

# UFAL

**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

**EDNALDO ALMEIDA GOMES**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIGLICANTE E ATIVIDADE  
ANTIDIABÉTICA DE NOVAS AMINOGUANIDINAS E DERIVADOS  
PLANEJADOS NO MODELO DE DIABETES INDUZIDA PELA  
ESTREPTOZOTOCINA**

**Universidade Federal de Alagoas**

**Campus A. C. Simões  
Tabuleiro do Martins  
57072-970 - Maceió-AL**

**EDNALDO ALMEIDA GOMES**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIGLICANTE E ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA  
DE NOVAS AMINO Guanidinas e Derivados Planejados no Modelo de  
DIABETES INDUZIDA PELA ESTREPTOZOTOCINA**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor à Universidade Federal de Alagoas - Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química (PPGQB), área de concentração Bioquímica e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior

**Maceió, AL**

**2019**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

G633a Gomes, Ednaldo Almeida.

Avaliação do potencial antiglicante e atividade antidiabética de novas aminoguanidinas e derivados planejados no modelo de diabetes induzida pela estreptozotocina / Ednaldo Almeida Gomes. – 2019.  
169 f.: il. color.

Orientador: João Xavier de Araújo Júnior.

Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia, Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 144-167.

Anexos: f. 168-169.

1. Transtornos do metabolismo de glucose. 2. Diabetes mellitus. 3. Produtos finais de glicação avançada. 4. Metformina. I. Título.

CDU: 615.252.349.7



PPGQB

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando EDNALDO ALMEIDA GOMES intitulada: "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIGLICANTE E ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA DE NOVAS AMINOGUANIDINAS E DERIVADOS PLANEJADOS NO MODELO DE DIABETES INDUZIDA PELA ESTREPTOZOTOCINA", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, no dia 14 de março de 2019, às 9h30, na sala de Pós-Graduação da Esenfar.

### COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior  
(Orientador (a) - PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Mário Roberto Meneghetti  
(PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dra. Maria Aline Barros Fidelis de Moura  
(PGPCF/ESENFAR/UFAL)

Prof. Dr. Luciano Aparecido Meirelles Grillo  
(RENORBIO/IQB/UFAL)

*Aos Meus Pais,*

*Eduardo Gomes da Silva*

*Marinalva Maria de Almeida Gomes*

*Responsáveis por me trazer à vida.*

*Responsáveis por minha manutenção.*

*Responsáveis por me ensinar a andar, e se cair, levantar e seguir.*

*Responsáveis por me mostrar que existe um Deus, em quem posso confiar.*

*Responsáveis por me educar em princípios cristãos, morais e éticos..*

*Responsáveis por me mostrar diversos caminhos, e deixar que eu escolhesse qual seguir.*

*Responsáveis ainda, pela idéia confortante, de que aonde quer que eu fosse, estariam sempre ao meu lado.*

*E se por qualquer motivo eu me perdesse em meio a tantas encruzilhadas, saberia que o caminho de volta era um só.*

*Responsáveis por me fazer entender, que se um dia é da caça, o outro será do caçador. Que tudo é aprendido na matéria de vencer.*

*Responsáveis por mostrar que não existem barreiras intransponíveis e principalmente, que não há vitória sem luta!*

*A vocês dedico mais esta etapa da minha vida!*

*É impossível colocar em palavras o que sinto por você.*

*Amo vocês!*

## AGRADECIMENTOS

Agradecer pode não ser tarefa fácil. Para não correr o risco da injustiça, agradeço previamente a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização de mais essa etapa da minha vida. Contudo, discorro meus sinceros agradecimentos àqueles que diretamente tornaram possível a realização deste trabalho.

A DEUS, por me conceder a oportunidade de VIVER e por todas as dádivas que me são oferecidas diariamente.

A minha irmã Edinalva e meus sobrinhos Yasmin e Nicollas por sempre torcerem por mim.

Ao Prof. João Xavier, pela orientação, paciência e ensinamentos. Conhecimento este, que levarei para o resto vida. Meus sinceros agradecimentos.

A Profa. Patrícia de Albuquerque Sarmiento, pela paciência, pela colaboração, motivação e incentivo para execução e apoio em todas as etapas deste trabalho.

A Profa. Fabiane pela amizade, disposição e colaboração fundamentais no desenvolvimento deste trabalho.

A Prof. Êurica por disponibilizar seu laboratório para realizarmos os experimentos *in vivo* desta Tese.

Ao irmão que a vida me presenteou, Gilnison. Sem ele, tudo seria mais difícil.

Ao pequeno grupo de estudo em AGEs: Ana Beatriz, Mariana, Marianny e Silmara por toda ajuda.

À banca examinadora Prof. Mario Roberto Meneghetti, Prof. Luciano Aparecido Meirelles Grillo e a Prof<sup>a</sup>. Maria Aline Barros Fidelis de Moura pela disposição de avaliar esta tese.

E aos meus amigos (as) que estiveram comigo na caminhada com todo seu apoio na concretização de mais um sonho.

Agradeço ao corpo docente do Programa em Pós Graduação em Química e Biotecnologia da UFAL, que muito me ensinaram.

Aos colegas do LQM, pela amizade fortalecida.

*“O experimento nunca falha, apenas nossas opiniões falham,  
ao esperar do experimento aquilo que ele não é capaz de oferecer.”*

(Leonardo da Vinci)

## RESUMO

Diabetes *mellitus* (DM) é considerada um problema de saúde em todo o mundo. Caracterizada por um grupo de distúrbios metabólicos resultantes de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina ou em ambos. Um dos maiores problemas decorrentes da doença são as complicações provenientes da hiperglicemia crônica e estas complicações possuem uma relação direta com o acúmulo dos produtos de glicação avançada (AGEs). Diferentes substâncias têm sido estudadas como estratégias para a prevenção das complicações do diabetes, especialmente substâncias com potencial antiglicante, como a aminoguanidina. No intuito de se descobrir novos compostos ativos capazes de inibir a formação dos produtos de glicação avançada, foram planejados derivados aminoguanidínicos, os quais foram avaliados sua ação antiglicante e adiante foi avaliada a atividade antidiabética. Para a avaliação da atividade antiglicante, os AGEs foram produzidos utilizando o modelo albumina bovina sérica (BSA) e glicose como o agente glicador. Dos 22 derivados aminoguanidínicos estudados, 4 deles apresentaram resultados de inibição abaixo de 50%, 8 com percentuais de inibição entre 50 a 69%, 10 compostos apresentaram percentuais de inibição acima de 70%. Os compostos LQM 103, LQM 130, LQM 140 e LQM 141 apresentaram os melhores resultados, com respectivamente 95, 94, 98 e 99% de inibição dos AGEs durante os 56 dias de incubação, demonstrando terem um forte potencial anti-AGE. Em seguida foi realizado o ensaio de citotoxicidade celular *in vitro* por viabilidade celular (MTT-tetrazólio). Os resultados do MTT indicaram que os derivados aminoguanidínicos testados não apresentaram citotoxicidade frente à fibroblatos 3T3 nas concentrações de 10 e 100  $\mu$ M. Apenas o composto LQM 98 apresentou citotoxicidade na concentração de 10  $\mu$ M frente a células de macrófagos J774A.1, apesar deste composto esta entre os que apresentaram 70% de inibição da formação de produtos finais de glicação avançada. Os compostos mais promissores foram selecionados para o estudo *in vivo* de toxicidade aguda e antidiabética. Não foram observados evidências de toxicidade aguda em níveis comportamentais ponderais, hematológicos, bioquímicos sorológicos e histológicos. No ensaio antidiabético, os derivados aminoguanidínicos promoveram uma redução glicêmica nos animais tratados em até 60%. Desta forma, pode-se inferir que os derivados aminoguanidínicos LQM 140 e LQM 141 foram os mais promissores voltados à atividade antiglicante e antidiabética. No entanto, mais estudos necessitam ser realizados para compreender melhor as relações entre DM, atividade antiglicante dos derivados aminoguanidínicos, visando elucidar os mecanismos de ação e estabelecer o potencial terapêutico desses compostos para os pacientes diabéticos e prevenir as complicações crônicas que acompanham a hiperglicemia.

**Palavras-chave:** Antiglicante, Diabetes, Produtos finais de glicação avançada, Derivados aminoguanidínicos.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is considered a health problem all over the world. Characterized by a group of metabolic disorders resulting from defects in insulin secretion, insulin action or both. One of the major problems arising from the disease is the complications from chronic hyperglycemia and these complications have a direct relationship with the accumulation of advanced glycation products (AGEs). Different substances have been studied as strategies for the prevention of complications of diabetes, especially substances with potential anti-graft, such as aminoguanidine. In order to discover new active compounds capable of inhibiting the formation of advanced glycation products, aminoguanidine derivatives were designed, which evaluated their antiglycating action and the antidiabetic activity was evaluated. For the evaluation of the antiglycating activity, the AGEs were produced using bovine serum albumin (BSA) and glucose as the glyicator. Of the 22 aminoguanidine derivatives studied, 4 of them showed inhibition results below 50%, 8 with inhibition percentages between 50 and 69%, 10 compounds showed percent inhibition above 70%. The compounds LQM 103, LQM 130, LQM 140 and LQM 141 showed the best results, with respectively 95, 94, 98 and 99% inhibition of AGEs during the 56 days of incubation, showing to have a strong anti-AGE potential. Cellular cytotoxicity assay was performed *in vitro* by cell viability (MTT-tetrazolium). MTT results indicated that the aminoguanidine derivatives tested did not show cytotoxicity against 3T3 fibroblasts at concentrations of 10 and 100  $\mu\text{M}$ . Only the compound LQM 98 showed 10  $\mu\text{M}$  cytotoxicity against J774A.1 macrophages cells, although this compound was among those that showed 70% inhibition of the formation of advanced glycation end products. The most promising compounds were selected for the *in vivo* study of acute and antidiabetic toxicity. No evidence of acute toxicity was observed at ponderal, hematological, serological and histological biochemical levels. In the antidiabetic assay, the aminoguanidine derivatives promoted a glycemic reduction in treated animals up to 60%. In this way, it can be inferred that the aminoguanidine derivatives LQM 140 and LQM 141 were the most promising ones directed to the antiglycating and antidiabetic activity. However, further studies need to be carried out to better understand the relationships between DM, the antiglycating activity of aminoguanidine derivatives, in order to elucidate the mechanisms of action and to establish the therapeutic potential of these compounds for diabetic patients and to prevent the chronic complications that accompany hyperglycemia.

**Keywords:** Antiglycating. Diabetes. Advanced glycation endproducts. Aminoguanidine derivatives.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Vias deletérias que levam ao estresse oxidativo e provocam o dano celular a partir da elevação da glicose.	32
<b>Figura 2</b> - Formação dos produtos finais de glicação avançada.	35
<b>Figura 3</b> - Fatores que determinam as concentrações circulantes de produtos finais de glicação avançada (AGEs) em seres humanos.	36
<b>Figura 4</b> - Estrutura química da aminoguanidina.	39
<b>Figura 5</b> - Retrossíntese do esqueleto base das guanilhidrazonas e das tiossemicarbazonas.	44
<b>Figura 6</b> - Condições ambientais dos grupos de estudo: A. Estantes com as gaiolas experimentais. B. Gaiola experimental com cama de maravalha e animais em estudo.	53
<b>Figura 7</b> - Administração por via oral dos derivados aminoguanidínicos.	54
<b>Figura 8</b> - Controle do peso dos animais (A) e inalação com éter etílico (B).	58
<b>Figura 9</b> - Coleta de sangue através da cauda do animal e leitura em glicosímetro.	61
<b>Figura 10</b> - Animais em jejum, necropsia e órgãos coletados.	63
<b>Figura 11</b> - Remoção dos órgãos e análise histopatológica dos órgãos.	67
<b>Figura 12</b> - Percentual de Inibição da Formação de AGEs a partir da junção de Glicose –BSA com os derivados aminoguanidínicos e os controles aminoguanidina e quercetina. Substâncias que não apresentaram atividade antiglicante na concentração de 10 mM durante o período de leitura de 56 dias.	70
<b>Figura 13</b> - Percentual de Inibição da Formação de AGEs a partir da junção de Glicose –BSA com os derivados aminoguanidínicos e os controles aminoguanidina e quercetina. Resultados com valores inferiores a 70% de Inibição na concentração de 10 mM durante o período de leitura de 56 dias.	71
<b>Figura 14</b> - Percentual de Inibição da Formação de AGEs a partir da junção de Glicose –BSA com os derivados aminoguanidínicos e os controles aminoguanidina e quercetina. Resultados com valores superiores a 70% de Inibição na	72

concentração de 10 mM durante o período de leitura de 56 dias.

- Figura 15** - Percentual de Inibição da Formação de AGEs a partir da junção de Glicose – BSA com os derivados aminoguanidínicos e os controles aminoguanidina e quercetina. Resultados com percentuais de inibição superiores a aminoguanidina e quercetina na concentração de 10 mM durante o período de leitura de 56 dias. 74
- Figura 16** - Modificações estruturais importantes nos derivados aminoguanidínicos e suas influências sobre a atividade antiglicante. 75
- Figura 17** - Efeito do LQM 103, LQM 130, LQM 140, LQM 141 na viabilidade dos fibroblastos 3T3. 78
- Figura 18** - Níveis plasmáticos de ureia, creatinina e ácido úrico de ratos Wistar do teste de toxicidade aguda tratados em dose única com os derivados aminoguanidínicos, aminoguanidina e o controle negativo (n=3). 91
- Figura 19** - Níveis plasmáticos de AST/TGO (aspartato aminotransferase), ALT/TGP (alanina aminotransferase), GGT (Gamaglutamiltranspeptidase), bilirrubina total e direta, fosfatase alcalina de ratos Wistar do teste de toxicidade aguda tratados em dose única com os derivados aminoguanidínicos, aminoguanidina e o controle negativo (n=3). 94
- Figura 20** - Níveis plasmáticos de proteínas totais e albumina de ratos Wistar do teste de toxicidade aguda tratados em dose única com os derivados aminoguanidínicos, aminoguanidina e o controle negativo (n=3). 99
- Figura 21** - Níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos de ratos Wistar do teste de toxicidade aguda tratados em dose única com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles. 101
- Figura 22** - Análise histológica hepática da toxicidade aguda dose única por gavagem com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles. 107
- Figura 23** - Análise histológica renal da toxicidade aguda dose única por gavagem com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles. 108
- Figura 24** - Análise histológica do pâncreas da toxicidade aguda dose única por gavagem com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles. 109
- Figura 25** - Comparação entre animais diabéticos e não diabéticos. 110
- Figura 26** - Efeito da administração sobre a massa corporal (g) de ratos Wistar (n=5) dos derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controle antes do 111

tratamento e pós-tratamento (28dias) do teste de atividade antidiabética sob a massa corporal (g) de ratos Wistar (n=5).

**Figura 27** - Valores de hemoglobina glicada (HbA1c) de ratos Wistar (n=5) 115  
tratados com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.

**Figura 28** - Níveis plasmáticos de Ureia, Creatinina e ácido úrico de ratos Wistar 117  
tratados com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.

**Figura 29** - Níveis plasmáticos de proteínas totais e albumina de ratos Wistar 119  
tratados com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.

**Figura 30** - Níveis plasmáticos de AST/TGO (aspartato aminotransferase), 122  
ALT/TGP (alanina aminotransferase), GGT (Gamaglutamiltranspeptidase),  
bilirrubina total e direta, fosfatase alcalina de ratos Wistar tratados com os  
derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.

**Figura 31** - Níveis plasmáticos de Colesterol total, Colesterol HDL e 126  
Triglicerídeos de ratos Wistar tratados com os derivados aminoguanidínicos e  
seus respectivos controles.

**Figura 32** - Análise histológica hepática de ratos Wistar não diabéticos tratados 133  
com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.

**Figura 33** - Análise histológica hepática de ratos Wistar diabéticos tratados com 134  
os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.

**Figura 34** - Análise histológica renal de ratos Wistar não diabéticos tratados com 135  
os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.

**Figura 35** - Análise histológica renal de ratos wistar diabéticos tratados com os 136  
derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.

**Figura 36** - Análise histológica do pâncreas de ratos Wistar diabéticos tratados 138  
com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.

**Figura 37** - Análise histológica do pâncreas de ratos Wistar não diabéticos 139  
tratados com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Critérios aceitos para o diagnóstico do Diabetes <i>melitus</i> pela ADA aprovada pela OMS e pela SBD de glicose plasmática (em mg/dL) e seus estágios pré-clínicos.	22
<b>Tabela 2</b> - Agentes hipoglicemiantes com os respectivos fármacos.	25
<b>Tabela 3</b> - Série histórica da insulina desde a sua descoberta.	27
<b>Tabela 4</b> - Características farmacocinéticas das insulinas.	29
<b>Tabela 5</b> - Grupos para o ensaio de toxicidade aguda com as respectivas concentrações dos derivados aminoguanidínicos e número de animais.	56
<b>Tabela 6</b> - Grupos para a indução de diabetes com as respectivas concentrações dos derivados aminoguanidínicos e número de animais.	59
<b>Tabela 7</b> - Efeito dos derivados aminoguanidínicos sobre a viabilidade celular em 10 $\mu$ M.	77
<b>Tabela 8</b> - Efeito da administração dos derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles por via oral sobre o desenvolvimento ponderal (g) de ratos Wistar (n=3) tratados com dose única.	81
<b>Tabela 9</b> - Efeito da administração dos derivados aminoguanidínicos por via oral tratados com dose única sobre os parâmetros hematológicos de ratos Wistar (n=3) a) série vermelha e b) plaquetas e série branca.	85
<b>Tabela 10</b> - Efeito da administração dos derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles antes e pós-tratamento do teste de toxicidade aguda em dose única sobre a glicemia (mg/dL) de ratos Wistar (n=3).	89
<b>Tabela 11</b> - Peso absoluto (g) dos órgãos dos ratos Wistar do teste de toxicidade aguda tratados em dose única com os derivados aminoguanidínicos, aminoguanidina e o controle negativo (n=3).	104
<b>Tabela 12</b> - Valores de glicemia de ratos Wistar diabéticos e não diabéticos e percentuais antes e após o tratamento com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.	113
<b>Tabela 13</b> - Efeito da administração dos derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles sobre os parâmetros hematológicos de ratos Wistar (n=3) a) série vermelha e b) plaquetas e série branca.	129

**Tabela 14** - Peso absoluto (g) dos órgãos dos ratos Wistar tratados com os 131 derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.

## **LISTA DE QUADRO**

**Quadro 1** - Nomenclatura e estruturas químicas dos derivados 45 aminoguanidínicos.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ACEIs** - Inibidores da Enzima de Conversão da Angiotensina (do inglês “*Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors*”)

**ADA** - Associação Americana de Diabetes

**AGEs** - Produtos de Glicação Avançada (do inglês “*advanced glycation endproducts*”)

**AG** – Aminoguanidina

**ALT** – Alanina Aminotransferase

**ARBs** - Bloqueador do Receptor de Angiotensina (do inglês “*Angiotensin Receptor Blockers*”)

**AST** – Aspartato Aminotransferase

**AVC** - Acidente Vascular Cerebral

**Ca<sup>+2</sup>** – Cálcio

**CML** – Carboximetilisina

**CEL** – Carboxietilisina

**CHCM** – Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média

**DAG** – Diacilglicerol

**DCV** - Doenças Cardiovasculares

**DDC** - Doenças Cardíacas Coronárias

**DM** - Diabetes *Mellitus*

**DM1** - Diabetes *Mellitus* Tipo 1

**DM2** - Diabetes *Mellitus* Tipo 2

**DRCT** - Doença Renal Crônica Terminal

**3-DG** - 3-Deoxiglicosona

**GAD** – Glicolaldeído

**GFAT** - Frutose-6-Fosfato Aminotransferase

**GGT** – Gama- Glutamiltrasnferase

**GO** – Glioxal

**GSH** - Glutathiona Adenina Reduzida

**HbA1c** - Hemoglobina Glicada

**HCC** - Carcinoma Hepatocelular

**HCM** – Hemoglobina Corpuscular Média

**HCT** - Hematócrito

**HGB** - Hemoglobina

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de Hidrogênio

**IMC** - Índice de Massa Corporal

**LDH** - Lipoproteínas de Baixa Densidade

**MGO** – Metilglioxal

**NADPH** - Nicotinamida Adenina Difosfato

**NO** - Óxido Nítrico

**NOS** - Óxido Nítrico Sintase (do inglês “*Nitric Oxide Synthase*”)

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**PKC** - Proteína Cinase C

**PLT** - Plaquetas

**SBD** - Sociedade Brasileira de Diabetes

**SNA** – Sistema Nervoso Autônomo

**VCM** – Volume Corpuscular Médio

**TZDs** - Tiazolidinedionas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>21</b>
2.2.	<i>Diabetes mellitus</i> .....	21
2.3.	<b>Tratamento do <i>Diabetes mellitus</i> e procedimentos para avaliação do controle glicêmico</b> .....	<b>23</b>
2.3.1.	Antidiabéticos e hipoglicemiantes .....	25
2.3.2.	Insulinoterapia .....	27
2.4.	<b>Complicações crônicas do Diabetes</b> .....	<b>29</b>
2.5.	<b>Mecanismos de lesão tecidual provocado pela hiperglicemia</b> .....	<b>31</b>
2.6.	<b>Produtos finais de glicação avançada - AGEs</b> .....	<b>33</b>
2.7.	<b>Potencial biológico das guanil-hidrazonas</b> .....	<b>38</b>
2.8.	<b>Indução de DM nos modelos experimentais: ação da estreptozotocina</b> .....	<b>39</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>42</b>
3.1.	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>42</b>
3.2.	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>42</b>
<b>4.</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>44</b>
4.1.	<b>Substâncias utilizadas: Derivados aminoguanidínicos</b> .....	<b>44</b>
4.2.	<b>Atividade antiglicante</b> .....	<b>49</b>
	Avaliação do potencial antiglicante foi realizada empregando-se o sistema albumina sérica bovina (BSA)/glicose .....	49
4.3.	<b>Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT</b> .....	<b>51</b>
4.4.1	Manutenção dos macrófagos .....	52
4.4.2	Manutenção dos fibroblastos .....	52
4.4.	<b>Animais</b> .....	<b>53</b>
4.5.	<b>Avaliação da toxicidade aguda <i>in vivo</i> em dose única</b> .....	<b>54</b>
4.5.1	Protocolo experimental de toxicidade <i>in vivo</i> .....	55
4.5.2	Delineamento experimental .....	56
4.5.3	Observação dos sinais de toxicidade .....	57
4.6.	<b>Indução de Diabetes Experimental por Estreptozotocina</b> .....	<b>58</b>
4.6.1.	Delineamento experimental .....	59
4.6.2.	Administração das substâncias em estudo .....	60
4.6.3.	Avaliações .....	60

4.6.3.1. Avaliação da ingestão hídrica e alimentar e controle de massa corporal .....	61
4.6.3.2. Glicemia.....	61
<b>4.7. Eutanásia dos animais e coleta de sangue.....</b>	<b>62</b>
4.7.1. Análises .....	64
<b>4.8. Análise Estatística .....</b>	<b>67</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>69</b>
<b>5.1 Avaliação do potencial antiglicação utilizando sistema albumina sérica bovina (BSA)/glicose</b>	<b>69</b>
5.2. Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT .....	76
5.3. Avaliação da toxicidade aguda <i>in vivo</i> em dose única .....	80
5.3.1. Alterações comportamentais.....	80
5.3.2. Avaliação do perfil glicêmico, parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	82
5.4. Avaliação da atividade antidiabética <i>in vivo</i> .....	110
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>141</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>144</b>
<b>ANEXO - Parecer da Comissão Ética no uso de animais da Universidade Federal de Alagoas</b>	<b>169</b>

# INTRODUÇÃO

---

---

## 1 INTRODUÇÃO

O Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crônica caracterizada por altos níveis de glicose, decorrente de problemas na ação ou na produção de insulina pelo pâncreas. O DM pode ser classificado em duas categorias: diabetes Tipo 1 (DM1) – caracterizado por um déficit na produção de insulina, causada normalmente causada por uma autoimunidade do organismo contra as células  $\beta$  pancreáticas; e diabetes Tipo 2 (DM2) quando o organismo apresenta distúrbio de receptor, em que não utiliza adequadamente a insulina secretada, ou apresenta relativa deficiência de insulina com resistência à insulina (ADA, 2015).

O descontrole glicêmico em longo prazo pode acarretar complicações relacionadas às funções metabólicas, endócrinas, assim como os problemas micro e macro vasculares, com lesões em nervos, acometimento da microvasculatura da retina (retinopatia) com perda potencial de visão, do glomérulo renal (nefropatia), levando o indivíduo a insuficiência renal, neuropatia periférica com risco de úlceras nos pés, conhecido popularmente como “pé diabético”, vasculopatia periférica, devido à deposição de lipídeos nos vasos à proporção que vão sendo transportados para os tecidos; e neuropatia autonômica, acarretando sintomas gastrointestinais, geniturinários, problemas cardiovasculares, disfunção sexual, como também promovendo o maior risco de desenvolver a doença de Alzheimer ou outras funções de demência (ADA, 2015; ALVAREZ et al., 2009; ARYA; YADAV; SHARMA, 2011; BROWNLEE, 2001; MOULTON et al., 2015).

No estado hiperglicêmico crônico ocorre à formação e acúmulo dos produtos de glicação avançada (AGEs), que contribuem de forma relevante para o aparecimento e a progressão de alterações estruturais e funcionais causadora de danos teciduais irreversíveis em pacientes diabéticos, através de uma reação não enzimática denominada reação de Maillard. Desta forma, o controle glicêmico é um dos mais importantes parâmetros fisiológicos, essencial para prevenção das complicações crônicas da diabetes.

A prevenção das complicações e morbidade no DM é uma estratégia de grande importância de Saúde Pública para a redução da mortalidade. O tratamento apresenta custo elevado e é bastante complexo, especialmente quando se considera as mudanças intensas e radicais na rotina, como a administração diária da insulina e monitoramento constante da glicemia. Estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que os AGEs têm um papel essencial na patogênese da nefropatia diabética e na progressão da insuficiência renal. Com isso, a busca de novos fármacos, que apresentem benefícios em relação à capacidade antiglicante (anti-AGEs) e antidiabética, com mínimos efeitos colaterais, é uma estratégia vantajosa para o

controle desta doença. Com isso, os AGEs podem ser considerado um alvo promissor de novas intervenções terapêuticas (ADA, 2013; BARBOSA et al., 2008; BARBOSA et al., 2009; FERREIRA et al., 2011; LAGRANHA et al., 2007; MURUSSI et al., 2008).

As guanidinas e seus derivados representam uma classe importante de compostos nitrogenados. Dentre seus vários derivados, o de maior importância é a aminoguanidina. Esta apresenta um grupo hidrazina ligado ao átomo de carbono apresenta atividade de inibição de produtos glicosados (AGEs), tanto *in vitro* quanto *in vivo* (HORI et al, 2012). Estudos tem demonstrado o papel da aminoguanidina no retardo de complicações em pacientes com Diabetes *mellitus* com aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) (DI BERNARDO et al., 2008). Apesar de, Nenna et al (2015) reportarem que a aminoguanidina não é totalmente benéfica em humanos e que estudos em humanos foram interrompidos devido à falta de eficácia, principalmente devido à citotoxicidade nas células hepáticas.

O planejamento molecular adequado de novas estruturas a partir de um composto bioativo pode resultar em derivados com maior interesse terapêutico, seja por apresentar melhores efeitos farmacológicos, menor toxicidade, ou ainda, por adquirir características farmacotecnicamente mais adequadas (TAVARES, 2004).

Neste estudo, realizou-se a avaliação antiglicante e antidiabética de novos derivados aminoguanidínicos que foram sintetizados através da estratégia do bioisosterismo, visando um potencial terapêutico na prevenção das complicações crônicas induzidas pelo Diabetes *mellitus*, melhorando a qualidade de vida dos indivíduos acometidos.

# REFERENCIAL TEÓRICO

---

---

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.2. *Diabetes mellitus*

A história do diabetes reporta há aproximadamente três milênios a começar de sua descoberta, descrição e pesquisas sobre causas e tratamentos. Entretanto, somente na década de 80, com a necessidade de universalizar o diagnóstico e a classificação do DM, a Associação Americana de Diabetes - ADA e a Organização Mundial de Saúde - OMS organizaram diversas publicações de caráter normativo (BARNETT; KRALL, 2009).

Com o propósito de se precaver de maneira efetiva as complicações provenientes da doença, em 1997 foram modificados os critérios para o diagnóstico pela Associação Americana de Diabetes – ADA e aprovada pela Organização Mundial da Saúde – OMS e pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) (Diretrizes SBD, 2016). São quatro os critérios aceitos para o diagnóstico do DM com a utilização da glicemia (**Tabela 1**). O primeiro critério consiste na apresentação de sintomas de poliúria, polidipsia e perda de peso e com valores de glicemia casual  $\geq 200$  mg/dL. É considerada glicemia casual aquela realizada a qualquer hora do dia, independentemente do horário das refeições. Como segundo critério é utilizado glicemia de jejum  $\geq 126$  mg/dL, caso aconteça pequenas elevações da glicemia, deve ser repetida a análise em outro dia, visando confirmar o resultado do dia anterior. O terceiro refere-se à glicemia com valores  $\geq 200$  mg/dL, analisada 2 h após da sobrecarga de 75 g de glicose. E por fim, se trata de valores de hemoglobina glicada - HbA1c maior ou igual a 6,5% (Diretrizes SBD, 2016).

**Tabela 1 - Critérios aceitos para o diagnóstico do Diabetes *mellitus* pela ADA aprovada pela OMS e pela SBD de glicose plasmática (em mg/dL) e seus estágios pré-clínicos.**

CATEGORIA	JEJUM (NO MÍNIMO DE 8H)	2H APÓS 75 G DE DE GLICOSE	CASUAL
Glicemia normal	< 100	< 140	
Tolerância à glicose diminuída	≥ 100 a < 126	≥ 140 a < 200	
Diabetes <i>mellitus</i>	≥ 126	≥ 200	≥ 200 (com poliúria, polidipsia e perda não explicada de peso)

Fonte: Adaptado das Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2016.

O Diabetes *mellitus* é definido como uma síndrome metabólica complexa caracterizada por deficiência de insulina ou desenvolvimento de resistência ao hormônio, que leva à hiperglicemia e metabolismo alterado de glicose, lipídeos e proteínas (ARYA; YADAV; SHARMA, 2011). Com a finalidade de regular o nível de açúcar no sangue, as células  $\beta$ -pancreáticas sofrem alterações nas suas propriedades elétricas devido à estimulação da glicose (FRIDLYAND et al. 2010). A deficiência na produção de insulina, de modo geral, acontece devido às reações autoimunes contra as células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans pancreáticas, configurando o DM Tipo 1 (RICHARDSON et al., 2013).

Contudo, alguns indivíduos com DM1 não possuem mediadores de doença autoimune, sendo sugerida uma subdivisão classificada como diabetes Tipo 1 idiopática ou Tipo 1B (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014). Além disso, mesmo os fatores genéticos sendo considerados como a principal causa da autoimunidade frente a células  $\beta$ , existe ainda a hipótese de que infecções virais prévias podem predispor ao desenvolvimento do DM tipo 1 (CASANOVA; HUGHES; PRESHAW, 2014; RICHARDSON; HORWITZ, 2014).

Os Vírus, como por exemplo, os enterovírus, conseguem atuar através de um efeito citolítico direto ou por disparo de um processo autoimune, além do mimetismo molecular por homologia estrutural entre as estruturas virais e antígenos de células (HONEYMAN et al., 2010; KNIP; SIMELL, 2012). Os indivíduos que são mais propensos para desenvolver este tipo de diabetes podem ser diagnosticados por meio de marcadores genéticos e testes sorológicos do processo autoimune (ADA, 2015).

O desenvolvimento do DM Tipo 2 ocorre por causa de fatores genéticos e ambientais que, isolados ou associados, causam hiperglicemia crônica devido à resistência à ação da insulina (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006). Ocorre devido à resistência à ação da insulina, geralmente associado à dislipidemia, obesidade e sedentarismo (ADA, 2015). Este tipo de diabetes é mais comum entre as pessoas, com estimativa do aumento do número de portadores em razão do crescimento de obesos (CHEN; MAGLIANO; ZIMMET, 2012; KAHN; COOPER; DEL PRATO, 2014). Porém, mesmo que o conceito tradicional de DM Tipo 2 fosse caracterizado, unicamente, pela resistência à insulina e hiperinsulinemia (WEYER et al., 2001), ainda é possível que ocorra uma diminuição progressiva na secreção de insulina (ADA, 2015). Esta diminuição ocorre porque a hiperglicemia crônica e lipotoxicidade gerada pela dislipidemia provocam apoptose de células  $\beta$  pancreáticas (KAHN; COOPER; DEL PRATO, 2014).

O Diabetes *mellitus* gestacional está relacionado à intolerância à glicose juntamente com uma hiperglicemia de gravidade variável, iniciando e/ou diagnosticando na gestação e geralmente ocorre no 6º mês de gestação e tende a desaparecer após o parto. Estudos relatam que gestantes que desenvolveram diabetes gestacional correm maior risco de tornarem diabéticas futuramente em outras gestações seja com diabetes gestacional ou o DM Tipo 2, tendo em vista que as duas formas da doença estão relacionadas à resistência à insulina e diminuição da função das células  $\beta$  (BENNETT, KNOWLER, 2009; Diretrizes SBD, 2015; IDF, 2011).

### **2.3. Tratamento do Diabetes *mellitus* e procedimentos para avaliação do controle glicêmico**

As intervenções terapêuticas do DM consistem no controle dos sintomas agudos da doença, das complicações crônicas e na promoção da qualidade de vida dos indivíduos acometidos. O tratamento pode ser ou não medicamentoso, com mudanças dos hábitos de vida, incluindo a alimentação e prática de exercícios físicos (FUCHS, 2006). O tratamento medicamentoso inclui a insulinoterapia, através do uso da insulina exógena, e a administração de drogas alopáticas como sulfonilureias (glibenclamida), biguanidas (metformina) e inibidores da alfa-glicosidase (acarbose e miglitol), podendo ou não ser administradas em conjunto (HSU et al., 2009).

