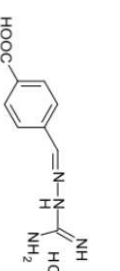
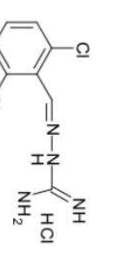
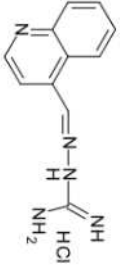
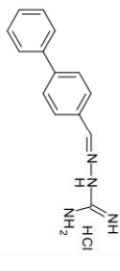
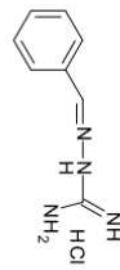
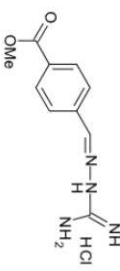
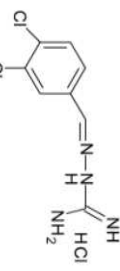
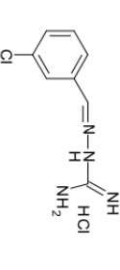
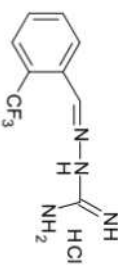
Eles foram obtidos através do emprego de técnicas sintéticas distintas, banho em óleo aquecido (tradicional) e irradiação por micro-ondas (moderna) (EPIFÂNIO, 2011; MARTINS, 2004). De maneira geral, estes derivados sintéticos foram obtidos a partir de uma reação de condensação entre o cloridrato de aminoguanidina e um aldeído aromático, em proporções estequiométricas.

5.1 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

O teste de citotoxicidade é uma importante ferramenta para estudos com produtos naturais ou sintéticos, para o desenvolvimento de potenciais fármacos. É preciso verificar nos estágios iniciais da pesquisa a toxicidade celular, pois o equilíbrio entre o efeito toxicológico e farmacológico de um composto é requisito importante para aplicabilidade como agente terapêutico.

Por isso, diversos estudos a exemplo de Marino et al. (2015), o qual utilizaram o MTT como ferramenta em estudos com um anticancerígeno, Mehrabadi et al. (2015) que testaram a pioglitazona, utilizada para o tratamento da diabetes mellitus tipo II, em mitocôndrias isoladas de ratos e Mahomoodally et al. (2012) que realizaram teste semelhante ao deste estudo porém, com linhagem celular diferente (3T3), com plantas medicinais utilizadas nas Ilhas Mascarenhas, avaliando o potencial antioxidante, antiglicante e citotóxico, com concentrações entre 250-2000 µg/ml tendo como controle a aminoguanidina, dentre outros estudos que utilizam tal ferramenta para triagem inicial em seus experimentos.

Tabela 4 - Nomenclatura e estruturas químicas dos derivados aminoguanidínicos.

 <p>LQM 001: cloridrato de 2-(1H-indol-3-ilmetileno)hidrazinacarbonylamidamida</p>	 <p>LQM 002: cloridrato de 2-[(4-clorofenil)metileno]hidrazinacarbonylamidamida</p>	 <p>LQM 003: cloridrato de 2-[(4-cianofenil)metileno]hidrazinacarbonylamidamida</p>	 <p>LQM 004: cloridrato de 2-[(3-hidroxi-4-metoxifenil)metileno]hidrazinacarbonylamidamida</p>	 <p>LQM 005: cloridrato de 2-[(3,4-dimetoxifenil)metileno]hidrazinacarbonylamidamida</p>	 <p>LQM 006: cloridrato de 2-[(4-hidroxi-3-metoxifenil)metileno]hidrazinacarbonylamidamida</p>
 <p>LQM 007: cloridrato de 2-[(4-hidroxi)metileno]hidrazinacarbonylamidamida</p>	 <p>LQM 008: cloridrato de 2-[(4-bromofenil)metileno]hidrazinacarbonylamidamida</p>	 <p>LQM 009: cloridrato de 2-(1,3-benzodioxol-5-ilmetileno)hidrazinacarbonylamidamida</p>	 <p>LQM 010: cloridrato de 2-[(3,5-di-tert-butil-4-hidroxi)metileno]hidrazinacarbonylamidamida</p>	 <p>LQM 011: cloridrato de 4-[[2-(aminoiminometil)hidrazinilideno]metil]ácido benzoico</p>	 <p>LQM 012: cloridrato de 2-[(2,6-diclorofenil)metileno]hidrazinacarbonylamidamida</p>
 <p>LQM 013: Cloridrato de 2-(4-quinolinilmetileno)hidrazinacarbonylamidamida</p>	 <p>LQM 014: Cloridrato de 2-[(1,1'-bifenil]-4-ilmetileno)hidrazinacarbonylamidamida</p>	 <p>LQM 015: Cloridrato de 2-(fenilmetileno)hidrazinacarbonylamidamida</p>	 <p>LQM 016: Cloridrato de 4-[[2-aminoiminometil]hidrazinilideno]metil]éster metílico do ácido benzoico</p>	 <p>LQM 017: Cloridrato de 2-[(3,4-diclorofenil)metileno]hidrazinacarbonylamidamida</p>	 <p>LQM 018: cloridrato de 2-[(3-clorofenil)metileno]hidrazinacarbonylamidamida</p>
 <p>LQM 020: cloridrato de 2-[[2-(trifluorometil)metileno]hidrazinacarbonylamidamida</p>					

Neste ensaio a citotoxicidade foi avaliada com a ajuda de um corante vital, o MTT 3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide. A prova do MTT é um dos indicadores colorimétricos de viabilidade celular mais utilizados, sendo capaz de avaliar a função celular mitocondrial de acordo com a redução enzimática do sal de tetrazólio pelas desidrogenases mitocondriais nas células viáveis (MOSMANN, 1983).

O parâmetro de avaliação observado é a porcentagem de células que se mantêm viáveis após exposição a determinado composto, sendo considerada citotóxica quando apresentar uma viabilidade inferior a 80% de células, quando comparadas com as células que receberam apenas o meio de cultivo celular e que tiveram 100% de viabilidade celular (DEZENGRINI et al., 2010)

Os resultados obtidos com o ensaio MTT indicam que em células J774A.1, após o tratamento com os derivados da aminoguanidina, na concentração de 10 μM , dezessete dos dezenove derivados não apresentaram redução na viabilidade celular, ou seja, foram seguras e não mostraram qualquer efeito tóxico quando as células foram tratadas com a menor concentração do experimento (Figura 11).

No entanto, observa-se também que com o aumento de dez vezes da concentração inicial, ou seja, com 100 μM da amostra, dez derivados se mantiveram dentro padrão de viabilidade aqui adotados que foi de 80% de células viáveis. Portanto, pode-se sugerir que a avaliação citotóxica dos compostos sobre as células é dose dependente, quanto maior a concentração dos derivados, maior a toxicidade, com menor viabilidade celular.

Também em um padrão dependente da concentração, Chipiti et al. (2015), estudando o extrato etanólico da raiz da *Albizia antunesiana* com a linhagem HEK 293 observou que diminuiu a viabilidade celular a medida em que se aumentava as concentrações testadas (50-200 $\mu\text{g} / \text{ml}$).

Em um ensaio com a pioglitazone, um antidiabético, Mehrabadi et al. (2015), também utilizou as concentrações de 10, 100 e 1000 μM para os testes com mitocôndrias e obteve resultados semelhantes ao deste estudo.

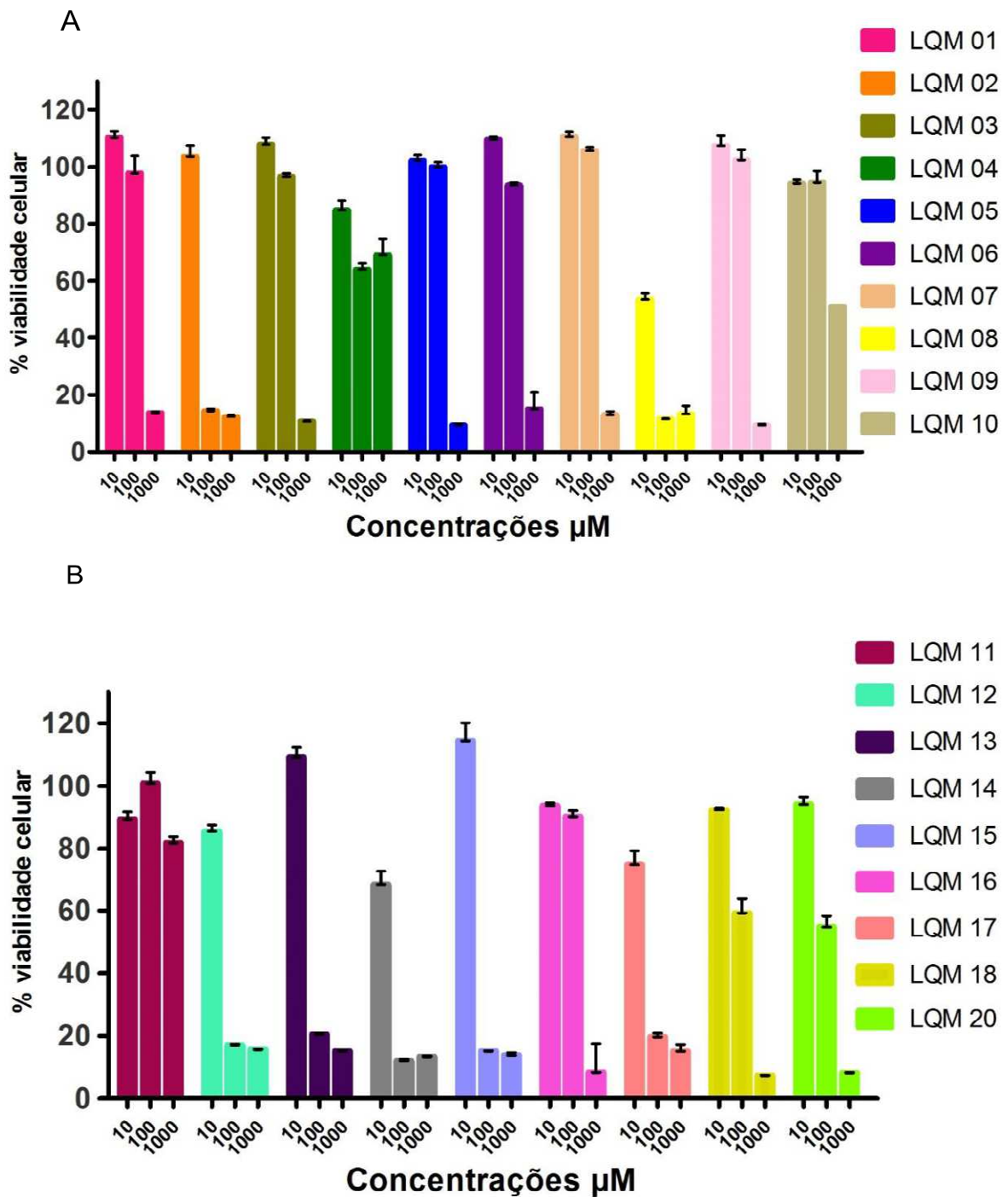


Figura 11– Avaliação dos derivados aminoguanidínicos nas concentrações de 10, 100 e 1000 μM , na redução da porcentagem de viabilidade celular em macrófagos da linhagem J774, pelo ensaio colorimétrico com MTT. Na figura A do derivado LQM 01 ao LQM 10 e na figura B do derivado LQM 11 ao LQM 20. Os resultados representam a média \pm erro padrão de três repetições.

5.2 Avaliação de atividade antiglicante in vitro

O sistema de empregar glicose e BSA para estudos de glicação não enzimáticos in vitro é um modelo amplamente utilizado. As proteínas podem ser modificadas quando expostas a açúcares redutores através do processo de glicação espontânea (SUN et al., 2010). Neste estudo, o modelo BSA-glicose foi adotado para selecionar os derivados aminoguanidínicos com potenciais antiglicante.

A aminoguanidina e a quercetina foram padrões utilizados como controles positivos na inibição da formação de AGEs. Ambos inibiram respectivamente, 73,61% e 82,43% dos AGEs (Figura 12). Portanto, obtive-se resultados promissores com sete derivados aminoguanidínicos. São eles: LQM3, LQM5, LQM6, LQM7, LQM13, LQM16 e LQM17, pois não apresentaram diferença estatística quando comparado a aminoguanidina. Já quando comparados com a quercetina o derivado LQM13 foi o que não apresentou diferença estatística, considerando $p < 0,05$.

Além disso, observou-se que os derivados LQM4, LQM12, LQM14, LQM15, LQM18 e LQM19 conseguiram inibir mais que 50% da formação, demonstrando também ter um forte potencial para ser um anti-AGE. Já que alguns estudos consideram 50% como parâmetro de inibição (BRASI, 2012; JHAUMEER-LAULLOO et al., 2012; ZHANG et al., 2015). Ressalta-se que estes resultados são referentes aos testes na concentração de 2mg/mL com leitura em espectrofluorimétrica de 48 horas.

Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com extratos de microalgas, cuja frações de acetato de etila de *Chlorella* e *Nitzschia laevis* apresentaram percentuais de inibição de 88,02% e 91,68%. Essa capacidade antiglicante destas microalgas foi atribuída a compostos fenólicos, tais como os flavonóides, taninos e ácidos fenólicos que possuem forte capacidade antioxidante devido às suas propriedades redox. Tais efeitos antioxidantes contribuem para a subsequente inibição no processo de glicação de proteínas (SUN et al., 2010). Porém, quando se reporta a estudos com plantas esses resultados são instáveis, pois no isolamento dos compostos pode acontecer a perda das propriedades que levaram a capacidade de inibição.