É fundamental que o tratamento propicie a obtenção de níveis glicêmicos o mais próximo da normalidade. Deste modo, existem níveis aceitáveis de tolerância para os valores de glicemia (exceto para a glicemia de jejum) e metas terapêuticas individualizadas a depender das comorbidades, duração do diabetes, complicações macro e micro vasculares, como também da idade do paciente. Para portadores do DM Tipo 1, no qual a insuficiência de insulina tende a ser total, o tratamento se dá através da reposição exógena direta do hormônio (podendo ser humana ou análogos). No caso do DM Tipo 2, a conduta pode ser mista, uma vez que para alguns indivíduos apenas a mudança do estilo de vida é suficiente para a normalização da glicemia, entretanto, outros além da dieta e dos exercícios físicos dependem da administração de antidiabéticos e/ou insulina para controle da doença (BAZZOTE, 2010; Diretrizes SBD, 2016).

Com o objetivo de analisar o controle glicêmico e a efetividade do tratamento escolhido, deve ser feito, além das dosagens de glicemia de jejum, a glicemia ao acaso, a pós-prandial, o auto monitoramento através da glicemia capilar e a hemoglobina glicada (HbA1c) (BAZZOTE, 2010; Diretrizes SBD, 2016). A Associação Americana de Diabetes – ADA estabelece que para o controle metabólico, a dosagem de hemoglobina glicada seja realizada ao menos duas vezes ao ano em pacientes com níveis estáveis de glicemia e quatro vezes ao ano em pacientes diabéticos, no qual o tratamento está sendo alterado ou que não estejam alcançando as metas glicêmicas recomendadas. A HbA1c – é uma fração formada a partir das reações entre a hemoglobina A (HbA) que é a fração principal e nativa da hemoglobina com alguns açúcares (NETTO, 2009).

Somente a fração HbA1c é considerada um marcador do índice de glicemia média, pois apresenta o terminal valina na cadeia beta que se liga de forma estável e irreversível à glicose. A quantidade de glicose ligada à hemoglobina é diretamente proporcional à concentração média de glicose no sangue. Como as hemácias apresentam uma vida média de aproximadamente 120 dias, a quantidade de glicose ligada à hemoglobina permite avaliar o controle glicêmico médio neste intervalo de tempo antes da data do exame. Sendo considerados os valores normais de 4 a 6% de HbA1c, assim, considera-se como tratamento do diabetes o valor de 6,5 a 7% de HbA1c como meta (Diretrizes SBD, 2016).

### 2.3.1. Antidiabéticos e hipoglicemiantes

Os agentes hipoglicêmicos orais são medicamentos que tem como objetivo reduzir os níveis glicêmicos através de uma variedade de mecanismos que incluem a redução na produção de glicose hepática (metformina), aumento na secreção de insulina pelas células beta do pâncreas (secretagogos de insulina como as sulfonilureias), melhora da sensibilidade à insulina (metformina e tiazolidinediona) e inibição da digestão e absorção da glicose intestinal (inibidores de alfa-glicosidase como acarbose e miglitol) (**Tabela 2**) (BAZZOTE, 2010; Diretrizes SBD, 2016; CHENG; FUNTUS, 2005).

**Tabela 2 - Agentes antidiabéticos e hipoglicemiantes com os respectivos fármacos.**

SENSIBILIZADORES DE INSULINA	SECRETAGOGOS DE INSULINA	MODULARES DA ABSORÇÃO DE NUTRIENTES NO TGI
<u>Biguanidas</u> – metformina	<u>Sulfonilureias</u> – clorpropamida, glibenclamida, glicazida, glipizida e glimepirida	Inibidores da $\alpha$ -glicosidase – acarbose
	<u>Metilglinidas</u> – repaglinida e natglinida	
<u>Tiazolidinodionas</u> – pioglitazona e rosiglitazona	<u>Inibidores da enzima dipeptidilpeptidase 4 (DDP-IV)</u> – vildagliptina, sitagliptina, saxagliptina e linagliptina	
	<u>Incretinomiméticos</u> – exenatida e liraglutida	

Fonte: Adaptado das Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2016.

A metformina é um derivado da guanidina, um composto hipoglicemiante proveniente da planta *Galega officinalis* (BAILEY; DAY, 1989). Apresenta efeito sensibilizador periférico para a insulina. No fígado, a metformina promove a inibição da neoglicogênese e

glicogenólise e estimula a glicogênese. Já em outros tecidos periféricos, como por exemplo: na musculatura esquelética, este é responsável pelo aumento da captação de glicose provocando rápida redução da glicemia plasmática. No adipócito, a metformina inibe a lipólise e a disponibilidade de ácidos graxos livres. Tem sido relatado que este medicamento exerce o número e melhora a afinidade dos receptores de insulina, tanto no adipócito quanto no tecido muscular. Em nível celular, foi comprovado que a mesma aumenta a atividade tirosina quinase do receptor de insulina, estimulando a translocação do transportador GLUT4 e a atividade da enzima glicogênio sintase (SANTOS et al., 1995). Diferentemente dos secretagogos, a metformina não aumenta os níveis plasmáticos de insulina (BAILEY; TURNER, 1996).

As sulfonilureias, como a clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glipizida, e a glimepirida, são medicamentos que agem no pâncreas aumentando a secreção de insulina. Elas se ligam aos seus receptores na superfície das células beta pancreáticas, que são intimamente ligadas com subunidades dos canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP, induzindo o fechamento desses canais com consequente inibição da saída dos íons potássio, desencadeando o processo de despolarização da membrana e secreção de insulina. Entretanto, estes medicamentos não afetam a sensibilidade à insulina e podem causar efeitos indesejáveis como hipoglicemia e ganho de peso, e, a longo prazo, danos renais e hepáticos (CHENG; FUNTUS, 2005).

As tiazolodinedionas, como a rosiglitazona e a pioglitazona, são medicamentos sensibilizadores da ação da insulina, tendo em vista que aumentam a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo de glicose e lipídeos (GOMES, 2006). Estudos envolvendo animais como modelos experimentais relataram que as tiazolodinedionas melhoram e preservam a função das células  $\beta$  pancreáticas (CHENG; FUNTUS, 2005). Em contrapartida, o uso destes fármacos provocam efeitos adversos tais como ganho de peso, edema, hepatotoxicidade e insuficiência cardíaca congestiva (CHENG; FUNTUS, 2005; GOMES, 2006).

Os inibidores da alfa-glicosidase, como a acarbose e o miglitol atuam como antagonistas enzimáticos da alfa-amilase diminuindo a absorção intestinal da glicose (JENMEY et al., 1993; SEGAL, 1997). Estes fármacos não interferem na secreção de insulina, e reduzem a glicemia de jejum e a hiperglicemia pós-prandial. Entretanto, apresenta efeitos indesejáveis, tais como: diarreias e dores abdominais (ARAUJO; BRITTO; PORTO DA CRUZ, 2000).

### 2.3.2. Insulinoterapia

Um grande avanço no tratamento do DM aconteceu em 1921 quando Banting et al. descobriram a insulina. Com o seu uso foi notado um aumento da expectativa de vida de pacientes portadores do DM e com isso despertou o interesse em conhecer o mecanismo de ação da insulina sobre o metabolismo intermediário, assim como entender as complicações crônicas do DM (**Tabela 3**) (BARNETT; KRALL, 2009)

**Tabela 3 - Série histórica da insulina desde a sua descoberta.**

1921	Descoberta a possibilidade de diminuir os níveis glicêmicos a partir da administração de extrato pancreático em cachorros diabéticos experimentais pancreatectomizados ( Banting et al.)
1922	Administrada pela primeira vez em humanos
1923	Marco inicial da comercialização e produção em larga escala pela indústria (Eli Lilly Company)
1925	Padronização da primeira unidade internacional de insulina (1 unidade – 0,125mg ). As insulinas U40/80 foram lançadas no mercado.
1926	Reconhecimento da insulina como hormônio proteico e uma maior estabilidade da formulação (John Jacob Abel)
1936	Zinco foi adicionado na insulina de protamina – PZI aumentando a duração da ação do hormônio (Scott, Fisher e Hagedorn)
1950	Criada a Insulina NPH com quantidades controladas de protamina (Nordisk Company)
1951	Insulina lenta desenvolvida a partir do tamponamento da insulina de zinco com acetato (Novo Company, Hallas-Moller)
1955	Delineamento da estrutura da insulina (Sanger et al.)
1967	Descoberta da pró-insulina (Steiner)
1971	Conceito do receptor de insulina (Ruth et al.)
1972	Insulina U 100 introduzida no mercado com o objetivo de melhorar a precisão da administração
1977	Gene da Insulina sendo clonado (Ullrich e et al.)
1981	Atividade da quinase sendo descrita no receptor de insulina (Kahn et al.)
1982	Insulina humana recombinante sendo lançada no mercado (Eli Lilly Company)
1996	Lançamento do Análogo de insulina de ação rápida – LISPRO (Humalog)
2001	Lançamento do Análogo de insulina de ação prolongada – GLARGINA (Lantus, Aventis Company)

Fonte: Adaptado de BARNETT, KRALL, 2009.

A insulina foi prescrita pela primeira vez em 1923 em um adolescente portador do DM, onde foi possível observar uma diminuição dos níveis glicêmicos, assim como foi estabelecido à relação da secreção pancreática e o DM. Com estas descobertas Banting e

Macleod ganharam o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia. Posteriormente a empresa americana *Eli Lilly* lançou a primeira insulina comercial (PIRES; CHACRA, 2008).

Inicialmente foram lançadas as insulinas de origem animal, no qual era obtida do extrato pancreático de boi ou do porco, denominada de insulina bovina ou suína, respectivamente, como também a mista. As indústrias farmacêuticas passaram a ter interesse em prolongar o tempo de ação da insulina, pois estas necessitavam sucessivas administrações durante o dia. Com isso, foi lançada posteriormente a insulina sintética com a ajuda da biologia molecular via DNA recombinante, esta era composta pela mesma sequência de aminoácidos da insulina humana endógena, classificada como insulina humana. A partir daí foram sendo sintetizados os análogos de insulina humana, cujas preparações iam sofrendo alterações na estrutura, propiciando assim diferentes tempos de ação para a formulação (BARNETT, KRALL, 2009; Diretrizes SBD, 2016; PIRES; CHACRA, 2008).

Nos indivíduos normais, os picos endógenos de insulina são iniciados em 15 a 45 minutos após o início das refeições e retornam ao basal com 90 a 180 minutos, com o objetivo de manter os níveis de glicose entre 70 a 125 mg/dL. Desta forma, foi necessário buscar preparações de insulina com tempos de ação distintos para os pacientes diabéticos, visando mimetizar o padrão da secreção endógena evitando os picos de hiperglicemia ou hipoglicemia (ROOS; SIQUEIRA; CLAUDIO, 2009).

As insulinas podem ser classificadas quanto ao seu perfil de ação: rápida, ultrarrápida, intermediária, prolongada e bifásica (**Tabela 4**) (BARNETT, KRALL, 2009; Diretrizes SBD, 2013; PIRES; CHACRA, 2008).

**Tabela 4 - Características farmacocinéticas das insulinas.**

INSULINA	INÍCIO DE AÇÃO	PICO DE AÇÃO	DURAÇÃO
RÁPIDA/ULTRARÁPIDA			
Regular	30-60min	2-4 horas	6-9 horas
Aspart/Lispro/Glulisina	10-15min	30-90 min	3-4 horas
AÇÃO INTERMEDIÁRIA			
NPH	1-2 horas	3-8 horas	12-15 horas
INSULINA BASAL			
Glargina	1-2 horas	sem pico	24 horas
Detemir	1-2 horas	sem pico	20 horas
PRÉ-MISTURAS			
70/30 NPH/Regular	30-60 min	3-8 horas (duplo)	12-15 horas
75/25 NPH/Lispro	10-15 min	30 min-8 horas (duplo)	12-15 horas

Fonte: Adaptado das Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2016.

## 2.4. Complicações crônicas do Diabetes

Com os estudos *in vivo* em células  $\beta$ , pode-se verificar que altas concentrações de glicose exarcebam a apoptose das células. A glicotoxicidade nas ilhotas de Langerhans do pâncreas é potencialmente irreversível, provocada pela longa exposição crônica de grandes concentrações de glicose em portadores do DM, com a diminuição característica da síntese e secreção da insulina (WAJCHENBERG, 2007).

A hiperglicemia crônica em longo prazo produz disfunções ou deficiência em vários órgãos, tais como: coração, vasos sanguíneos, nervos, olhos e rins. Perda de peso, poliúria, polidipsia, polifagia, perda da clareza na visão, prejuízo no crescimento, susceptibilidade a infecções e, como também, a cetoacidose. São sintomas que quando não controlados, podem resultar em retinopatia com perda crescente da visão, nefropatia, neuropatia, amputações, disfunções gastrintestinais, geniturinárias, cardiovasculares e sexuais. Pacientes com DM também apresentam aumento na prevalência de doenças cerebrovasculares e cardiovasculares (ADA, 2015).

A insuficiência das células mesangiais do glomérulo renal, das endoteliais dos capilares da retina, dos neurônios e das células de Schwann dos nervos periféricos, pode impedir a demasiada captação de glicose para o meio intracelular durante a hiperglicemia

prolongada as tornam vulneráveis às altas concentrações de glicose, ocasionando, mais tarde, nas complicações crônicas microvasculares diabéticas (BROWNLEE, 2001). A retinopatia diabética é representada pela quebra na barreira hemato-retiniana, perda de pericitos capilares, formação de microaneurismas, disfunção neuronal e isquemia progressiva e pode ser subdividida em não proliferativa e proliferativa (MANIGRASSO et al., 2014; MCVICAR 2015). O diagnóstico da retinopatia diabética é dado pelo aparecimento de lesões na vasculatura da retina que, em alguns casos, acarretam a perda irreversível da visão por hemorragias no humor vítreo ou por descolamento da retina resultante da retração secundária à fibrose (SHEETZ; KING, 2002).

A nefropatia diabética é considerada uma das principais causas de doença renal crônica terminal - DRCT nos indivíduos. O primeiro estágio é composto por anormalidades na hemodinâmica glomerular, resultando em hiperfiltração glomerular e, posteriormente, em microalbuminúria. Com isso, a função glomerular tende a declinar e, muitas vezes, ocorre à perda concomitante de albumina na urina. E em grande parte dos indivíduos acometidos, a diminuição da taxa de filtração glomerular pode progredir até a perda total da função renal (SHEETZ, KING, 2002).

A neuropatia diabética é descrita como a presença de sinais e sintomas de disfunção dos nervos periféricos em pacientes com DM, contanto que sejam descartadas outras causas de neuropatia (BANSAL; KALITA; MISRA, 2006). Cerca de 50% dos indivíduos portadores de DM são atingidos em algum grau pela neuropatia diabética que varia de uma mononeuropatia a uma polineuropatia (SHEETZ, KING, 2002).

A neuropatia pode prejudicar também o sistema nervoso autônomo - SNA de distintos sistemas. A neuropatia autonômica no sistema cardiovascular ainda é pouco diagnosticada, mesmo tendo um impacto significativo na sobrevivência e na qualidade de vida dos indivíduos portadores de DM. Os indivíduos acometidos sofrem inicialmente a perda do sistema parassimpático e posteriormente à falência do sistema nervoso autonômico simpático (KHANDOKER, 2012). Vale salientar também que o DM está relacionado à doença macrovascular aterosclerótica acelerada, no qual atinge as coronárias e as artérias que irrigam o cérebro e os membros inferiores (macroangiopatias) (MANIGRASSO et al., 2014).

Além dessas complicações citadas alguns estudos têm apontado à correlação entre DM Tipo 2 e um grande risco do desenvolvimento de Alzheimer. A hiperglicemia provoca sequelas neurológicas que, apesar de não estarem totalmente esclarecidas, podem prejudicar o metabolismo cerebral. As altas concentrações de glicose acarretam alterações nas glias, provocando desordens do SNC, sem envolver um déficit de insulina. Os astrócitos, quando

estão na presença de altas concentrações de glicose, diminuem o processo de captação de glutamato, o que pode favorecer a excitotoxicidade que está relacionada com o aumento da excitabilidade neuronal e hiperativação dos receptores glutamatérgicos e influxo excessivo de Cálcio –  $\text{Ca}^{+2}$  (BANKS; OWEN; ERICKSON, 2012; HUANG et al., 2012).

Com a exarcebação do influxo de  $\text{Ca}^{+2}$ , associado à ativação de diversas proteínas, como: proteases, fosfatases e fosfolipases, há uma elevação na produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, gerando um quadro de estresse oxidativo sobre as células neurais, acarretando a morte neuronal (BANKS; OWEN; ERICKSON, 2012; HUANG et al., 2012; MELLO; QUINCOZES-SANTOS; FUNCHAL, 2012; VALENTE et al., 2012).

## 2.5. Mecanismos de lesão tecidual provocado pela hiperglicemia

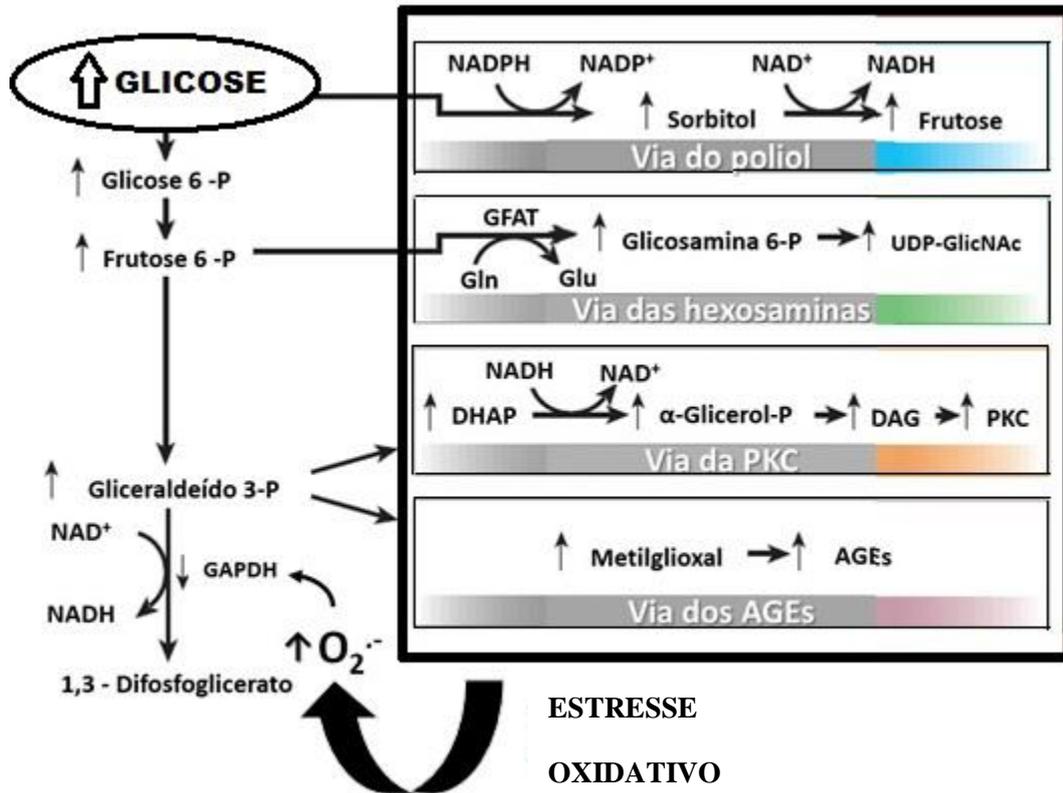
Existem alguns mecanismos que podem explicar o dano celular causado pela hiperglicemia.

Os principais são:

- ✓ Aumento do fluxo de glicose e outros açúcares na via dos polióis, produzindo estresse oxidativo;
- ✓ Aumento no fluxo da via das hexosaminas, com a exarcebação de citocinas; ativação de isoformas da proteína cinase C - PKC, gerando aumento de citocinas, estresse oxidativo e fatores proliferativos;
- ✓ Aumento da formação de produtos finais de glicação avançada - AGEs, gerando aumento de glicação de proteínas plasmáticas e da matriz extracelular; e aumento da expressão dos seus receptores.

Brownlee (2001) explicou que as vias deléteras citadas acima se dão devido à produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio na cadeia transportadora de elétrons, conforme a ilustração abaixo (**Figura 1**) (GIACCO; BROWNLEE, 2010).

Figura 1 - Vias deletérias que levam ao estresse oxidativo e provocam o dano celular em estágio hiperglicêmico.



Fonte: Adaptado de Brownlee, 2001.

Na via dos polióis, as altas concentrações de glicose intracelular resultam na conversão do sorbitol pela enzima aldose redutase. Esta possui uma baixa afinidade pela glicose e, em estados normais de glicemia, o processo metabólico da glicose através desta via é irrisório. Já na hiperglicemia, a glicose é convertida enzimaticamente em sorbitol, que por sua vez é oxidada à frutose através da sorbitol desidrogenase. No processo de redução da glicose para sorbitol há um consumo de nicotinamida adenina difosfato - NADPH, um composto necessário para a renovação da glutatona adenina reduzida – GSH através da glutatona redutase. Essa diminuição de GSH pode levar a um aumento do estresse oxidativo intracelular (mecanismo mais relevante que explica os efeitos deletérios originados da via dos polióis) (BROWNLEE, 2001).

Através das vias das hexosaminas, a glicose em excesso é convertida a frutose-6-fosfato que por sua vez, é convertida enzimaticamente a N-acetilglicosamina-6-fosfato através da glutamina frutose-6-fosfato aminotransferase (GFAT). Posteriormente, a N-

acetilglicosamina-6-fosfato é transformada a UDP-N-acetilglicosamina que auxilia na expressão de proteínas, funcionando como fatores de transcrição e por fim alterando a expressão de várias proteínas, dentre elas: Inibidor-1 do Ativador do Plasminogênio (PAI-1) e o fator de crescimento transformante beta – TGF- $\beta$ , nos quais estão ligados a vasculopatia diabética (BROWNLEE, 2001).

Já a excitação das isoformas da proteína cinase C é realizada através da ativação do segundo mensageiro diacilglicerol – DAG, resultando na alteração do fluxo sanguíneo, da diminuição da produção de óxido nítrico – NO e um aumento da endotelina-1. Acontece também alteração na permeabilidade vascular, devido ao aumento da expressão de fatores de crescimento, dentre eles: crescimento endotelial vascular (VEGF), TGF- $\beta$ . Nesta via pode também ter aumento da expressão do PAI-1, favorecendo a oclusão vascular e ativação do fator de transcrição NF-kB e a enzima NADPH oxidase (BROWNLEE, 2001), como também a via de formação dos AGEs, que levam ao estresse oxidativo, e será reportado a seguir.

## **2.6. Produtos finais de glicação avançada - AGEs**

Os produtos finais de glicação avançada são decorrentes de conversões pós-traducionais que acontecem em proteínas, por uma sequência de reações entre resíduos de aminoácidos básicos e hidratos de carbono ou carbonilas reativas. Os produtos finais de glicação são originados através de ligações covalentes não enzimáticas entre aldeídos redutores e grupos aminos terminais de cadeias polipeptídicas, fosfolipídeos, ácidos nucleicos e resíduos de lisina e arginina das proteínas (HORI et al., 2012; MONNIER, 2003).

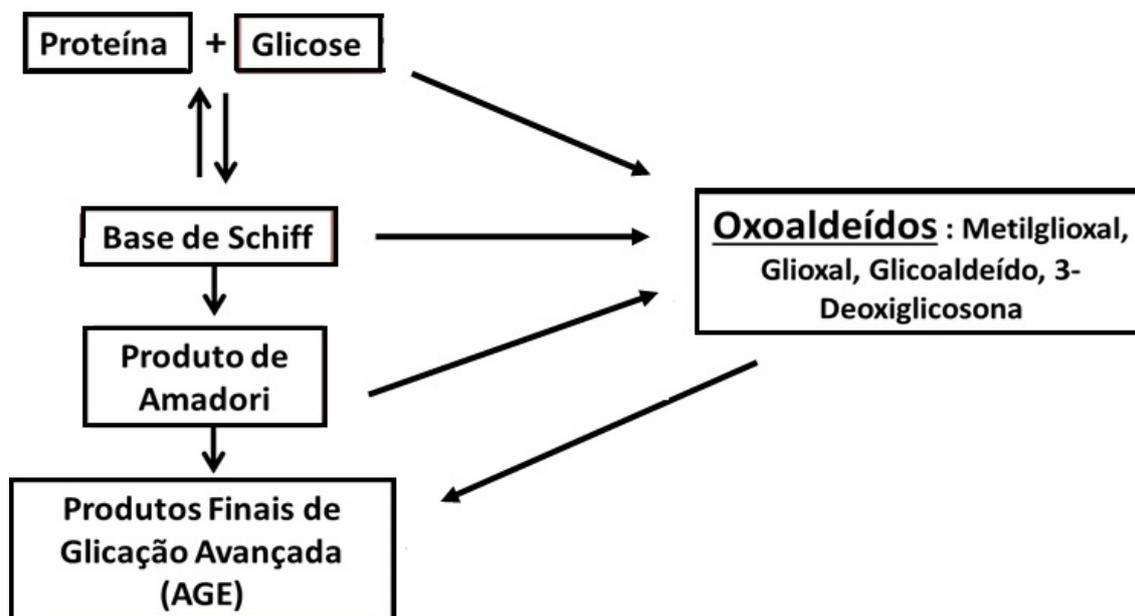
O processo de glicação *in vivo* ocorre de forma lenta e gradativa e é reversível em níveis normoglicêmicos, entretanto, tende a acelerar nos estágios de hiperglicemia que é o ponto de partida para a formação dos AGEs tanto intra quanto extracelulares. A via clássica da glicação, conhecida também por reação de Maillard, ou de escurecimento, possui três fases: inicial, intermediário e tardio (HORI et al., 2012).

Na fase inicial ocorre a formação da base de Schiff (um produto instável), produzida através da reação do grupo funcional carbonila da glicose, como também de outros açúcares redutores (frutose, manose, galactose e xilose), com grupamentos amino livres, oriundos de ácidos nucleicos, lipoproteínas. Com isso esta base passa por reações químicas, formando uma estrutura mais estável denominada de produto de Amadori (cetoamina), que são conhecidos marcadores de glicação no estágio inicial como, por exemplo, a frutose-lisina.

As principais variáveis que regulam a formação destes compostos são as concentrações de glicose circulante, a meia vida da proteína, sua reatividade em termos de grupamentos amina livres e a permeabilidade celular à glicose. Estes compostos possuem grupamentos carbonilas reativos e, através de ligações irreversíveis, podem acumular-se nas proteínas de meia vida curta e longa, como por exemplo: a hemoglobina glicada e a frutossamina e são conhecidos exemplos de produtos de Amadori (LAPOLLA; TRALDI; FEDELE, 2004).

No estágio intermediário, acontece a quebra da base de Schiff, do produto de Amadori e a autooxidação da glicose produzem oxoaldeídos, como metilglioxal (MGO), glioxal (GO), glicolaldeído (GAD) e 3-deoxiglicosona (3-DG) que são altamente reativos quando comparados aos seus açúcares de origem. Em particular, o metilglioxal (um alfa-oxaldeído) que é um dos compostos propagadores mais importantes *in vivo*, tanto pela sua alta reatividade como pela sua elevada concentração plasmática. No estágio final, estes propagadores podem interagir com grupamentos amino de proteínas diversas, e através de reações químicas formam, de forma irreversível, compostos denominados de AGEs que se acumulam nas proteínas e levam a lesões tissulares (**Figura 2**) (AHMED, 2005; BAYNES; THORPE, 1999; BEM; KUNDE, 2006; FRYE et al., 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Outro mecanismo pelo qual os AGEs podem ser formados envolve a auto-oxidação de açúcares livres na presença de oxigênio e metais livres levando à formação de compostos carbonila, que interagem com proteínas e formam cetoaminas altamente reativas (LAPOLLA; TRALDI; FEDELE, 2004).

**Figura 2 - Formação dos produtos finais de glicação avançada.**



Fonte: Adaptado de Adaptado de Frye, E. B. et al., 1998.

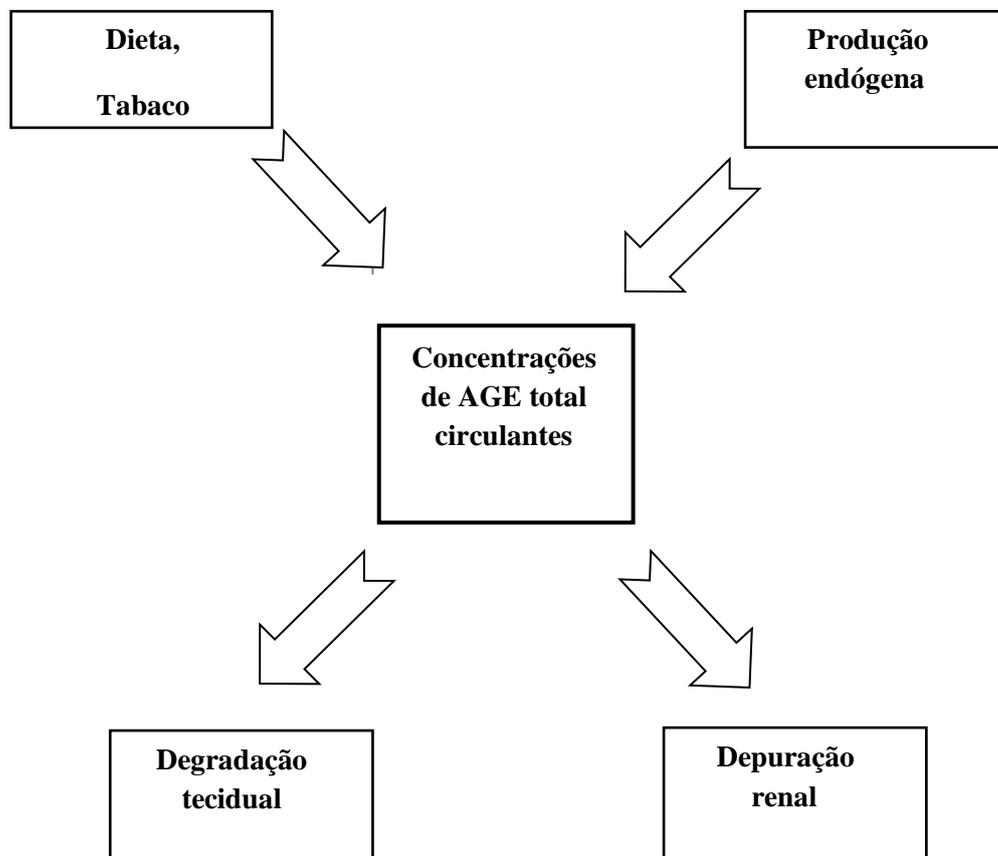
Diversos AGEs estão descritos na literatura, como por exemplo, a pirralina, pentosidina, argipirimidina, dímeros de lisina derivados do glioxal (GOLD), dímeros de lisina derivados da 3-deoxiglicosona (DOLD), AFGP (1-alkil-2-formil-3,4-diglicosil pirrol), FFI (2-(2-fluoril)-4,5-furanil-1-himidazol), carboxietil-lisina (CEL), carboximetil-lisina (CML) - encontrado em maior quantidade no soro sanguíneo humano (AHMAED et al., 2002; IKEDA et al., 1996; KIKUCHI et al., 2003; SCHLEICHER et al., 2001). Alguns apresentam autofluorescência com comprimentos de onda de excitação de 370 nm e emissão de 440 nm. Já a pentosidina, apresenta uma autofluorescência com comprimentos de onda de excitação 328 nm e emissão 378 nm (NAGAI et al., 2010).

Nos diabéticos esses produtos podem ser encontrados em diversos tecidos, tais como: o plasma humano, a urina e o fluido cerebrospinal, além de se acumularem em tecidos como retina e rins (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008; THORNALLEY, 2005).

Além da formação endógena, existe também fontes exógenas de produtos capazes de gerar AGEs, como por exemplo o tabaco. Estudos tem relatado grande quantidade de AGEs plasmático em pessoas fumantes quando comparados a não fumantes, mesmo não sendo portadores do DM (ROBINSON, 2012). Concentram-se principalmente nas lipoproteínas de

baixa densidade – LDL, aumentando o risco das complicações crônicas do DM (NICHOLL; BUCALA, 1998). Outra fonte são os alimentos preparados em altas temperaturas e com altas concentrações de açúcar (PEPPA; VLASSARA, 2005). Cerca de 10% dos AGEs ingeridos são absorvidos em nível intestinal, dos quais 2/3 (dois terços) são encontrados na forma bioativa e 1/3 (um terço) é excretado no período de 48 horas com a função renal normal (KOSCHINSKY, 1997). Com isso, a quantidade de AGEs é um equilíbrio entre a formação endógena e as fontes exógenas *versus* o catabolismo, os quais estão incluídos a degradação tecidual e a eliminação renal (**Figura 3**) (URIBARRI, 2005).

**Figura 3 - Fatores que determinam as concentrações circulantes de produtos finais de glicação avançada (AGEs) em humanos.**



Fonte: Adaptado de Uribarri J. et al., 2005.

Alguns estudos apontam uma ligação positiva entre o consumo de AGEs oriundos da dieta e as concentrações plasmáticas desses compostos. Da mesma forma, o índice de massa corporal – IMC pode induzir na quantidade de AGEs circulantes, devido a degradação e

catabolismo dos AGEs no tecido adiposo (KOSCHINSKY, 1997; SEMBA, 2011; SEMBA, 2014; URIBARRI, 2005).

Os AGEs aglomerados nos tecidos podem causar lesão tecidual a partir de ligação cruzada com proteínas ou diretamente pela ligação nos receptores celulares específicos. Estes podem ser reconhecidos em diferentes linhagens celulares, entre elas: hemácias, células mesangiais, neurônios, fibroblastos, linfócitos T, monócitos, macrófagos, células da musculatura lisa. Entre os diferentes receptores de AGEs, o RAGE é o receptor melhor identificado, além dele o AGE-R1, AGE-R2 e AGE-R3 são capazes de interagir com AGEs e suas atividades estão correlacionadas a depuração e a detoxicação desses compostos (YONEKURA, 2003).