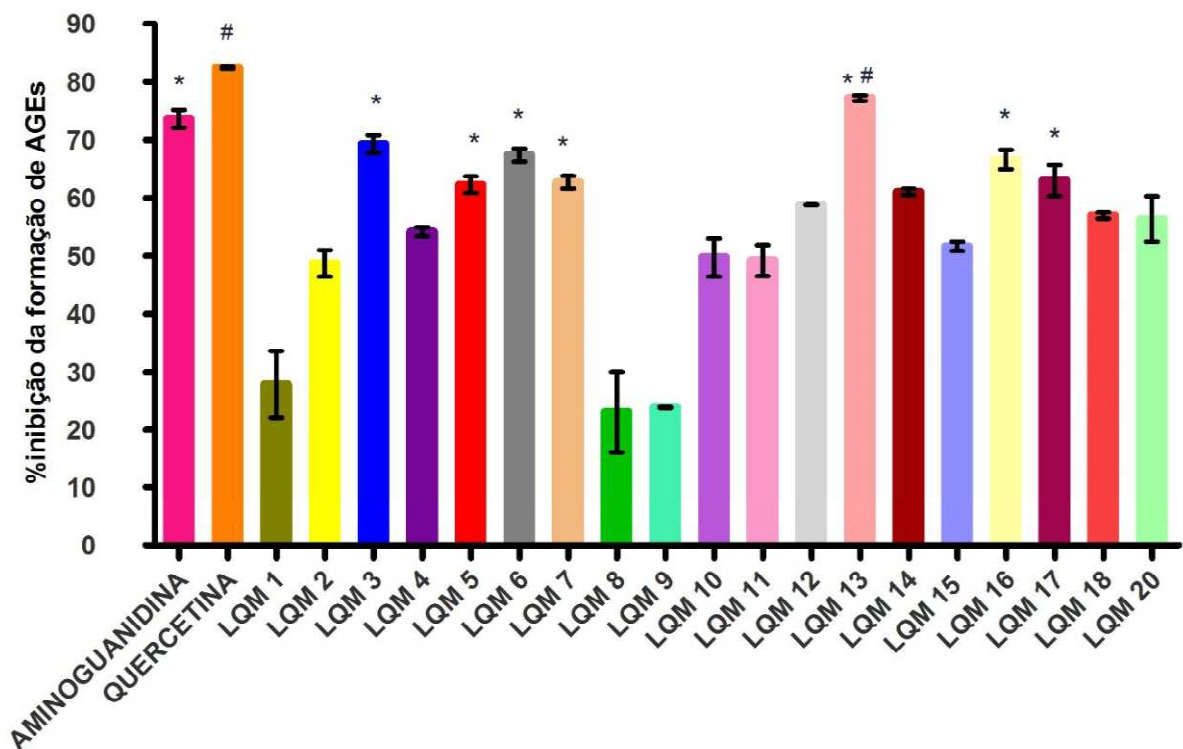


Figura 12 – Inibição da formação de AGEs formados de Glicose – BSA, pelos derivados aminoguanidínicos e seus controles na concentração de 2,0 mg/mL com leitura de 48 horas. Notas: Médias de triplicata. * Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado a aminoguanidina, # Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado a quercetina após ANOVA com pós-teste de Dunnett considerando $p < 0,05$.

Em um ensaio para estudar o potencial antiglicante de compostos derivados da *Cuminum cyminum* L., Zhang et al. (2015) também usou como controle positivo a aminoguanidina, porém o açúcar utilizado na produção do AGE foi a frutose. Seus resultados chegaram a um percentual de inibição também acima de 50% para alguns compostos principalmente os ricos em flavonóides, mas a aminoguanidina inibiu apenas 34,1%.

Com os resultados deste screening preliminar, novos testes foram realizados com os derivados LQM 3, LQM 13 e LQM 15, utilizando concentrações entre 0,5 a 2,5 mg/mL e leitura seriada a cada sete dias, em até 49 dias, como pode ser observado na figura 13.

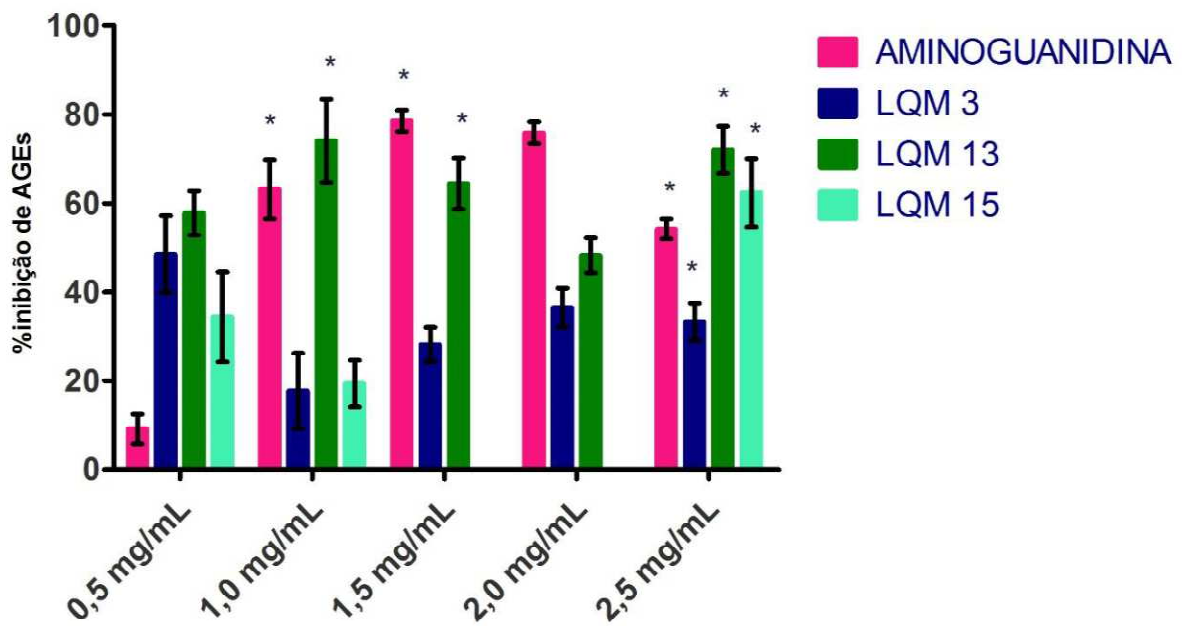


Figura 13 – Inibição da formação de AGEs formados de Glicose – BSA, pelos derivados aminoguanidínicos LQM 3, LQM 13 e LQM 15, nas concentrações de 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL, 1,5 mg/mL, 2,0 mg/mL e 2,5 mg/mL pelo período de 49 dias. Notas: Médias de triplicata. * Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado a aminoguanidina após ANOVA com pós-teste de Dunnett considerando $p < 0,05$.

Esses resultados evidenciam que o derivado LQM 13 apresentou resultados semelhantes ou superiores a aminoguanidina em quatro das cinco concentrações estudadas, além disso o derivado LQM 15 na concentração de 2,5 mg/mL também apresentou resultado significativo. Com isso, conseguiu-se com os resultados apresentados aprimorar a técnica apresentada por Perez Gutierrez (2012), o qual em estudo com extrato metanólico *Origanum majorana* L. conseguiu percentuais de inibição, tanto com o extrato como com controle positivo, a aminoguanidina, menores do que esta pesquisa. As concentrações utilizadas por ele foram entre 0,1 a 0,5 mg/mL e o maior percentual de inibição foi 64,7% para o extrato metanólico e 58,3% para aminoguanidina.

A partir dos dados referentes a citotoxicidade celular realizada no ensaio do MTT e da capacidade de inibição da formação dos produtos finais da glicação avançada foram selecionados os derivados LQM 03 e LQM 13 para os ensaios in vivo. Além do derivado LQM 15 que apesar de não ter sido um dos melhores para atividade antiglicante foi incluído para os testes seguintes, por já ter apresentado potencial antidiabético em um estudo preliminar feito por nosso grupo de pesquisa (SARMENTO et al., 2014).

5.3 Estudo de toxicidade de dose aguda

Os estudos de toxicidade aguda verificam a capacidade de determinada substância em instalar um processo patológico devido a sua introdução no organismo. Por meio deste estudo é possível obter dados avaliando a dosagem e efeitos provocados, o que irá determinar seu potencial de toxicidade.

O teste de toxicidade aguda deve priorizar a via pretendida para utilização pelos humanos. Neste estudo fez-se a opção por administração via oral usando a gavagem para se ter a segurança na dose administrada (CUNHA et al., 2009).

Os derivados aminoguanidínicos testadas foram a LQM3, LQM13 e a LQM15, nas concentrações de 2 mg, 10 mg e 100 mg/Kg de peso. Após administração os animais foram observados durante as duas primeiras horas e após seis horas da ingestão. Nos primeiros dez minutos após a ingestão do derivado LQM 15, nas concentrações de 10mg e 100mg, os animais apresentaram letargia mas respondiam a estímulo mecânico, sendo mais acentuada nos que receberam 100 mg. Nos outros animais não foram observadas alterações no comportamento dos mesmos.

Durante os 14 dias que se seguiram não houve mudança de comportamento que pudesse ser atribuída a administração dos derivados. Além disso, o percentual de letalidade foi nulo durante todo o experimento indicando assim, baixo grau de toxicidade para essas concentrações.

A toxicidade sistêmica pode ser identificada pela diminuição do peso corporal dos animais e por alterações no consumo de água e ração, sendo tais sinais importantes para a avaliação da toxicidade de uma substância, pois fornece informações sobre o estado geral de saúde dos animais. Uma diminuição na ingestão alimentar, ocasionando mudança nos pesos corporais é um dos primeiros sinais críticos de toxicidade (ROCHA et al., 2012; ASHAFI; KAZEEM, 2015).

Tabela 5 – Parâmetros de massa corporal, consumo de ração e água dos animais em ratos Wistar (n=6) tratados em dose única com derivados aminoguanidínicos.

GRUPOS	PARÂMETROS		
	Massa corporal (g)	Consumo de água (mL)	Consumo de Ração (g)
CN	271,1 _± 3,045	36,55 ^b _± 1,040	22,23 ^c _± 0,804
LQM03/2mg	247,2 ^a _± 1,890	32,34 ^b _± 0,9739	21,40 ^c _± 0,581
LQM03/10 mg	240,3 ^a _± 1,315	32,63 ^b _± 1,352	22,40 ^c _± 0,770
LQM03/100 mg	250,0 ^a _± 1,552	34,17 ^b _± 1,290	22,48 ^c _± 0,857
LQM13/2 mg	255,1 ^a _± 1,523	32,78 ^b _± 1,454	22,31 ^c _± 1,095
LQM13/10 mg	257,5 ^a _± 2,138	32,64 ^b _± 1,218	23,59 ^c _± 1,095
LQM13/100 mg	240,7 ^a _± 2,841	32,22 ^b _± 1,318	21,50 ^c _± 0,737
LQM15/2 mg	261,3 ^a _± 2,935	35,56 ^b _± 1,598	22,55 ^c _± 0,831
LQM15/10 mg	268,6 ^a _± 3,160	36,11 ^b _± 1,232	22,50 ^c _± 0,723
LQM15/100 mg	256,8 ^a _± 2,395	32,35 ^b _± 1,034	22,13 ^c _± 1,285

Notas: Médias \pm erro padrão. Derivados aminoguanidínicos e controle negativo (CN). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si utilizando ANOVA com pós teste de Dunnett considerando $p < 0,05$.

Neste estudo não foi encontrada diferença significativa entre o controle negativo e os grupos experimentais que receberam derivados aminoguanidínicos, mesmo os animais que receberam os derivados LQM15 nas concentrações de 10 e 100 mg. Analisando a tabela cinco pode-se observar que os animais aqui estudados mantiveram o mesmo padrão consumo. Pequenas diferenças podem ser observadas pelas perdas comuns no ato da alimentação e ingestão hídrica nas gaiolas.

Um rato adulto, pesando cerca de 300g, consome aproximadamente cinco gramas de ração e 10mL de água para cada 100g de peso corpóreo por dia (CARVALHO et al., 2009). Contudo, o consumo varia de acordo com a temperatura e umidade ambiental, estado de saúde, vida sexual e hora do dia, sendo que os ratos possuem hábitos noturnos e alimentam-se quase sempre à noite.

Ao padronizar a avaliação da função renal de ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar do biotério da Universidade Federal de Juiz de Fora, Castro et al. (2013),

encontrou resultados semelhantes para consumo de ração e ingestão hídrica aos deste estudo.

Trabalhos envolvendo estudos pré-clínicos utilizam parâmetros bioquímicos, hematológicos e anatomopatológicos para avaliar possíveis sinais de toxicidade após a exposição às substâncias testadas. Todos os estudos encontrados são unânimes ao afirmar que existem variações de valores hematológicos e bioquímicos em animais de experimentação devido as condições de cada biotério e ao tipo de estudo realizado (DANTAS et al., 2006; SANTOS, 2010; BRANCO et al., 2011; ORLANDINI, 2012).

Os valores hematológicos apresentados em função dos diferentes tratamentos e concentrações mostram poucas alterações, estando dentro dos valores de referência, mesmo havendo diferença estatística significativa entre alguns grupos. Tais alterações não comprometeram a fisiologia orgânica dos animais tratados. Portanto, com os dados hematológicos apresentados não foi possível identificar toxicidade nos derivados estudados.

Os resultados apresentados foram comparados estatisticamente ao controle negativo, o qual recebeu apenas H₂O, bem como a valores de referência padrão apresentados na literatura (CARVALHO et al., 2009; ORLANDINI, 2012; ROCHA et al., 2012; VIVAS, 2014). Os dados hematológicos desta pesquisa estão expressos na tabela seis.

Tabela 6 – Parâmetros hematológicos e leucometria obtidos de ratos Wistar (n=6) tratados com dose única de derivados aminoguanidínicos.

GRUPOS	PARÂMETROS						Leucometria global
	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	HCM (pg)	VCM (fL)	CHCM (%)		
CN	45,3 ^a ±1,229	12,9 ^b ±1,087	24,6 ^c ±2,157	85,9 ^d ±2,049	28,53 ^e ±2,153	3150 ^f ± 328,6	
LQM03/2mg	46,9 ^a ± 0,872	18,7 [±] 1,608	29,0 ^c ±1,029	72,9 ^d ±2,630	40,03 [±] 1,630	3525 ^f ±231,2	
LQM03/10 mg	47,7 ^a ±0,843	21,0 [±] 0,647	30,7 [±] 2,245	70,0 [±] 2,340	44,32 [±] 3,862	3433 ^f ±470,4	
LQM03/100 mg	47,8 ^a ±0,946	23,0 [±] 1,101	34,5 [±] 1,860	71,5 ^d ±2,626	48,30 [±] 2,580	4450 ^f ±636,4	
LQM13/2 mg	N/D	12,4 ^b ±0,378	24,9 ^c ±0,8310	N/D	N/D	3625 ^f ±289,5	
LQM13/10 mg	N/D	12,0 ^b ±0,386	23,1 ^c ±0,5432	N/D	N/D	4300 ^f ±630,1	
LQM13/100 mg	N/D	11,0 ^b ±0,130	22,0 ^c ±0,5546	N/D	N/D	3883 ^f ±517,5	
LQM15/2 mg	44,7 ^a ±1,626	10,4 ^b ±0,982	22,4 ^c ±1,696	97,8 ^d ±6,536	23,10 ^e ±1,601	2725 ^f ±318,0	
LQM15/10 mg	45,3 ^a ±1,520	11,0 ^b ±0,602	22,8 ^c ±0,555	94,3 ^d ±4,750	24,42 ^e ±1,232	2717 ^f ±431,6	
LQM15/100 mg	45,0 ^a ±1,932	10,7 ^b ±1,379	23,0 ^c ±1,754	99,4 ^d ±3,192	23,48 ^e ±2,409	2417 ^f ±297,7	

Notas: Médias ± erro padrão. HCM- hemoglobina corpuscular média; VCM – volume corpuscular médio; CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si utilizando ANOVA com pós teste de Dunnett considerando p<0,05.

Um dado importante a ser descrito sobre o derivado LQM 13 é que independente da concentração administrada, ou seja a 2mg/Kg, a 10 mg/Kg ou a 100mg/Kg de peso do animal, todas as amostras de sangue coletadas coagularam de forma imediata, não sendo possível estabelecer valores de hematócrito, VCM e CHCM, neste caso apenas a hemoglobina foi calculada. Contudo, a relevância clínica de tais achados produzidos por esse derivado precisa de estudos mais extensivos, para que possa ser elucidado essa potencial capacidade de coagulação.

A leucometria global teve valores baixos em todos os grupos. A literatura confirma que sangue coletado do ventrículo ou de veia cava possuem valores menores quando comparados com o sangue retirado da veia caudal. A razão desta diferença não é consenso dentro dos estudos.

Dantas et al. (2006), apresentam algumas razões para esses achados. Primeiro, a diferença poderia ser atribuída à uma demanda imunológica do animal nos possíveis locais onde as amostras de sangue são coletadas por exemplo, na cauda, no olho ou no coração. Outra teoria é que a resistência vascular e a estase sanguínea, gerada na superfície dos leitos capilares, poderia ocasionar uma maior contagem de leucócitos nas amostras de sangue coletadas da cauda. Por fim, o estresse induzido pela eutanásia poderia interferir na contagem de leucócitos.

Testes bioquímicos avaliando a função renal e hepática dos animais também foram realizados e são apresentados nas figuras 14 e 15. Os valores de colesterol, triglicerídeos, LDL, HDL e VLDL também foram mensurados mas, não houve alterações patológicas, bem como diferença significativa entre os grupos (dados não apresentados).

Com relação a função renal, observou-se como parâmetros ureia, creatinina, proteína total e frações (albumina e globulina). Os resultados indicam que os animais tiveram a função renal preservada, independente da concentração ingerida, mesmo quando os valores tiveram diferença significativa estatisticamente, comparando com o controle negativo, estes permaneceram dentro dos valores de referência descritos na literatura (CASTRO et al., 2013; ASHAFA; KAZEEM, 2015). Esses dados corroboram com os histopatológicos apresentados na figura 16.

Avaliando a toxicologia em ratos Wistar do Extrato hidroetanólico de *Dianthus basuticus*, planta utilizada na medicina tradicional chinesa como antidiabética, Ashafa e Kazeem (2015) também não encontraram alterações nos

parâmetros da função renal avaliados, creatinina, ureia, ácido úrico, bem como de sódio, potássio.

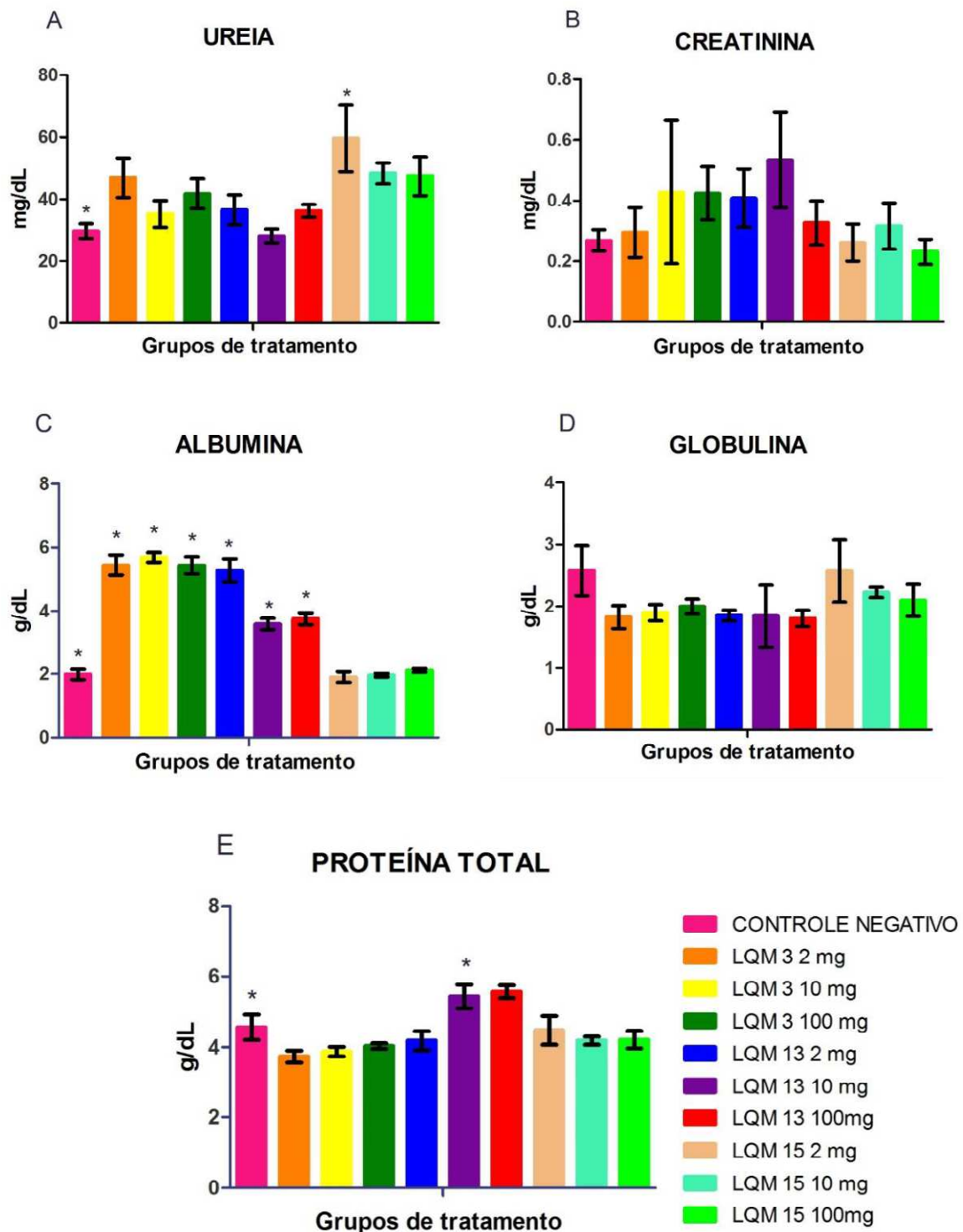


Figura 14 – Valores bioquímicos da função renal ratos Wistar do teste de toxicidade aguda tratados em dose única com derivados aminoguanidínicos e o controle negativo (N=6). Notas: Médias \pm erro padrão. Derivados aminoguanidínicos (LQM) e controle negativo (CN). Médias seguidas de * diferem do CN utilizando ANOVA com pós teste de Dunnett considerando $p < 0,05$.

Os resultados deste estudo revelaram que não houve um aumento nos níveis de TGO, TGP, GGT e fosfatase alcalina, ao contrário, em alguns grupos os níveis ficaram abaixo do controle negativo (Figura 14), indicando que a ingestão dos derivados aminoguanidínicos aparenta não causar danos hepáticos. Esses dados corroboram com os histopatológicos dos fígados estudados (Figura 17).

Estas enzimas estão presentes em várias células do nosso corpo e apresentam-se em grande quantidade nos hepatócitos. Por isso, são consideradas indicadores altamente sensíveis de dano hepatocelular e, dentro de certos limites, podem fornecer uma taxa quantitativa do grau de danificação sofrido pelo fígado (ASHAFA; KAZEEM, 2015).

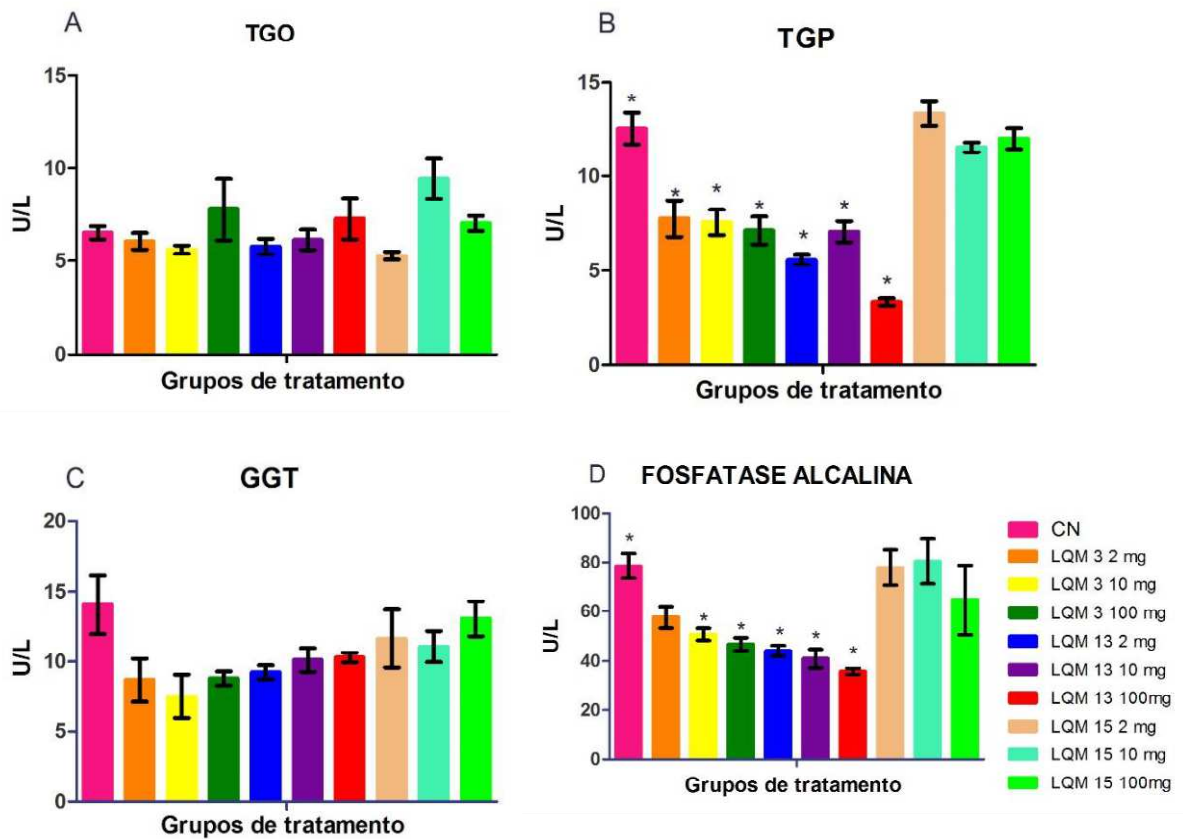


Figura 15 – Valores bioquímicos da função hepática ratos Wistar do teste de toxicidade aguda tratados em dose única com derivados aminoguanidínicos e o controle negativo (N=6). Notas: Médias \pm erro padrão. Derivados aminoguanidínicos (LQM) e controle negativo (CN) TGO= transaminase glutâmico oxalacética, TGO= alanina aminotransferase, GGT= Gama-Glutamil Transferase. Médias seguidas de * diferem do CN utilizando ANOVA com pós teste de Dunnett considerando $p < 0,05$.

Dentre os parâmetros de avaliação morfológica, o peso dos órgãos coração, fígado e rim não mostraram alterações macroscópicas e a massa dos órgãos não teve diferença estatística significativa entre os animais que receberam os derivados e o controle negativo.

Foi possível observar que tanto os índices de massa cardíaca ($p = 0,5667$) quanto hepática ($p = 0,7072$) e renal ($p = 0,5474$) não possuem diferença estatística significativa, corroborando com resultados obtidos em outros estudos, a exemplo de Rocha et al. (2012) e Parasuraman et al. (2015). A figura 16 mostra os resultados desses parâmetros morfológicos avaliados.