O dano celular provocado pelos AGEs pode ser explicado através dos seguintes mecanismos: modificação de proteínas intracelulares pelos AGEs em células do endotélio, incluindo proteínas que estão envolvidas na regulação de transcrição de genes; modificação de componentes da matriz extracelular após os precursores de AGEs serem difundidos para o exterior da célula, acarretando alterações na sinalização entre célula e matriz. Ao sair da célula, os precursores podem alterar ainda proteínas circulantes, como por exemplo: a albumina, que podem se ligar aos receptores RAGEs em células endoteliais, mesangiais e macrófagos, ativando-os, estabelecendo o terceiro mecanismo de dano tecidual: essa ativação sinaliza reações em série que resultam na expressão de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, associados com as complicações vasculares (BROWNLEE, 2001; SCHALKWIJK; MIYATA, 2012; THORNALLEY, 2005).

A determinação dos produtos de glicação no soro ou nos tecidos dos portadores de diabetes é empregada para examinar o risco de progressão do DM. Os parâmetros mais empregados são: a avaliação da hemoglobina glicada (HbA1c), das proteínas glicadas do soro, e frutosaminas. Também podem ser examinados os produtos intermediários da glicação, dentre eles: metilglioal, deoxigliconas e glioal (LAPOLLA; TRALDI; FEDELE, 2004).

De acordo com Lapolla, Traudi e Fedele (2004), foi constatado um aumento na concentração de metilglioal nos rins, olhos e plasma de animais diabéticos quando comparados aos animais não diabéticos.

A aminoguanidina atua como uma “armadilha” sequestrando os compostos intermediários carbonílicos da formação dos AGEs, entre eles: o metilglioal, glioal e o 3-deoxiglicosona (LEWIS; HARDING, 1990; HIRSCH; BAINES, FEATHER, 1992; THORNALLEY; YUREK-GEORGE, 2000), atua também na inibição da formação dos produtos finais de glicação, tais como: a carboximetilisina – CML e carboxietilisina – CEL e

um potente inibidor da óxido nítrico sintase – NOS (CORBETT et al., 1992). A aminoguanidina foi primeiro composto a ser estudado como um potente inibidor da formação de AGEs tanto *in vitro* quanto *in vivo* (BROWNLEE; CERAMI; VLASSARA, 1988).

## 2.7. Potencial biológico das guanil-hidrazonas

As guanilhidrazonas ou aminoguanil-hidrazona (AGH) são compostos que apresentam em sua estrutura química grupamentos amidina (guanil) ligado a um grupamento hidrazona (-C=NNH-) e são derivados das aminoguanidinas (CLAYDEN et al., 2009; FRANÇA et al., 2016; MITCHELL; BROWN; SKURRAYR, 1998; WALZER et al., 1994). Estão descritos na literatura uma grande variedade de derivados guanil-hidrazona que foram sintetizados e amplamente estudados (PAPANASTASIOU et al., 2008; SUNDBERG et al., 1990; ULRICH; CERAMI, 1984; WALZER et al., 1994). A função guanidina presente nestas moléculas apresenta uma forte basicidade e faz parte integrante de vários compostos biologicamente ativos e está intimamente relacionada a diversas propriedades biológicas (ORNER; HAMILTON, 2001).

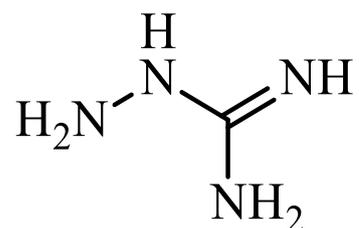
Estas substâncias são obtidas através de reação de condensação quimiosseletiva da aminoguanidina com aldeídos e/ou cetonas, sob condições de refluxo em meio alcoólico ou ainda sob irradiação por microondas, em um tempo consideravelmente menor e, em alguns casos, com rendimentos levemente maiores e são chamadas de guanil-hidrazona devido ao nome do aldeído ou cetona utilizado (MARTINS et al., 2004; ULRICH, 1984).

Existem vários estudos descritos na literatura acerca do potencial farmacológico das guanil-hidrazonas, entre eles podem ser destacados as ações: inibição da síntese de DNA (RACZYNSKA et al., 2003), indutores da apoptose (ZHANG et al., 2009), antimaláricas (RUIZ; AVIADO, 1970), tripanocida (MESSEDER et al., 1995; SANTOS-FILHO; FIGUEROA-VILLAR; ARAÚJO, 1997; SUNDBERG et al., 1990;), antineoplásicos (ANDREANI et al., 2000; BRZOZOWSKI; SACZEWSKI, SLAWINSKI, 2007; FOYE et al., 1990), antibacteriano (AHMED et al., 2013; BORGES; FIGUEROA-VILLAR, 2001; GADAD et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2012; WALZER et al., 1994), anti-hipertensivo (FOYE, 1990; HOFFMAN, 2003), antidiabéticos (EDMONT et al., 2000; LARSEN et al., 2001) dentre outras, algumas das quais já foram estudadas por nosso grupo de pesquisa.

A aminoguanidina (AG), comercialmente chamada de Pimagedina®, (**Figura 4**) faz parte do grupo das guanidinas e tem se destacado por ter ação inibitória na formação de AGEs

por causa da presença do grupo hidrazina na molécula que reage com os compostos glicoxal, metilglicoxal e 3-desoxiglicoxona que são compostos intermediários no processo de formação dos AGEs (AHMED, 2005; BARBOSA, 2012; THORNALLEY, 2003; WANG et al., 2007). Parving (2001) relatou benefícios no tratamento da glomerulosclerose em ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina com o uso da aminoguanidina. Podendo atuar também na inibição da atividade da enzima iNOS e assim reduzir o stress nitrosativo (SZABÓ et al., 1997). Além disso atua na inibição do metabolismo da histamina, do catabolismo de poliaminas e na atividade da catalase, bem como potencializa os efeitos da angiotensina na produção de prostaciclina (NILSSON, 1999).

**Figura 4 - Estrutura química da aminoguanidina.**



Fonte: GOMES, 2019.

## **2.8. Indução de DM nos modelos experimentais: ação da estreptozotocina**

Em consequência das incipientes informações acerca das alterações metabólicas acometidas pelo Diabetes *mellitus* em humanos, torna-se necessário a utilização de modelo animal adequado para estudá-la. Este possibilita o entendimento dos mecanismos de patogênese e os agravamentos decorrentes da doença, sendo possível direcionar estratégias preventivas e tratamento para os portadores do DM.

Para o estudo do diabetes, os modelos animais mais utilizados são os roedores e envolvem a administração de agentes químicos  $\beta$  – citotóxicos como a aloxana e a estreptozotocina - STZ, que por sua semelhança estrutural com a glicose são transportados para dentro da célula  $\beta$  através dos transportadores GLUT 2. As células  $\beta$  pancreáticas apresentam uma maior sensibilidade a estes agentes quando comparadas a outros tipos de células. Isso se deve a baixa expressão gênica das enzimas antioxidantes, contribuindo para o acúmulo da droga e aumento do dano. Apesar da aloxana e da estreptozotocina serem tóxicas

às células  $\beta$  pancreáticas nos roedores a citotoxicidade é distinta para cada droga (LENZEN, 2008; MARLES; FARNSWORTH, 1995; MATHEUS; LEITER, 2009).

Em 1963 Rakieten et al, relataram a capacidade da estreptozotocina em induzir diabetes. A partir daí vem sendo utilizada continuamente nos modelos animais visando estudar tanto a patologia do diabetes, como também as morbidades e possíveis intervenções terapêuticas para esta doença (DEEDS et al., 2011).

A STZ é um glicosamina pertencente à classe das nitrosoureas que foi isolado do fungo *Streptomyces achromogenes*, tendo como função estimular a produção de radicais livres e levar à destruição das células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans do pâncreas (DEEDS et al., 2009).

Alguns mecanismos são propostos para explicar a destruição das células  $\beta$  do pâncreas nos animais expostos a estreptozotocina: mecanismo citotóxico - o composto atua como um agente alquilante sobre a estrutura do DNA por radical  $\bullet\text{CH}_3$ . Além do mais, o grupo N-metil-nitrosourea impede a atividade da superóxido dismutase – SOD provocando o acúmulo de espécies reativas de oxigênio – EROS, tais como: o radical superóxido –  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , radical hidroxila –  $\text{HO}\bullet$  e peróxido de hidrogênio -  $\text{H}_2\text{O}_2$ , causando aumento na peroxidação lipídica e diminuição na atividade das enzimas antioxidantes das células  $\beta$ . Como também a inibição ciclo do ácido tricarboxílico e diminuição do consumo de oxigênio pela mitocôndria, limitando a síntese de ATP mitocondrial causando apoptose celular. A administração de estreptozotocina vem sendo utilizada na indução do Diabetes *mellitus* em animais por apresentar os principais sintomas da doença, como também os mecanismos dos danos causados pela doença, dentre eles: estresse oxidativo, glicação avançada que são responsáveis pelas complicações crônicas dos portadores do Diabetes *mellitus* (LENZEN, 2008; MATHEUS, LEITER, 2009; SKUDELSKI, 2001).

Estudos envolvendo os derivados guanil-hidrazônicos são bastante promissores. Além do amplo espectro de atividades biológicas descritos anteriormente, estas moléculas apresentam custos acessíveis e sua síntese que é relativamente fácil, tornando a utilização apropriada em países em vias de desenvolvimento, tendo em vista os sérios problemas no sistema de saúde, o que justifica a necessidade de um maior investimento em novas pesquisas para conhecer as potencialidades destes compostos.

# OBJETIVOS

---

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial antiglicante e atividade antidiabética de novas aminoguanidinas e derivados planejados no modelo de diabetes induzida pela estreptozotocina.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar atividade antiglicante dos derivados aminoguanidínicos;
- ✓ Verificar a citotoxicidade dos derivados aminoguanidínicos por viabilidade celular;
- ✓ Avaliar a toxicidade aguda *in vivo* dos derivados aminoguanidínicos em ratos Wistar;
- ✓ Avaliar os parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos do ensaio de toxicidade em ratos Wistar.
- ✓ Avaliar o efeito antidiabético dos derivados aminoguanidínicos
- ✓ Avaliar os parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos em modelo experimental de diabetes em ratos Wistar.

# **METODOLOGIA**

---

---

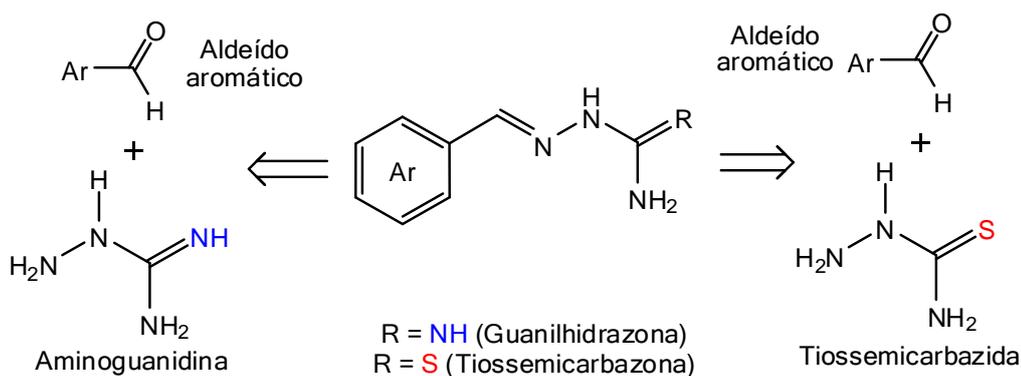
## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Substâncias utilizadas: Derivados aminoguanidínicos

Considerando a ampla variedade de atividades biológicas dos derivados amidínicos em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, foi planejada a síntese das tiossemicarbazonas e guanil-hidrazonas, conhecidos também por derivados aminoguanidínicos (ARAÚJO-JÚNIOR, 2006; ARAÚJO-JÚNIOR, 2007; BENDERITTER, 2007; SCHMITT, 2006).

O planejamento dos derivados aminoguanidínicos foi realizado através de variações em duas regiões do esqueleto base das guanil-hidrazonas e das tiossemicarbazonas aromáticas. Partindo de quantidades equimolares de aldeídos aromáticos e cloridrato de aminoguanidina, para obtenção das guanilhidrazonas, e com a tiossemicarbazida, para a obtenção das tiossemicarbazonas (**Figura 5**).

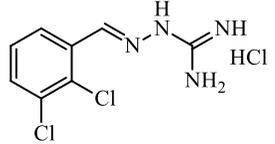
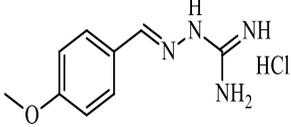
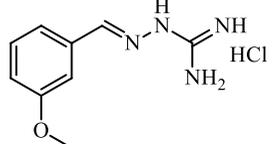
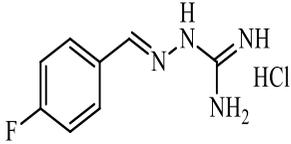
**Figura 5 - Retrossíntese do esqueleto base das guanil-hidrazonas e das tiossemicarbazonas.**

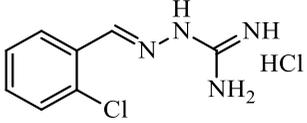
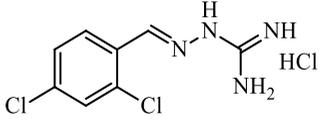
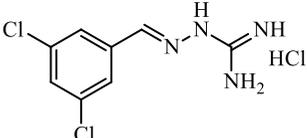
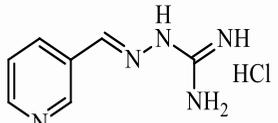
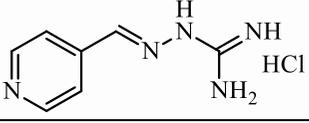
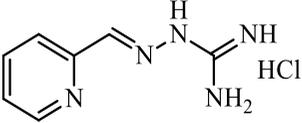
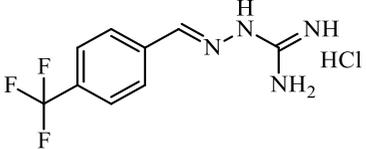


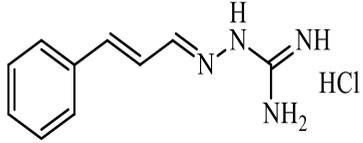
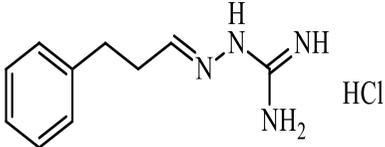
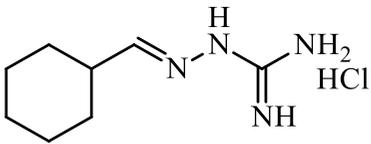
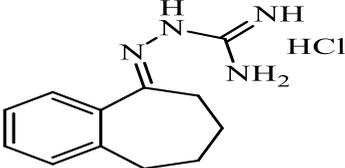
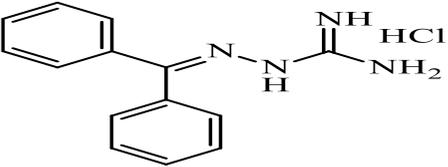
Fonte: Adaptado de EPIFÂNIO, 2011.

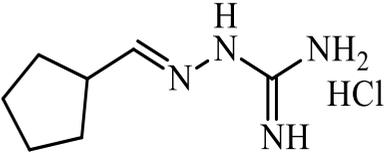
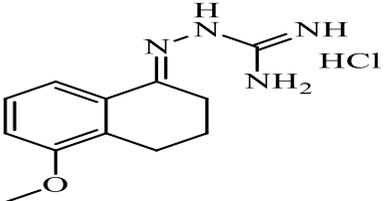
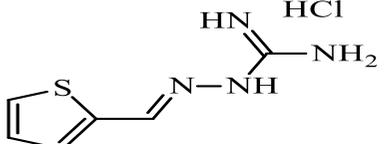
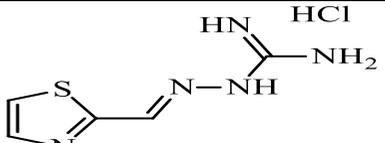
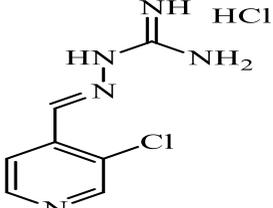
Neste estudo foram utilizados 22 derivados aminoguanidínicos, sintetizados no Laboratório de Química Medicinal – LQM - ESENFAR e codificados com a sigla LQM, seguidos de um número (**Quadro 1**), para os ensaios de atividade antiglicante e os mais promissores para a citotoxicidade *in vitro* (MTT). O ensaio de atividade antidiabética *in vivo*, partiu dos derivados aminoguanidínicos que apresentaram melhores perfis antiglicante.

**Quadro 1 - Nomenclatura e estruturas químicas dos derivados aminoguanidínicos.**

CÓDIGO	NOMENCLATURA	ESTRUTURA QUÍMICA	FÓRMULA E PESO MOLECULAR
LQM 55	2-(2,3-diclorobenzilidenoamino) guanidina		<p>C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>4</sub> 265,9893g/mol</p>
LQM 95	2-(4-metoxibenzilidenoamino) guanidina		<p>C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>4</sub>O 228,0778g/mol</p>
LQM 96	2-(3-metoxibenzilidenoamino) guanidina		<p>C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>4</sub>O 228,0778 g/mol</p>
LQM 97	2-(4-fluorobenzilidenoamino) guanidina		<p>C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>ClFN<sub>4</sub> 216,0578 g/mol</p>

LQM 98	2-(2-clorobenzilidenoamino) guanidina		C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> 232,0283 g/mol
LQM 99	2-(2,4-diclorobenzilidenoamino) guanidina		C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>4</sub> 265,9893 g/mol
LQM 100	2-(3,5-diclorobenzilidenoamino) guanidina		C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>4</sub> 265,9893 g/mol
LQM 102	2-(piridina-3-il)(metilenoamino) guanidina		C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> 199,0625 g/mol
LQM 103	2-(piridina-4-il)(metilenoamino) guanidina		C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> 199,0625 g/mol
LQM 104	2-(piridina-2-il)(metilenoamino) guanidina		C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> 199,0625 g/mol
LQM 106	2-(4-(trifluorometil)(benzilidenoamino) guanidina		C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>4</sub> 266,0546 g/mol

LQM 130	2-(3-fenilalidenoamino) (guanidina)		C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> CIN <sub>4</sub> 224,0829 g/mol
LQM 131	2-(3-fenilpropilidenoamino) guanidina		C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> CIN <sub>4</sub> 226,0985 g/mol
LQM 132	2-(ciclohexilmetilenoamino) guanidina		C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> CIN <sub>4</sub> 204,1142g/mol
LQM 134	2-(3,4-dihidronaftaleno-1(2H)-ilidenoamino) guanidina		C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> CIN <sub>4</sub> 238,0985g/mol
LQM 135	2-(6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzo[7]anilen-5-ilidenoamino) guanidina		C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> CIN <sub>4</sub> 252,1142 g/mol
LQM 136	2-(difenilmetilenoamino) guanidina		C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> CIN <sub>4</sub> 274,0985 g/mol

LQM 137	2-(ciclopentilmetilenoamino) guanidina		C7H15ClN4 190,0985 g/mol
LQM 138	2-(5-metoxi-3,4-dihidronaftaleno-1(2H)-ilidenoamino) guanidina		C12H17ClN4O 268,1091 g/mol
LQM 139	2-(tiofeno-2-il)(metilenoamino) guanidina		C6H9ClN4S 204,0236 g/mol
LQM 140	2-(thiazol-2-il)(metilenoamino) guanidina		C5H8ClN5S 205,0189 g/mol
LQM 141	2-(3-cloropiridina-4-il)metilenoamino) guanidina		C7H9Cl2N5 233,0235 g/mol

## 4.2. Atividade antiglicante

Avaliação do potencial antiglicante foi realizada empregando-se o sistema albumina sérica bovina (BSA)/glicose

A realização do ensaio para avaliação do potencial antiglicante de uma substância pode ser executada através da produção de AGE, a partir da ligação do BSA com um açúcar tal como, a ribose, a frutose ou glicose.

A glicação de proteínas por glicose foi avaliada utilizando metodologia adaptada utilizada por Sarmiento, 2016 (BEAULIEU et al., 2010; JHAUMEER-LAULLOO et al., 2012; PEREZ GUTIERREZ et al., 2012; SÉRO et al., 2013).

Antes de dar início ao experimento, todos os materiais, tais como: vidrarias, pipetadores, ponteiras, placas, soluções, reagentes, tampões, amostras, dentre outros foram submetidos à luz ultravioleta por um período de 15 minutos em capela de fluxo laminar. Os 22 derivados aminoguanidínicos foram solubilizados em uma solução a 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO). Os reagentes e as amostras foram filtrados em filtros de membrana 0,2 µm.

O ensaio antiglicante foi realizado dentro da capela utilizando placas estéreis de 96 poços. Em cada poço da placa foram acrescentadas as seguintes soluções, nesta ordem:

- ❖ Azida sódica 8 g/L
- ❖ Glicose 800 mM
- ❖ Derivados aminoguanidínicos e controles 10 mM
- ❖ BSA 40 mg/mL
- ❖ Tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4

- ❖ Branco:

75 µL de azida sódica 8 g/L  
50 µL de BSA 40 mg/mL  
75 µL Tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4

- ❖ Controles negativos

a) Da fluorescência  
75 µL de azida sódica 8 g/L  
125 µL Tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4

## b) Da técnica

50 µL de azida sódica 8 g/L  
25 µL de glicose 800 mM  
50 µL de BSA 40 mg/mL  
75 µL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4

❖ Controles positivos

## a) Aminoguanidina e Quercetina

5 µL de azida sódica 8 g/L  
25 µL de glicose 800 mM  
50 µL de aminoguanidina ou quercetina 10 mM  
50 µL de BSA 40 mg/mL  
70 µL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4

❖ Derivados aminoguanidínicos

5 µL de azida sódica 8 g/L  
25 µL de glicose 800 mM  
50 µL dos derivados aminoguanidínicos 10 mM  
50 µL de BSA 40 mg/mL  
70 µL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4

Após as placas ficarem prontas foram protegidas da luz com folha de papel alumínio e levadas imediatamente à estufa para serem incubadas a 37 °C. Após 24 h, foi feita a primeira leitura e ficaram incubadas por cerca de 60 dias. As quantidades globais de AGEs fluorescentes formadas foi determinada através de um Leitor de microplacas (FLEXSTATION 3), com comprimento de onda de excitação em 350 nm e comprimento de onda de emissão em 450 nm (AHMAD AHMED, 2006; BEAULIEU et al., 2010; BOUSOVÁ et al., 2005).

A porcentagem de inibição da formação de AGEs para cada substância foi calculada pela seguinte equação (SUN et al., 2010).

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

### 4.3. Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT

A citotoxicidade foi avaliada através da utilização do método colorimétrico pelo sal de metil-tetrazolium (MTT), composto de tonalidade amarela quando em solução. Esse teste tem por objetivo avaliar a viabilidade celular, já que esse sal é facilmente incorporado por células viáveis as quais reduzem esse sal através das enzimas succinato desidrogenase, que se encontra nas mitocôndrias ativas num composto chamado de formazan, insolúvel em água e de cor violácea (HUSSAIN; NOURI; OLIVER, 1993; MOSMANN, 1983).

Portanto, a capacidade das células em reduzir o MTT indica que estas estão metabolicamente estáveis e viáveis (ANVISA, 2012). Assim, quanto mais escura a coloração ao final da reação, maior é a viabilidade celular (GOES et al., 2012).

Foram realizados dois ensaios de viabilidade celular com linhagens celulares diferentes: macrófagos da linhagem J774.A1 e fibroblastos da linhagem 3T3.

Os macrófagos da linhagem J774.A1 foram plaqueados em placas de 96 poços por 1 hora em ( $1 \times 10^5$  /poço) e expostos a concentração de 10  $\mu$ M dos compostos diluídos em meio RPMI suplementado por um período de 48 h em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Os poços controles continham células cultivadas somente em meio de cultura ou células cultivadas na presença do diluente das substâncias (DMSO 0,1%). Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 100  $\mu$ L da solução de MTT (5 mg/100 mL). As placas foram novamente incubadas por um período de 1 hora em estufa a 37 °C e a 5% de CO<sub>2</sub>, logo após foi retirado o sobrenadante e adicionado 100  $\mu$ L de DMSO e realizada a leitura em espectrofotômetro a 550 nm. A viabilidade celular das culturas tratadas com as substâncias foi comparada ao padrão de morte obtido nas culturas controle.

Os fibroblastos 3T3 foram semeados em uma placa de 96 poços ( $7 \times 10^3$  células / poço) durante a noite e tratados com 10 ou 100  $\mu$ M de LQMs para 24 horas. Após a incubação com o tratamento 22,5  $\mu$ L de MTT (3- Brometo de (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltiazólio) (Sigma- Aldrich - EUA) (5 mg / mL em PBS), foi adicionado a cada poço durante 4 horas. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 150  $\mu$ L de DMSO foram adicionados cada poço para solubilizar os cristais de formazan formados. A absorbância de cada poço foi registrada usando um espectrofotômetro de microplaca e densidade óptica (DO) foi medida a 540 nm. A porcentagem de A célula de viabilidade foi calculada através desta fórmula: (células tratadas OD / OD células não tratadas) X 100.

#### 4.4.1 Manutenção dos macrófagos

Mácrofagos da linhagem J774.A1 foram mantidos em garrafas de cultura contendo 10 mL de soro fetal bovino (SFB) e 2 mM de L-glutamina, aminoácidos não essenciais e piruvato. No momento do uso, as células foram contadas, ajustadas em meio RPMI e suplementado com 10% de SFB e semeadas.

#### 4.4.2 Manutenção dos fibroblastos

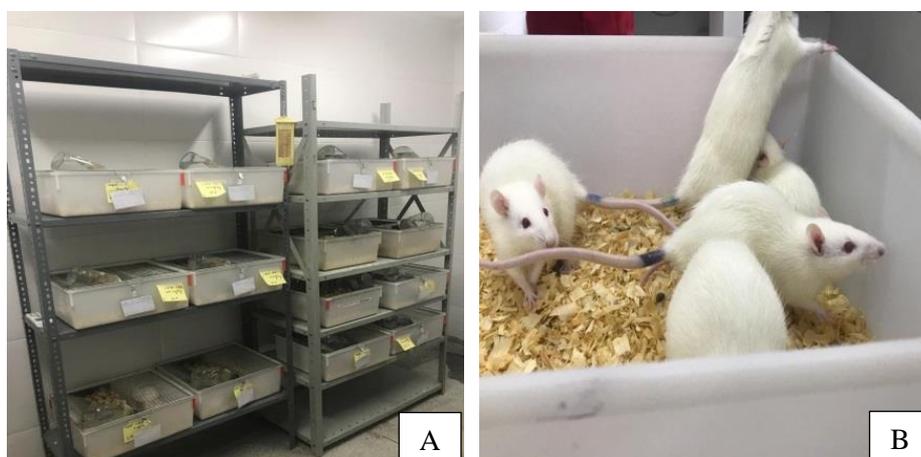
Fibroblastos 3T3 foram cultivados em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% de soro bovino fetal (FBS), L-glutamina (2 mM) e gentamicina (40 µg / mL) em incubadora umidificada em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> a 37 ° C.

#### 4.4. Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com dois meses de idade, normais e saudáveis, com peso médio de 250 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas – BIOCEN-UFAL. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular – ESENFAR da Universidade Federal de Alagoas, onde permaneceram em condições ambientais controladas, gaiolas coletivas de prolipileno com cama de maravalha, com controle de temperatura, luminosidade e com fornecimento de água e ração. A identificação dos animais foi realizada por meio de marcação permanente na cauda dos animais (**Figura 6**). Os animais ficaram em observação por um período de 10 dias antes dos ensaios, para verificação das condições clínicas e a identificação de variáveis que por ventura pudessem influenciar nos experimentos.

Os cuidados dos animais bem como os protocolos de pesquisa estavam de acordo com os princípios e diretrizes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, nº 100/2016, conforme parecer consubstanciado (**Anexo 1**).

**Figura 6 - Condições ambientais dos grupos de estudo: A. Estantes com as gaiolas experimentais. B. Gaiola experimental com cama de maravalha e animais em estudo.**



Fonte: GOMES, 2019.

#### 4.5. Avaliação da toxicidade aguda *in vivo* em dose única

A avaliação da toxicidade foi realizada com o objetivo de verificar o efeito da administração única dos derivados aminoguanidínicos por via oral (gavagem) (**Figura 7**). Sendo possível determinar o potencial de toxicidade através de alguns dados, tais como: dosagem, sinais, danos provocados no organismo. O ensaio de toxicidade aguda pode ser feito através da administração de uma quantidade do composto durante um período não superior a 24 horas, seguidos da observação dos animais por 14 dias após administração (ANVISA, 2013; LIMA, 2009).

**Figura 7 - Administração por via oral dos derivados aminoguanidínicos.**



Fonte: GOMES, 2019.

Foram considerados neste trabalho os princípios éticos relacionados à pesquisa envolvendo animais, buscou-se reduzir ao máximo o número de animais para o experimento. Neste estudo, foram selecionados os derivados aminoguanidínicos: LQM 103, LQM 130, LQM 140 e LQM 141, por terem apresentado os melhores perfis antiglicante.

#### 4.5.1 Protocolo experimental de toxicidade *in vivo*

Os animais ficaram mantidos em gaiolas coletivas, com condições controladas de temperatura ( $22 \pm 1$  °C) e ciclo claro/escuro de 12 / 12 horas, com livre acesso a água e a alimento.

O monitoramento do consumo de água e de ração foi realizado através de medições diárias, e foram feitos registros individuais nas fichas de consumo animal. O consumo da ração foi calculado considerando o peso da ração fornecida juntamente com o peso das sobras das rações nos comedouros. Isto também foi feito no registro do consumo diário da água, onde foram utilizados bebedouros individuais volumetricamente graduados.

Antes da realização do experimento, os animais ficaram no ambiente de trabalho por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento.

A administração dos derivados aminoguanidínicos foi realizada via oral (v.o.) única, após a solubilização em solução salina. Cada animal recebeu 1 mL da amostra na concentração específica de cada grupo.

#### 4.5.2 Delineamento experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em 16 grupos, cada grupo contendo 03 animais, sendo três grupos para cada composto testado (**Tabela 5**):

**Tabela 5 - Grupos para o ensaio de toxicidade aguda com as respectivas concentrações dos derivados aminoguanidínicos e número de animais.**

GRUPO	SUBSTÂNCIAS	TRATAMENTO	Nº DE ANIMAIS
G1	Controle negativo	Receberão apenas água	3
G2	Derivado LQM 103	2 mg/kg de peso do animal	3
G3	Derivado LQM 103	10 mg/kg de peso do animal	3
G4	Derivado LQM 103	100 mg/kg de peso do animal	3
G5	Derivado LQM 130	2 mg/kg de peso do animal	3
G6	Derivado LQM 130	10 mg/kg de peso do animal	3
G7	Derivado LQM 130	100 mg/kg de peso do animal	3
G8	Derivado LQM 140	2 mg/kg de peso do animal	3
G9	Derivado LQM 140	10 mg/kg de peso do animal	3
G10	Derivado LQM 140	100 mg/kg de peso do animal	3
G11	Derivado LQM 141	2 mg/kg de peso do animal	3
G12	Derivado LQM 141	10 mg/kg de peso do animal	3
G13	Derivado LQM 141	100 mg/kg de peso do animal	3
G14	Aminoguanidina	2 mg/kg de peso do animal	3
G15	Aminoguanidina	10 mg/kg de peso do animal	3
G16	Aminoguanidina	100 mg/kg de peso do animal	3
TOTAL DE ANIMAIS			48

Fonte: GOMES, 2019.

#### 4.5.3 Observação dos sinais de toxicidade

Durante as primeiras 24 h, os animais ficaram em observação em tempos variados em busca de sinais tóxicos e de mortalidade após a administração da dose: 15 minutos, 30 minutos, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h e a partir de então diariamente por 14 dias de observação (BRITO, 1994; CUNHA et al., 2009; MALONE; ROBICHAUD, 1962).

Observações comportamentais sistemáticas foram realizadas para avaliar o *screening* hipocrático no qual forneceu uma estimativa da toxicidade das substâncias sobre o estado consciente e disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e atividades sobre o sistema nervoso central – SNC (tremores, convulsão e sedação) e sobre o sistema nervoso autônomo – SNA (lacrimejamento, salivação e respiração) (MALONE; ROBICHAUD, 1983).

Parâmetros que foram avaliados: modificações na pele, pelos, olhos, mucosas, alterações na atividade motora, contorções abdominais, alterações respiratórias e circulatórias, piloereção, postura (ataxia, perda de reflexos), ptose palpebral, morte e outros comportamentos atípicos.

Os sinais de toxicidade no momento do seu aparecimento, a intensidade, a duração e a progressão dos mesmos foram anotados, e tabulados numa escala de 0 a 4 (ausente, raro, pouco, moderado, intenso) e posteriormente analisados.

Os animais eram observados e pesados apenas uma vez por dia, diariamente, sempre no mesmo horário, sendo determinada a evolução ponderal dos animais (g). Ao final das atividades experimentais, verificou-se a variação da massa corporal, através da fórmula: **Varição de Peso ( $\Delta$ ) = Peso Final – Peso Inicial** (BRASIL, 1996; ZAUPA et al., 2002).

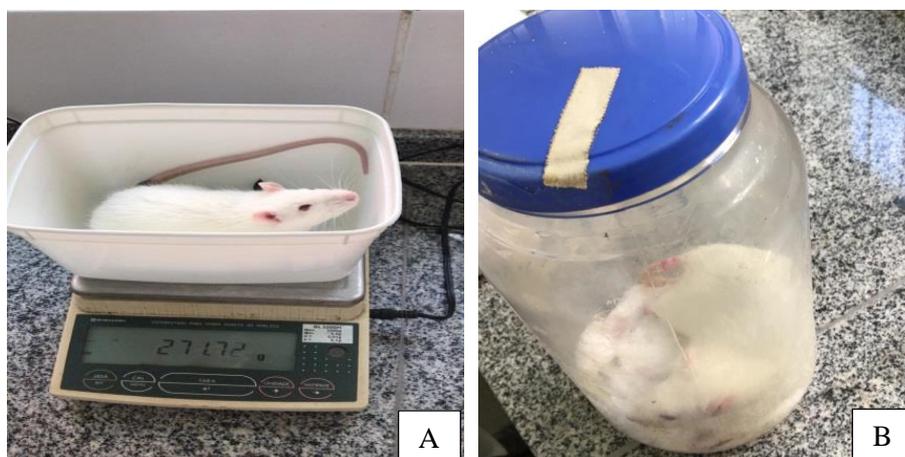
No último dia os animais foram anestesiados, eutanasiados e necropsiados, com observação histológica do rim, fígado, pâncreas, além do hemograma e parâmetros bioquímicos para avaliação do perfil lipídico, proteico, hepático e renal.