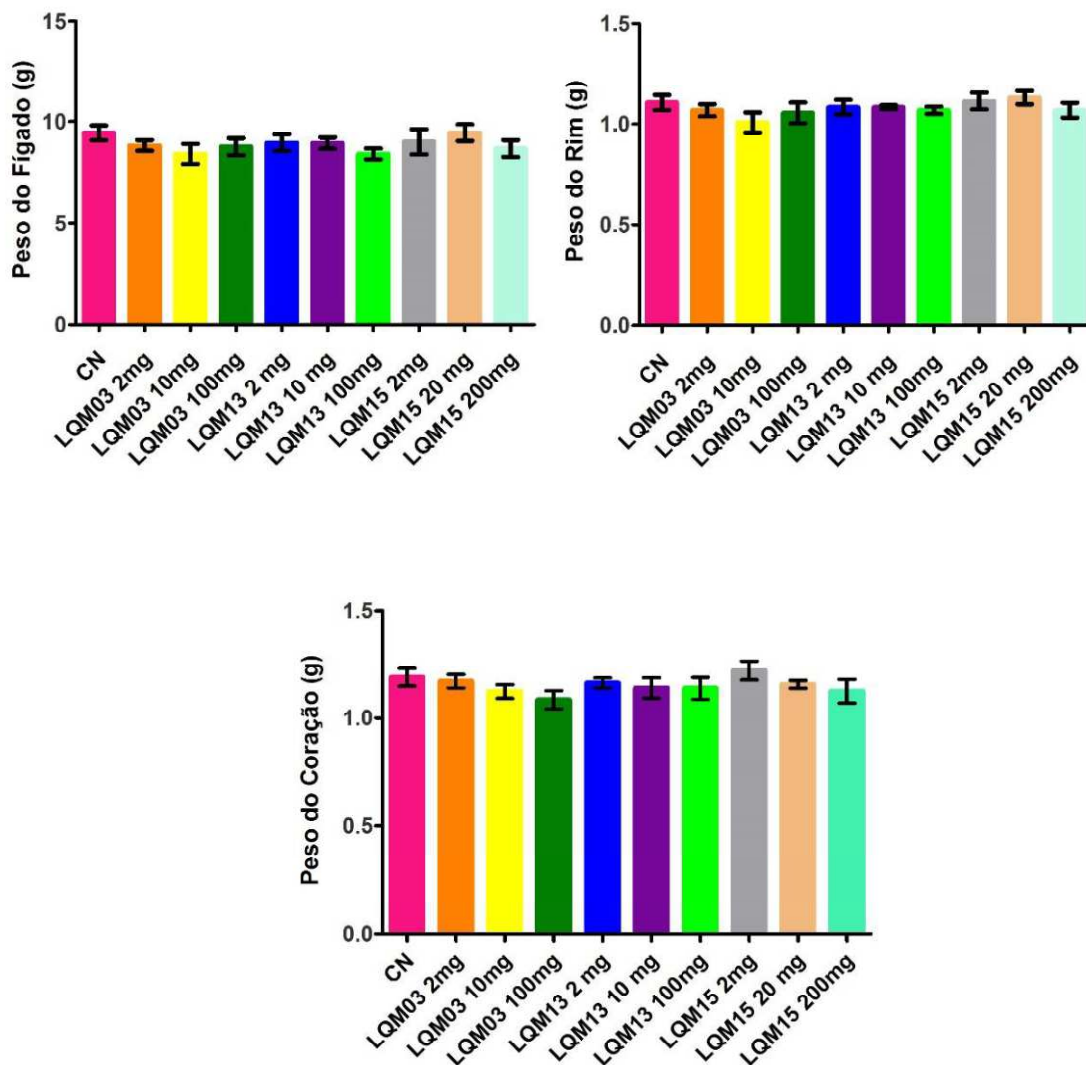


Figura 16 – Valores do peso dos órgãos fígado, rim e coração dos ratos Wistar tratados com dose única de derivados aminoguanidínicos e seu controle negativo (N=6). Notas: Médias \pm erro padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o CN – controle negativo e os demais grupos após ANOVA com pós-teste de Dunnett considerando $p < 0,05$.

Nesses mesmos órgãos foram realizados exames histopatológicos para avaliação de possíveis alterações morfológicas que evidenciassem alguma toxicidade dos derivados, conforme pode ser observado nas figuras 17, 18, e 19. Após avaliação das lâminas, tanto do grupo controle quanto daqueles tratados com os derivados não se detectou alterações irreversíveis como necrose e apoptose celular. Estes resultados corroboram com a avaliação bioquímica que não mostrou alterações metabólicas que evidenciassem nefro e/ou hepatotoxicidade.

No rim (figura 17), os derivados aminoguanidínicos independente da concentração administrada não promoveu alterações histológicas. A região cortical e medular encontrou-se preservadas, os túbulos contorcidos proximais e distais e o segmento de ducto coletor não evidenciaram alterações. Não foram encontrados focos de inflamação ou fibrose, congestão ou áreas de hemorragia, ou seja sem sinais de glomerulonefrite ou necrose tubular. Apenas células anucleadas (Figura 17 F) foram encontradas em todos os grupos, o que pode caracterizar uma metabolização renal dos derivados.

Em um estudo semelhante realizado com o extrato etanólico da *Terminalia chebula*, planta indiana utilizada popularmente como antidiabético, a planta bem como o seu controle que foi a aminoguanidina (100 mg/Kg) não apresentou ação tóxica nos rins e no fígado, de ratos que também tiveram diabetes induzida por estreptozotocina (KIM et al., 2011).

O fígado (figura 18) apresenta arquitetura preservada, com morfologia e histologia descrita na literatura em mamíferos, presença da tríade portal que é composta por um ramo da veia porta, um ramo da artéria hepática e um ramo de um ducto biliar (Figura 18 G). Os hepatócitos, um dos principais responsáveis pela metabolização de uma série de substâncias estavam sem alterações, bem como os capilares sinusoidais (Figura 18 D e I) e células de Kupffer (macrófagos hepáticos). Não foi encontrado esteatose hepática.

Nico et al. (2013), encontraram resultados semelhantes ao avaliar a ação da aminoguanidina sobre o fígado de ratos diabéticos submetidos a treinamento físicos. Os autores sugerem que a aminoguanidina não é hepatotóxica na dose de 1g/L e que seus efeitos são melhores em indivíduos submetidos a treinamento físico.

Para o coração (figura 19) não houve alterações específicas visíveis dos grupos tratados com os derivados em comparação com o controle negativo. Com este

tipo de coloração ressaltam-se as fibras musculares, que se mantiveram preservadas em todos os grupos.

A partir dos parâmetros de consumo de água e ração, peso corporal, perfil hematológico e bioquímico, além das análises anatopatológicas e ausência de óbitos durante o experimento, pode-se inferir que no estudo para toxicidade aguda, os derivados LQM 03, LQM 13 e LQM 15, nas concentrações de 2 mg/Kg, 10 mg/Kg e 100 mg/Kg não demonstraram toxicidade.

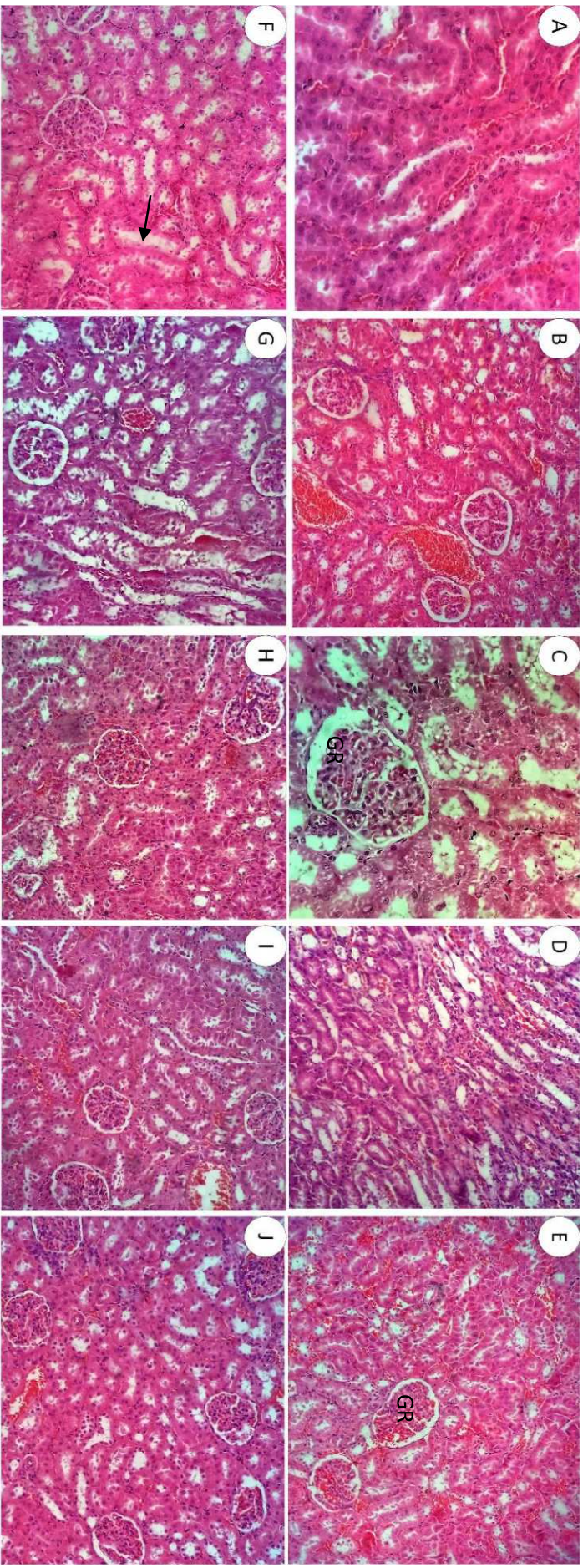


Figura 17 - Análise histopatológica renal da toxicidade aguda dose única, por via oral, dos derivados aminoguanidínicos e o controle negativo. (A) Controle negativo; (B) LQM 3 a 2 mg/Kg; (C) LQM 3 a 10 mg/Kg; (D) LQM 3 a 100 mg/Kg; (E) LQM 13 a 2 mg/Kg; (F) LQM 13 a 10 mg/Kg —→ Células anucleada; (G) LQM 13 a 100 mg/Kg; (H) LQM 15 a 2 mg/Kg; (I) LQM 15 a 10 mg/Kg; (J) LQM 15 a 100 mg/Kg. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento: 40x. GR – glomérulo.

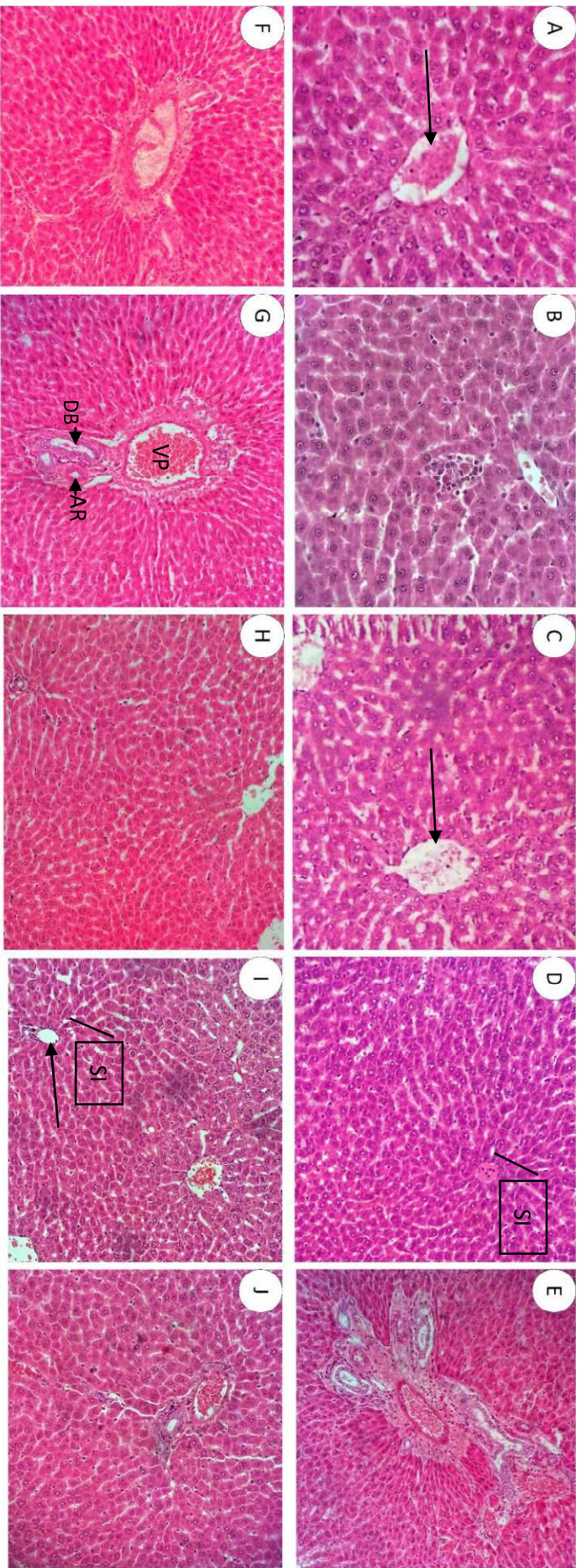


Figura 18 - Análise histopatológica hepática da toxicidade aguda dose única, por via oral, dos derivados aminoguanidínicos e o controle negativo. (A) Controle negativo; (B) LQM 3 a 2 mg/Kg; (C) LQM 3 a 10 mg/Kg; (D) LQM 3 a 100 mg/Kg; (E) LQM 13 a 2 mg/Kg; (F) LQM 13 a 10 mg/Kg; (G) LQM 13 a 100 mg/Kg; (H) LQM 15 a 2 mg/Kg; (I) LQM 15 a 10 mg/Kg; (J) LQM 15 a 100 mg/Kg. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento: 40x. — Espaço porta; SI Sinusoides; VP – veia porta; DB – ducto biliar; AR – artéria.

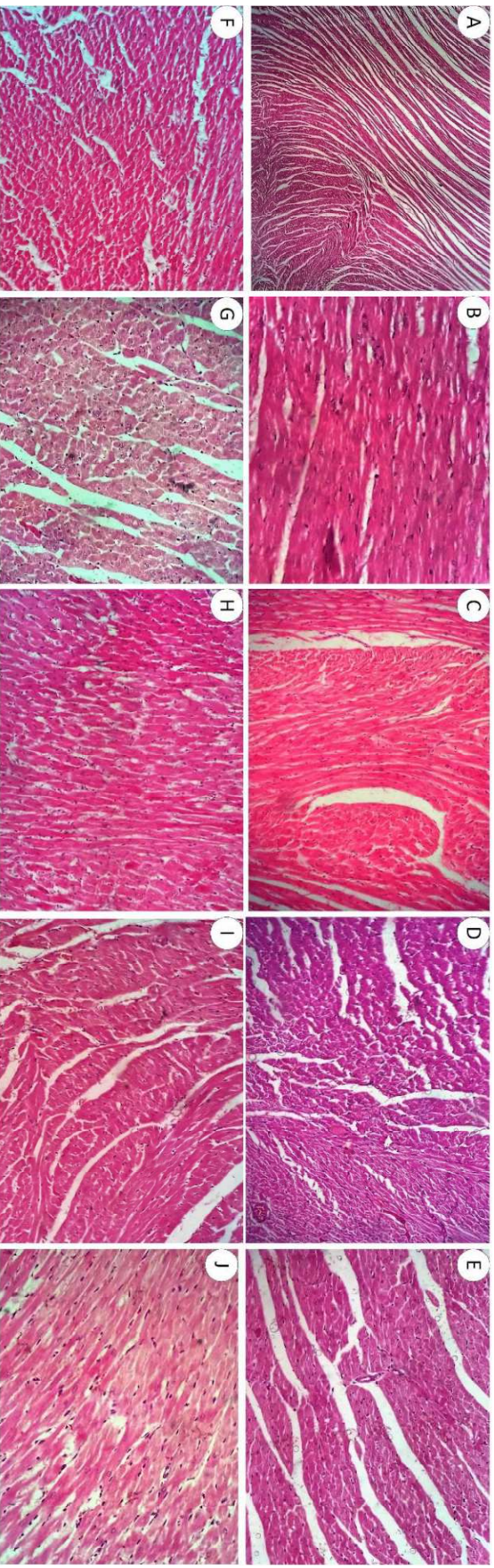


Figura 19 - Análise histopatológica cardíaca da toxicidade aguda dose única, por via oral, dos derivados aminoguanidínicos e o controle negativo. (A) Controle negativo; (B) LQM 3 a 2 mg/Kg; (C) LQM 3 a 10 mg/Kg; (D) LQM 3 a 100 mg/Kg; (E) LQM 13 a 2 mg/Kg; (F) LQM 13 a 10 mg/Kg; (G) LQM 13 a 100 mg/Kg; (H) LQM 15 a 2 mg/Kg; (I) LQM 15 a 10 mg/Kg; (J) LQM 15 a 100 mg/Kg. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento: 40x.

5.4 Avaliação da atividade antidiabética e antiglicante in vivo

No estudo para avaliação do potencial antidiabético e antiglicante in vivo a massa corporal dos animais teve pouca variação durante os 14 dias de estudo, apresentando leve aumento, tanto nos animais normais como nos diabéticos. Não foi observado sinais de polifagia e polidipsia, sintomas recorrentes em diabéticos, nos animais diabéticos tratados ao longo do experimento. A figura 20 apresenta a evolução no peso dos animais deste estudo.

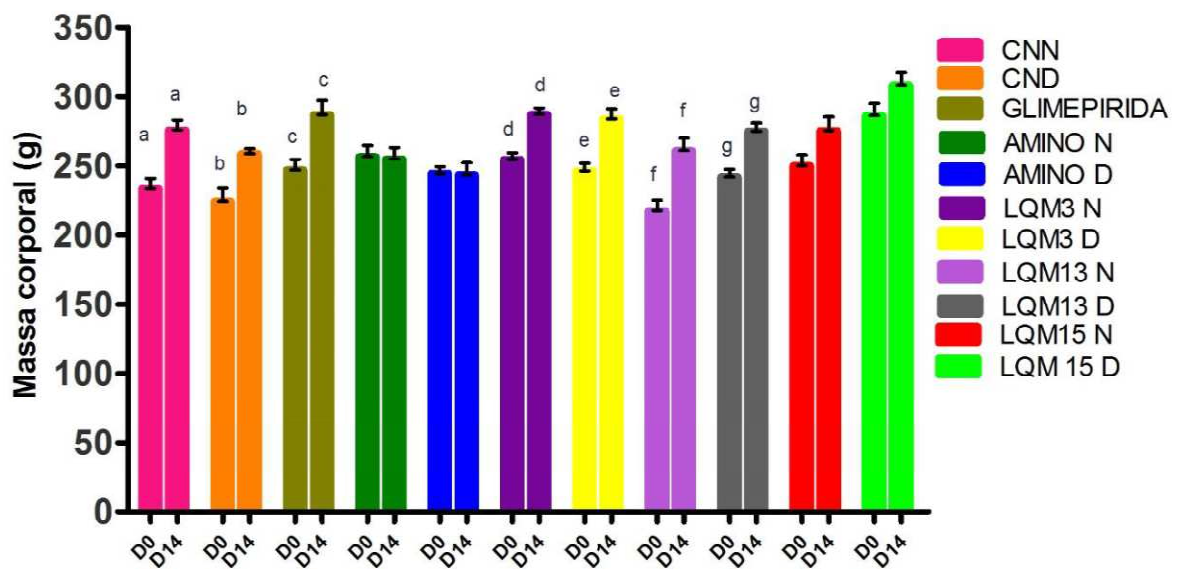


Figura 20 – Comparação entre a massa corporal inicial (D0) e final (D14) de ratos Wistar tratados com derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles. Notas: Médias \pm erro padrão. Letras iguais diferem estatisticamente entre si. Utilizando Teste t de Student considerando $p < 0,5$

Um dado importante para ser ressaltado é que os animais tratados com aminoguanidina mantiveram o peso sem diferença estatística durante os 14 dias do experimento, bem como os que receberam o derivado LQM 15 não tiveram ganho de peso significativo, tanto os normais como os diabéticos. Essa ação de manutenção do peso corporal da aminoguanidina não foi encontrada nos estudos pesquisados. Diferentemente desses achados, Majd et al. (2014) encontraram um aumento significativo de peso no grupo de animais diabéticos tratados com uma solução de 0,1% (w / v) de aminoguanidina, ad libitum, durante 8 semanas.

A perda de peso que é um dos sinais do diabetes não tratado, não foi observada em nenhum dos animais diabéticos deste estudo. A manutenção do

consumo de alimentos, com aumento gradual de peso, pode ser devido ao efeito hipoglicemiante dos derivados ao longo dos dias de tratamentos.

Erejuwa et al. (2011) avaliaram a associação do mel a glibenclamida e a metformina para melhora do controle glicêmico, eles observaram perda de peso ao longo do experimento nos animais diabéticos do seu estudo. Nem glibenclamida, nem metformina, drogas padrão para tratamento, evitaram essa perda de peso.

Os valores de massa cardíaca, hepática, renal e pancreática foram calculados considerando o peso corporal dos animais. Após os 14 dias de administração oral dos derivados aminoguanidínicos aos ratos, nenhuma alteração na morfologia dos órgãos foi observada em relação aos grupos controle (Tabela sete). As diferenças de massa encontradas se devem a variação do peso corporal dos animais de alguns grupos. Histologicamente esses órgãos também não apresentaram alterações relacionadas ao uso dos derivados ou de seus controles (dados não apresentados).

Tabela 7 – Parâmetros morfológicos de ratos tratados com derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles por 14 dias.

Grupos	Massa cardíaca	Massa hepática	Massa renal	Massa pancreática
GLI	0,398 ^a ±0,018	3,250±0,086	0,380 ^e ±0,008	0,475±0,045
CND	0,433±0,011	3,320±0,119	0,422±0,015	0,488±0,038
Amino D	0,477 ^a ±0,022	3,507 ^d ±0,074	0,443±0,008	0,575±0,049
LQM 03D	0,402±0,011	2,958 ^d ±0,078	0,408±0,010	0,580±0,116
LQM 13D	0,475±0,030	3,205±0,115	0,477 ^e ±0,017	0,505±0,059
LQM 15D	0,428±0,023	3,182±0,113	0,438±0,029	0,520±0,041
CNN	0,418±0,010	3,442 ^c ±0,065	0,397±0,016	0,577±0,035
Amino N	0,470 ^b ±0,014	3,377±0,062	0,418±0,018	0,572±0,029
LQM 03N	0,390 ^b ±0,009	3,096±0,073	0,414±0,015	0,518±0,068
LQM 13N	0,430±0,008	3,165±0,047	0,462±0,005	0,470±0,037
LQM 15N	0,420±0,012	2,978 ^c ±0,072	0,458±0,020	0,514±0,030

Notas: Médias ± erro padrão. Médias seguidas da mesma letra na coluna diferem estatisticamente entre si utilizando ANOVA com pós teste de Dunnet considerando $p < 0,05$.

A maioria dos estudos em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina não apresenta alterações no peso dos órgãos. Silva et al. (2011), não encontraram diferença para o fígado, mas o peso dos rins apresentou-se 1,5 vez aumentado. Também Dantas et al. (2006), avaliando alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná, encontraram uma massa renal elevada, mesmo em animais que não foram submetidos a nenhuma terapêutica medicamentosa, nem indução de diabetes.

Os valores médios hematológicos em função dos diferentes tratamentos estão apresentados na tabela oito. Avaliar o sistema hematopoiético é um dos parâmetros importantes utilizados em estudos in vivo, para determinar o estado fisiológico e patológico, uma vez que fornece informações importantes sobre a reação do corpo a uma agressão (OMOTAYO; KAZEEM, 2015).

Para melhor compreensão os dados foram agrupados em diabéticos e não diabéticos. Apesar de apresentarem algumas diferenças estatisticamente significativas, quando comparados ao controle negativo diabético e o controle negativo normal, clinicamente estão dentro dos parâmetros relatados na literatura (MARTINS et al., 2009; ROCHA et al., 2012; VIVAS, 2014).

Em nenhum grupo observou-se anemia, porém os leucócitos estavam baixos nos animais normais que receberam o LQM 13. Vale lembrar que durante o experimento houve dois óbitos em animais que receberam este derivado, sendo um diabético e outro normal. E no estudo de toxicidade aguda todas as amostras retiradas desse grupo apresentou coagulação imediata. Não foi possível correlacionar esses achados a possíveis efeitos adversos desse derivado.

Tabela 8 – Parâmetros hematológicos e leucometria obtidos de ratos Wistar diabéticos e não diabéticos tratados derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.

PARÂMETROS	GRUPOS DIABÉTICOS					
	CND	AD	GLI	LQM 03	LQM 13	LQM15
Hematócrito (%)	44±1,05 ^a	44±1,54	44±0,58	38±1,07 ^a	36±0,75 ^a	38±0,37 ^a
Hemoglobina(g/dL)	12,6±0,52	12,4±0,53	13,1±0,89	12,0±1,29	13,1±0,69	13,5±0,73
Hemácia (10 ⁶)	4,3±0,18	4,6±0,16	4,4±0,29	5,0±0,29	5,0±0,10	4,5±0,28
HCM (pg)	29,1±1,79	27,0±0,91	29,7±1,79	24,8±3,74	25,9±1,30	30,3±3,46
VCM (fL)	102,2±4,79	95,2±0,92	101,4±7,94	77,1±4,43	70,4±2,36	85,1±6,26
CHCM (%)	28,5±0,97 ^b	28,4±1,04	29,8±2,24	31,4±3,18	36,9±2,68 ^b	35,3±2,12
Leucometria global (mm ³)	3833±636,4	4217±585,0	5483±742,9	3520±554,7	2900±491,2	3080±383,3
PARÂMETROS	GRUPOS NÃO DIABÉTICOS					
	CNN	AN	LQM 03	LQM 13	LQM15	
Hematócrito (%)	45±0,79 ^c	44±2,10	37±0,89 ^c	39±1,65 ^c	38±0,71 ^c	
Hemoglobina(g/dL)	12,1±0,73	11,1±0,57	13,7±0,44	13,6±1,28	13,7±0,87	
Hemácia (10 ⁶)	4,9±0,33	4,5±0,31	4,6±0,39	4,6±0,39	4,7±0,06	
HCM (pg)	24,7±1,21	25,2±1,83	30,9±3,53	30,7±2,74	29,9±2,02	
VCM (fL)	93,7±6,39	99,6±4,69	82,8±7,84	91,8±15,13	80,6±1,38	
CHCM (%)	26,7±1,42 ^d	25,1±0,86	37,1±0,90 ^d	34,7±3,58 ^d	36,1±3,58 ^d	
Leucometria global (mm ³)	6092±940,2 ^e	2983±325,2 ^e	4590±447,0	2563±379,9 ^e	4420±681,3	

Notas: Médias ± erro padrão. Médias seguidas da mesma letra diferem estatisticamente entre si utilizando ANOVA com pós teste de Dunnet considerando p<0,05.

Avaliando a ação antidiabética in vivo dos derivados aminoguanidínicos LQM 3, LQM 13 e LQM 15 na concentração de 2 mg/kg de peso é possível afirmar que esses três possuem ação para controle dos valores glicêmicos. Estatisticamente pode-se afirmar que estes tiveram uma ação semelhante a droga padrão glimepirida, a qual apresentou uma redução de 53% nos índices de glicose, enquanto que a LQM3 teve 57,6%, a LQM13 obteve 57,9% e por fim a LQM15 com 65,2% (Tabela nove).

Tabela 09 – Valores de glicemia de ratos Wistar diabéticos e percentual de redução antes e após o tratamento em com derivados aminoguanidínicos e seus controles.