#### 4.6. Indução de Diabetes Experimental por Estreptozotocina

A glicemia de todos os animais foi mensurada logo que os animais chegaram do BIOCEN-UFAL, para confirmar que estes se encontravam na condição normoglicêmica.

Os animais foram previamente deixados em jejum de 12 horas com acesso livre à água potável. Após serem pesados, os animais foram anestesiados por inalação com éter etílico e posteriormente o diabetes foi induzido através da administração intravenosa (punção da veia peniana) de estreptozotocina (STZ) (Cayman chemical company), (PM = 265,22), a uma dose de 40 mg/kg de massa corporal, dissolvida em tampão citrato de sódio 10 mM e pH 4,5 (PATEL et al., 2011, SILVA, 2011). Os ratos dos grupos controle receberam volumes equivalente de tampão citrato 10 mM e pH 4,5 (**Figura 8**).

**Figura 8 - Controle do peso dos animais (A) e inalação com éter etílico (B).**



Fonte: GOMES, 2019.

Em virtude da semelhança entre as moléculas de glicose e STZ e a sua competição pelo transportador de glicose tipo 2 (GLUT2), os animais permaneceram em jejum 90 minutos após a administração da droga, evitando assim a internalização da glicose ao invés da droga diabtogênica (SZKULDESKI, 2001). No quinto dia após a indução, a confirmação do diabetes foi realizada por meio da determinação da glicemia de jejum utilizando um glicosímetro (Kit G-Tech), através de uma gota de sangue retirada da ponta da cauda do animal. Foram considerados diabéticos somente os animais que apresentaram glicemia acima ou igual a 250 mg/dL (LERCO et al., 2003).

A maravalha de todas as caixas (diabéticos ou não diabéticos) foi trocada diariamente com a finalidade de manutenção das condições mínimas de estresse, em especial em razão dos animais diabéticos aumentarem consideravelmente o volume urinário. Ainda, o acompanhamento do peso corporal, volume de água e ração disponíveis, além do monitoramento de sinais de estresse foram acompanhados diariamente em prol da manutenção do bem-estar animal.

#### 4.6.1. Delineamento experimental

Foram utilizados diferentes grupos experimentais para estudar o efeito hipoglicemiante dos derivados aminoguanidínicos. Os ratos foram aleatoriamente divididos em 13 (treze) grupos com 5 (cinco) animais cada, totalizando 65 animais (**Tabela 6**) e receberam os seguintes tratamentos por via oral:

**Tabela 6 - Grupos para a indução de diabetes com as respectivas concentrações dos derivados aminoguanidínicos e número de animais.**

GRUPO	SUBSTÂNCIAS	TRATAMENTO	Nº DE ANIMAIS
<b>DIABÉTICOS</b>			
G1	Glimepirida		5
G2	Controle negativo diabético - CND	Receberão apenas água	5
G3	Aminoguanidina	2 mg/kg de peso do animal	5
G4	Derivado LQM 103	2 mg/kg de peso do animal	5
G5	Derivado LQM 130	2 mg/kg de peso do animal	5
G6	Derivado LQM 140	2 mg/kg de peso do animal	5
G7	Derivado LQM 141	2 mg/kg de peso do animal	5
TOTAL DE ANIMAIS			35
<b>NÃO DIABÉTICOS</b>			
G08	Controle negativo normal - CNN	Receberão apenas água	5
G09	Aminoguanidina	2 mg/kg de peso do animal	5
G10	Derivado LQM 103	2 mg/kg de peso do animal	5
G11	Derivado LQM 130	2 mg/kg de peso do animal	5

G12	Derivado LQM 140	2 mg/kg de peso do animal	5
G13	Derivado LQM 141	2 mg/kg de peso do animal	5
TOTAL DE ANIMAIS			30

Fonte: GOMES, 2019.

#### 4.6.2. Administração das substâncias em estudo

Os derivados aminoguanidínicos foram solubilizados em solução salina e administrados por gavagem durante 28 dias após a confirmação do diabetes. A quantidade de substâncias fornecida aos animais foi de 2 mg de substância por quilograma de peso do animal. O volume final administrado em cada animal foi de 1 mL. A administração foi realizada por gavagem com o animal imobilizado, por meio de tração manual da pele da região dorsal e utilizando cânula em aço inoxidável.

#### 4.6.3. Avaliações

Os animais foram monitorados quanto ao comportamento, variação de peso corporal, consumo de ração e água.

Após o período de 28 dias os animais foram submetidos à anestesia geral com injeção intraperitoneal de Tiopental Sódico 60 mg/kg, posteriormente eutanasiados por exsanguinação com punção cardíaca para coleta de 4 a 5 mL de sangue para avaliar o perfil hematológico e as funções hepáticas e renal, por meio de análise bioquímica dos níveis séricos das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, gama-glutamil transferases, análise de ureia, fosfatase alcalina, creatinina, ácido úrico, proteína C reativa ultrasensível, colesterol e triglicérides. Também foram avaliados os perfis de hemoglobina glicada. Os órgãos relacionados à condição diabética: fígado, rins e pâncreas foram pesados e analisados quanto às alterações histopatológicas. Os demais órgãos: coração, baço foram apenas pesado.

#### 4.6.3.1. Avaliação da ingestão hídrica e alimentar e controle de massa corporal

A quantidade de ração consumida foi avaliada por meio do registro diário de ingestão alimentar pelos animais (variação entre a oferta e as sobras da dieta deixadas nas gaiolas) durante os 28 dias de ensaio, para obtenção da ingesta nos diferentes grupos experimentais. O volume de água consumido pelos diferentes grupos também foi registrado diariamente, através da diferença entre a oferta e a sobra de água nas garrafas .

Durante todo período experimental, os animais foram submetidos, semanalmente, a três avaliações da massa corpórea, de forma a minimizar a manipulação e estresse dos animais e também realizar o controle das doses das substâncias.

#### 4.6.3.2. Glicemia

As dosagens de glicemia foram realizadas em glicosímetro G-Tech® com a utilização da tira-teste, com amostras de sangue obtidas por punção da veia caudal dos animais (**Figura 9**). As amostras de sangue foram coletadas antes do início do tratamento (t=0) e então uma vez por semana.

**Figura 9 - Coleta de sangue através da cauda do animal e leitura em glicosímetro.**



Fonte: GOMES, 2019.

#### 4.7. Eutanásia dos animais e coleta de sangue

No final do período experimental, após jejum de 12 horas, todos os animais foram pesados, anestesiados com Tiopental Sódico. Em seguida o sangue foi coletado por punção cardíaca e os animais foram submetidos a eutanásia por aprofundamento de anestesia.

O sangue foi distribuído em tubos de 4 mL contendo anticoagulante EDTA sódico a 10% para realização dos parâmetros hematológicos e hemoglobina glicada, tubos sem anticoagulante contendo gel separador e ativador de coágulo (Vacutube®), o qual possibilitou uma amostra de soro com maior qualidade e facilidade de manuseio, para centrifugação do soro e posterior realização das análises bioquímicas. Para a obtenção do soro, após a coagulação do sangue os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 3500 rpm (rotações por minuto) e o sobrenadante (soro) foi coletado.

Foram analisados os seguintes parâmetros:

- ✓ **Hematológicos:** leucócitos totais, hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) e plaquetas (PLT) A contagem diferencial foi realizada por meio de esfregaço de sangue corado por panótico rápido.
- ✓ **Bioquímicos:** aspartato aminotransferase (AST ou TGO), alanina aminotransferase (ALT ou TGP), fosfatase alcalina (ALP), gama-glutamil transferase (GGT), creatinina, uréia, colesterol total, triglicérides e ácido úrico. Para as análises, foram utilizados kits comerciais e seguidas as orientações recomendadas pelo fabricante. A atividade das aminotransferases foram expressas em unidades internacionais por litro (UI/L) e as demais medidas expressas em mg/dL.

Após eutanásia de cada animal foram excisados os seguintes órgãos: fígado, rins, pâncreas, coração e baço, que foram pesados em balança analítica sendo o fígado, rins e pâncreas separados em frascos identificados com solução de formaldeído 10% para análises histopatológicas (**Figura 10**). Desta forma foi possível calcular a média de peso dos órgãos dos animais para cada grupo e avaliar com testes estatísticos a existência de possíveis diferenças de resultados entre os diferentes grupos (LOPES, 2011).

**Figura 10 - Animais em jejum, necropsia e órgãos coletados.**



Fonte: GOMES, 2019.

#### 4.7.1. Análises

##### ➤ Hemograma

O sangue foi colhido por punção cardíaca em tubo contendo EDTA e foram feitas as contagens das séries vermelha, branca e plaquetária dos animais em aparelho Sysmex XE – 2100.

##### ➤ Aspartato aminotransferase (AST ou TGO) e Alanina aminotransferase (ALT ou TGP)

A função hepática foi avaliada por meio das determinações dos níveis séricos de transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP). Nestas, como também, nas demais análises bioquímicas: ácido úrico, ureia, creatinina, GGT, fosfatase alcalina, colesterol e triglicérides foram utilizados *kits*, conforme especificações do fabricante. Todas as medidas de atividade enzimática foram visualizadas para a temperatura 37 °C com programação no aparelho. Para a dosagem da glicemia capilar uma alíquota de 30µL de soro de cada animal foi inserida no centro da zona vermelha reativa da tira, removendo anteriormente a banda protetora. Após 15 segundos foi introduzida horizontalmente à tira no aparelho e o aparecimento no visor confirma que a leitura do código magnético específico do teste foi corretamente lida pelo aparelho. O tempo foi indicado em segundos, até surgimento do resultado.

Níveis elevados de TGO e TGP podem indicar infarto do miocárdio, doenças do fígado, distrofia muscular e lesões nos órgãos. A atividade aumentada de TGP (ALT) é bastante específica para a doença parenquimal do fígado, enquanto que a TGO (AST) não é uma enzima específica do fígado.

##### ➤ Ácido úrico

A dosagem de ácido úrico é usada para o diagnóstico e monitorização de vários distúrbios renais e metabólitos como a insuficiência renal, gota, leucemia, psoríase, situações de jejum ou outras doenças com distúrbios nutricionais.

➤ Ureia e Creatinina

A uréia é usada para a avaliação da função renal. A reação provoca a alteração parcial da cor de um indicador tamponizado em verde/azul, sendo a sua intensidade proporcional à concentração de uréia na amostra.

Creatinina é empregada para diagnóstico e monitorização de distúrbios renais crônicos e agudos e para monitorizar a diálise.

➤ Gama-glutamil transferase (GGT) e Fosfatase alcalina (ALP)

A GGT é utilizada para diagnóstico e monitorização de doenças do fígado e do trato biliar. A atividade elevada desta enzima é um dos indicadores mais sensível da doença hepato-biliar.

Já a causa mais frequente do aumento total da atividade de Fosfatase Alcalina (ALP) no soro é a doença do fígado e/ou trato biliar.

➤ Colesterol e Triglicérides

A determinação do colesterol é utilizada para alertar sobre o risco aterogênico e no diagnóstico e tratamento de doenças com níveis de colesterol elevados e distúrbios do metabolismo lipídico e das lipoproteínas. Triglicérides são determinados para detecção precoce do risco de aterosclerose, classificação da hiperlipoproteinemia e para a monitorização da dieta ou terapia farmacológica com o objetivo de diminuir os lipídeos.

➤ Hemoglobina glicada (Hb1Ac)

A glicohemoglobina ou hemoglobina glicada é um marcador importante para o monitoramento de pacientes diabéticos. Durante a vida circulatória dos glóbulos vermelhos, a Hb1Ac é formada continuamente pela ligação da glicose ao terminal valina da cadeia beta da hemoglobina. Este processo reflete uma média da exposição da hemoglobina à glicose por um extenso período. A taxa de produção é dependente do nível de glicose sanguínea e da vida média das hemácias. Em relação à avaliação do percentual de hemoglobina glicada, é importante destacar que tal mensuração e a de glicemia são complementares, revelando aspectos diferentes, uma vez que a primeira reflete o controle glicêmico nos últimos dois a

três meses, enquanto a segunda refere-se à glicemia unicamente do dia (SUMITA; ANDRIOLO, 2008).

No final do tratamento, amostras de sangue foram obtidas para determinação da porcentagem de hemoglobina glicada, avaliando os níveis glicêmicos retroativos durante as semanas de estudo.

Este método baseia-se na interação de antígeno e anticorpo para determinação direta da HbA1c no sangue total. As determinações foram realizadas seguindo as recomendações do fabricante.

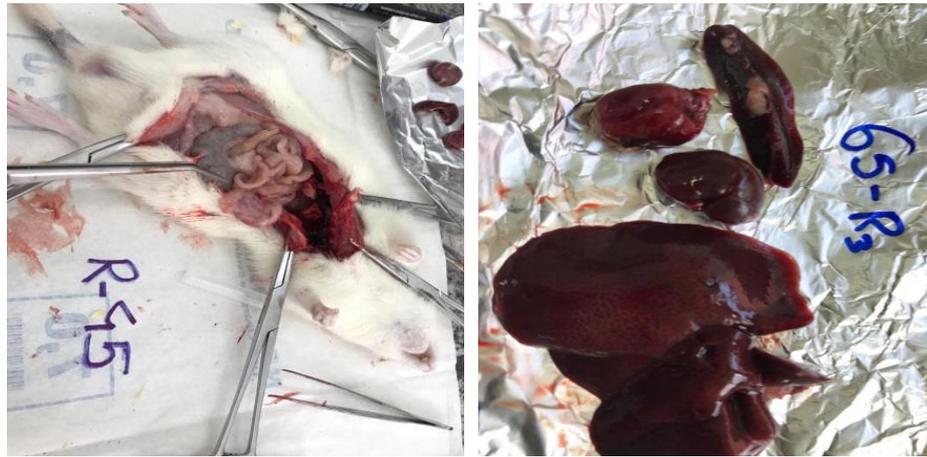
#### ➤ Avaliação Histopatológica

Quando ocorre a toxicidade em um órgão, se tratando de animais de experimentação a maior parte do diagnóstico inicial depende do reconhecimento da mudança na estrutura do órgão, peso relativo e morfologia, o que pode ser avaliado por meio de análises histopatológicas. Alternativamente, as evidências de exames de histopatologia pode ser correlacionados com dosagens hormonais em estudos onde existem efeitos marcados no órgão alvo e hormônios relevantes. Normalmente, uma alteração dos resultados dos testes são apoiados por outras provas, recolhidas principalmente pela histopatologia e tais observações permitem a confirmação sobre se um efeito é devido à toxicologia, farmacologia, ou é uma variação biológica (EVANS, 2008 cap. 11).

Foram avaliadas possíveis alterações histológicas de órgãos que são afetados pela condição diabética (fígado, rins e pâncreas). A avaliação histológica dos pâncreas objetivou a análise da morfologia das ilhotas de Langerhans.

Os órgãos foram limpos e armazenados em solução de formol tamponada neutra a 10% (**Figura 11**). As peças foram então desidratadas com gradiente crescente de etanol e embebidas em parafina. Após a desparafinização e hidratação das lâminas, estas foram coradas com hematoxilina de Harris e eosina para o exame histopatológico.

**Figura 11 - Remoção dos órgãos e análise histopatológica dos órgãos.**



Fonte: GOMES, 2019.

#### **4.8. Análise Estatística**

Os resultados foram descritos de forma quantitativa e analisados estatisticamente pelo teste *One way* ANOVA não paramétrico (Kruskal-Wallis) com pós teste de Dunnett . A análise estatística foi realizada com auxílio do programa *GraphPad* Prisma 5.0 ® software, utilizando-se como nível de significância,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  e  $p < 0.001$ . As médias e valores de erro padrão foram determinados para todos os parâmetros estudados.

# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

---

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação do potencial antiglicação utilizando sistema albumina sérica bovina (BSA)/glicose

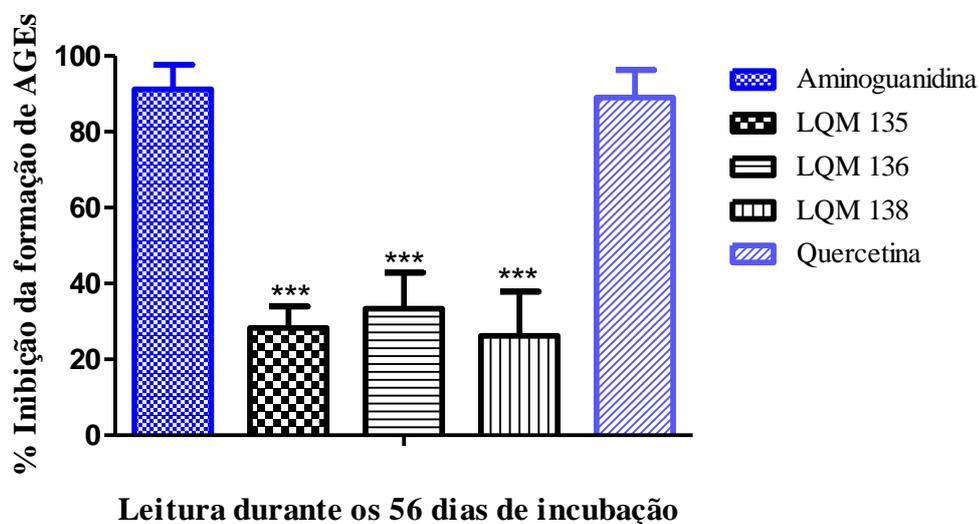
Neste estudo foi utilizado o modelo albumina bovina sérica (BSA) - como a proteína modelo e a glicose - como o agente glicador. O sistema BSA de açúcares redutores é um modelo amplamente utilizado em estudos de glicação não enzimáticos. Já que a albumina é a proteína mais abundante do plasma humano e representa 80% do total das proteínas glicadas na circulação sanguínea (MENDES, 2019). As proteínas podem ser modificadas quando expostas a açúcares redutores pelo processo de glicação espontânea.

O potencial antiglicante dos derivados aminoguanidínicos estudados foram agrupados em 4 categorias, mediante os percentuais de inibição encontrados. Neste estudo foram utilizados como padrões positivos: a aminoguanidina e a quercetina, ambos inibiram respectivamente, 91% e 89% dos AGEs, corroborando com o estudos de Spera (2014) que encontrou um percentual de inibição para a aminoguanidina de 81% e Sarmiento (2016) com 82% de inibição para a quercetina, utilizando as mesmas condições deste experimento. Estudos relatam que para ser considerado um anti-AGE a substância deverá apresentar 50% de inibição (BRASIL, 2012; JHAUMEER-LAULLOO et al., 2012; ZHANG et al., 2015).

Dos 22 derivados aminoguanidínicos, 18 deles apresentaram percentual de inibição acima de 50%. Vale ressaltar que os resultados são referentes às leituras seriadas nas 24h, 48h, 72h, 96 horas, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias do experimento.

No grupo 1 foram alocados os derivados LQM 135, LQM 136 e LQM 138, que apresentaram respectivamente, 28%; 33%; 26% de inibição dos AGEs durante os 56 dias de incubação. Quando comparados com os padrões aminoguanidina e a quercetina e com os parâmetros já estabelecidos na literatura, foram classificados como substâncias que não apresentam perfis antiglicantes, ou seja, percentual de inibição inferior a 50% (**Figura 12**).

**Figura 12 - Percentual de Inibição da Formação de AGEs a partir da junção de Glicose –BSA com os derivados aminoguanidínicos e os controles aminoguanidina e quercetina. Substâncias que não apresentaram atividade antiglicante na concentração de 10 mM durante o período de leitura de 56 dias.**



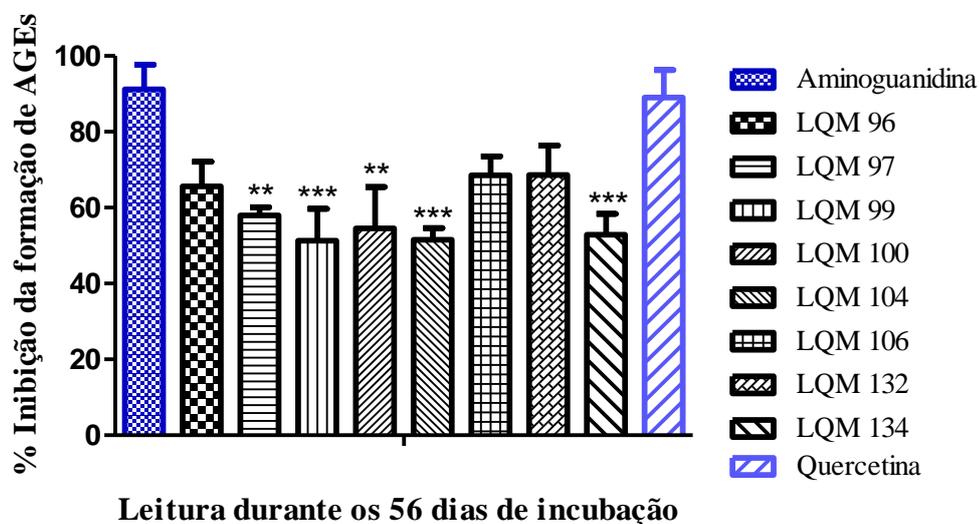
Os valores em cada coluna representam a média em triplicata. ANOVA, seguida pelo teste de Dunnett, utilizado com pós-teste. Valores significativos considerando: \*\*\*  $p < 0,05$  vs aminoguanidina.

Fonte: GOMES, 2019.

Na **figura 13**, estão agrupadas as substâncias pertencentes ao grupo 2 – estas foram alocadas neste grupo, devido às substâncias terem apresentado percentuais de inibição entre 50 a 69%, sendo então, consideradas possíveis antiglicantes, dentre elas: LQM 96 (66%); LQM 97 (58%); LQM 99 (51%); LQM 100 (55%); LQM 104 (52%); LQM 106 (69%); LQM 132 (69%); LQM 134 (53%). Como podem ser observadas no gráfico as substâncias LQM 96, LQM 106 e LQM 132 não apresentaram diferença estatística quando comparadas com a aminoguanidina e quercetina. Portanto, não apresenta diferença significativa em relação aos controles, permite dizer que essas substâncias demonstraram atividade semelhante ao padrão.

A substituição do átomo de flúor na posição 4 do composto LQM 97, por um pseudo átomo  $CF_3$ , composto LQM 106, conduziu a uma melhoria na atividade, fato este que pode devido o substituinte ser mais eletronegativo que o composto LQM 97.

**Figura 13 - Percentual de Inibição da Formação de AGEs a partir da junção de Glicose –BSA com os derivados aminoguanidínicos e os controles aminoguanidina e quercetina. Resultados com valores inferiores a 70% de Inibição na concentração de 10 mM durante o período de leitura de 56 dias.**



Os valores em cada coluna representam a média em triplicata. ANOVA, seguida pelo teste de Dunnett, utilizado com pós-teste. Valores significativos considerando: \*\*\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$  vs aminoguanidina.

Fonte: GOMES, 2019.

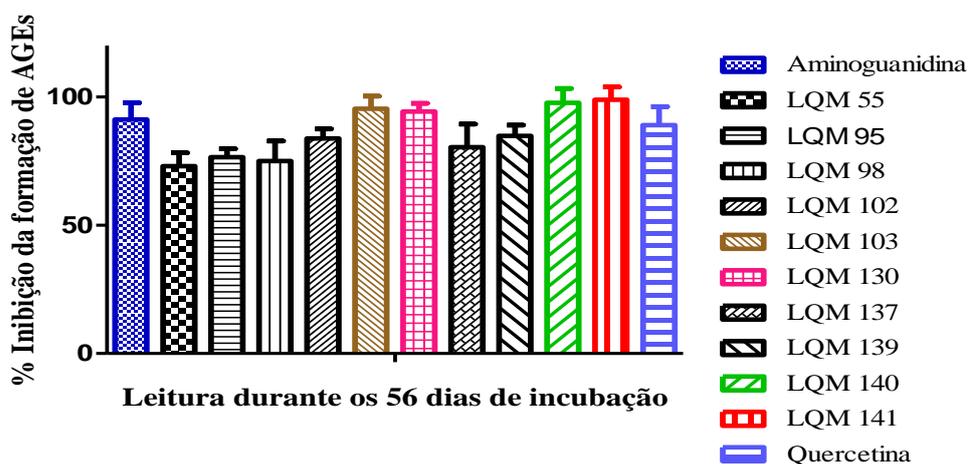
O grupo 3 está representado na **figura 14** expressa os compostos que apresentaram percentuais de inibição acima de 70% da formação dos AGEs, fazem parte deste grupo: LQM 55 (73%); LQM 95 (77%); LQM 98 (75%); LQM 102 (84%); LQM 103 (95%); LQM 130 (94%); LQM, 137 (80%); LQM 139 (85%); LQM 140 (98%); LQM 141 (99%).

Dos 22 (vinte e dois) derivados deste estudo, 10 (dez) apresentaram os melhores perfis antiglicante, considerando o percentual de inibição acima de 70%. Com base nos resultados, nota-se que algumas substâncias apresentaram percentuais de inibição maiores do que a aminoguanidina, um antiglicante descrito na literatura (SLIMAN et al., 2010), demonstrando a capacidade destas moléculas em inibir a formação dos AGEs. Vale ressaltar que foi a partir desta substância que foram sintetizados os derivados aminoguanidínicos deste estudo.

Como também, quando comparado com o outro padrão avaliado neste estudo, a quercetina. Ramkissoon et al., (2013), relataram que os compostos que apresentam

propriedades redox agem como um antioxidantes e são capazes de atuarem inibindo a formação de AGEs no organismo.

**Figura 14 - Percentual de Inibição da Formação de AGEs a partir da junção de Glicose –BSA com os derivados aminoguanidínicos e os controles aminoguanidina e quercetina. Resultados com valores superiores a 70% de Inibição na concentração de 10 mM durante o período de leitura de 56 dias.**



Os valores em cada coluna representam a média em triplicata. ANOVA, seguida pelo teste de Newman-keuls, utilizado com pós-teste. Valores significativos considerando:  $p < 0.05$  vs quercetina.

Fonte: GOMES, 2019.

A presença de substituintes doadores de elétrons na posição 4, como no composto LQM 95, que possuem uma metoxila na posição 4 (*p*-OCH<sub>3</sub>), resultou no aumento da atividade quando comparada com o LQM 15 (55%), molécula não substituída do estudo de Sarmento (2016). Já quando a metoxila é inserida na posição 3 (*m*-OCH<sub>3</sub>) houve uma diminuição da atividade, quando comparada apenas as posições deste grupamento, ou seja, entre os compostos LQM 95 e 96.

A introdução de halogênios, em especial o átomo de cloro é bem tolerada, já que dentre os análogos clorados, o composto LQM 98 (*orto*-Cl, 75%), apresentou uma melhor inibição, quando comparado com seu correspondente não substituído, LQM 15 (55%). Já quando se adiciona outro átomo de cloro na posição *para* (*p*), (*o*, *p*) gerando o LQM 99

(51%), observou-se uma redução do percentual de inibição, quando comparado ao seu correspondente, LQM 98 (75%). E quando este foi introduzido na posição *meta* (*m*), (*o*, *m*) LQM 55 apresentou equivalência da atividade. Quando o átomo de cloro foi introduzido apenas nas posições *m*, *m'*, composto LQM 100, houve uma redução da atividade antiglicante, quando comparado ao composto LQM 55, apresentando 55% de inibição.

A introdução do anel fenila juntamente com o uso de espaçadores ( $2\text{CH}_2$ ) na molécula, como apresentado no composto LQM 131, houve uma anulação da atividade antiglicante, quando comparado com o LQM 15. Já introdução de uma dupla ligação neste espaçador ( $\text{HC}=\text{CH}$ ) aumentou consideravelmente, conforme observado no composto LQM 130.

A substituição do anel fenila por um anel heteroaromático, como o tiofeno presente no composto LQM 139, houve uma melhoria significativa na atividade quando comparada ao LQM 15 do estudo de Sarmiento (2016). Da mesma forma, se este substituinte não for heterocíclico e nem aromático, como no LQM 137, observa-se atividade semelhante ao LQM 139. Já quando esta substituição for por um homólogo superior do ciclopentano, como por exemplo, o ciclohexano, proposto no LQM 132, nota-se uma redução na atividade antiglicante, e isto pode estar relacionado com a rigidez do composto 137 (BARREIRO, FRAGA, 2015).

Sarmiento (2016) ao estudar o potencial antiglicante de outra série de 20 compostos derivados aminoguanidínicos sintetizados pelo nosso grupo de pesquisa, 13 deles apresentaram resultados satisfatórios, ou seja, conseguiram inibir mais que 50% da formação de AGEs, empregando as condições desenvolvida nesta pesquisa. Isso corrobora com os resultados encontrados nesta pesquisa e reafirmando a importância da aminoguanidina como um agente promissor na prevenção da formação de AGEs (SLIMAN et al, 2010).

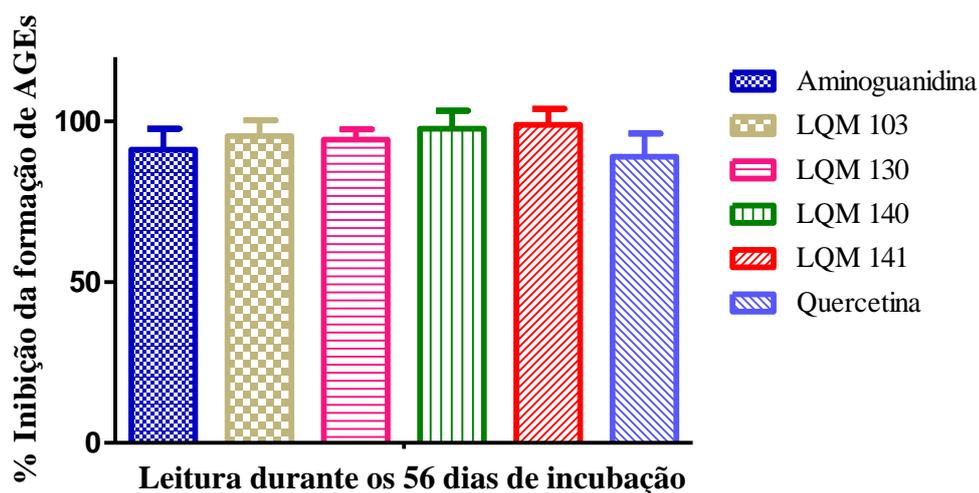
Como se pode observar na **figura 15**, os derivados aminoguanidínicos apresentaram percentuais de inibição maiores que os controles utilizados neste estudo: aminoguanidina e quercetina, demonstrando serem esses os melhores preditores da atividade antiglicante, para os derivados aminoguanidínicos analisados.

O composto LQM 103, mostrou-se bastante potente quando comparado com os análogos LQM 102 e 104, isto pode ser justificado através da posição do átomo de nitrogênio (N) no anel, pois quanto mais distante ele estiver da aminoguanidina melhor foi a atividade.

A adição do átomo de cloro na posição *orto* em relação à aminoguanidina, cuja síntese deu origem ao composto LQM 141 apresentou uma atividade de inibição de aproximadamente 100%. Em adição, é possível observar que a piridina com 3-Cl são de

grande relevância na atividade antiglicante, devido as interações intermoleculares da molécula deixando o sistema mais coplanar.

**Figura 15 - Percentual de Inibição da Formação de AGEs a partir da junção de Glicose –BSA com os derivados aminoguanidínicos e os controles aminoguanidina e quercetina. Substâncias que apresentaram os melhores resultados na concentração de 10 mM durante o período de leitura de 56 dias.**

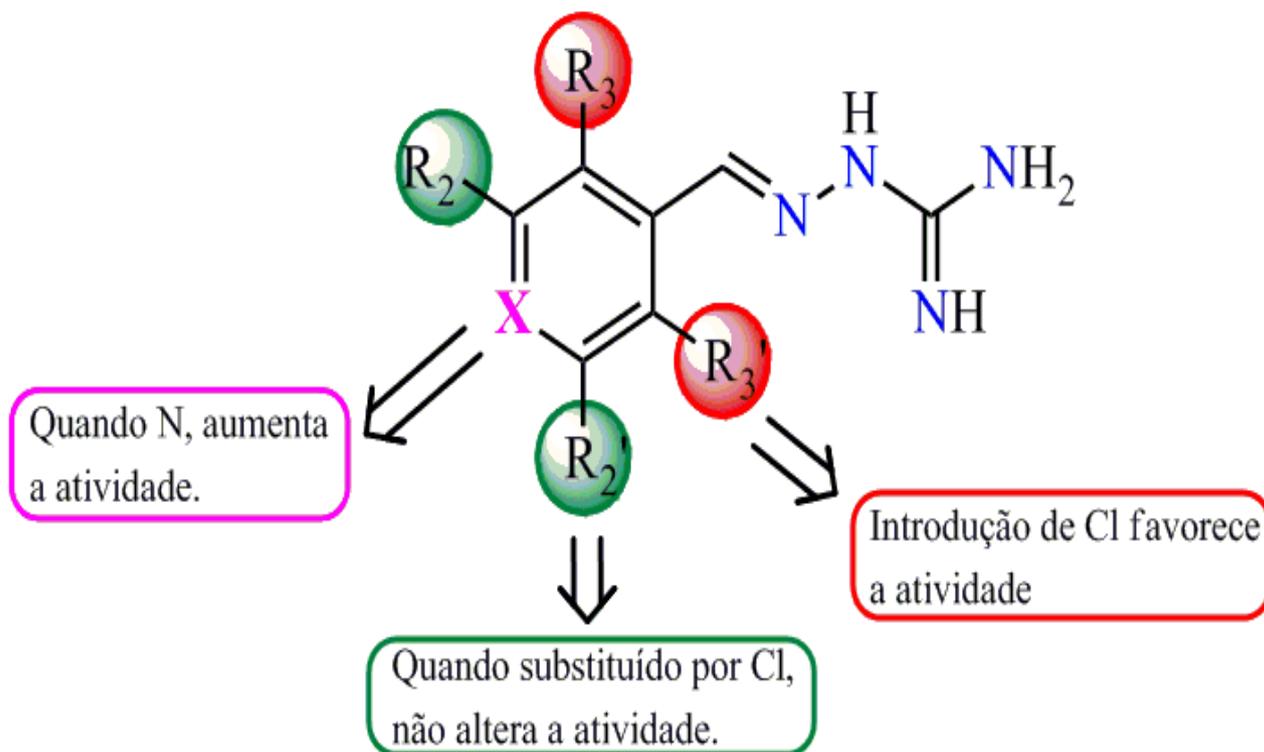


Os valores em cada coluna representam a média em triplicata. ANOVA, seguida pelo teste de Newman-keuls, utilizado com pós-teste. Valores significativos considerando:  $p < 0.05$  vs quercetina.