GRUPOS	Glicemia de jejum (mg/dL)		% de redução de glicemia	p value
	Antes do tratamento	Após o tratamento		
CNN	91,2±6,3	82,3±4,3	N/A	
CND	205,2±10,8	234,8±7,7*	-----	0,8747
AN	92,5±6,5	85,8±6,2	N/A	
AD	193,2±4,8	106,2±6,0 ^a	45%	0,0002
GLI	172,7± 21,0	81,2± 11,6 ^a	53%	0,0222
LQM 3 N	99,6±5,4	83,4±11,9	N/A	
LQM 3 D	196,8±3,7	83,4±4,8 ^a	57,6%	<0,0001
LQM 13 N	95,0±6,7	94,7±9,9	N/A	
LQM 13 D	187,0±6,3	78,7±8,7 ^a	57,9%	0,0001
LQM 15 N	73,2±5,0	97,4±13,6	N/A	
LQM 15 D	199,4±8,0	69,4±2,8 ^a	65,2%	<0,0001

NOTA: Média ± erro padrão. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem da glimepirida (GLI) e médias seguidas de * na mesma coluna diferem do controle negativo diabético (CND) pelo ANOVA com pós-teste de Dunnett considerando p<0,05

Kim et al. (2014), estudando a aminoguanidina como protetor da retinopatia diabética, numa concentração de 50 mg / kg (p.o.) uma vez por dia durante 13 semanas, também encontrou um pequeno decréscimo nos valores de glicemia nesses ratos. Sabe-se que a aminoguanidina não é considerado um antidiabético. A sua ação é na inibição dos produtos finais da glicação avançada (STIRBAN, GAWLOWSKI, RODEN, 2014)

A hemoglobina glicada é um padrão de monitoramento para os diabéticos. Seus valores elevados refletem a média dos níveis glicêmicos dos últimos dois a quatro meses. Sendo indicado para estudos crônicos do diabetes. Apesar desse conceito em humanos, Santos (2014) apresenta valores elevados de hemoglobina glicada em animais com sete dias de indução do diabetes por estreptozotocina. Como o metabolismo dos ratos Wistar é mais acelerado que o de humanos acredita-se que a condição de hiperglicemia induziu de forma rápida as reações de glicação não enzimática (FARIA et al., 2011).

A A1C é um componente menor da Hb, sendo encontrada em indivíduos adultos não-diabéticos em uma proporção de 1% a 4% dos indivíduos normais. Na prática, os valores normais de referência vão de 4% a 6% (NETTO et al., 2009).

A figura 21 apresenta os valores de hemoglobina glicada nos animais diabéticos deste estudo. Apesar de apresentarem diferença significativa entre os animais tratados com os derivados LQM 3 e LQM 13 e a aminoguanidina e o controle negativo, todos os animais obtiverem valores abaixo de 3%, ou seja, clinicamente normais. Níveis de HBA1c acima de 7% estão associados a um risco progressivamente maior de complicações crônicas (NETTO et al., 2009).

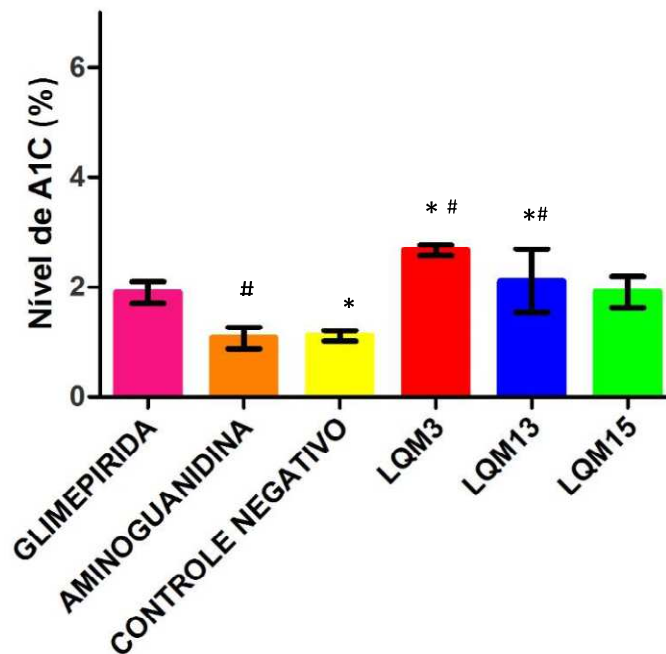


Figura 21 – Valores de hemoglobina glicada de ratos Wistar diabéticos tratados por 14 dias com derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles. Notas: Médias \pm erro padrão. Médias seguidas de *diferem do controle negativo e seguidas # diferem da aminoguanidina utilizando ANOVA com pós teste de Dunnett considerando $p < 0,05$.

Ao utilizar a aminoguanidina como inibidor de produtos finais da glicação avançada, em uma concentração de 250 mg/Kg, em ratos diabéticos induzidos por aloxano, Carvalho et al. (2011), também quantificaram a hemoglobina glicada e a frutossamina nesses animais. A hemoglobina glicada neste estudo foi de 4,8%, ou seja, maior do que os valores apresentados por todos os grupos tratados com os derivados desta pesquisa.

Em estudos agudos de glicação a frutosamina é o melhor parâmetro por representar a concentração média da glicação entre a albumina e a glicose nas últimas duas ou três semanas. Ela é um produto de glicação não enzimática das proteínas séricas, em sua maioria a albumina, que se constitui na maior massa proteica plasmática depois da hemoglobina (50-80%) e grupo carbonil da glicose. É proporcional à concentração da glicemia e correlaciona-se com a glicemia de jejum e com a hemoglobina glicada (KOGA, KASAYAMA, 2010; FEITOSA, ANDRADE, 2014). A figura 22 apresenta os valores de frutosamina nos grupos estudados. Todos os animais tratados tiveram uma diferença significativa ($P < 0,0001$) quando comparados com o controle negativo diabético.

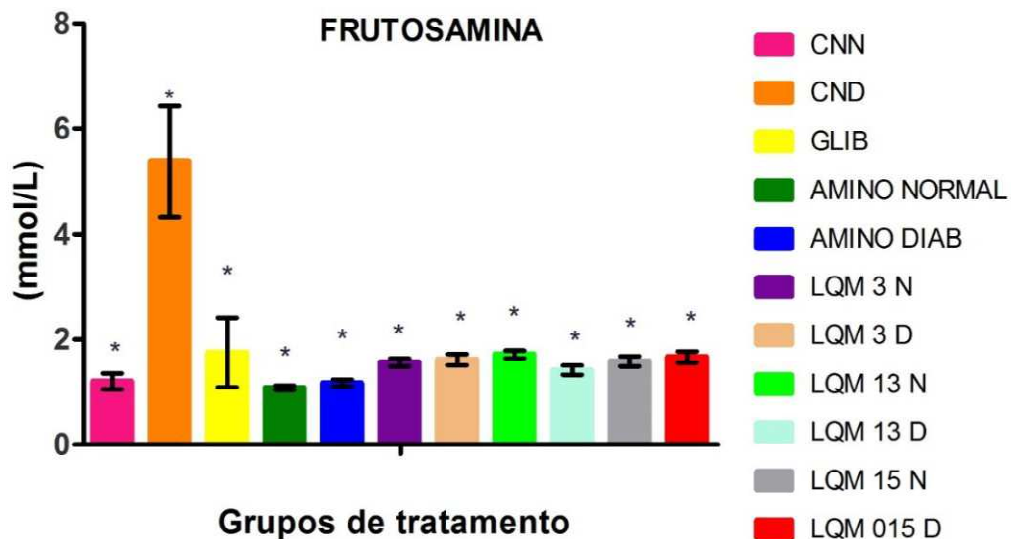


Figura 22– Valores de frutosamina de ratos Wistar tratados por 14 dias com derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles. Notas: Médias \pm erro padrão. Médias seguidas de * diferem entre si utilizando ANOVA com pós teste de Dunnett considerando $p < 0,05$.

Diferentemente deste estudo a concentração de frutosamina não foi influenciada, pela indução do diabetes com estreptozotocina na pesquisa, de Silva et al. (2011), ao observar seu efeito sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo. Mesmo a STZ aumentando os níveis glicêmicos em sete vezes, não se conseguiu observar elevação de frutosamina, possivelmente, em decorrência do curto tempo de experimento (dez dias).

Outros parâmetros bioquímicos foram avaliados, buscando possíveis efeitos do tratamento com os derivados aminoguanidínicos, nas funções renal e hepática, além do perfil lipídico dos animais. Sabendo de possíveis efeitos nefrotóxicos avaliou-se ureia e creatinina, além das proteínas totais e frações que também podem estar relacionadas a hepatotoxicidade.

A ureia apesar de ser utilizada como biomarcador renal, ela não tem a mesma precisão da creatinina, pois os túbulos renais reabsorvem 40% desse produto, além de poder variar com a ingestão proteica, sangramento gastrointestinal e o uso de alguns medicamentos. Já excreção da creatinina é mais fidedigna, pois só acontece por via renal, uma vez que ela não pode ser reabsorvida e também não é reaproveitada pelo organismo (ABENSUR, 2011; COSTA et al., 2011).

Por isso, quando se mensura os níveis de creatinina plasmática, estes refletem a taxa de filtração renal, de forma que quando os níveis estão elevados indicam uma deficiência na funcionalidade renal, o que não foi observado com o uso dos derivados aminoguanidínicos após os 14 dias de tratamento.

As descobertas deste estudo estão de acordo com resultados anteriores descritos na literatura. Nayac et al. (2014) afirmam que o aumento dos AGEs no plasma está associado com o aumento da creatinina sérica. Os animais tratados com os derivados tiveram valores de creatinina mais baixos que os controles (Figura 23).

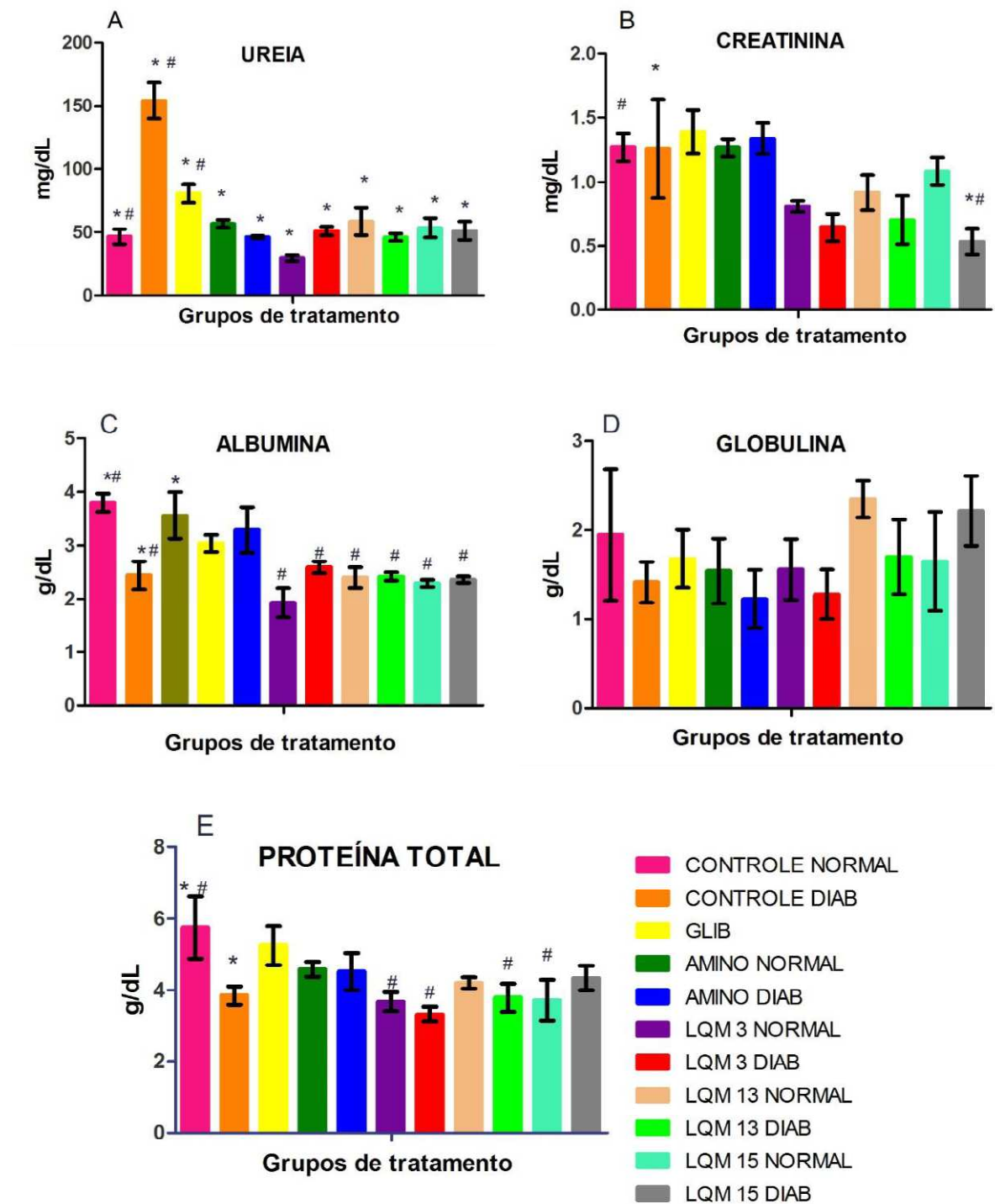


Figura 23 – Valores bioquímicos da função renal de ratos Wistar diabéticos e não diabéticos tratados por 14 dias com derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles. Notas: Médias \pm erro padrão. Médias seguidas de *diferem do controle negativo diabético e seguidas # diferem do controle negativo normal utilizando ANOVA com pós teste de Dunnett considerando $p < 0,05$.

As enzimas hepáticas em circunstâncias normais residem dentro dos hepatócitos. No presente estudo os valores de TGO e TGP estiveram muito próximo dos animais do controle negativo não diabéticos, sugerindo que o uso dos derivados de forma aguda pode não ser hepatotóxico (FIGURA 24).

Assim como, Mahmoud, Zakaria, Fahmy (2015) que estudaram a ação da aminoguanidina na função hepática e renal de ratos induzidos a cirrose hepática crônica e mesmo neste contexto, a aminoguanidina conseguiu melhorar a função hepática e renal.

A fosfatase alcalina apesar de ter variado em todos os grupos, os valores apresentados estão dentro da referência de 56 – 153 U/L (LIMA et al., 2014). A literatura afirma que essa variação pode acontecer durante tratamentos farmacológicos (COSTA et al., 2011)

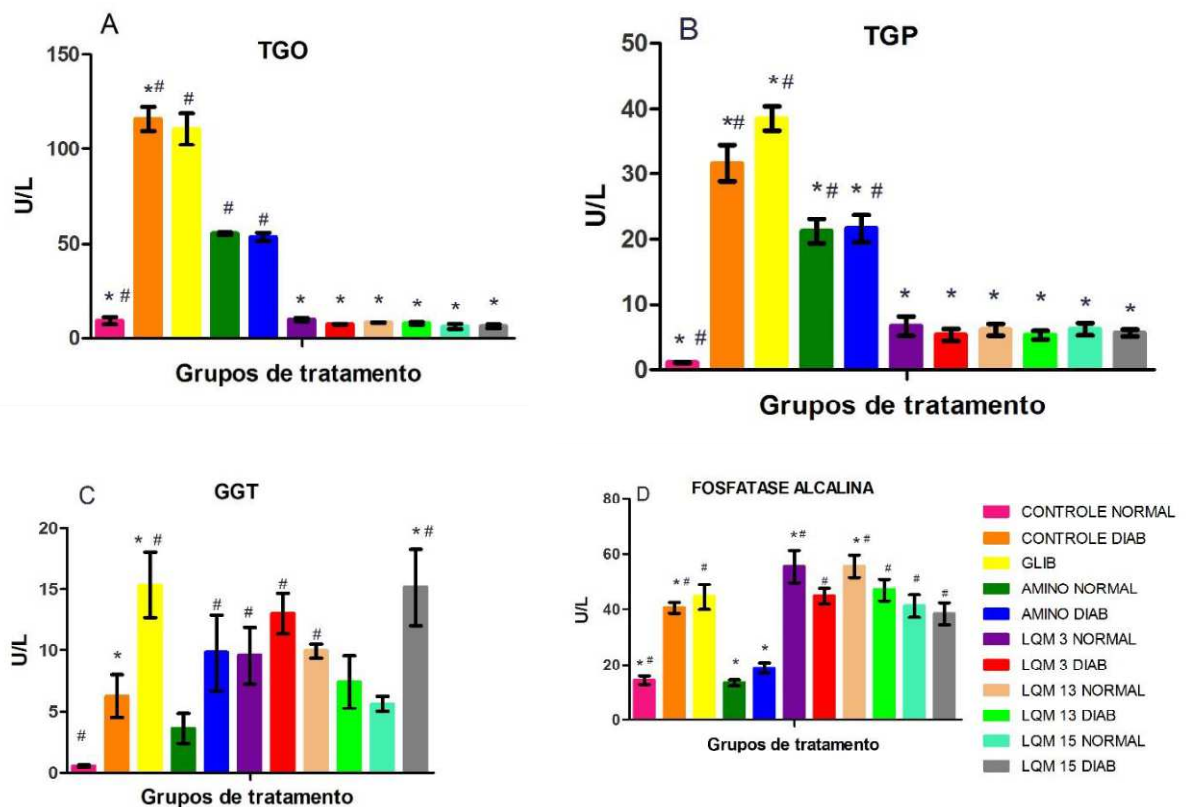


Figura 24 – Valores bioquímicos da função renal hepática de ratos Wistar diabéticos e não diabéticos tratados por 14 dias com derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles. Notas: Médias \pm erro padrão. Médias seguidas de *diferem do controle negativo diabético e seguidas # diferem do controle negativo normal utilizando ANOVA com pós teste de Dunnett considerando $p < 0,05$.

A produção de triglicerídeos é aumentada em estados de resistência à insulina e no diabetes, levando os indivíduos a um maior risco de doenças cardiovasculares (XIAO et al., 2015). Com relação aos níveis séricos dos triglicerídeos foi detectada uma diminuição significativa nos ratos tratados com os três derivados aminoguanidínicos. Todos os animais tiveram valores significativamente menores que os animais dos controles diabéticos e não diabéticos (Tabela 10).

Diante dos efeitos na redução sérica dos triglicerídeos e nos demais parâmetros de lipídeos pode-se sugerir estudos para o uso desses derivados no tratamento das dislipidemias. No entanto, essa consideração precisa ser investigada de forma mais detalhada, inclusive em modelos animais de dislipidemia.

Tabela 10 – Perfil lipídico ratos Wistar diabéticos e não diabéticos após tratamento com derivados aminoguanidínicos e seus controles.

Grupos	PARÂMETROS				
	Colesterol total	Triglicerídeos	HDL	LDL	VLDL
CND	143,0±16,5 ^a	78,3±11,1 [*]	50,7±8,8 [*]	75,3±8,3 [*]	15,7±2,2 [*]
GLI	168,0±9,1 ^a	112,1±12,4 [*]	19,2±2,1 ^{*b}	126,4±9,8 ^{*c}	22,4±2,5 [*]
Amino D	118,7±11,3	91,4±14,4	31,5±5,9 [*]	68,9±10,4	18,3±2,9
LQM 03D	40,8±6,1 ^{*a}	62,9±0,27	14,4±0,9 ^{*b}	23,5±6,2 ^{*c}	12,6±0,1
LQM 13D	48,3±3,2 ^{*a}	63,4±0,36	16,3±1,5 ^{*b}	28,7±3,2 ^{*c}	12,7±0,1
LQM 15D	45,5±3,6 ^{*a}	62,2±0,07	16,8±0,8 ^{*b}	25,3±4,2 ^{*c}	12,4±0,0
CNN	100,5±13,6 ^a	81,3±13,3	38,1±7,0 ^b	46,1±13,4 ^{*c}	16,2±2,6
Amino N	122,1±8,3	75,0±9,2	41,0±3,7	66,2±11,4	15,0±1,8
LQM 03N	53,0±3,7 ^{*a}	63,5±0,55	16,7±0,7 ^{*b}	33,0±4,1 ^{*c}	12,7±0,1
LQM 13N	52,8±3,2 ^{*a}	62,6±0,29	14,6±0,4 ^{*b}	35, 2±3,0 ^{*c}	12,5±0,1
LQM 15N	37,8±2,4 ^{*a}	62,1±0,16	15,3±0,6 ^{*b}	19,5±2,5 ^{*c}	12,4±0,0

Notas: Média ± erro padrão. Médias seguidas de * na mesma coluna diferem do controle negativo diabético (CND) e médias seguidas da mesma letra na coluna diferem do controle negativo normal (CNN) e pelo ANOVA com pós-teste de Dunnett considerando p<0,05

Assim, a avaliação da atividade antidiabética e antiglicante dos derivados aminoguanidínicos apresentou dados promissores e inter-relacionados por apresentarem baixa toxicidade, atuarem de forma significativa nos AGES in vitro e in vivo, com redução nos valores de hemoglobina glicada e frutossamina, além de possuírem ação antidiabética em ratos Wistar, com indução por estreptozotocina, mantendo padrões bioquímicos para função renal e hepática dentro da normalidade.

6 CONCLUSÕES

Baseados nos resultados obtidos, nas condições experimentais do presente trabalho, conclui-se que no teste de toxicidade celular *in vitro* os derivados aminoguanidínicos foram seguros e não mostraram qualquer efeito tóxico, em dezessete dos dezenove derivados, quando as células foram tratadas com a concentração de 10 μM . E para 100 μM da amostra, dez desses derivados se mantiveram dentro padrão de 80% de células viáveis.

Os derivados aminoguanidínicos, LQM3, LQM5, LQM6, LQM7, LQM13, LQM16 e LQM17, tiveram excelente ação na inibição da formação de produtos finais da glicação avançada *in vitro*. O LQM 13 atingiu até 94,6% de inibição de AGEs sendo esse resultado superior a aminoguanidina.

Nos estudos *in vivo* os derivados LQM 3, LQM 13 e LQM 15 não foram tóxicos, ou seja, os animais não perderam peso, nem apresentaram alterações comportamentais, nem bioquímicas ou histológicas que pudessem ser atribuídas ao uso dos derivados.

Nos testes para atividade antidiabética e antiglicante, esses três derivados conseguiram reduzir os valores de glicemia em até 65%, sendo significativos quando comparados com a glimepirida droga padrão utilizada. Além disso, os níveis de frutossamina e hemoglobina glicada se mantiveram baixos nos grupos tratados com os derivados, com parâmetros bioquímicos que não indicaram nefro e/ou hepatotoxicidade.

Portanto, é possível concluir, que os derivados testados têm potencial para novos estudos, estes representam protótipos de fármacos promissores, para que no futuro seja possível ter um produto capaz de reduzir os índices glicêmicos e, ao mesmo tempo ter ação antiglicante, protegendo os indivíduos das complicações macro e microvasculares do diabetes.

A boa atividade antiglicante e antidiabética, tanto *in vitro* como *in vivo*, apresentada pelos derivados aminoguanidínicos desta pesquisa merece posteriormente, um estudo para determinação do seu mecanismo de ação.

REFERENCIAS

- ABENSUR, H. Biomarcadores na Nefrologia. Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2011.
- AHMAD, M.S.; AHMED N. Antiglycation properties of aged garlic extract: possible role in prevention of diabetic complications. *J Nutr*, v. 136, n.3, p. S796-9, 2006.
- ALKHALAF, A. et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial on benfotiamine treatment in patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Care*, v. 33, n.7, p. 1598–1601, 2010.
- ALKHALAF, A. et al. Effect of benfotiamine on advanced glycation endproducts and markers of endothelial dysfunction and inflammation in diabetic nephropathy. *PLoS One*, v. 7, n. 7, p. e40427, 2012.
- AMDCC - ANIMALS MODELS OF DIABETIC COMPLICATIONS CONSORTIUM. Validation of models of cardiovascular disease in diabetes. Georgia, 2003. 13 p.
- ASHAFA, A. O. T.; KAZEEM, M. I. Toxicopathological Evaluation of Hydroethanol Extract of *Dianthus basuticus* in Wistar Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 14, n. 2, p. 102-108. 2015.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus: *Diabetes Care*. 2013, 36 p.
- ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. et al. Sequential region and chemo selective cross coupling reactions by means of O6-tri-isopropylsulfonate of 4-bromo-pyridazine 3,6-dione. *Tetrahedron letters*, v. 47, p. 6125-6128, 2006.
- ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. et al. Synthesis of region specifically polysubstituted pyridazinones. *Tetrahedron letters*, v. 48, p. 7817-7820, 2007.
- ASHAFA, A. O. T.; KAZEEM, M. I. Toxicopathological Evaluation of Hydroethanol Extract of *Dianthus basuticus* in Wistar Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, p. 1-10. 2015.
- BARLOVIC, D. P.; SORO-PAAVONEN, A.; JANDELEIT-DAHM, K. A. RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. *Clin Sci (Lond)*. v. 121, n. 2, p. 43-55, 2011.
- BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. *Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 23- 49, 2005.
- BEAULIEU, L. P. et al. Inhibitory Effect of the Cree Traditional Medicine *Wiishichimanaan* (*Vaccinium vitis-idaea*) on Advanced Glycation Endproduct Formation: Identification of Active Principles. *Phytother Res.*, v. 24, p. 741–747, 2010.
- BENDERITTER, P. et al. 2-Amino-6-iodo-4-tosyloxypyrimidine: a versatile key intermediate for regioselective functionalization of 2-aminopyrimidines in 4- and 6-positions. *Tetrahedron*, v. 63, p.12465-12470, 2007.

BIRLOUEZ-ARAGON, I. et al. A diet based on high-heat-treated foods promotes risk factors for diabetes mellitus and cardiovascular diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 91, p.1220–1226, 2010.

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

BONFILIO, R. Análise químico-farmacêutica de glimepirida comprimidos. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista: Araraquara, 2011.

BOUSOVÁ, I. et al. Evaluation of in vitro effects of natural substances of plant origin using a model of protein glycoxidation. *J Pharm Biomed Anal.* v. 37, n. 5, p. 957-962, 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Vigitel Brasil 2014 Saúde Suplementar : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Saúde Suplementar. Brasília, 2015. 165 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos*. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2012. 74 p.

BRITO, A. S. *Manual de Ensaio Toxicológicos in vivo*. Campinas: Editora da UNICAMP, 1994, 122 p.

CAI, W. et al. Oral advanced glycation endproducts (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and sirtuin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, n. 39, p. 15888 – 15893, 2012.

CARVALHO, G. D. et al. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. *Ceres*. v. 56, n. 1, p. 051-057, 2009.

CARVALHO, V. F. et al. Inhibition of advanced glycation end products by aminoguanidine restores mast cell numbers and reactivity in alloxan-diabetic rats. *Eur J Pharmacol*, v.669, p.143-148, 2011.

CASTRO, B. B. A. et al. Pinheiro H.S. Standardization of renal function evaluation in Wistar rats (*Rattus norvegicus*) from the Federal University of Juiz de Fora's colony. *J. Bras. Nefrol.*, v. 36, n. 2, p. 139-149, 2014 .

CHIPITI, T. et al. In vitro α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects and cytotoxic activity of *Albizia antunesiana* extracts. *Pharmacognosy Magazine*. v. 11, n. 2, p. S231-S236, 2015.

COSTA, J. P. et al. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 33, n. 3, 2012.

- CUNHA, L. C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. *Rev. bras. farmacogn.*, João Pessoa, v. 19, n. 2a, p. 403-411, 2009.
- DANTAS, J. A. et al. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Acta Sci. Health Sci. Maringá*, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.
- DEACON, C. F.; LEOVITZ, H. E. Comparative review of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and sulphonylureas. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, p.1-15, 2016.
- DELBIN, M.A. et al. Interaction between Advanced Glycation End Products Formation and Vascular Responses in Femoral and Coronary Arteries from Exercised Diabetic Rats. *Federici M, PLoS ONE*. v. 7, n. 12, 2012.
- DESAI, N.R. et al. Patterns of medication initiation in newly diagnosed diabetes mellitus: Quality and cost implications. *Am J Med.*, v. 2012, v. 125, n. 302, p.1-7. 2012.
- DEZENGRINI, R. et al. Atividade de três drogas antivirais sobre os herpesvírus bovino tipos 1, 2 e 5 em cultivo celular. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2010, v. 30, n. 10, p. 855-860. 2010.
- ENGELN, L.; STEHOUWER, C. D. A.; SCHALKWIJK, C. G. Current therapeutic interventions in the glycation pathway: evidence from clinical studies *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 15, n. 8, p. 677-689, 2013.
- EPIFÂNIO, W. A. N. Síntese e avaliação citotóxica de derivados aminoguanidínicos como protótipo de fármacos antineoplásicos. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Alagoas. 2011.
- EREJUWA O.O. et al. Glibenclamide or Metformin Combined with Honey Improves Glycemic Control in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *International Journal of Biological Sciences*, v.7, n.2, p.244-252, 2011.
- FARIA, P. P. et al. Avaliação de parâmetros físicos e biológicos de ratos wistar após administração de decanoato de nandrolona. *Acta Biomedica Brasiliensia*, v. 3, n.2, 2012.
- FEITOSA, A.R.; ANDRADE, F.S. Evaluation of fructosamine as a parameter of blood glucose control in diabetic pregnant women. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 58, n. 7, p. 724-730, 2014.
- FRANÇA, P. H. B. et al.: Preliminary in vitro evaluation of the anti-proliferative activity of guanylhydrazone derivatives. *Acta Pharm.* V. 66, p.129-137, 2016.
- FRASER, D. A. et al. The effects of long-term oral benfotiamine supplementation on peripheral nerve function and inflammatory markers in patients with type 1 diabetes: a 24-month, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Diabetes Care*. v. 35, n. 5, p. 1095-1097, 2012.