Fonte: GOMES, 2019.

A partir das informações da relação estrutura atividade (REA) sugeridas acima, a **figura 16** sumariza todas as modificações estruturais importantes para a classe de moléculas e suas influências sobre a atividade antiglicante.

**Figura 16 - Modificações estruturais importantes nos derivados aminoguanidínicos e suas influências sobre a atividade antiglicante.**



Fonte: GOMES, 2019.

Estudos vêm demonstrando que existem uma variedade de substâncias com propriedades Anti - AGEs. Estas podem contribuir para a inibição da formação dos produtos de glicação avançada e com isso contribuir na redução da progressão das complicações provenientes do *Diabetes mellitus*.

Com os resultados da capacidade de inibição da formação dos produtos de glicação avançada dos 22 derivados aminoguanidínicos estudados, foram selecionados os compostos que apresentaram resultados mais promissores os quais estão alocados no grupo 3 (**Figura 14**) para o ensaio de citotoxicidade celular realizada no ensaio do MTT. Assim como, foram escolhidos neste grupo, os 4 compostos que apresentaram maiores percentuais de inibição para o ensaio *in vivo*, tanto do ensaio de toxicidade aguda, como também o ensaio de atividade antidiabética, dentre eles: LQM 103; LQM 130; LQM 140 e LQM 141 (**Figura 15**).

## 5.2. Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT

No ensaio de citotoxicidade é possível detectar a interferência de uma substância com diferentes estruturas e/ou mecanismos celulares tais como: a integridade da membrana, o citoesqueleto, o metabolismo, a síntese e/ou degradação, a liberação de constituintes ou produtos celulares, a regulação iônica ou a divisão celular (REPETTO, 2002).

A aplicabilidade de qualquer substância natural ou sintética sobre sistemas celulares vivos requer avaliações quanto aos possíveis danos em nível celular e genômico (INAGAKI et al., 2007; ZHU et al., 2007).

Na avaliação toxicológica de novas moléculas, os modelos *in vitro* têm certas vantagens intrínsecas, dado que se evitam as interferências das respostas do organismo, são versáteis, economizando tempo e dinheiro, podem ser automatizados e requerem quantidade muito pequena do composto a ser investigado (GÁMEZ; MÁZ, 2007). Os estudos toxicológicos *in vitro* são amplamente utilizados e empregam um conjunto importante de métodos (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006); entre eles se destacam a avaliação da atividade citotóxica de substâncias através do ensaio de captação do vermelho neutro e o ensaio de redução de MTT que estão dentro dos métodos aos quais se pode utilizar para avaliar a toxidez e quantificar a viabilidade celular após exposição a substâncias tóxicas. Existem muitos alvos celulares para o dano e, geralmente, estes mecanismos convergem e produzem uma resposta celular comum. A morte celular seguirá mecanismos similares independentemente de que a causa do dano seja de natureza química, física ou biológica.

Neste estudo, foi avaliada a citotoxicidade dos derivados aminoguanidínicos mais promissores no processo de inibição da formação de AGEs, tais como: LQM 55; LQM 95; LQM 98; LQM 102; LQM 103; LQM 130; LQM, 137; LQM 139; LQM 140; LQM 141 em cultura de células utilizando a redução de MTT (sais tetrazólio) como parâmetro de viabilidade celular. Foram utilizados macrófagos linhagem J774. A1, na concentração de 10  $\mu$ M, conforme ilustrado na **tabela 7**.

**Tabela 7 - Efeito dos derivados aminoguanidínicos sobre a viabilidade celular em 10 µM.**

<b>LQM</b>	<b>Citotoxicidade MTT 24 horas (10 µM)</b>
<b>55</b>	NT
<b>95</b>	NT
<b>98</b>	45,9±0,98***
<b>102</b>	NT
<b>103</b>	NT
<b>106</b>	NT
<b>130</b>	NT
<b>132</b>	NT
<b>137</b>	NT
<b>139</b>	NT
<b>140</b>	NT
<b>141</b>	NT

Citotoxicidade - média da citotoxicidade máxima ± erro padrão da média da citotoxicidade na concentração de 10 µM em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de citotoxicidade foram considerados significativos quando \*\*\*p <0,001 em relação ao grupo DMSO 0,1%. NT: substância não apresentou atividade letal significativa para macrófagos da linhagem J774.A1 na concentração de 10 µM em relação ao grupo DMSO.

Fonte: GOMES, 2019.

Neste ensaio foi utilizado à escala de citotoxicidade proposto por Sletten e Dahl, que classifica segundo os níveis de viabilidade celular em porcentagens da seguinte forma: não citotóxico quando igual ou maior que 90% da viabilidade celular; levemente citotóxico de 80 a 89%; moderadamente citotóxico 50 a 79% e severamente citotóxico menor que 50% (OLIVEIRA, 2009).

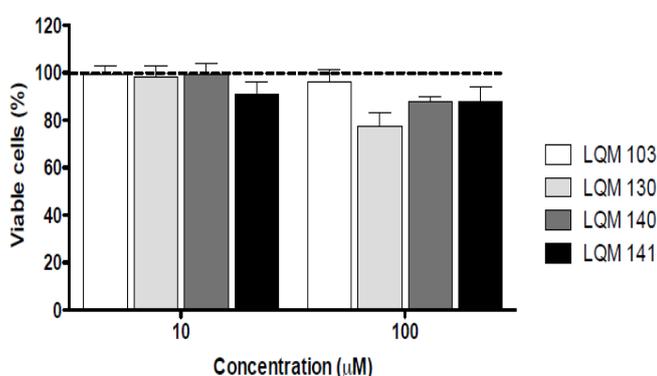
Os dados demonstraram que dos 12 (doze) derivados aminoguanidínicos testados, apenas o composto LQM 98 apresentou citotoxicidade, ou seja, os demais compostos não apresentaram redução na viabilidade celular e sem efeitos tóxicos na concentração testada. Corroborando com o estudo desenvolvido por Sarmiento (2016), que ao estudar derivados aminoguanidínicos 17 dos 19 compostos testados não apresentaram citotoxicidade na concentração de 10 µM.

Devido a não citotoxicidade frente aos macrófagos da linhagem J744.A1 nas concentração estudada, é possível dar sequência nos ensaios *in vivo* com os compostos que apresentaram maiores percentuais de inibição na formação dos produtos finais de glicação avançada.

A partir do resultado do teste de viabilidade celular pelo método do MTT, utilizando macrófagos da linhagem J774. A1, foram selecionados 4 (quatro) substâncias que apresentaram os melhores perfis antiglicantes e que não foram tóxicas frente aos macrófagos e foi feito um novo ensaio de viabilidade celular frente a fibroblastos 3T3, dentre eles: LQM 103, LQM 130, LQM 140 e LQM141. Os fibroblastos desempenham um papel fundamental na produção de colágeno, que é uma proteína de importância estrutural na formação da matriz extracelular e abundante no corpo humano e no reino animal. Portanto, os fibroblastos são as células responsáveis pela formação da matriz extracelular (CAMPOS, 2007). A escolha pelos fibroblastos 3T3 se apoiou na perspectiva de realizar posteriormente ensaios com atividade cicatrizante.

Conforme apresentado na **figura 17**, o tratamento com LQMs a 10  $\mu$ M não teve efeito sobre a viabilidade celular dos fibroblastos. Por outro lado, a incubação com o LQM 130 e o LQM 140 a 100  $\mu$ M induziu decréscimo de 22,5% e 12,1% ( $P < 0,05$ ), respectivamente, na percentagem de células viáveis em comparação com o grupo controle.

**Figura 17 - Efeito do LQM 103, LQM 130, LQM 140, LQM 141 na viabilidade dos fibroblastos 3T3.**



As barras representam a média  $\pm$  SEM. A linha tracejada representa o grupo controle (tratado com DMEM). Os dados foram expressos como % viáveis células em comparação com o grupo controle. One-way ANOVA seguido pelo Newman-Keuls pós-teste, \*  $p < 0,05$  (controle vs. tratamento). Fonte: GOMES, 2019.

Os testes de viabilidade celular com os LQMs foram realizados com fibroblastos 3T3, devido ao fato de que os fibroblastos são a maior fonte de proteínas na matriz extracelular e responsáveis pela produção de colágeno, favorecendo a cicatrização por meio do processo de neoangiogênese. Nestes testes foi observado que, na concentração de 10  $\mu\text{M}$  as substâncias testadas apresentaram-se atóxicas, isto é, a viabilidade celular foi maior que 90%, enquanto na concentração de 100  $\mu\text{M}$  o composto LQM 130 foi considerado moderadamente citotóxico com percentagem entre 50 a 79% de viabilidade (OLIVEIRA, 2009).

De acordo com Williams (2008), a complexidade do equilíbrio entre a resposta imune e as funções regenerativas do organismo impõe dificuldades no estabelecimento dos limites da biocompatibilidade de um material. Portanto, tem sido usada um amplo ensaios *in vitro*, com o objetivo de auxiliar em pesquisa da biocompatibilidade. Esses testes não determinam, isoladamente, a biocompatibilidade de um material; entretanto, constitui importante etapa no seguimento para testes em animais e finalmente no uso clínico.

### 5.3. Avaliação da toxicidade aguda *in vivo* em dose única

#### 5.3.1. Alterações comportamentais

O estudo de toxicidade aguda é utilizado para avaliar a toxicidade desencadeada por uma substância 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. Este ensaio pode contribuir para o estabelecimento de um regime de doses para as pesquisas com doses repetidas, além de fornecer informações iniciais sobre o modo de ação da substância em estudo (ANVISA, 2010; BRITO, 1994; KLAASSEN; WATKINS, 2012). Estes ensaios demonstram que toda substância é um agente tóxico em potencial, dependendo apenas das condições de exposição como: dose, tempo, frequência e via de administração (VALADARES, 2006; ZATTA et al., 2009; PIRES JÚNIOR et al., 2012).

Neste estudo utilizamos ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar como animais de experimentação, por apresentarem inúmeras vantagens em relação aos outros animais de maior porte: fácil manuseio (alimentação, higiene, acomodação); possibilidade de trabalhar simultaneamente com vários grupos experimentais sem a ocupação de grandes espaços; facilidade para remoção dos diversos órgãos (LERCO et al., 2003).

Linhagens de animais de experimentação, quando padronizadas, atuam como ferramentas capazes de simular as complexas interações de órgãos e sistemas, possibilitando a compreensão *in vivo* dos eventos relacionados ao desenvolvimento da doença (MELO, 2012).

As doses adequadas das substâncias para ser utilizada em um bioensaio são escolhidas após a realização de testes de toxicidade aguda, nos quais são observados sinais clínicos de toxicidade, dor, comportamento e ocorrência de morte (OECD, 2002).

Neste trabalho realizou-se o teste de toxicidade aguda com os derivados aminoguanidínicos LQM 103, LQM 130, LQM 140 e LQM 141 e os respectivos controles, nas concentrações de 2 mg/kg, 10 mg/kg e 100 mg/kg. Nos primeiros 30 minutos após a ingestão do derivado LQM 130, na concentração de 100 mg/kg, os animais apresentaram letargia, dificuldade respiratória e tremores. Nas demais concentrações desta substância e nem nas demais substâncias com suas respectivas concentrações testadas, não houve registro de mortes ou quaisquer variações na aparência geral ou sinais de toxicidade quando comparados ao grupo controle normal.

Os animais foram acompanhados quanto a sua massa corporal, ingestão e alimento e de água, uma vez que esses dados podem ser utilizados como indicadores de toxicidade. A ingestão de ração, água e a produção de excreta variaram entre os grupos durante o experimento, entretanto, isso não atingiu a saúde e o estado geral dos animais, onde os mesmos se apresentaram sempre ativos e responsivos aos estímulos (dados não mostrados).

Em relação à evolução corporal, observou-se uma equivalência entre os grupos nos três tratamentos, não apresentando diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao grupo controle normal. Foi observado que em todos os grupos houve um aumento da massa corporal dos animais, não sendo observada alteração comportamental indicativa de toxicidade, exceto para o LQM 130 – 100 mg/kg (**Tabela 8**).

De acordo com Vital et al. (2009), estes fatores indicam a ausência de toxicidade pelo uso da substância testada, uma vez que não foram registrados sinais de toxicidade geral, como a perda de peso e óbitos durante todo o período experimental, sugerindo o não envolvimento do SNC e SNA.

**Tabela 8 - Efeito da administração dos derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles por via oral sobre o desenvolvimento ponderal (g) de ratos Wistar (n=3) tratados com dose única.**

GRUPO	PESO INICIAL	PESO FINAL	Δ
CONTROLE	236,0 ± 3,1	280,5 ± 2,9	44,5
LQM 103 2 mg/kg	205,7 ± 1,6	235,0 ± 1,6	29,3
LQM 103 10 mg/kg	215,7 ± 1,2	242,0 ± 0,6	26,3
LQM 103 100 mg/kg	249,3 ± 5,5	309,3 ± 9,8	60,0
LQM 130 2 mg/kg	233,0 ± 0,8	272,7 ± 4,1	39,7
LQM 130 10 mg/kg	251,7 ± 4,1	277,7 ± 14,5	26,0
LQM 130 100 mg/kg	212,7 ± 3,5	183,3 ± 18,8	29,4
LQM 140 2 mg/kg	254,0 ± 4,9	300,3 ± 7,0	46,3
LQM 140 10 mg/kg	241,0 ± 1,9	277 ± 1,6	33,0
LQM 140 100 mg/kg	226,7 ± 12,1	267,3 ± 12,0	40,6
LQM 141 2 mg/kg	227,0 ± 3,6	270,7 ± 7,8	43,7
LQM 141 10 mg/kg	219,0 ± 3,6	280,3 ± 3,8	61,3
LQM 141 100 mg/kg	211,3 ± 9,2	248,7 ± 11,2	37,4

AMINO Guanidina 2 mg/kg	219,7 ± 4,7	237,0 ± 5,2	17,3
AMINO Guanidina 10 mg/kg	205,0 ± 5,7	282,7 ± 8,2	77,7
AMINO Guanidina 100 mg/kg	209,7 ± 7,6	286,7 ± 12,2	77,0

Os dados representam a média ± erro padrão da média (n=3/grupo). Não houve diferença entre si utilizando ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet, utilizado com pós-teste considerando  $p < 0.05$ .  $\Delta$  = variação de peso.

Fonte: GOMES, 2019.

A alteração do peso corporal é um parâmetro utilizado nos ensaios toxicológicos como um indicador dos efeitos adversos de drogas e substâncias químicas (GONZÁLEZ; SILVA, 2006; PIRES-JÚNIOR et al., 2012; RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002), sendo importante que os animais sobreviventes não percam mais do que 10% do seu peso corporal inicial (KLAASSEN; WATKINS, 2012). A ausência de alterações nos parâmetros fisiológicos avaliados enfatiza a baixa toxicidade das substâncias testadas.

### 5.3.2. Avaliação do perfil glicêmico, parâmetros bioquímicos e hematológicos.

O sangue é um indicativo do estado fisiológico e patológico dos seres vivos (ODUOLA et al., 2007), sendo que seus valores podem ser alterados pela ingestão de substâncias tóxicas, quer seja de origem natural ou sintética (VAZQUEZ; GUERRERO, 2007). A análise dos parâmetros sanguíneos é importante para mensurar os danos apresentados ao organismo pela utilização da substância. As mudanças nestes parâmetros demonstram alto valor preditivo para a toxicidade humana, quando os dados são convertidos a partir de estudos com animais (JESUS et al., 2012).

O hemograma é um importante aliado dos estudos de toxicidade, uma vez que o sistema hematopoiético é muito sensível às atividades de agentes tóxicos, principalmente aqueles com potencial mutagênico ou citotóxico, resultando em alterações qualitativas ou quantitativas, transitórias ou permanentes e que podem limitar a utilização de fármacos e medicamentos; alterações hematológicas podem refletir, também, na atividade imunológica (LIMA et al., 2002).

É um exame laboratorial complementar que permite analisar de forma quantitativa e qualitativa os elementos figurados do sangue, se divide em: eritrograma (série vermelha),

leucograma (série branca) e série plaquetária. No eritrograma é executado a contagem de eritrócitos (RBC), dosagem de hemoglobina (HGB), determinação do hematócrito (HCT), o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM), a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e o coeficiente de variação da distribuição das hemácias (RDW), ou seja, um indicativo do grau de anisocitose das hemácias expresso em porcentagem (GROTO, 2008).

Baixas concentrações de hemoglobina, hemácias e hematócrito podem indicar anemia, hemorragia recente ou retenção de líquido, causando hemodiluição (GUYTON; HALL, 2008; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Já uma contagem diminuída de plaquetas (trombocitopenia) pode resultar de uma série de situações patológicas, como a destruição aumentada dessas células, devido ao uso de certas drogas, a desordens imunes, a coagulação vascular disseminada e até lesões mecânicas (DOGAN; TURKOGLU, 2008).

A diferencial de leucócitos é usada para avaliar a distribuição e a morfologia dos glóbulos brancos, fornecendo informações mais específicas sobre o sistema imune do que a contagem de leucócitos isoladamente (FAILACE, 2009).

De maneira geral a série vermelha avalia a presença de doenças dos glóbulos vermelhos, como a anemia, a série branca avalia processos alérgicos e infecciosos, agudos ou crônicos e a série plaquetária avalia o sistema de coagulação primário (THEML et al. 2001).

De acordo com a **Tabela 9**, alguns grupos tratados com os derivados aminoguanidínicos apresentaram diferença estatística significativa em alguns parâmetros quando comparados com o controle normal, apesar de estar dentro dos valores de referência (DANTAS et al. 2011). As anemias podem ser detectadas na observação de valores inferiores aos normais do número de hemácias do sangue circulante e/ou do seu conteúdo de hemoglobina.

A contagem de plaquetas para a maioria dos grupos tratados nas três concentrações testadas com os derivados aminoguanidínicos não apresentaram diferença estatisticamente significativa com o controle normal, exceto para os grupos LQM 103 (10 mg/kg), LQM 130 (100 mg/kg) e LQM 140 (100 mg/kg) que apresentaram uma trombocitopenia.

No leucograma diferenças estatísticas significativas foram observadas somente no grupo tratado com o LQM 103 nas concentrações de 2 mg/kg e 10 mg/kg com o controle normal, observou-se uma redução no número de leucócitos (leucopenia).

O estudo dos leucócitos é baseado em: contagem, características morfológicas, proporções relativas, maturação e modificações na inflamação. A leucocitose é resultante na

maioria dos casos, do aumento do número de neutrófilos (neutrofilia), o que não aconteceu no nosso estudo. As principais causas de leucocitose são: infecção/inflamação, traumatismo e leucemia/linfoma.

Segundo Caniceiro et al. (2007), a hematotoxicidade pode ser definida como o estudo dos efeitos adversos sobre o sangue e a medula óssea provocados por xenobióticos, podendo ser causada por lesão direta aos componentes do sangue ou como consequência secundária devido lesões em outros tecidos.

Os valores hematológicos apresentados nos diferentes grupos de tratamento e concentrações com os derivados aminoguanidínicos foram observados poucas alterações, apesar da diferença estatística significativa em alguns grupos. E que estas alterações por sua vez, não comprometeram a saúde dos animais, com isso não foi identificado toxicidade dos derivados aminoguanidínicos estudados.

**Tabela 9 - Efeito da administração dos derivados aminoguanidínicos por via oral tratados com dose única sobre os parâmetros hematológicos de ratos Wistar (n=3) a) série vermelha e b) plaquetas e série branca.**

A) SÉRIE VERMELHA

GRUPOS	SÉRIE VERMELHA						
	HEMÁCIAS ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	HEMOGLOBINA (g/dL)	HEMATÓCRITO (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	RDW (%)
CONTROLE	8,7 ± 0,04	15,4 ± 0,07	53 ± 0,04	60,4 ± 0,3	17,6 ± 0,1	29,0 ± 0,1	14,7 ± 0,3
LQM 103 - 2 mg/kg	9,0 ± 0,1	16,6 ± 0,2**	59 ± 0,4***	65,5 ± 0,5	18,4 ± 0,08	28,1 ± 0,20	13,3 ± 0,08**
LQM 103 - 10 mg/kg	7,9 ± 0,2**	14,5 ± 0,3	51 ± 1,5	62,9 ± 8,3	18,4 ± 7,9	29,3 ± 0,2	12,3 ± 0,2***
LQM 103 - 100 mg/kg	8,6 ± 0,1	14,6 ± 0,3	53 ± 0,5	61,4 ± 0,4	17,7 ± 0,06	28,9 ± 0,2	14 ± 0,2
LQM 130 - 2 mg/kg	8,5 ± 0,01	15,2 ± 0,15	52 ± 0,8	61,4 ± 0,9	17,9 ± 0,2	29,2 ± 0,2	13,8 ± 0,1
LQM 130 - 10mg/kg	8,8 ± 0,2	16,8 ± 0,4***	58 ± 1,2**	61,8 ± 0,6	17,8 ± 0,03	28,8 ± 0,2	14,7 ± 0,3
LQM 130 - 100 mg/kg	9,2 ± 0,29	14,6 ± 0,2	57 ± 1,8*	62,0 ± 0,45	16,1 ± 0,5	26,0 ± 0,8***	13,5 ± 0,4**
LQM 140 - 2 mg/kg	8,8 ± 0,05	15,4 ± 0,13	54 ± 0,18	61,3 ± 0,16	17,5 ± 0,13	28,5 ± 0,2	14,2 ± 0,03
LQM 140 - 10 mg/kg	9,0 ± 0,02	15,8 ± 0,10	56 ± 0,36	61,3 ± 0,27	17,4 ± 0,08	28,4 ± 0,04	14,2 ± 0,03
LQM 140 - 100 mg/kg	8,7 ± 0,15	15,5 ± 0,3	54 ± 0,9	61,6 ± 0,36	17,7 ± 0,07	28,8 ± 0,11	14,5 ± 0,05
LQM 141 - 2 mg/kg	8,2 ± 0,030	15 ± 0,06	53 ± 0,8	62,2 ± 0,15	18,2 ± 0,03	29,3 ± 0,1	13,2 ± 0,28***
LQM 141 - 10 mg/kg	8,4 ± 0,03	15,3 ± 0,16	53 ± 0,3	62,8 ± 0,25	18,2 ± 0,2	28,9 ± 0,14	13,6 ± 0,03*
LQM 141 - 100 mg/kg	8,3 ± 0,1	15,3 ± 0,09	52 ± 0,6	62,8 ± 0,2	18,5 ± 0,1	29,5 ± 0,18	13,8 ± 0,4
AMINO Guanidina - 2 mg/kg	8,8 ± 0,1	16,4 ± 0,14*	56 ± 0,65	64 ± 0,1	18,6 ± 0,09	29,1 ± 0,08	12,5 ± 0,13***

AMINO GUANIDINA – 10 mg/kg	9,2 ± 0,13	16,9 ± 0,2 <sup>***</sup>	58 ± 0,8 <sup>**</sup>	62,8 ± 0,5	18,5 ± 0,1	29,3 ± 0,16	12,7 ± 0,3 <sup>***</sup>
AMINO GUANIDINA – 100 mg/kg	9,3 ± 0,2 <sup>*</sup>	17,5 ± 0,3 <sup>***</sup>	59 ± 0,1 <sup>***</sup>	62,9 ± 0,5	18,8 ± 0,2	29,9 ± 0,04	13,4 ± 0,11 <sup>***</sup>

Os dados representam a média ± erro padrão da média (n=3/grupo). Não houve diferença entre si utilizando ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet, utilizado com pós-teste considerando  $p < 0.05$ .

## B) PLAQUETAS E SÉRIE BRANCA

GRUPOS	PLAQUETAS	SÉRIE BRANCA						
		WBC ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Bastão (%)	Segmentados (%)	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)
CONTROLE	799 ± 88	7,6 ± 0,85	-	15 ± 2,2	82 ± 1,8	3 ± 0,4	-	-
LQM 103 - 2 mg/kg	739 ± 12,7	4,2 ± 0,27 <sup>**</sup>	1 ± 0,18	19 ± 0,48	78 ± 0,48	2 ± 0,18	-	-
LQM 103 – 10 mg/kg	520 ± 58,8 <sup>***</sup>	4,7 ± 0,95 <sup>*</sup>	-	24 ± 1,11	72 ± 1,26	3 ± 0,18	1 ± 0,18	-
LQM 103 - 100 mg/kg	743 ± 20,5	6,2 ± 0,45	-	19 ± 1,62	78 ± 1,49	2 ± 0,31	1 ± 0,18	-
LQM 130 - 2 mg/kg	830 ± 29,6	5,9 ± 0,28	-	17 ± 1,42	80 ± 1,11	3 ± 0,31	-	-
LQM 130 – 10mg/kg	689 ± 38,7	6,7 ± 0,44	-	18 ± 1,62	79 ± 1,31	3 ± 0,31	-	-
LQM 130 – 100 mg/kg	427 ± 78,1 <sup>***</sup>	7,7 ± 1,51	-	36 ± 7,67	60 ± 7,19	3 ± 0,36	1 ± 0,18	-
LQM 140 - 2 mg/kg	635 ± 16,8	5,7 ± 0,33	-	21 ± 0,83	77 ± 0,83	2 ± 0,36	-	-
LQM 140 – 10 mg/kg	707 ± 12,6	6,8 ± 0,41	-	18 ± 0,36	79 ± 0,36	3 ± 0,36	-	-
LQM 140 - 100 mg/kg	612 ± 17,3	7,0 ± 0,12	-	15 ± 1,64	82 ± 1,46	3 ± 0,18	-	-
LQM 141 - 2 mg/kg	773 ± 9,2	5,7 ± 0,230	-	17 ± 1,01	79 ± 0,48	3 ± 0,73	1 ± 0,360	-
LQM 141 - 10 mg/kg	777 ± 21 <sup>*</sup>	6,7 ± 0,23	-	11 ± 0,65	85 ± 0,79	3 ± 0,00	1 ± 0,18	-
LQM 141 - 100 mg/kg	753 ± 15,2	6,8 ± 0,55	-	11 ± 1,09	85 ± 1,31	4 ± 0,36	-	-

AMINOGUANIDINA – 2 mg/kg	783 ± 10,6	7,0 ± 0,42	-	23 ± 0,79	73 ± 0,65	3 ± 0,48	1 ± 0,0	-
AMINOGUANIDINA – 10 mg/kg	749 ± 14,6	5,0 ± 0,58	-	21 ± 1,62	76 ± 1,27	3 ± 0,63	-	-
AMINOGUANIDINA – 100 mg/kg	718 ± 60,0	5,9 ± 0,89	-	21 ± 5,62	75 ± 5,85	3 ± 0,31	1 ± 0,31	-

Os dados representam a média ± erro padrão da média (n=3/grupo). Não houve diferença entre si utilizando ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet, utilizado com pós-teste considerando  $p < 0.05$ .

Fonte: GOMES, 2019.

Os parâmetros bioquímicos agem como indicadores dos processos adaptativos do organismo, no metabolismo energético, protéico e mineral, além de oferecer indicativos na interpretação do funcionamento hepático, renal, pancreático, ósseo e muscular (GONZÁLEZ; SILVA, 2006; SILVA, 2012).

A concentração plasmática de glicose adequadamente é primordial para o bom funcionamento do cérebro. O organismo busca diferentes vias para manter a glicemia e, dependendo do estado atual do metabolismo dos carboidratos, a glicose pode ser originada de uma ou mais fontes. Na maioria das vezes o glucagon e o hormônio de crescimento (GH) são os responsáveis pela manutenção dos níveis adequados de glicose, enquanto em estados anormais, como jejum ou estresse, os glicocorticóides e a epinefrina são particularmente importantes. O principal agente diminuidor da concentração de glicose é a insulina (GUYTON; HALL, 2002; KERR, 2003; BUSH, 2004; THRALL, 2007).

De acordo com a **Tabela 10**, os níveis séricos de glicose mantiveram normais no início (tempo zero) e no pós-tratamento (14<sup>o</sup> dia), contribuindo assim para o não comprometimento sistêmico dos animais submetidos ao tratamento com os derivados aminoguanidínicos. Os dados colhidos através dos níveis de glicose não apresentaram diferença estatística entre eles quando comparado ao início do tratamento e no final do tratamento.

**Tabela 10 - Efeito da administração dos derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles antes e pós-tratamento do teste de toxicidade aguda em dose única sobre a glicemia (mg/dL) de ratos Wistar (n=3).**

<b>GRUPOS</b>	<b>GLICEMIA INICIAL (mg/dL)</b>	<b>GLICEMIA FINAL (mg/dL) 14° DIA</b>
CONTROLE	108 ± 2,01	94 ± 2,01
LQM 103 2 mg/kg	109 ± 1,37	108 ± 2,53
LQM 103 10 mg/kg	91 ± 6,86	105 ± 1,74
LQM 103 100 mg/kg	97 ± 0,96	99 ± 1,31
LQM 130 2 mg/kg	93 ± 6,14	95 ± 2,28
LQM 130 10 mg/kg	103 ± 6,35	97 ± 3,28
LQM 130 100 mg/kg	98 ± 0,73	90 ± 5,22
LQM 140 2 mg/kg	104 ± 7,49	93 ± 2,33
LQM 140 10 mg/kg	98 ± 2,10	101 ± 4,52
LQM 140 100 mg/kg	104 ± 3,32	109 ± 2,03
LQM 141 2 mg/kg	96 ± 1,79	95 ± 1,62
LQM 141 10 mg/kg	105 ± 1,92	101 ± 3,30
LQM 141 100 mg/kg	111 ± 1,97	96 ± 4,79
AMINO Guanidina 2 mg/kg	95 ± 5,85	99 ± 2,28
AMINO Guanidina 10 mg/kg	101 ± 0,63	102 ± 5,06
AMINO Guanidina 100 mg/kg	100 ± 2,28	90 ± 2,45

Os dados representam a média ± erro padrão da média (n=3/grupo). Não houve diferença entre si utilizando ANOVA, seguida pelo teste de Dunnet, utilizado com pós-teste considerando  $p < 0.05$ .

Fonte: GOMES, 2019.

O fígado e os rins são os órgãos ativos na metabolização e eliminação de xenobióticos. Portanto, as análises destes parâmetros bioquímicos podem ajudar a identificar os órgãos alvo de toxicidade e o estado geral de saúde do animal (ALMEIDA et al., 2002).

Analisando os parâmetros bioquímicos de função renal como ureia, creatinina e ácido úrico (**Figura 18**). Os resultados indicaram que os animais tratados com os derivados aminoguanidínicos tiveram a função renal preservada, independente da concentração ingerida. Estes permaneceram dentro dos valores de referência descritos na literatura (CASTRO et al., 2014; ASHAFI; KAZEEM, 2015). Já a aminoguanidina, substância que deu origem aos derivados deste estudo, pode ser observada um pequeno aumento dos níveis séricos destes parâmetros, principalmente nas maiores concentrações testadas, quando comparada ao controle normal, sendo estatisticamente significativo.

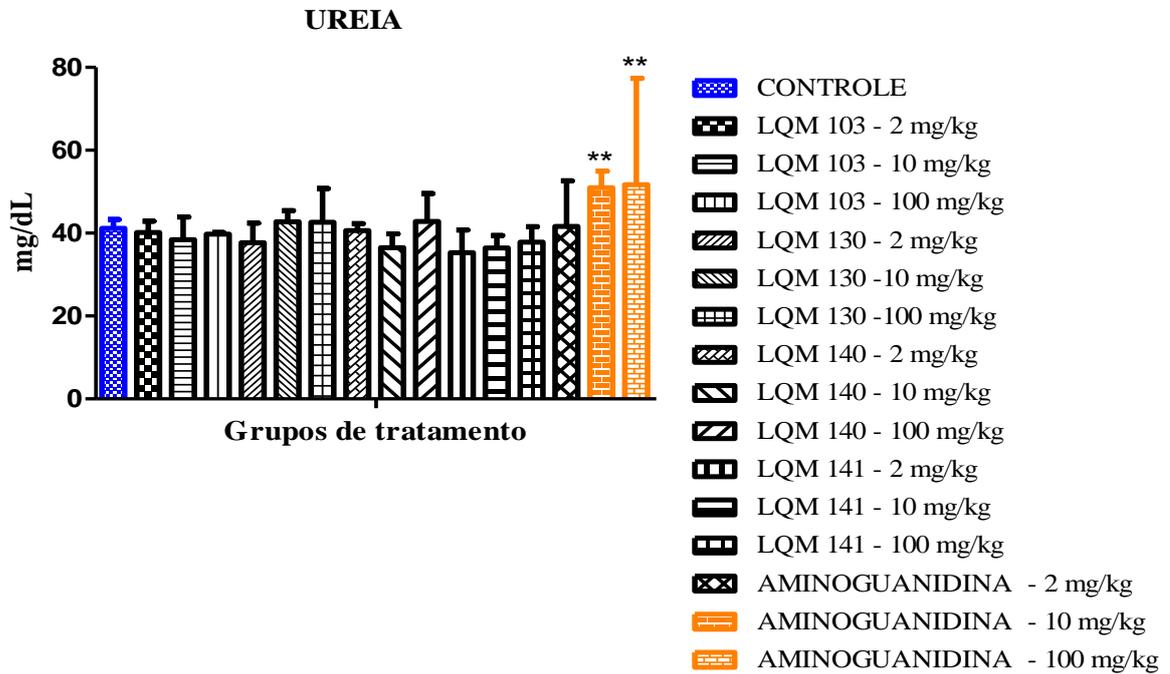
A insuficiência renal leva a um déficit na excreção da creatinina, uréia e ácido úrico, como resultado advém uma exacerbação da concentração sorológica destes parâmetros (KERR, 2003; BUSH, 2004; THRALL, 2007).

A creatinina é um produto do metabolismo formado pela descarboxilação da creatina-fosfato no músculo e com relação direta com a massa muscular e metabolismo energético. O catabolismo da creatinina é lento e constante, numa taxa que é proporcional à massa muscular individual, sucedendo um influxo constante de creatinina para o plasma que não é afetado por mudança na atividade ou lesão muscular. Assim, as mudanças na concentração plasmática da creatinina são derivadas de alterações na excreção dela, na função renal (KERR, 2003; MOTTA, 2003; BUSH, 2004; THRALL, 2007).

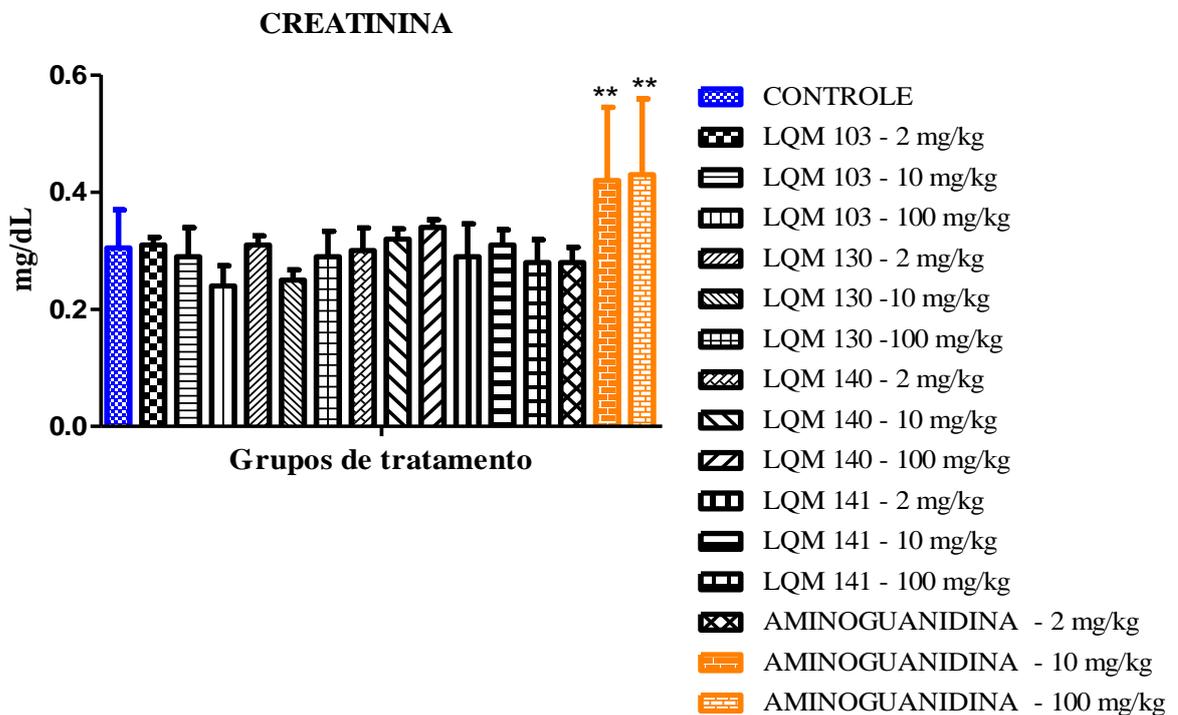
Valores aumentados de uréia e creatinina podem sugerir comprometimento da função renal, neste estudo não foi observado elevação destes parâmetros. Portanto, nenhum sinal de toxicidade renal pode ser relacionado à administração dos derivados aminoguanidínicos.

Figura 18 - Níveis plasmáticos de ureia, creatinina e ácido úrico de ratos Wistar do teste de toxicidade aguda tratados em dose única com os derivados aminoguanidínicos, aminoguanidina e o controle negativo (n=3).

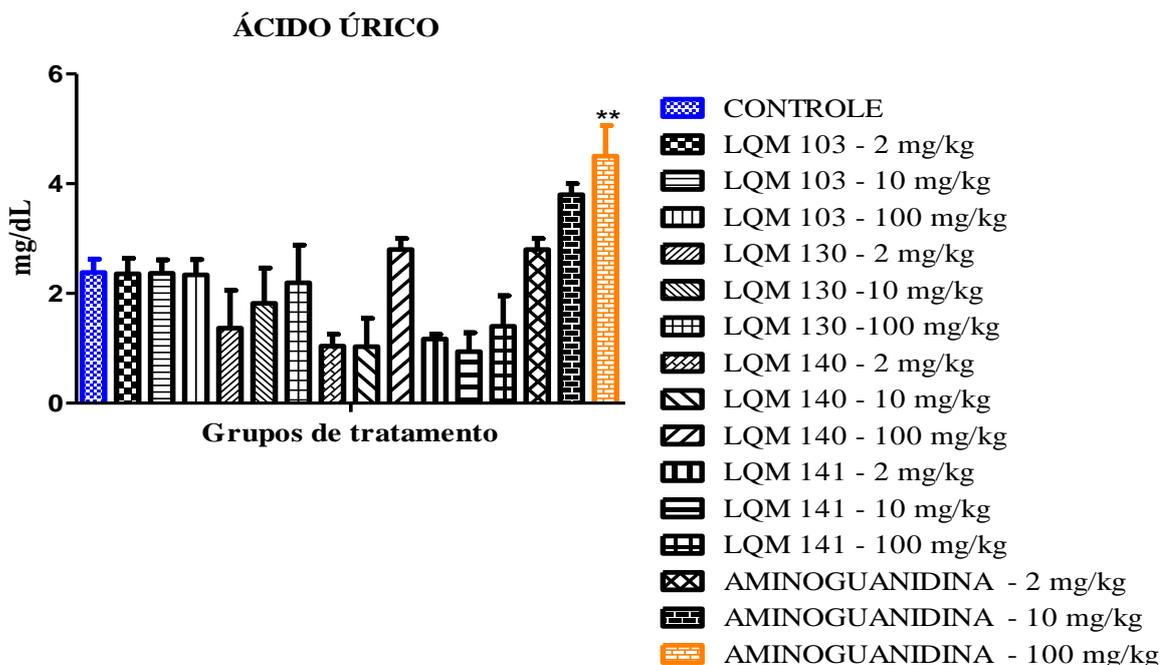
a)



b)



c)



(A) Ureia; (B) Creatinina; (C) Ácido úrico. Os resultados dos grupos experimentais (n=3) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). ANOVA e pós-teste de Dunnett, considerando  $p < 0,05$ .

Fonte: GOMES, 2019.

As aminotransferases AST/TGO e ALT/TGP, a gama glutamiltransferase (GGT), a bilirrubina total e frações e a fosfatase alcalina (ALP) fazem parte do grupo de exames responsáveis para o diagnóstico das doenças hepáticas. Estes são os mais praticados na clínica médica e são capazes de identificar alguma doença oculta do fígado e/ou das vias biliares e nos estudos de toxicidade *in vivo* são utilizados para acompanhar as funções hepáticas a fim de identificar alterações hepatológicas que podem significar hepatotoxicidade frente a determinadas substâncias.

A função hepática dos animais deste estudo foi analisada através da determinação dos parâmetros AST/TGO, ALT/TGP, bilirrubina total e frações, GGT e ALP.

De acordo com a **figura 19**, os animais tratados com os derivados aminoguanidínicos não apresentaram diferença estatística dos níveis de AST com relação ao grupo controle normal, pode ser observado também que à medida que a concentração ingerida aumenta, os níveis séricos tendem a aumentar, exceto para o grupo testado com o derivado aminoguanidínico LQM 141 (100 mg/kg) que manteve o mesmo padrão independente da dose

ingerida. Na ALT também não houve diferença estatística com os grupos de animais tratados com os derivados aminoguanidínicos, comparados ao controle normal. E em alguns casos observou uma redução, como por exemplo, o grupo tratado com o derivado LQM 141 nas três concentrações testadas os níveis séricos ficaram abaixo do controle negativo, vale salientar que esta redução não está relacionada com lesões. O mesmo se repetiu com os parâmetros descritos anteriormente quando tratados com a aminoguanidina os níveis séricos de ALT aumentaram, principalmente nas maiores concentrações testadas, quando comparada ao controle normal, sendo estatisticamente significativo.

A AST é essencialmente mitocondrial e não é liberada tão rapidamente quanto a ALT, que é citoplasmática. A ALT é o indicador mais sensível de hepatotoxicidade do que a AST, pois enquanto a primeira é essencialmente hepática, a segunda também pode ser encontrada em altas concentrações em outros órgãos como rins, pulmões e coração (MOTTA, 2003).

Os níveis de bilirrubina total, bilirrubina direta, GGT e FAL permaneceram dentro dos limites da normalidade para todos os grupos tratados com os derivados aminoguanidínicos, não apresentando diferença estatística significativa comparada ao grupo controle normal.

As bilirrubinas são subproduto da quebra da molécula heme da hemoglobina. Aproximadamente 75% da bilirrubina são oriundos da destruição das hemácias velhas, uma pequena porção originada do fígado, e grande parte oriunda da destruição de hemácias defeituosas na medula óssea. A bilirrubina, por ser insolúvel, circula no plasma sob a forma não conjugada ligada à albumina, ao chegar aos sinusóides hepáticos, via sistema mononuclear fagocitário e após conjugação com ácido glicurônico, converte em bilirrubina conjugada. A porção conjugada é hidrossolúvel e desta forma pode ser eliminada pelo rim. Sendo classificada como bilirrubina direta. A porção não conjugada é chamada de bilirrubina indireta e é mensurada através da subtração da bilirrubina direta na total. Valores alterados de bilirrubina total, o indivíduo pode apresentar um quadro de icterícia. Nos quadros de hiperbilirrubinemia, a investigação diagnóstica deve abordar o hemograma para doença hemolítica e outros testes de função hepática para suspeitas de quadros hepatobiliares (GUYTON; HALL, 2002; KERR, 2003; MOTTA, 2003; BUSH, 2004; THRALL, 2007).

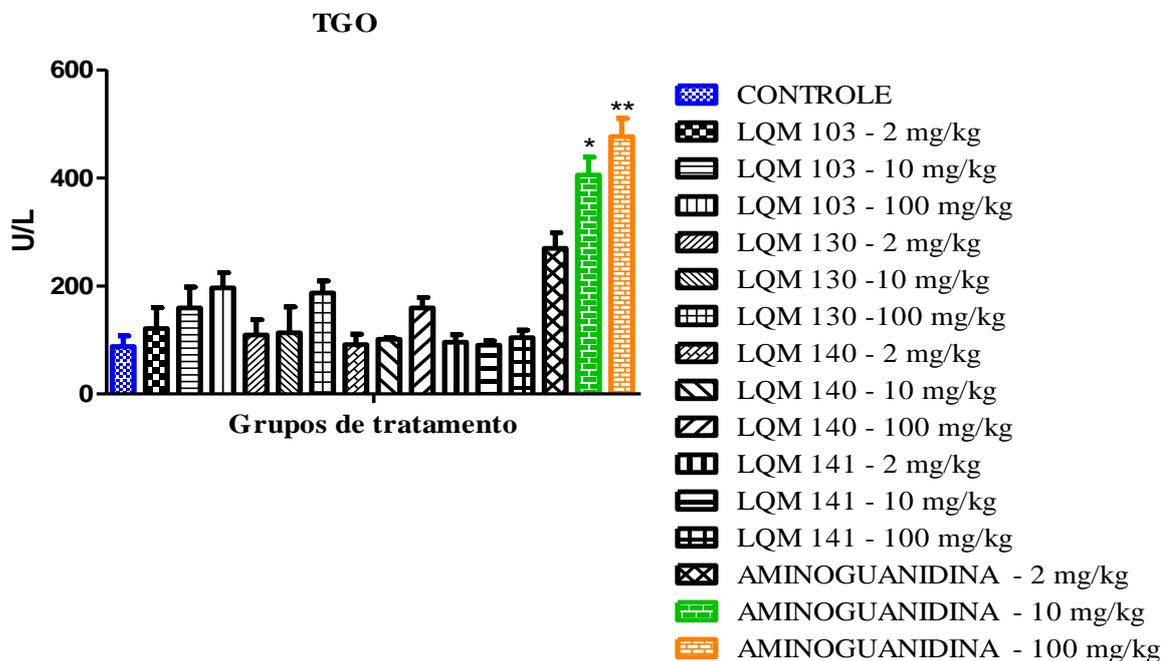
A GGT e a fosfatase alcalina são enzimas que sofrem alteração ficam quando há lesão das vias biliares. O fígado produz a bile, que é drenada pelas vias biliares. Entretanto, a GGT e a FAL não são tão específicas para as vias biliares quanto a AST e, principalmente, a ALT é para o fígado. Doenças do fígado que causem lesão das vias biliares intra-hepáticas podem implicar na elevação da AST, ALT e também de GGT e FAL. Assim, obstruções das vias

biliares que causam lesão do fígado também podem implicar no aumento das quatro enzimas (THRALL, 2007).

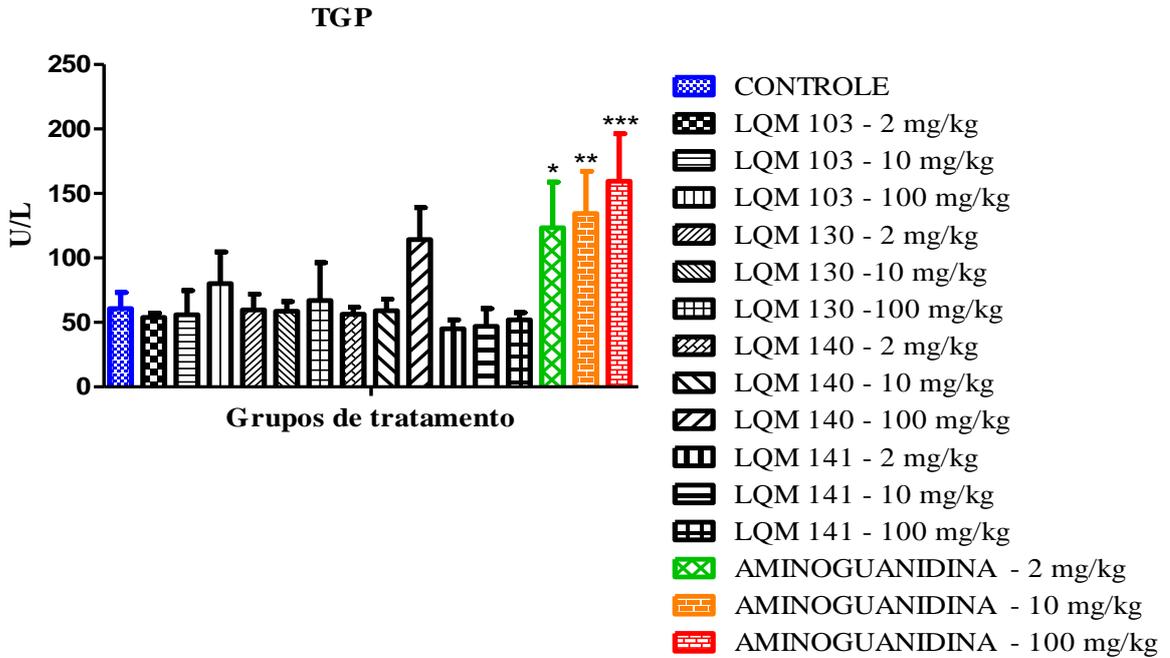
Os resultados dos parâmetros para a avaliação hepática mostraram que em alguns casos os grupos tratados com os derivados aminoguanidínicos apresentavam níveis séricos inferiores ao encontrado no grupo controle normal ou no mesmo nível, sugerindo que o tratamento com os derivados aminoguanidínicos aparentemente não causou nenhum dano, corroborando com os histopatológicos dos fígados estudados.

**Figura 19 - Níveis plasmáticos de AST/TGO (aspartato aminotransferase), ALT/TGP (alanina aminotransferase), GGT (Gamaglutamiltranspeptidase), bilirrubina total e direta, fosfatase alcalina de ratos Wistar do teste de toxicidade aguda tratados em dose única com os derivados aminoguanidínicos, aminoguanidina e o controle negativo (n=3).**

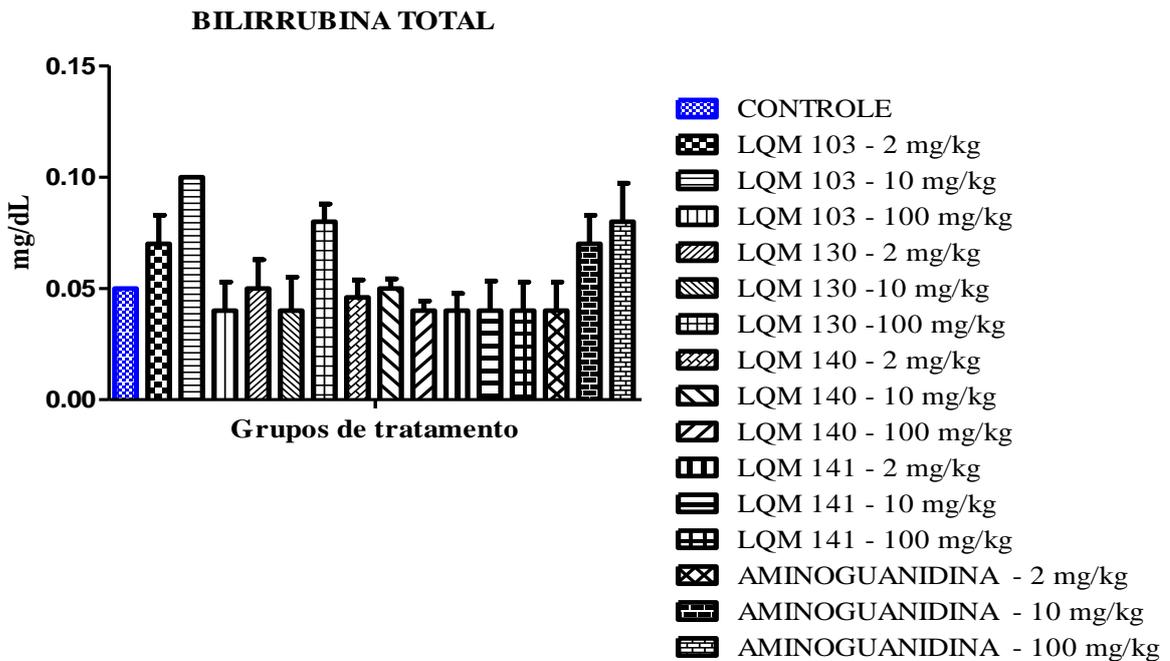
a)



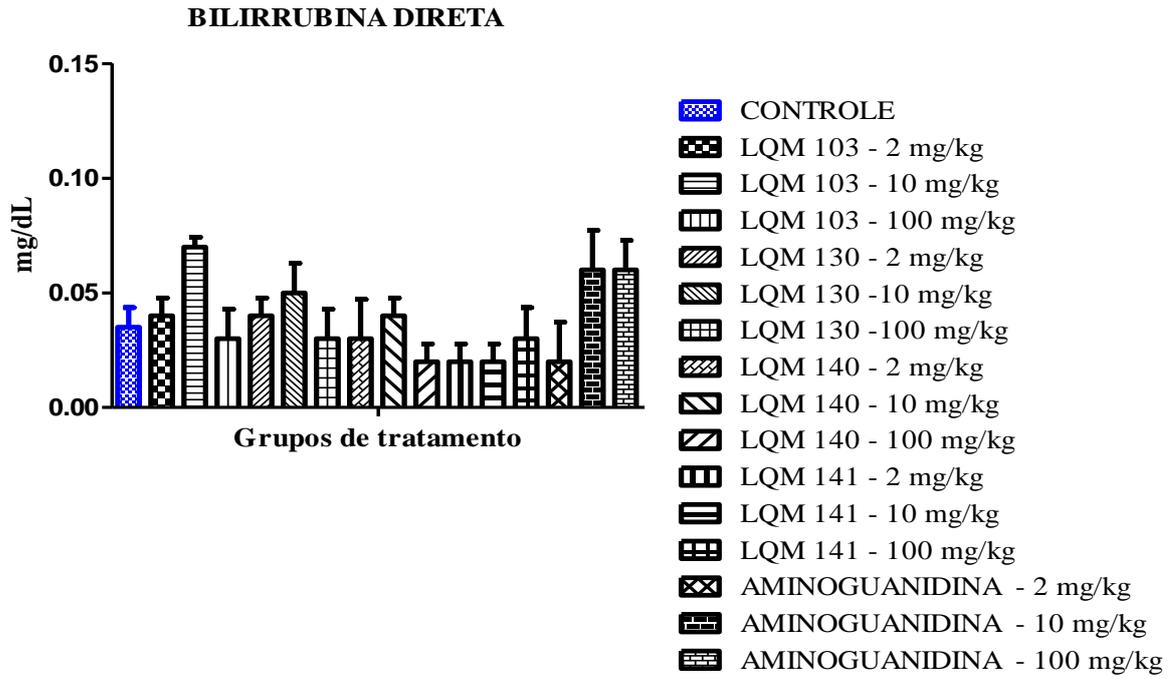
b)



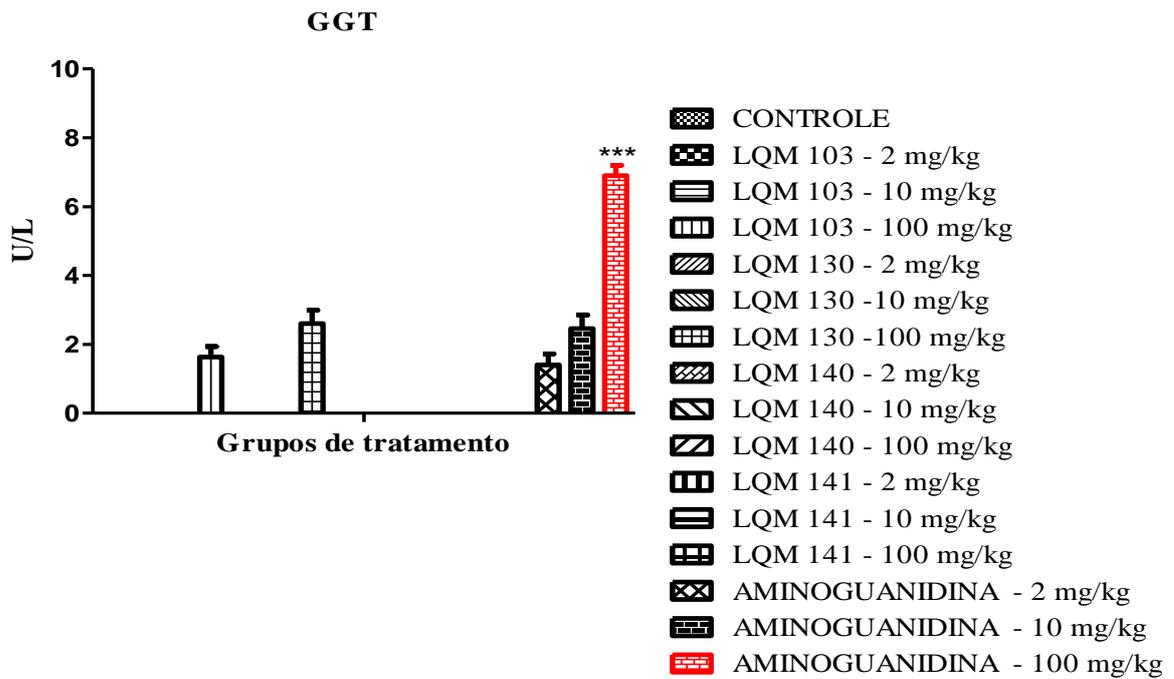
c)



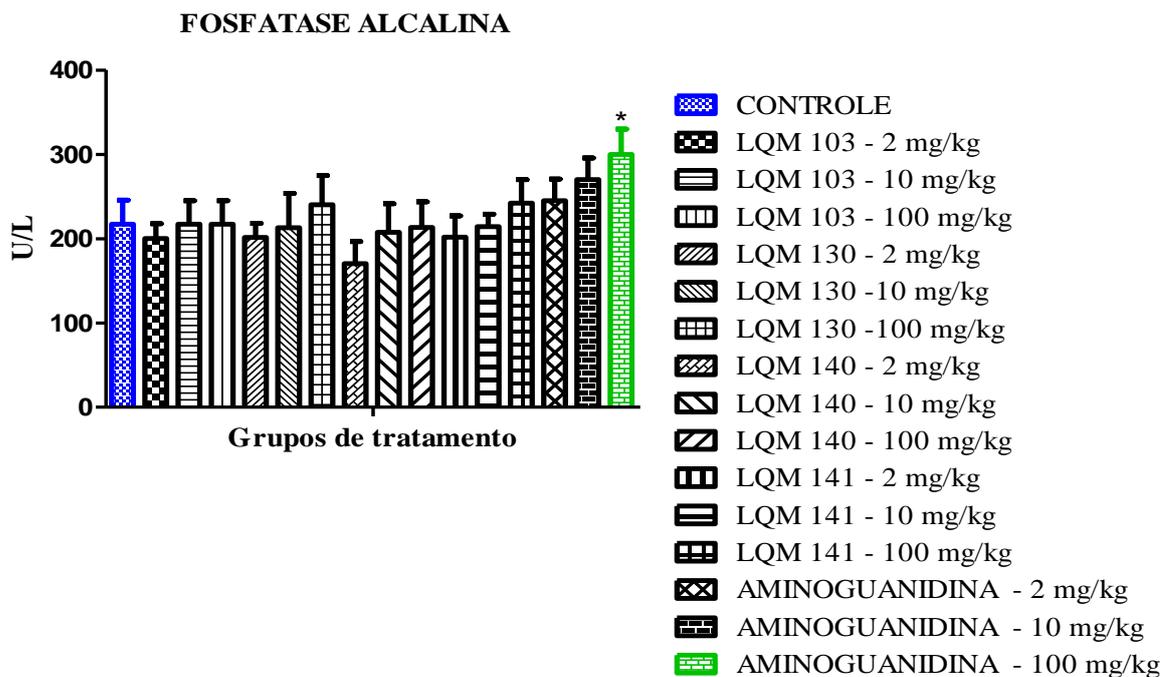
d)



e)



f)



(A) AST; (B) ALT; (C) Bilirrubina total; (D) Bilirrubina direta; (E) GGT; (F) Fosfatase alcalina. Os resultados dos grupos experimentais (n=3) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). ANOVA e pós-teste de Dunnett, considerando  $p < 0,05$ .

Fonte: GOMES, 2019.

Analisando os parâmetros bioquímicos do metabolismo protéico (proteínas totais, albumina) (**Figura 20**). Para as proteínas totais os grupos com os derivados aminoguanidínicos LQM 103 (10 e 100 mg/Kg), LQM 130 (100 mg/Kg), LQM 140 (10 e 100 mg/Kg) houve uma redução significativa na concentração plasmática, comparadas ao grupo controle. Já no grupo LQM 141 nas concentrações estudadas não houve alteração significativa entre os grupos estudados. Apesar de terem apresentado uma redução dos níveis séricos citados acima, a concentração plasmáticas destes ainda foi superior ao da aminoguanidina.

Em relação à albumina também houve uma diminuição estatisticamente significativa na concentração plasmática dos grupos dos derivados aminoguanidínicos LQM 103, 130, 140 na concentração de 100 mg/kg, entretanto, apresentou uma concentração plasmática superior ao da aminoguanidina nas três concentrações testadas.

No plasma existe um complexo de proteínas incluindo albumina, globulinas, enzimas, proteínas específicas de transporte, hormônios protéicos e fatores de coagulação. O

mensuramento destas fornece um bom parâmetro para a avaliação do estado nutricional e para a presença de doenças sistêmicas severas.

A elevação na concentração de proteínas totais pode significar deficiência relativa de água, doença inflamatória crônica e doença imunomediada, por aumento na fração de globulinas, como por exemplo: cirrose do fígado, doenças bacterianas subagudas ou crônicas e doença autoimune (KERR, 2003; BUSH, 2004; THRALL, 2007).

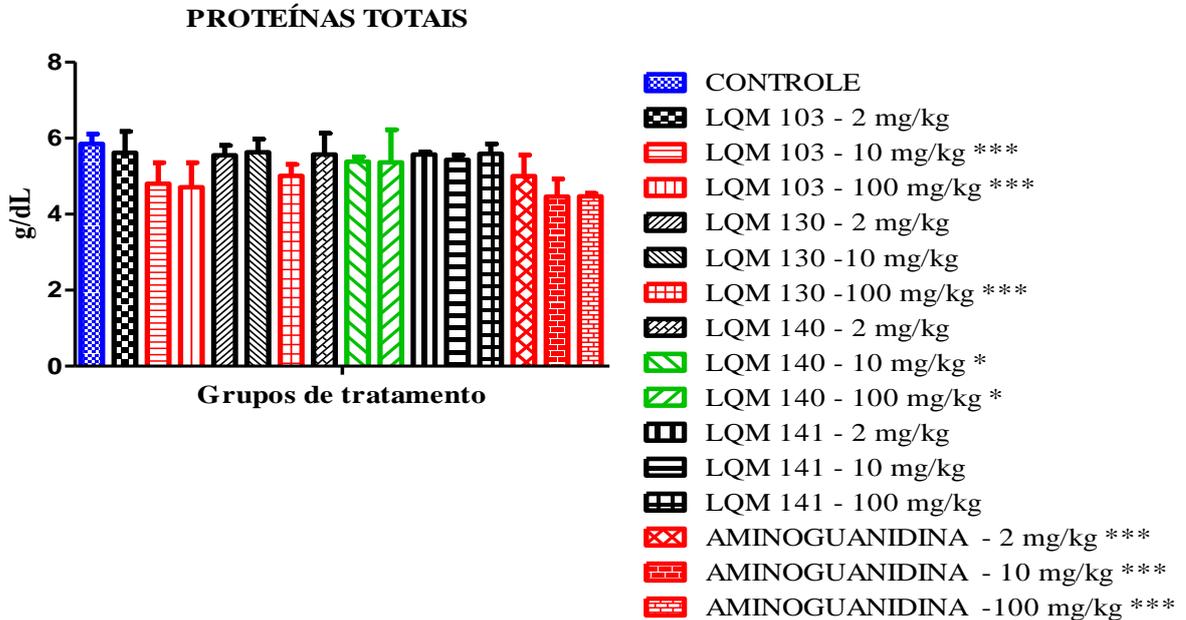
A diminuição da concentração de proteínas totais e/ou de albumina pode ser detectada em condições de superidratação, menos comum; por perda excessiva de proteína (hipoalbuminemia) que pode estar relacionada a um déficit renal (nefropatias), nas enteropatias, hemorragias, queimaduras e por diminuição da síntese de proteínas (principalmente, no caso de animais experimentais, por insuficiência hepática) (KERR, 2003; BUSH, 2004; THRALL, 2007).

Os fármacos são distribuídos aos vários locais e seus metabólitos eliminados do organismo através da corrente sanguínea. Inicialmente a substância ativa é levada rapidamente para os tecidos de maior fluxo sanguíneo, tais como: cérebro, fígado e rins e em seguida redistribuída para tecidos de baixo fluxo sanguíneo como o músculo e gordura. Estas vão se ligar à albumina, aos tecidos, às proteínas plasmáticas e aos receptores. E isto contribui para a determinação da intensidade e da duração do efeito do medicamento (MOTA, 2003). A porção do fármaco que se liga à proteína pode ser intensa o suficiente para causar redução da concentração de proteínas plasmáticas livres, que são detectadas no doseamento plasmático ou sorológico, por aumento do volume de distribuição.

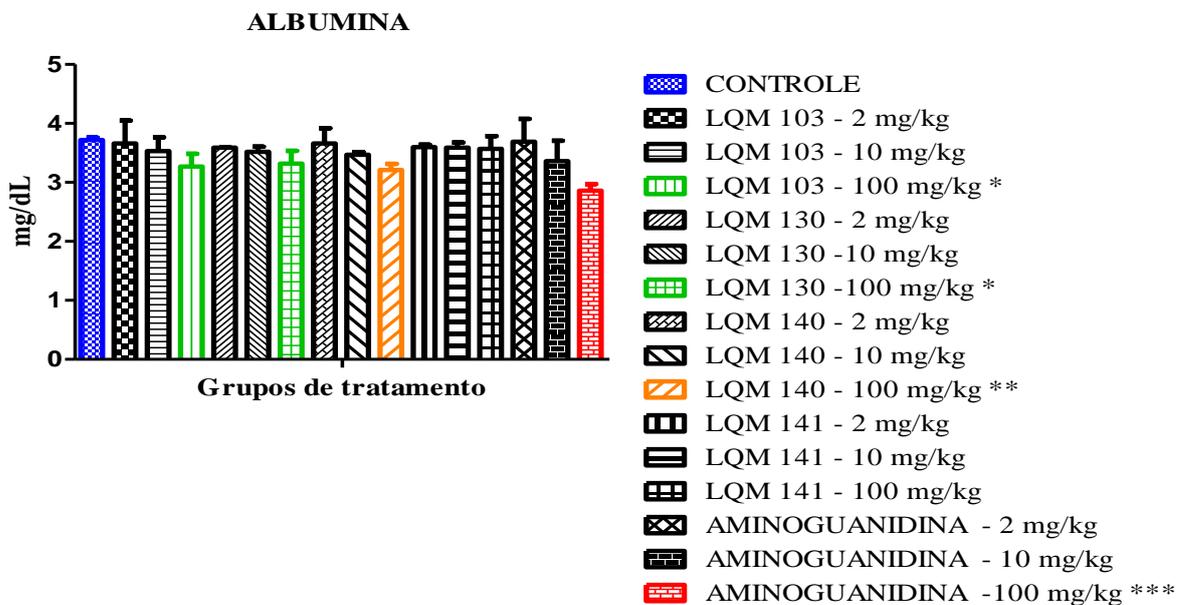
Neste estudo, a diminuição das proteínas plasmáticas dos derivados aminoguanidínicos LQM 130 (10 mg/kg) e LQM 140 (10 e 100 mg/kg) não foi associada à perda protéica, tendo em vista que os animais não apresentaram manifestações clínicas relativas à doença renal. Já que apresentariam sinais característicos, tais como: proteinúria, anemia, desnutrição e principalmente edema. Ademais, a histologia renal apresentou-se normal.