FREEDMAN, B. I. et al. Design and baseline characteristics for the aminoguanidine Clinical Trial in Overt Type 2 Diabetic Nephropathy (ACTION II). *Control Clin Trials*, v. 20, n. 5, p. 493–510, 1999.

FRODE, T. S.; MEDEIROS, Y.S. Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 115, p. 173–183, 2008.

GOÉS, A. J. S. et al. Synthesis and antiedematogenic activity of some N-tryptophyl-5-benzylidene-2,4-thiazolidinedione and N-tryptophyl-5-benzylidene-rhodanine derivatives. *Quím. Nova*, v.27, n. 6, 2004.

GOLDBERG, T. et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc.*, v. 104, n. 8, p. 1287-1291, 2004.

HEGAB, Z. et al. Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. *World J Cardiol.*, v. 26, n. 4, p. 90–102, 2012.

HUEBSCHMANN, A. G. et al Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*, v. 29, n.6, p.1420-1432, 2006.

JHAUMEER-LAULLOO, S. et al. In vitro Anti-glycation and Anti-oxidant Properties of Synthesized Schiff Bases. *Medicinal Chemistry*, v. 8, p. 409-414. 2012.

KALRA, S. et al. Place of sulfonylureas in the management of type 2 diabetes mellitus in South Asia: A consensus statement. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, v. 19, n. 5, p. 577-596, 2015.

KAMPMANN, U. et al. Gestational diabetes: A clinical update. *World J Diabetes*, v. 6, n. 8, p. 1065 – 1072, 2015.

KIM, J. H. et al. Oral administration of ethyl acetate-soluble portion of *Terminalia chebula* conferring protection from streptozotocin-induced diabetic mellitus and its complications. *Biol Pharm Bull*, v. 34, n. 11, p. 1702-1709, 2011.

KOGA, M.; KASAYAMA, S. Clinical impact of glycated albumin as another glycemic control marker. *Endocr J.*, v. 57, n. 9, p. 751-762, 2010.

LEON, B. M.; MADDOX, T. M. Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World J Diabetes*, v. 6, n. 13, p. 1246-1258, 2015.

LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena*, v. 10, n. 3, 2014.

MAHOMOODALLY, F. M. et al. Antioxidant, antiglycation and cytotoxicity evaluation of selected medicinal plants of the Mascarene Islands. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 12, n.165, p. 1-12, 2012.

MAHMOUD, M. F., ZAKARIA, S., FAHMY, A. Can Chronic Nitric Oxide Inhibition Improve Liver and Renal Dysfunction in Bile Duct Ligated Rats? *Advances in Pharmacological Sciences*, v. 2015, p. 1-7, 2015.

- MAJD, A. A. et al. Aminoguanidine partially prevents the reduction in liver pyruvate kinase activity in diabetic rats. *Advanced Biomedical Research*, v. 3, n.260, 2014.
- MARTINS, T. L. C. Síntese de guanilhidrazonas, atividade antibiótica e estudos de interação DNA por RMN. Tese de doutorado, Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2004.
- MARINO, R. et al. Tumor-selective anti-cancer effects of the synthetic alkyl phosphocholine analog CLR1404 in neuroblastoma. *American Journal of Cancer Research*, v. 5, n. 11, p. 3422-3435, 2015.
- MONNIER V.M. Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Arch Biochem Biophys*, v.419, n.1, p.1-15, 2003.
- MORI R.C.T. Glimepirida melhora a sensibilidade à insulina em ratos obesos (MSG) sem exacerbar a obesidade. Mecanismos moleculares envolvidos nos tecidos muscular, adiposo e hepáticos. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2007.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J. Immunol. Methods*, v.65, p.55-63, 1983.
- MUTHENNA, P. et al. Inhibition of advanced glycation end-product formation on eye lens protein by rutin. *British Journal of Nutrition*, v. 107, p. 941-949, 2012.
- MYTHILI, M.D. et al. Effect of streptozotocin on the ultrastructure of rats pancreatic islets. *Microscopy Research and Technique*, v. 63, p. 274 – 281, 2004.
- NAYAK, Y. et al. Antidiabetic activity of 3-hydroxyflavone analogues in high fructose fed insulin resistant rats. *Excli Journal*, v. 13, p. 1055-1074, 2014.
- NETTO, A. P. et al. Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA1C) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 45, n. 1, p. 31-48, 2009.
- NOWOTNY, K. et al. Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. Breitenbach M, Eckl P, eds. *Biomolecules*, v. 5, n. 1, p. 194-222, 2015.
- OLIVEIRA, R.J.S. Efeito da faseolamina sobre parâmetros bioquímicos gerais e oxidativos do coração de ratos diabéticos induzidos por STZ. Dissertação mestrado em genética e bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.
- OLIVEIRA, A. M. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of the siaresinolic acid, a triterpene isolated from the leaves of *Sabicea grisea* Cham. & Schldl. var. *grisea*. *Natural Medicines*, v. 69, p. 232-240, 2015.
- OLIVEIRA, J.E.P.; VENCIO, S. (org). Sociedade Brasileira de Diabetes: Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2014-2015 – São Paulo: AC Farmacêutica. 2015. 390 p.

ORLANDINE, L.F. Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos wistar expostos à amônia por inalação. Dissertação Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

OUDEGEEST-SANDER, M. H. et al. The effect of an advanced glycation end-product crosslink breaker and exercise training on vascular function in older individuals: a randomized factorial design trial. *Exp Gerontol.* v. 48, n. 12, p. 1509–1517, 2013.

PARASURAMAN, S. et al. Evaluation of Antidiabetic and Antihyperlipidemic Effects of Hydroalcoholic Extract of Leaves of *Ocimum tenuiflorum* (Lamiaceae) and Prediction of Biological Activity of its Phytoconstituents. *Pharmacognosy Research*, v. 7, n. 2, p. 156-165, 2015.

PASQUALOTTO, K R. ; ALBERTON, D. ; FRIGERI, H.R. Diabetes mellitus and Complications. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 3, n. 4, p. 134-145, 2012.

PEREZ-GUTIERREZ, R. M. Inhibition of Advanced Glycation End-Product Formation by *Origanum majorana* L. In Vitro and in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012, p. 1-8, 2012.

RABBANI, N. et al. High-dose thiamine therapy for patients with type 2 diabetes and microalbuminuria: a randomised, double-blind placebo-controlled pilot study. *Diabetologia*, v. 52, n. 2, p. 208–212, 2009.

REZAIAN-MEHRABADI, A. et al. Study of the Effects of ATP Suppliers and Thiol Reductants on Toxicity of Pioglitazone in Isolated Rat Liver Mitochondria . *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, v. 14, n. 3, p. 825-832, 2015.

ROCHA, A. O. B. et al. Toxicological effect of *Pradosia huberi* Ducke hydroalcoholic extract in the Wistar rats. *Brazilian Journal of Pharmacy*, v. 93, n. 3, p. 371-378, 2012.

ROSA, R. et al. Estimated hospitalizations attributable to Diabetes Mellitus within the public healthcare system in Brazil from 2008 to 2010: study DIAPS 79. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, São Paulo , v. 60, n. 3, p. 222-230, 2014.

SANTOS, F. A. Produtos avançados de glicação e adutos de DNA relacionados a estresse oxidativo e inflamação em modelo de ratos diabéticos. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2014.

SANTOS, M. R. V. et al. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. *Scientia Plena*, v. 6, n. 10, p. 1-6, 2010.

SARMENTO, P. A. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of guanidinederivatives with potential hypoglycemic activity. *BMC Proceedings*, v.8, p. 1-2, 2014.

SCHMIDT, M. I. et al Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges, *The Lancet*, v. 377, n. 9781, p. 1949-196, 2011.

SCHMITT, M. et al. Use of 4-bromo pyridazine 3,6-dione for building 3-amino pyridazine libraries. *Molecular Diversity*, v. 10, p.429-434, 2006.

SÉRO, L. et al. Tuning a 96-Well Microtiter Plate Fluorescence-Based Assay to Identify AGE Inhibitors in Crude Plant Extracts. *Molecules*, v. 18, p. 14320-14339, 2013.

SILVA, et al. Effect of streptozotocin on the glycemic and lipid profiles and oxidative stress in hamsters. *Arq Bras Endocrinol Metab.* v.55, n.1, 2011.

SOUZA, C.F. et al. Pré-diabetes: diagnóstico, avaliação de complicações crônicas e tratamento. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 56, n. 5, p. 275-284, 2012.

STIRBAN, A.; GAWLOWSKI, T.; RODEN, M. Vascular effects of advanced glycation endproducts: Clinical effects and molecular mechanisms. *Molecular Metabolism*, v. 3, n. 2, p. 94-108, 2014.

SUN, Z. et al. Inhibitory effects of microalgal extracts on the formation of advanced glycation endproducts (AGEs). *Food Chemistry*, v. 120, p. 261–267, 2010.

URIBARRI, J. et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 110, p. 911–916, 2010.

URIBARRI, J. et al. Restriction of advanced glycation end products improves insulin resistance in human type 2 diabetes: potential role of AGER1 and SIRT1. *Diabetes Care*, v. 34, p. 1610–1616, 2011.

VENSKE, D. K. R. Efeitos do consumo de uma dieta hiperpalatável e uma dieta hiperpalatável aquecida sobre parâmetros indicadores de resistência periférica à insulina, estresse oxidativo, defesa antiglicação e dano ao DNA em ratos Wistar. *Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.* 2010.

VIVAS, W.L.P. Manual prático de hematologia. 2014. 33p. Disponível em: <www.aa.med.br/upload/biblioteca/Manual%20de%20Hematologia.pdf>

WILLIAMS, M. E. et al. Effects of pyridoxamine in combined phase 2 studies of patients with type 1 and type 2 diabetes and overt nephropathy. *Am J Nephrol*, v. 27, n. 6, p. 605–614, 2007.

WHO, World Health Organization. Use of glycated haemoglobin (HbA1C) in the diagnosis of diabetes mellitus. Geneva, 2011. 25 p. Disponível em: <http://www.who.int/diabetes/publications/report-hba1c_2011.pdf>

XIAO, C. et al. Gut Peptides Are Novel Regulators of Intestinal Lipoprotein Secretion: Experimental and Pharmacological Manipulation of Lipoprotein Metabolism. *Diabetes*, v. 64, n. 7, p. 2310-2318, 2015.

ZHANG, Y. et al. New Antiglycative Compounds from Cumin (*Cuminum cyminum*) Spice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, n. 46, p. 10097-10102, 2015.

ZIEMAN, S. J. et al. Advanced glycation endproduct crosslink breaker (alagebrium) improves endothelial function in patients with isolated systolic hypertension. *J Hypertens*, v. 25, n. 3, p. 577–583, 2007.

ANEXO

- Parecer da Comissão de Ética no uso de animais da Universidade Federal de Juiz de Fora.
- Comprovante da Patente depositada no INPI pelo Núcleo de Tecnologia e Inovação da Universidade Federal de Alagoas.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 029/2013 – CEUA sobre “ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-IPERGLICÊMICA E/OU INIBIDORA SOBRE OS PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA DE DERIVADO AMINOGLUCÔNICO EM RATOS DIABÉTICOS”, possui de responsabilidade de ELITA SCIO FORTES, em de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Conea), e foi aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 04/06/2013. Para o desenvolvimento da pesquisa foram liberados 120 ratos (120 machos) da linhagem Wistar, conforme solicitado e que serão entregues no período de 01/07/2013 a 31/03/2014.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 029/2013 – CEUA about “ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-IPERGLICÊMICA E/OU INIBIDORA SOBRE OS PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA DE DERIVADO AMINOGLUCÔNICO EM RATOS DIABÉTICOS”, under responsibility of ELITA SCIO FORTES - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Conea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 04/06/2013. For the development of this research 120 rats (120 males) of Wistar lineage, were released, as requested and they will be delivered in the period of 01/07/2013 to 31/03/2014.

Juiz de Fora, 06 de Junho de 2013.



Presidente/CEUA



Secretário/CEUA



05/01/2016 870160000098

15:37



00.000.2.2.15.0858926.1

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2016 000145 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Sociedade com intuito não econômico

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: sbuchoa@gmail.com

Dados do Pedido

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO COMO PRINCÍPIO OS DERIVADOS DA AMINOGUANIDINA OU GUANILHIDRAZÔNICOS COM ATIVIDADE ANTIDJABÉTICA E/OU INIBIDORA DOS PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA

Resumo: A presente patente trata da invenção de uma formulação farmacêutica composta a partir de derivados da aminoguanidina ou guanilhidrazônicos visando a diminuição dos índices glicêmicos no tratamento do Diabetes Mellitus, além de poder ser utilizado na prevenção das complicações diabéticas agindo como agente inibidor da formação de produtos finais da glicação avançada, ou seja, um anti-AGE, prevenindo, aterosclerose, nefropatia, retinopatia, cataratas ou neuropatias. Os derivados da presente invenção, ou possíveis sais desses derivados, podem ser usados isoladamente ou em misturas de diferentes proporções com outros fármacos, para uso oral e/ou parenteral, no tratamento do diabetes e na profilaxia das complicações diabéticas.