Figura 20 - Níveis plasmáticos de proteínas totais e albumina de ratos Wistar do teste de toxicidade aguda tratados em dose única com os derivados aminoguanidínicos, aminoguanidina e o controle negativo (n=3).

a)



b)



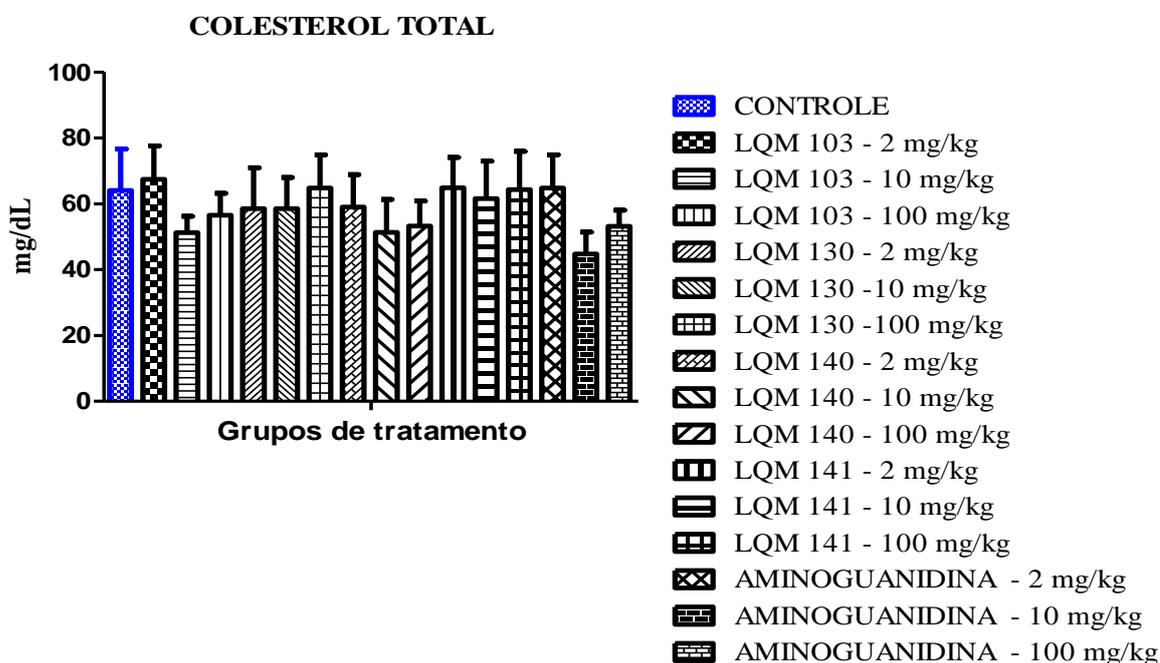
(A) Proteínas totais; (B) Albumina. Os resultados dos grupos experimentais (n=3) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). ANOVA e pós-teste de Dunnett, considerando  $p < 0,05$ .

O monitoramento dos lipídeos plasmáticos é de grande relevância para a clínica. Estes poderão dar informações úteis de doenças cardiovasculares (YAKUBU et al., 2008). A hipercolesterolemia, nos animais, pode sugerir doença hepática ou biliar, síndrome nefrótica, Diabetes *mellitus*, já a hipocolesterolemia pode estar associada à disfunção hepática grave. O aumento dos triacilgliceróis, juntamente com níveis de colesterol elevado, é considerado fator de risco para doença arterial aterosclerótica e pode estar relacionado com doença renal. Valores altos também são detectados no Diabetes *mellitus*, na síndrome nefrótica, na pancreatite, em doenças coronarianas e na arteriosclerose (LIMA, 2002; MOTTA, 2003; KERR, 2003; MATOS; MARTINS 2005; THRALL, 2007).

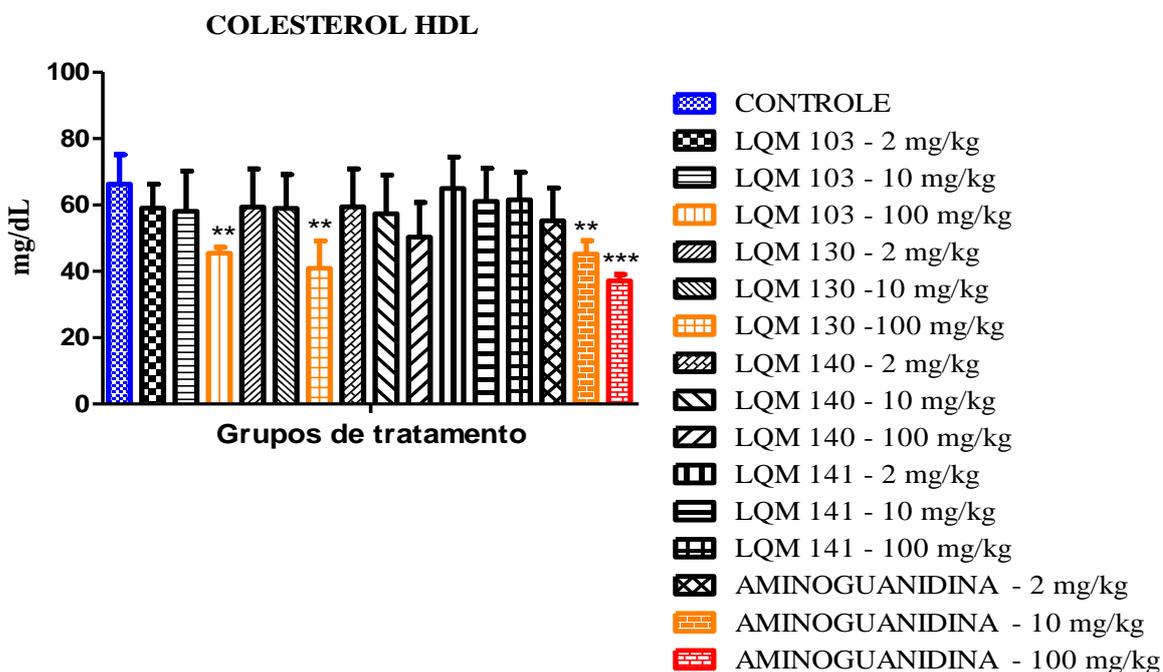
Os animais estudados não apresentaram hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, assim como não foi encontrado opalescência nas amostras. De acordo com a **figura 21**, os valores de colesterol total e triglicérides não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados comparadas ao controle. Nos níveis de colesterol HDL pode ser observado uma redução da concentração nos grupos LQM 103, LQM 130 na concentração estudada de 100 mg/kg sendo estatisticamente significativo, não havendo correlação com o aumento dos níveis de colesterol total nestes grupos.

Figura 21 - Níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos de ratos Wistar do teste de toxicidade aguda tratados em dose única com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.

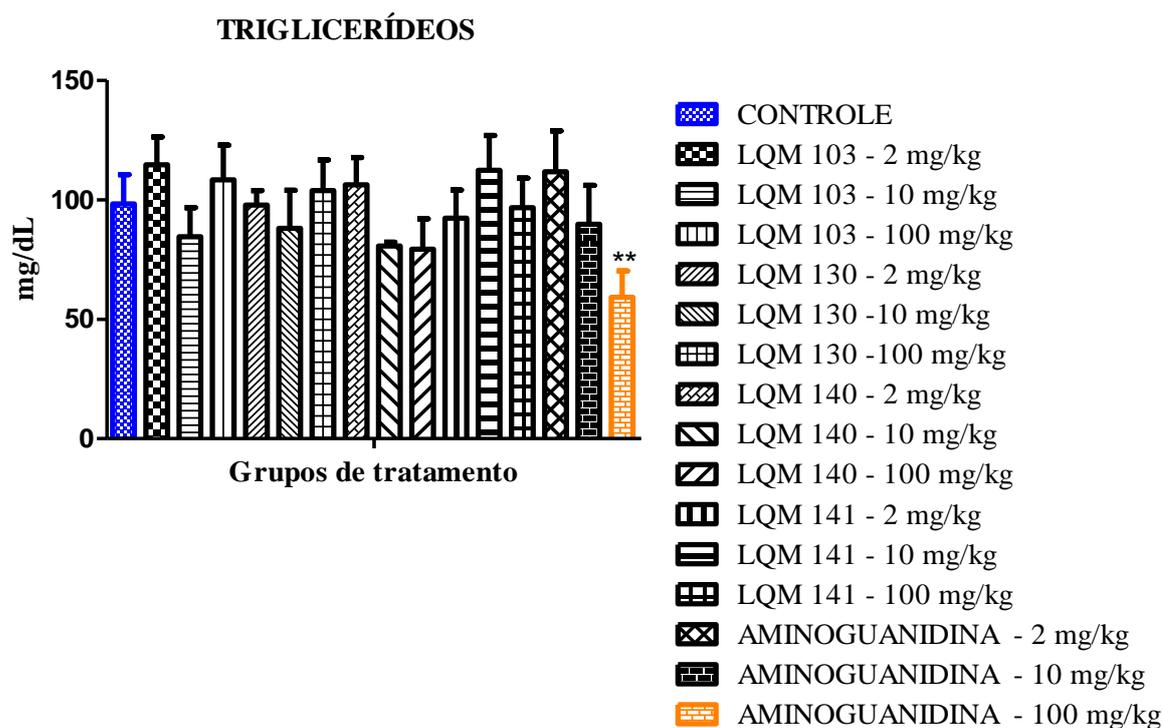
a)



b)



c)



(A) Colesterol total; (B) Colesterol HDL; (C) Triglicerídeos. Os resultados dos grupos experimentais (n=3) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). ANOVA e pós-teste de Dunnett, considerando  $p < 0,05$ .

Fonte: GOMES, 2019.

### 5.3.3. Parâmetros Histopatológicos

Na análise macroscópica dos órgãos (fígado, rins e pâncreas) não foi observado alterações nos órgãos dos animais tratados com os derivados aminoguanidínicos em dose única. O fígado foi o órgão que apresentou uma maior variação de peso entre os grupos quando comparados ao controle normal, apresentado diferença estatística significativamente em alguns grupos. Já o rim e pâncreas o peso do órgão não apresentou diferença estatisticamente significativa com o controle normal (**Tabela 11**).

Segundo Guyton e Hall (2008) o fígado é um órgão altamente vascularizado responsável pela biotransformação, metabolização, síntese e excreção de determinadas substâncias muitas vezes nocivas ao organismo.

Vários fatores podem ter influenciado para a identificação dessa alteração no organismo dos animais, tais como: a dose utilizada, o tempo de exposição e a sensibilidade da espécie (GOMES, 2012).

Segundo Klaassen e Watkins (2012), diferenças significativas podem ocorrer entre indivíduos da mesma espécie na resposta a uma substância química devido a sutis diferenças genéticas que constituem o polimorfismo genético. Este mesmo autor ressalta ainda que essas diferenças podem ser responsáveis por reações idiossincráticas aos produtos químicos e por diferenças nas respostas tóxicas.

**Tabela 11 - Peso absoluto (g) dos órgãos dos ratos Wistar do teste de toxicidade aguda tratados em dose única com os derivados aminoguanidínicos, aminoguanidina e o controle negativo (n=3).**

GRUPOS	PESO DOS ÓRGÃOS		
	FÍGADO	RIM	PÂNCREAS
CONTROLE	8,0 ± 0,12	0,90 ± 0,04	0,35 ± 0,02
LQM 103 - 2 mg/kg	6,2 ± 0,21**	0,69 ± 0,00	0,30 ± 0,09
LQM 103 - 10 mg/kg	6,6 ± 0,08*	0,69 ± 0,00	1,16 ± 0,09***
LQM 103 - 100 mg/kg	9,1 ± 0,27	0,76 ± 0,19	0,47 ± 0,19
LQM 130 - 2 mg/kg	7,9 ± 0,23	0,64 ± 0,14	0,38 ± 0,08
LQM 130 - 10mg/kg	8,4 ± 0,58	0,7 ± 0,11	0,20 ± 0,03
LQM 130 - 100 mg/kg	6,3 ± 0,51**	0,54 ± 0,04	0,16 ± 0,01
LQM 140 - 2 mg/kg	9,5 ± 0,18*	0,78 ± 0,14	0,18 ± 0,08
LQM 140 - 10 mg/kg	8,0 ± 0,16	0,97 ± 0,02	0,13 ± 0,02
LQM 140 - 100 mg/kg	8,3 ± 0,44	0,83 ± 0,05	0,26 ± 0,01
LQM 141 - 2 mg/kg	7,9 ± 0,22	0,73 ± 0,1	0,14 ± 0,02
LQM 141 - 10 mg/kg	8,9 ± 0,08	0,82 ± 0,06	0,33 ± 0,03
LQM 141 - 100 mg/kg	7,1 ± 0,43	0,80 ± 0,05	0,14 ± 0,01
AMINO Guanidina - 2 mg/kg	7,1 ± 0,16	0,95 ± 0,02	0,08 ± 0,01*
AMINO Guanidina - 10 mg/kg	6,9 ± 0,23	0,97 ± 0,02	0,13 ± 0,02
AMINO Guanidina - 100 mg/kg	6,6 ± 0,35*	0,88 ± 0,03	0,09 ± 0,01

Os resultados dos grupos experimentais (n=3) foram representados como média ± erro padrão da média (E.P.M.). ANOVA e pós-teste de Dunnett, considerando  $p < 0,05$ .

Fonte: GOMES, 2019.

A análise histopatológica investiga o tipo e a extensão da lesão de um órgão e ela traz informações que dão a definição da intensidade e fase da doença, possibilitando o monitoramento dos diversos tratamentos empregados. Foram processados fragmentos do fígado, rim e pâncreas para análise histológica, com a finalidade de avaliar possíveis alterações morfológicas microscópicas nos respectivos órgãos, o grupo controle foi usado como parâmetro de normalidade para comparação. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina a fim de realizar análise microscopia ótica.

Em uma análise histológica do fígado encontram-se principalmente células hepáticas denominadas de hepatócitos, que apresentam núcleo central, arredondado com um ou dois nucléolos bem evidenciados. Estas se juntam formando os lóbulos hepáticos. Em cada lóbulo hepático encontram-se uma veia centrolobular, veia porta, uma artéria hepática, um ducto biliar e vasos linfáticos (GUYTON, 2002; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004).

Os espaços entre os lóbulos são chamados de sinusóides (capilares hepáticos compostos por células endoteliais típicas de capilares sanguíneos e macrófagos chamados de células de Kupffer). As células de Kupffer são estreladas, ativamente fagocitárias, e tem a característica de englobar hemácias remanescentes, resíduos e materiais particulados (GUYTON, 2002; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004).

A análise histológica do fígado dos animais sacrificados após o 14º dia não foi detectado alterações irreversíveis, como necrose ou apoptose celular. O grupo controle e os animais tratados com os derivados aminoguanidínicos na menor concentração testada, ou seja, 2 mg/kg, apresentaram características semelhantes, com a manutenção da arquitetura histológica do órgão, parênquima hepático com estrutura geral preservada, com lóbulos hepáticos normais, circundados por sinusóides contendo células de Kupffer e hemácias. Os espaços porta também se apresentavam normais, não tendo sido visualizado infiltrado inflamatório, degeneração gordurosa ou distribuição anormal dos fibroblastos e do colágeno. Já nos grupos LQM 130, LQM 140 e aminoguanidina tratados com concentração intermediária e na maior dose, ou seja, 10 mg/kg e 100 mg/kg, respectivamente, pode ser observado foco inflamatório (**Figura 22**).

O sistema renal é formado por um conjunto de estruturas histológicas responsáveis pelos mecanismos de filtração glomerular e tubular. O glomérulo renal é constituído por uma rede de capilares fenestrados, sem diafragma, oriundos da arteríola aferente e pela cápsula de *Bowman* contendo dois folhetos, visceral e parietal. Esse último é formado por células epiteliais planas que limitam o espaço capsular onde se acumula o filtrado glomerular.

A função primordial dos rins é a manutenção da homeostasia, regulando o meio interno predominantemente pela reabsorção de substâncias e íons filtrados nos glomérulos e excreção de outras substâncias (SODRÉ et al., 2007).

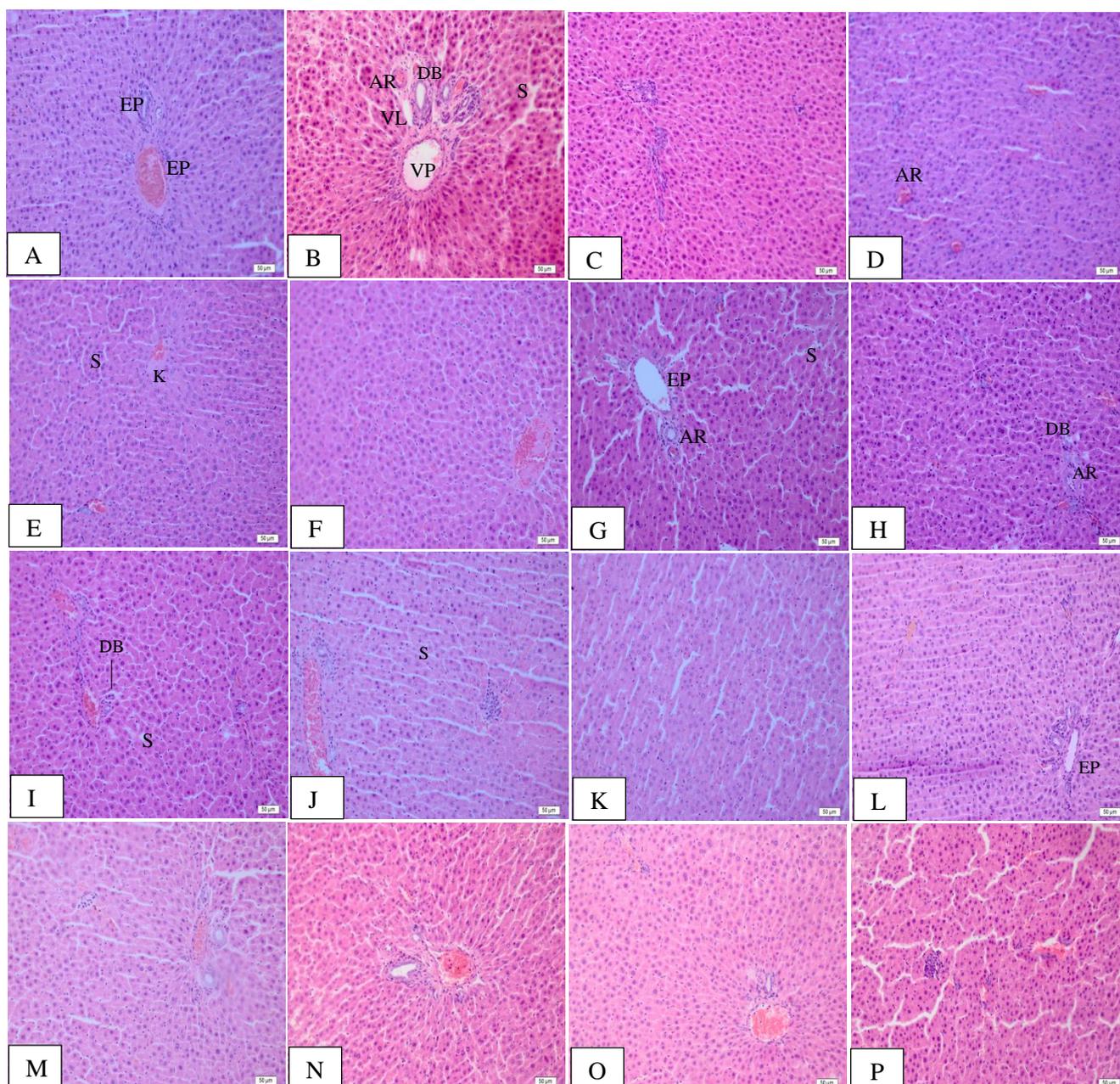
A análise histológica dos rins dos animais eutanasiados após o 14º dia não foi detectado alterações histológicas. No grupo controle e nos animais tratados com os derivados aminoguanidínicos nas três concentrações testadas, ou seja, 2 mg/kg, 10 mg/kg e 100 mg/kg não foram encontrados focos de inflamação ou fibrose, congestão ou áreas de hemorragias. A arquitetura córtico-medular preservada, o córtex apresentou glomérulos regularmente distribuídos. Os túbulos contorcidos proximais e distais e o segmento de ducto coletor não evidenciaram alterações (**Figura 23**). Este resultado confirma a avaliação bioquímica que não mostrou alterações metabólicas neste órgão.

Em relação à análise histológica do pâncreas não foi possível obter imagens dos grupos LQM 103 – 100 mg/kg, LQM 140 – 2 mg/kg, LQM 140 – 100 mg/kg e LQM 141 – 100 mg/kg. Nos demais grupos os cortes histológicos do pâncreas mostraram tecido pancreático dentro do limite da normalidade, com distintos componentes exócrinos e endócrinos (**Figura 24**). A parte exócrina é composta por células epiteliais com formato piramidal e orientada radialmente em torno do lúmen central e a parte endócrina exhibe as ilhotas de Langerhans típica, compatível ao parênquima pancreático normal.

O exame histopatológico dos órgãos vitais (fígado, rim e pâncreas) não detectou alterações significativas, tanto no grupo controle quanto ao tratado com os derivados aminoguanidínicos.

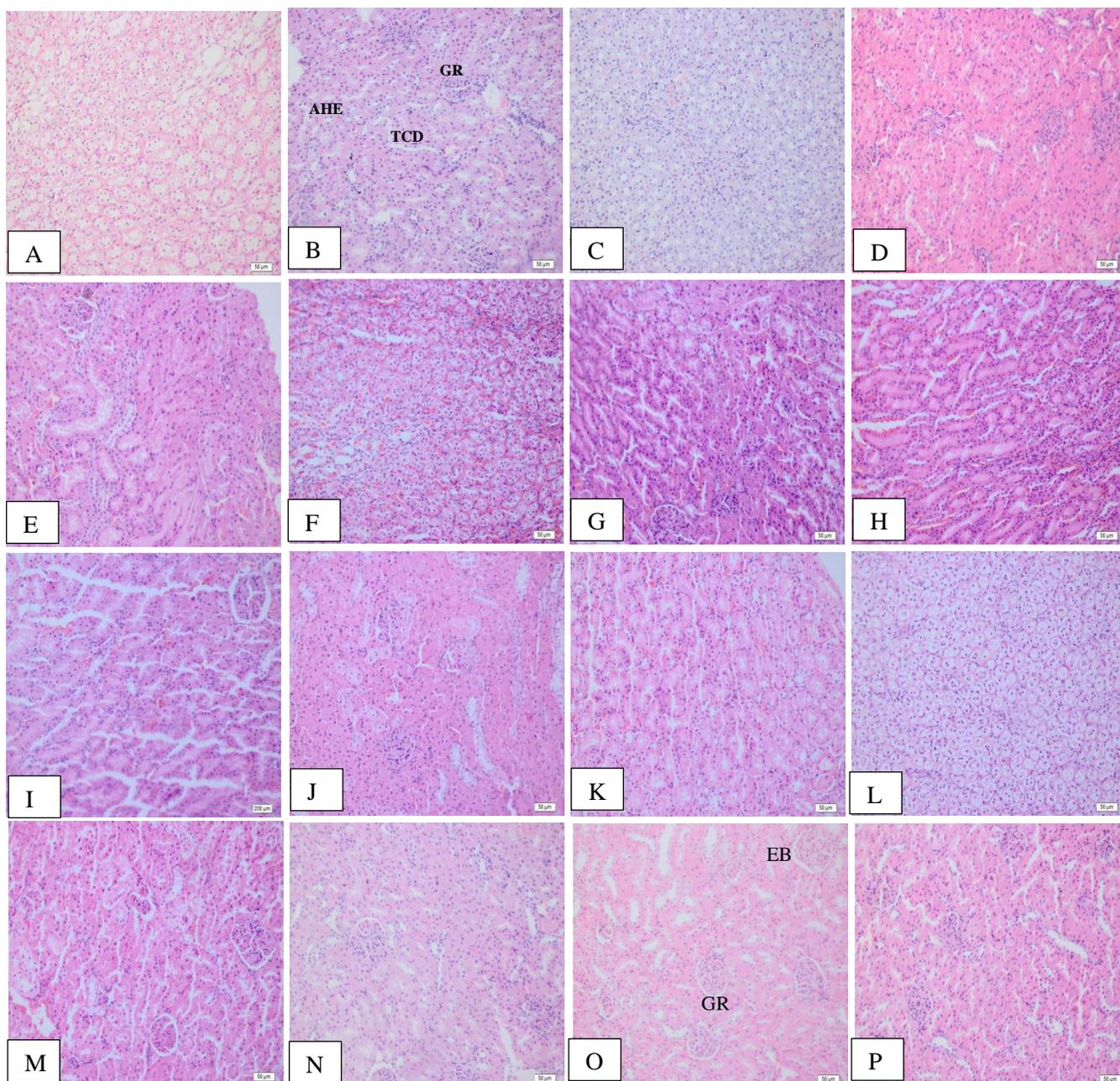
Estes dados sugerem baixa toxicidade dos derivados aminoguanidínicos estudados, uma vez que não houve comprometimento da saúde geral dos animais. Entretanto, não é aconselhável a total desconsideração tóxica dessas substâncias, sobre o organismo, necessitando de maiores esclarecimentos sobre os mecanismos de ação envolvidos.

**Figura 22 - Análise histológica hepática da toxicidade aguda dose única, por gavagem com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.**



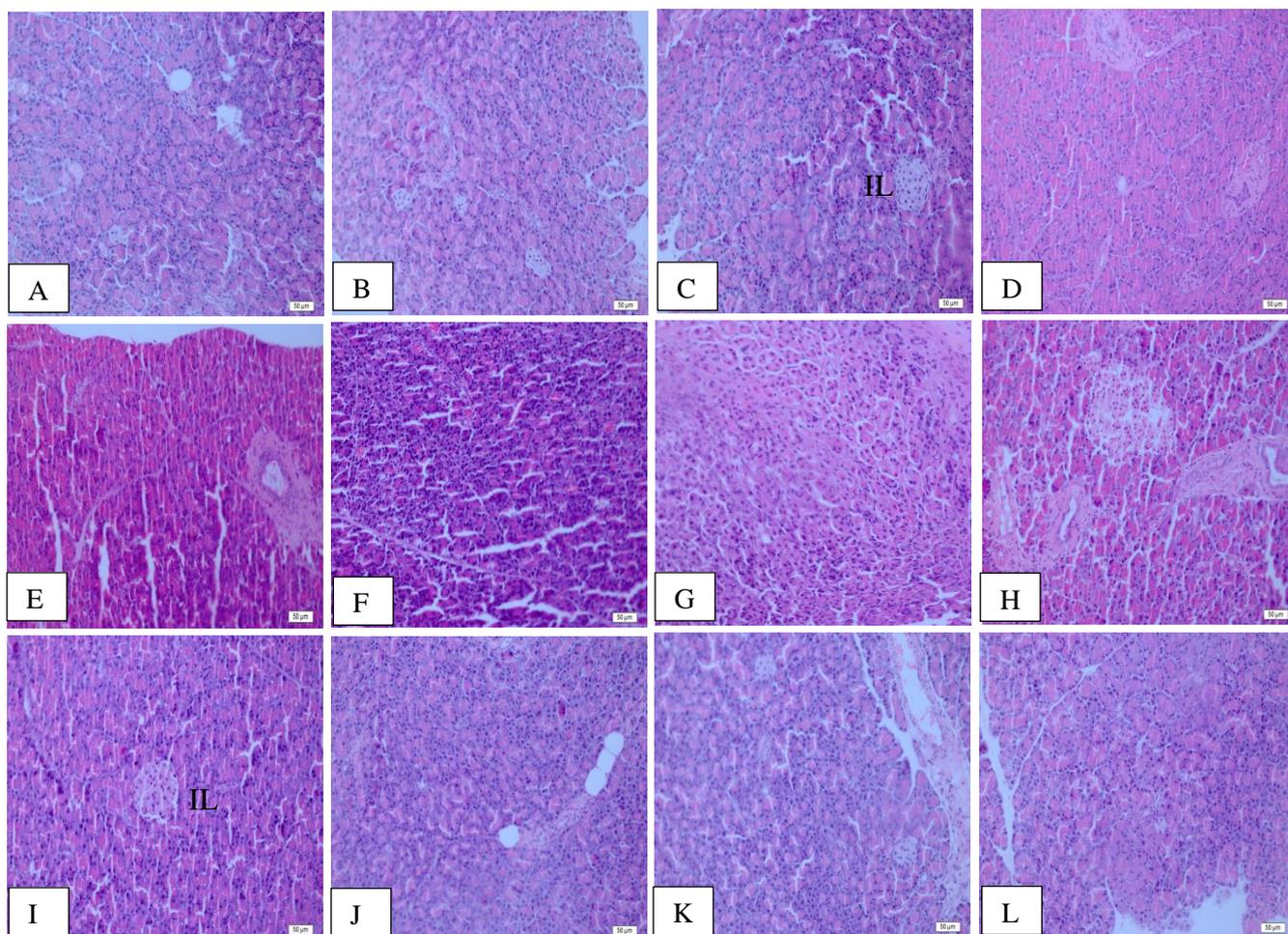
(A) Controle negativo; (B) LQM 103 – 2 mg/kg; (C) LQM 103 – 10 mg/kg; (D) LQM 103 – 100 mg/kg; (E) LQM 130 – 2 mg/kg; (F) LQM 130 – 10 mg/kg; (G) LQM 130 – 100 mg/kg; (H) LQM 140 – 2 mg/kg; (I) LQM 140 – 10 mg/kg; (J) LQM 140 – 100 mg/kg; (K) LQM 141 – 2 mg/kg; (L) LQM 141 – 10 mg/kg; (M) LQM 141 – 100 mg/kg; (N) Aminoguanidina – 2 mg/kg; (O) Aminoguanidina – 10 mg/kg; (P) Aminoguanidina – 100 mg/kg. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento 20x/200x . No detalhe, artéria (AR); célula de Kupffer (K); ducto biliar (DB); espaço porta (EP); sinusóides (S); vasos linfáticos (VL); veia porta (VP). Fonte: GOMES, 2019.

**Figura 23 - Análise histológica renal da toxicidade aguda dose única por gavagem com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.**



(A) Controle negativo; (B) LQM 103 – 2 mg/kg; (C) LQM 103 – 10 mg/kg; (D) LQM 103 – 100 mg/kg; (E) LQM 130 – 2 mg/kg; (F) LQM 130 – 10 mg/kg; (G) LQM 130 – 100 mg/kg; (H) LQM 140 – 2 mg/kg; (I) LQM 140 – 10 mg/kg; (J) LQM 140 – 100 mg/kg; (K) LQM 141 – 2 mg/kg; (L) LQM 141 – 10 mg/kg; (M) LQM 141 – 100 mg/kg; (N) Aminoguanidina – 2 mg/kg; (O) Aminoguanidina – 10 mg/kg; (P) Aminoguanidina – 100 mg/kg. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento 20x/200x . AHE – Alça de Henle, EB- espaço de Bowman, GR – glomérulo, TCD – túbulo contorcido distal. Fonte: GOMES, 2019.

**Figura 24 - Análise histológica do pâncreas da toxicidade aguda dose única por gavagem com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.**



(A) Controle negativo; (B) LQM 103 – 2 mg/kg; (C) LQM 103 – 10 mg/kg; (D) LQM 130 – 2 mg/kg; (E) LQM 130 – 10 mg/kg; (F) LQM 130 – 100 mg/kg; (G) LQM 140 – 10 mg/kg; (H) LQM 141 – 2 mg/kg; (I) LQM 141 – 10 mg/kg; (J) Aminoguanidina – 2 mg/kg; (K) Aminoguanidina – 10 mg/kg; (L) Aminoguanidina – 100 mg/kg. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento 20x/200x . IL – ilhota de Langerhans. Fonte: GOMES, 2019.

□

#### 5.4. Avaliação da atividade antidiabética *in vivo*

Foi utilizado a estreptozotocina em dose única na concentração de 40 mg/kg para a indução do diabetes. O diabetes induzido pela STZ é um modelo experimental que mais se aproxima ao diabetes no humano. Achados clínicos que acometem os humanos como: hiperglicemia, hipoinsulinemia, polifagia, poliúria e polidipsia e perda de massa corporal são encontrados também nos animais diabéticos induzidos por STZ (AKBARZADEH et al., 2007; FERNANDES et al., 2010; SARKHAIL et al., 2007).

##### 5.4.1. Massa corporal

Neste estudo, a variação de massa corporal entre os grupos de animais diabéticos e não diabéticos foi observada durante os 28 dias de tratamento. A massa corporal aumentou significativamente nos grupos CNN (109 g), 140 – N (111 g) e 141 – N (119 g) ao final do experimento. Já os grupos dos animais diabéticos mostraram redução acentuada do ganho de massa corporal em comparação com os grupos de animais saudáveis, diferença de 68 g entre os grupos CNN e CND.

Além disso, os ratos diabéticos se apresentaram mais frágeis, alguns raquíticos, com perda de pêlos, pelagem eriçada e sem brilho, características bem diferentes dos animais saudáveis (**Figura 25**).

**Figura 25 - Comparação entre animais diabéticos e não diabéticos.**

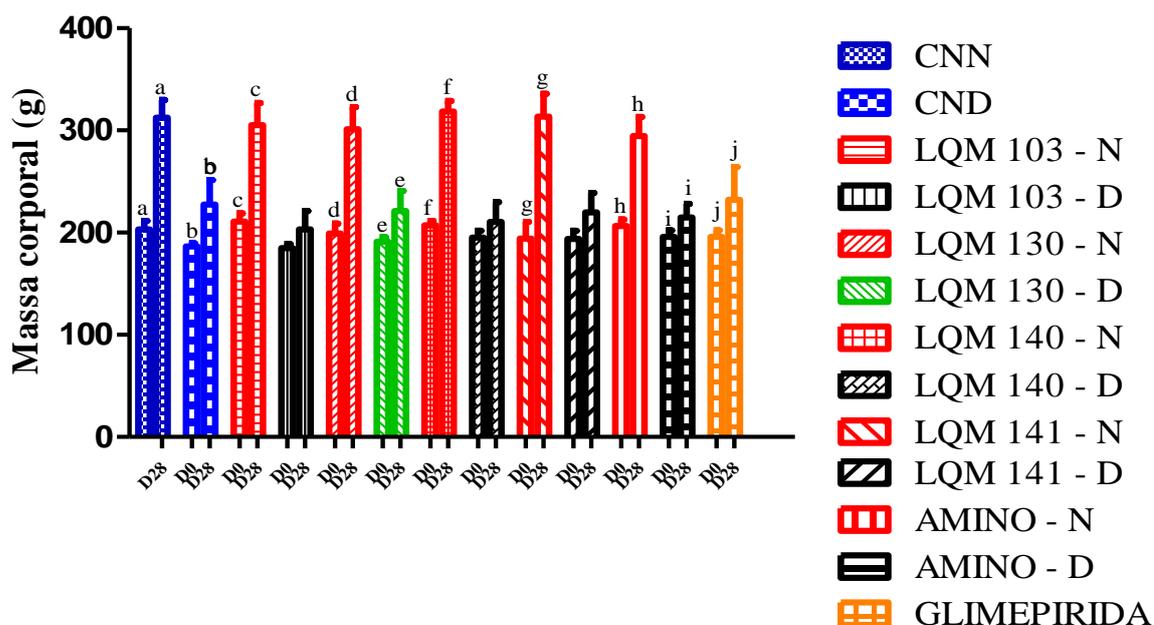


Fonte: GOMES, 2019.

O tratamento dos animais diabéticos com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles não resultaram em um aumento significativo da massa corporal, apesar de todos os grupos terem tido um ganho de peso (entre 15 a 41g) até o final do experimento (**Figura 26**). Tal fato pode ser justificado devido à indisponibilidade de carboidratos para o metabolismo energético, redução do tecido adiposo e a perda ou degradação de proteínas estruturais. Durante o catabolismo das proteínas para gerar aminoácidos para a gliconeogênese no período de déficit de insulina, acarreta em perda muscular e perda de massa nos organismos diabéticos (MURALI, 2013; SARAVANAN et al., 2009; SUBRAMANI et al., 2014).

A perda de massa corporal dos animais diabéticos corrobora com a constatação de Sarmiento (2016), que observou efeitos semelhantes em animais diabéticos induzidos com estreptozotocina.

**Figura 26 - Efeito da administração sobre a massa corporal (g) de ratos Wistar (n=5) dos derivados aminoguanidínicos e seu respectivo controle antes do tratamento e pós-tratamento (28 dias) do teste de atividade antidiabético sob a massa corporal (g) de ratos Wistar (n=5).**



Os resultados dos grupos experimentais (n=5) foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). ANOVA e pós-teste de Bonferroni, considerando  $p < 0,05$ . Letras iguais diferem estatisticamente entre si. Fonte: GOMES, 2019.

#### 5.4.2. Glicemia e hemoglobina glicada

Os animais diabéticos induzidos com estreptozotocina apresentaram valores de glicemia de jejum estatisticamente superiores em relação aos animais do grupo controle tratados com salina, confirmando a efetividade do estabelecimento do diabetes, como pode ser observado na **Tabela 12**.

No início do tratamento o CND apresentou a segunda maior concentração de glicemia, perdendo apenas para o grupo diabético LQM 141. De maneira interessante, ao término do tratamento o grupo diabético LQM 141 apresentou valor de glicemia mais baixa em relação aos demais grupos diabéticos, com uma redução de aproximadamente 60%, como também houve uma redução da glicemia em todos os grupos tratados com os demais derivados aminoguanidínicos (**Tabela 12**).

A partir desses resultados pode-se inferir que o tratamento diário com os derivados aminoguanidínicos por via oral na dose de 2 mg/kg reduziu os índices glicêmicos ou preveniu a hiperglicemia em ratos Wistar expostos à estreptozotocina (40 mg/kg), durante 28 dias de experimento. E que estes apresentaram uma melhor resposta quando comparados à droga padrão glimepirida.

Corroborando com o que foi observado nesse estudo, Sarmiento (2016) mostrou que o tratamento com outros derivados aminoguanidínicos na mesma concentração utilizada inibiu o aumento glicêmico induzido pela STZ. Comparando com outros dados da literatura que relataram que a aminoguanidina não é considerada um antidiabético sua ação é na inibição dos produtos de glicação avançada (STIRBAN et al., 2014), dados encontrados neste estudo.

**Tabela 12 - Valores de glicemia de ratos *Wistar* diabéticos e não diabéticos e percentuais antes e após o tratamento com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.**

GRUPOS	GLICEMIA DE JEJUM (mg/dL)		% de redução da glicemia
	Antes do tratamento	Após o tratamento	
CNN	88 ± 3,22	95 ± 1,79	--
CND	514 ± 61,09	522 ± 29,05 <sup>#</sup>	--
LQM 103 - N	94 ± 3,96	96 ± 3,48	--
LQM 103 - D	387 ± 41,00	269 ± 52,63	30,5
LQM 130 - N	89 ± 0,84	81 ± 0,81	--
LQM 130 - D	467 ± 56,0	322 ± 50,0 <sup>*</sup>	31,0
LQM 140 - N	88 ± 3,22	94 ± 2,22	--
LQM 140 - D	488 ± 52,03	293 ± 49,69 <sup>***</sup>	40,0
LQM 141 - N	88 ± 3,22	92 ± 2,80	--
LQM 141 - D	582 ± 12,58	231 ± 30,51 <sup>***</sup>	60,3
AMINO Guanidina - N	97 ± 3,53	94 ± 3,56	--
AMINO Guanidina - D	270 ± 26,85	330 ± 53,35	
GLIMEPIRIDA	432 ± 49,17	307 ± 12,96	28,9

Os dados representam a média ± erro padrão da média (n=5/grupo). Utilizando ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni, utilizado com pós-teste considerando  $p < 0,05$ .

Fonte: GOMES, 2019.

Antes e durante o experimento, os animais foram alimentados com dieta padrão fornecida pelo BIOCEN-UFAL, com livre acesso à água. Como esperado para animais diabéticos induzidos com STZ, foi observado aumento significativo no consumo de ração, água e diurese pelos ratos diabéticos, em comparação com os grupos não diabéticos (dados não mostrados). Este fato é resultado de uma redução crônica da captação de glicose e sua utilização pelas células, além da perda considerável na urina, o que gera um estímulo persistente para comer e beber. De acordo com Murali (2013), animais diabéticos apresentam um quadro de poliúria, aumento da ingestão hídrica, desidratação, perda de massa corporal e polifagia.

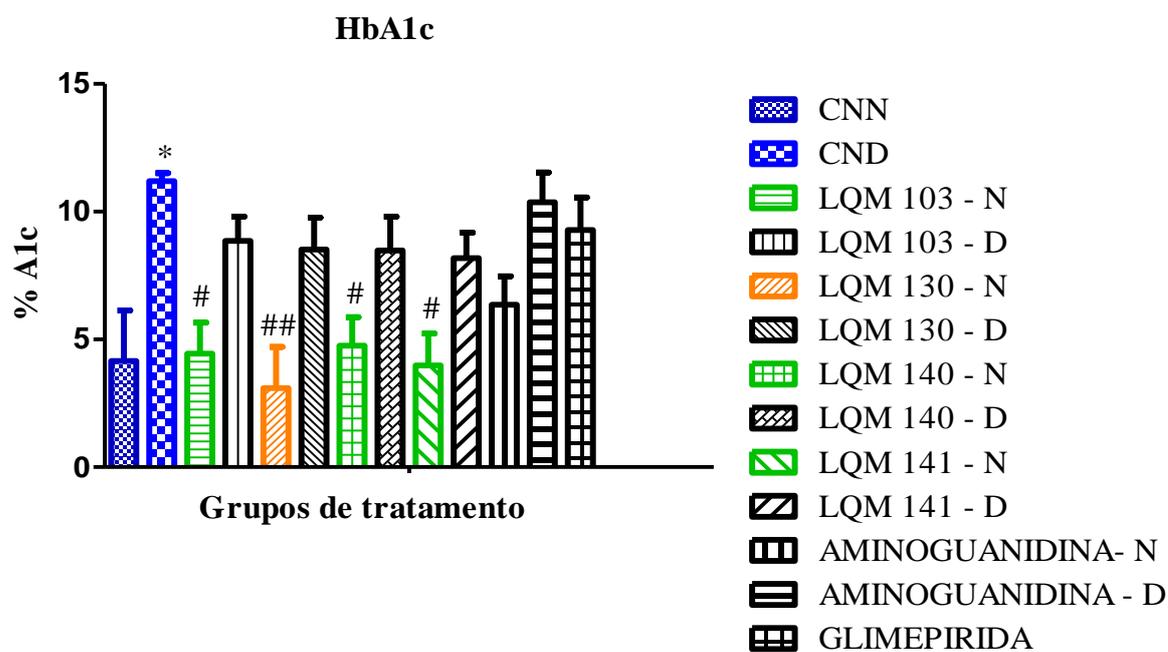
Durante o experimento pode ser observado que as caixas dos animais diabéticos estavam mais úmidas, indicando poliúria, estando diretamente relacionado com o aumento de ingestão de água.

A indução com STZ eleva os níveis de hemoglobina glicada como pode ser observado no grupo CNN e grupos diabéticos (**Figura 27**). Os grupos diabéticos tratados com os derivados aminoguanidínicos apresentaram níveis de hemoglobina glicada inferior ao CND, apresentando diferença estatisticamente significativa. Sugerindo uma ação protetora dos derivados aminoguanidínicos.

A hemoglobina glicada é um marcador padrão do controle de glicose no sangue, é considerada a média dos níveis glicêmicos no sangue durante a meia-vida das hemácias que é em média 120 dias nos humanos. Segundo Santos (2014), este processo é acelerado nos ratos, apresentando valores elevados de hemoglobina glicada após 7 dias de indução do diabetes induzidas por estreptozotocina. Isto pode ser justificado devido ao metabolismo acelerado destes animais e que a hiperglicemia desencadeia as reações não enzimáticas (FARIA et al., 2012).

Esta permanece dentro das hemácias e sua glicação não enzimática é estabelecida, sobretudo por alguns fatores: concentração média da glicose plasmática, tempo de meia vida da hemácia e permeabilidade da membrana do eritrócito à glicose (ANDRIOLO, VIEIRA, 2008; CAMARGO, GROSS, 2004; SACKS, 2006; SUMITA, ANDRIOLO, 2008).

**Figura 27 - Valores de hemoglobina glicada (HbA1c) de ratos Wistar (n=5) tratados com os derivados aminoguanidínicos e seu respectivos controles.**



Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média (n=5/grupo). ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls para comparação dos diferentes grupos. \* Diferente em relação ao grupo CNN. # Diferente em relação ao grupo CND, considerando  $p < 0.05$ .

Fonte: GOMES, 2019.

### 5.4.3. Análises Bioquímicas

Os resultados foram analisados e comparados em relação ao grupo CNN e CND. Os valores de referência dos exames bioquímicos e hematológicos dos animais não tratados são primordiais para o entendimento de diversos estudos, dentre eles: as avaliações de efeitos farmacológicos e toxicológicos sobre estes parâmetros (MELO, 2012).

A STZ não acomete apenas as  $\beta$  pancreáticas, pode afetar os rins, levar a um estresse oxidativo, como também a disfunção do endotélio, com isso é possível que existam alterações nos perfis hematológico e bioquímico nos animais que foram induzidos com STZ (FRODE; MEDEIROS, 2008).

Os níveis glicêmicos persistentemente aumentados são prejudiciais ao organismo e esta falta de controle desencadeia complicações diversas, desde dano tecidual a falência de vários órgãos (SUMITA; ANDRIOLO 2008).

#### 5.4.3.1. Avaliação da função hepática e renal

Apesar do estudo da função renal tenha instigado o interesse de muitos pesquisadores, sobretudo no campo do desenvolvimento de testes que auxiliem aos clínicos a estabelecer um diagnóstico precoce e assim monitorar a terapêutica medicamentosa, nenhum marcador disponível é completamente eficaz em analisar a função e/ou a lesão renal de forma precisa. Assim, torna-se essencial o conhecimento de todos eles para uma melhor avaliação na rotina laboratorial (SODRÉ, COSTA, LIMA, 2007) que muitas das vezes não é possível de ser realizado em estudos com animais, devido à pequena quantidade de material biológico disponível, como também ao alto custo das análises.

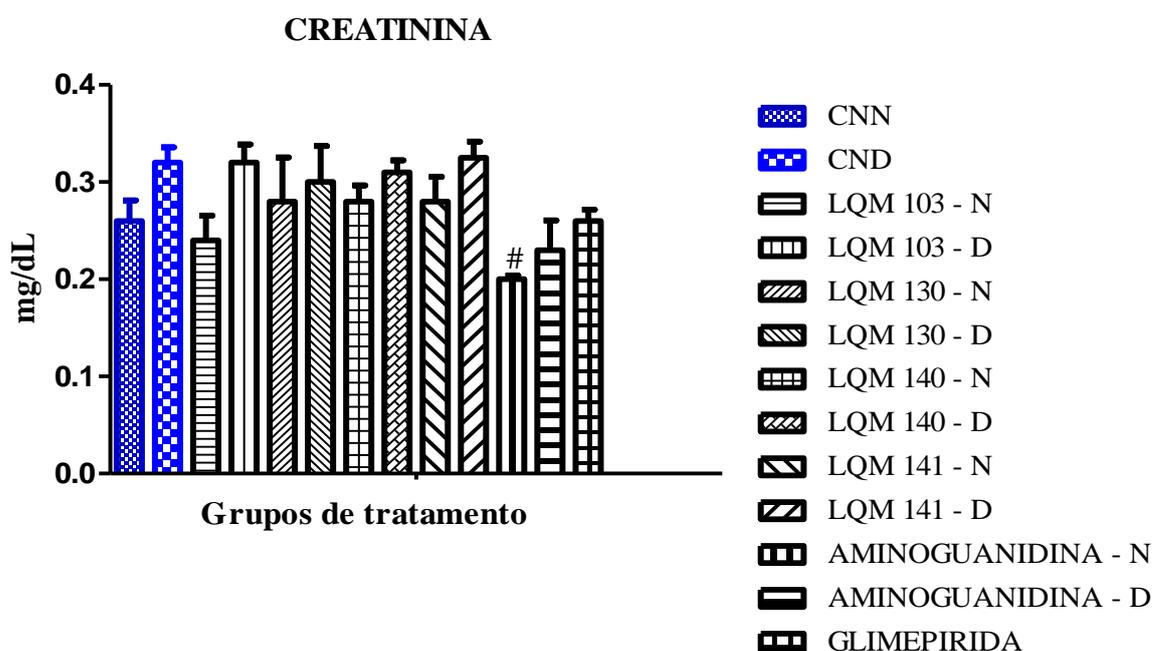
As concentrações séricas de creatinina e ácido úrico não tiveram diferença estatística entre os grupos tratados com os derivados aminoguanidínicos e o grupo CNN, mantendo o padrão da normalidade (**Figura 28**). Já os níveis séricos de ureia dos animais diabéticos pode ser verificado uma diferença estatística significativa quando comparada ao grupo CNN. Os animais diabéticos submetidos ao tratamento com derivados aminoguanidínicos não tiveram redução dos níveis séricos de ureia em relação aos animais diabéticos sem tratamento.

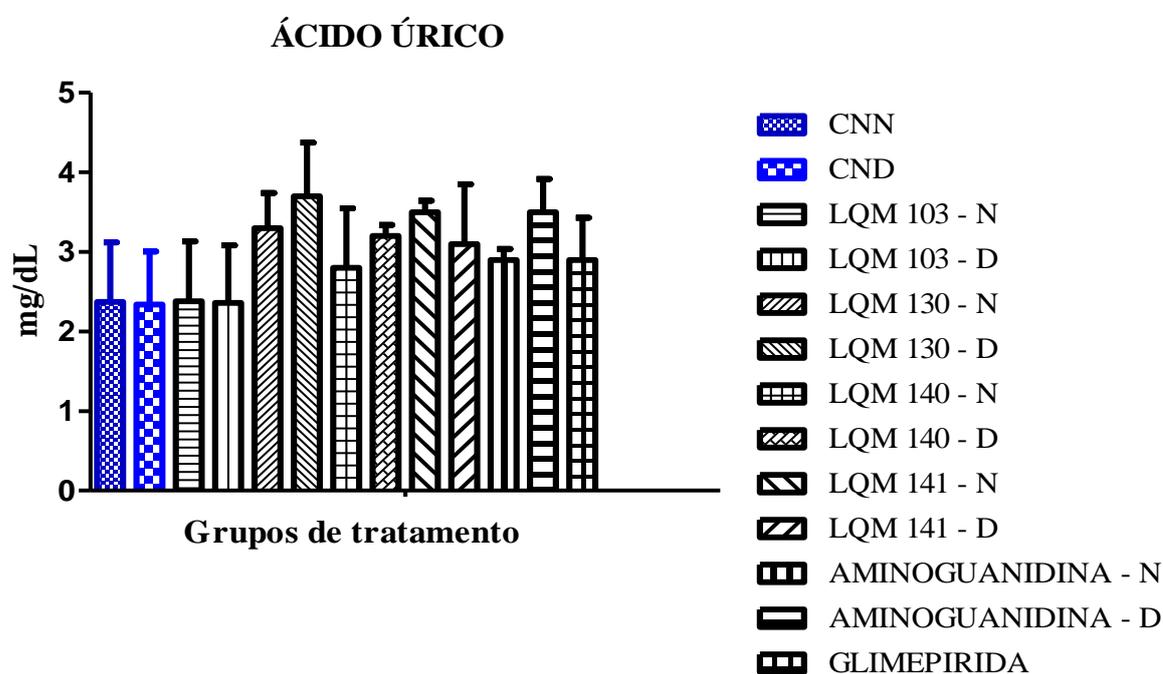
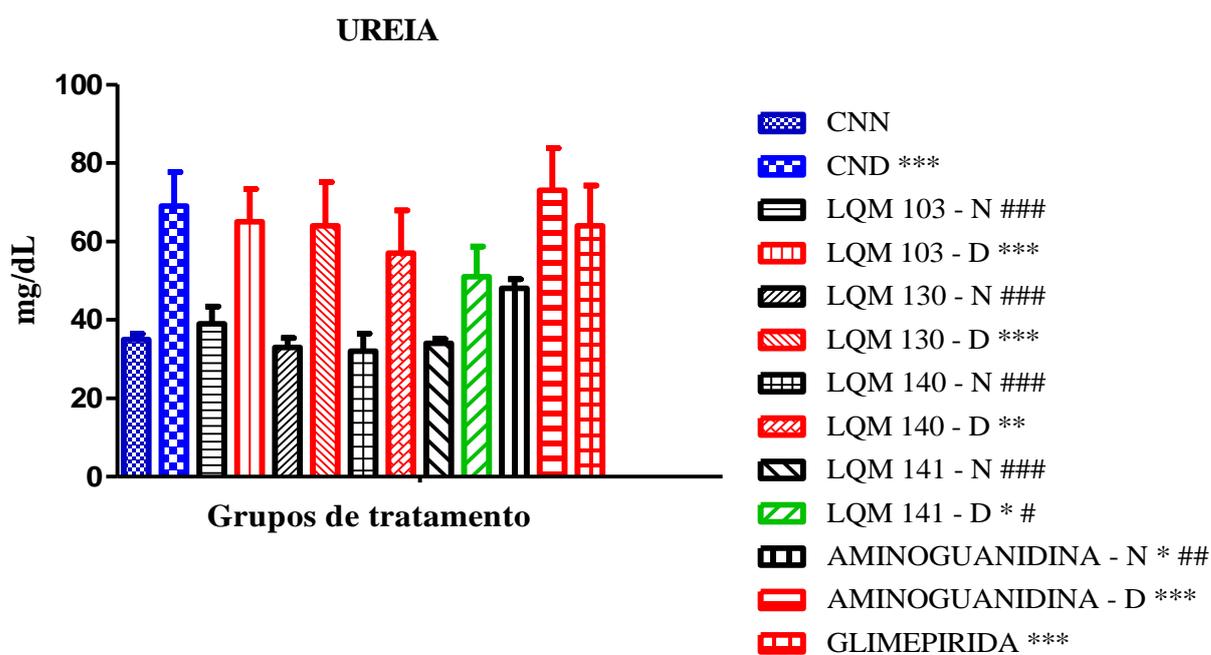
A elevação dos níveis da ureia no diabetes tem origem na alteração do metabolismo de proteínas. Também pode ser considerado um indicador para desidratação, perda peso, disfunção renal e hepática (CALIXTO-LIMA; REIS et al., 2012).

A creatinina sérica é utilizada para a avaliação da função renal, como também a taxa de filtração glomerular (KLOET; KRAUSE; WOODS, 2010). Neste estudo, os derivados aminoguanidínicos reduziram os danos na barreira de filtração causados aos rins em resposta à hiperglicemia prolongada. No DM grande parte das lesões envolvidas com a perda da capacidade de filtração está relacionada ao espessamento das membranas basais vasculares e dos túbulos renais devido à acumulação de AGEs. A acumulação destes produtos não só avalia os níveis de hiperglicemia como também a hiperlipidemia, o stress oxidativo e inflamação (BARLOVIC et al., 2011; HEGAB et al., 2012; MEERWALDT et al., 2008).

O ácido úrico é um dos principais produtos do catabolismo de proteínas oriundas da dieta e de fontes endógenas, concentrando-se principalmente no fígado. É principalmente excretado pelo rim (através da urina) e os níveis séricos são determinados pela relação entre a dieta, à produção endógena e os mecanismos de reabsorção e de excreção renal (DEL-FABRO, 2007). O aumento nos níveis de ácido úrico é decorrente do desequilíbrio entre sua absorção e a excreção, podendo estar associado com patologias como Diabetes *Mellitus* e distúrbios lipídicos. Neste estudo não foi observado alterações nos níveis de ácido úrico.

**Figura 28 - Níveis plasmáticos de Ureia, Creatinina e Ácido Úrico de ratos Wistar tratados com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.**



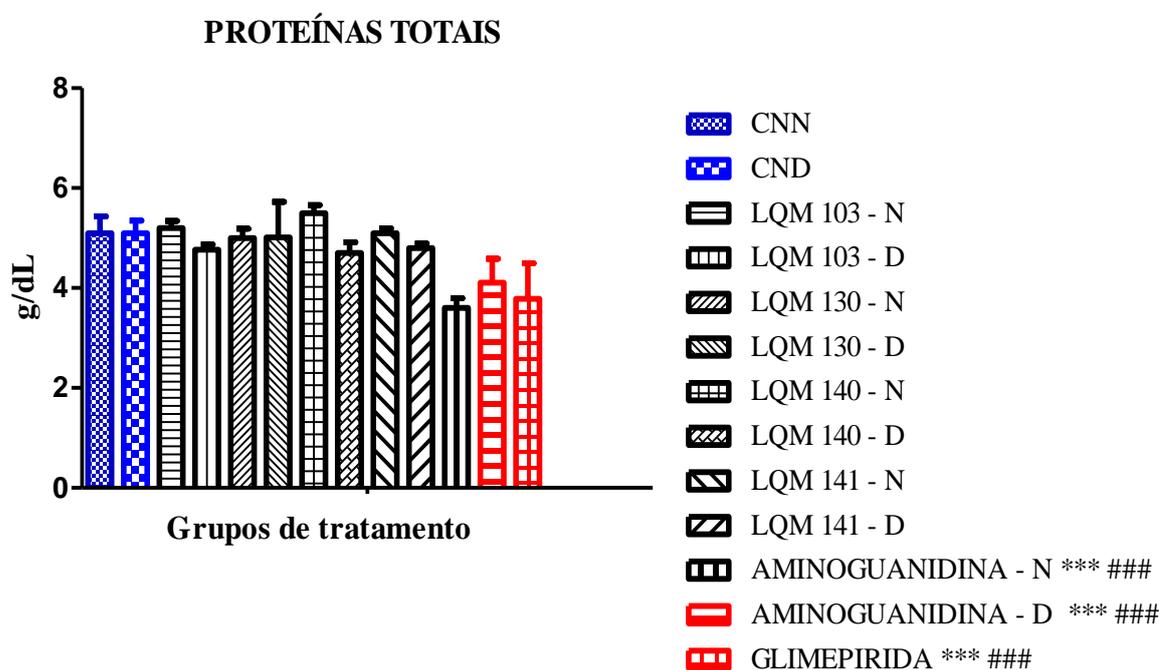


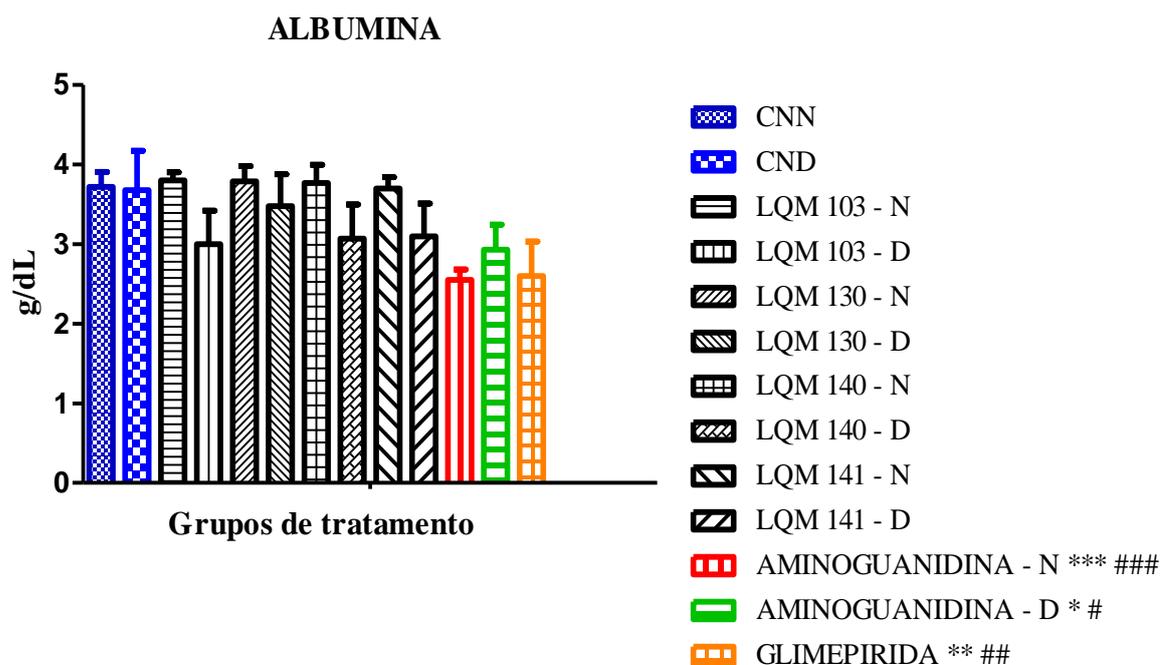
Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=5$ /grupo). ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls para comparação dos diferentes grupos. \* Diferente em relação ao grupo CNN. # Diferente em relação ao grupo CND, considerando  $p<0.05$ .

Fonte: GOMES, 2019.

Com relação às proteínas totais e albumina não foi constatado diferença estatística entre os grupos tratados com os derivados aminoguanidínicos, comparados ao grupo CNN (**Figura 29**). A albumina também é uma alternativa como marcador glicêmico de períodos curtos (duas a quatro semanas) (YOSHIUCHI, 2008) e, um importante marcador de lesão renal, seja uma lesão renal primária ou em consequências a doenças sistêmicas como hipertensão e diabetes. Os achados referentes aos níveis de proteínas totais e albumina nos diferentes grupos experimentais indicaram que pelo menos até o momento da eutanásia as possíveis lesões hepáticas e renais não foram determinantes para redução deste parâmetro sérico.

**Figura 29 - Níveis plasmáticos de proteínas totais e albumina de ratos Wistar tratados com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.**





Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=5/\text{grupo}$ ). ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls para comparação dos diferentes grupos. \* Diferente em relação ao grupo CNN. # Diferente em relação ao grupo CND, considerando  $p<0.05$ .

Fonte: GOMES, 2019.

Com relação às enzimas aspartato aminotransferase (AST) e a gama glutamiltransferase (GGT), bilirrubina total e direta não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. No entanto, a concentração sérica dessas enzimas em alguns grupos estava acima da concentração sérica do grupo CNN. Já para alanina aminotransferase (ALT) apenas o grupo diabético tratado com o derivado LQM 140 apresentou diferença estatística significativa quando comparada a concentração do grupo CNN (**Figura 30**).

Os níveis séricos de AST, ALT e GGT estiveram abaixo do encontrado nos animais do CND, sugerindo que o uso dos derivados aminoguanidínicos não ter provocado uma hepatotoxicidade, corroborando com os achados no estudo de Sarmiento (2016). Vale salientar que estes parâmetros tendem a se elevar também pela influência da anestesia e estresse muscular os quais os ratos são submetidos para a coleta de sangue.

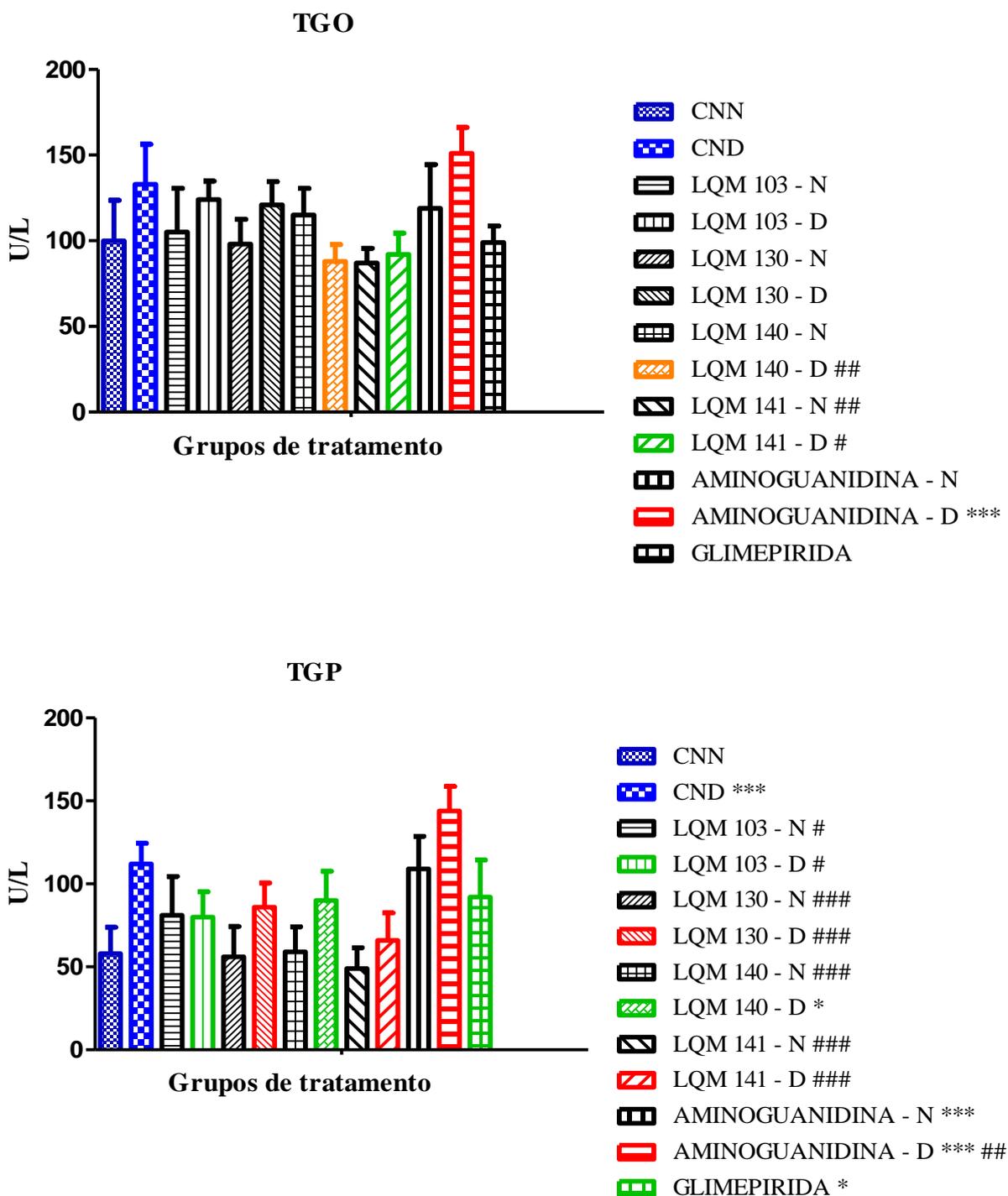
AST e ALT são enzimas intracelulares presentes nos hepatócitos e de escolha para o auxílio de diagnóstico. Estas catalisam a conversão de aspartato e alanina em oxaloacetato e piruvato, respectivamente e são parâmetros úteis na avaliação das lesões (MOTTA, 2009).

Nos portadores de diabetes os níveis séricos das enzimas hepáticas TGO e TGP são aumentados. Concentrações séricas elevadas das transaminases pode ser um indício de alterações hepáticas e doenças cardiovasculares e sendo observadas com maior frequência entre os diabéticos do que o não diabético (ARKKILA et al., 2001; FERNANDES et al., 2010). Estas alterações podem ser explicadas por que essas enzimas são requeridas quando há aumento do metabolismo energético, uma vez que desempenham um importante papel na gliconeogênese (FERNANDES et al., 2010).

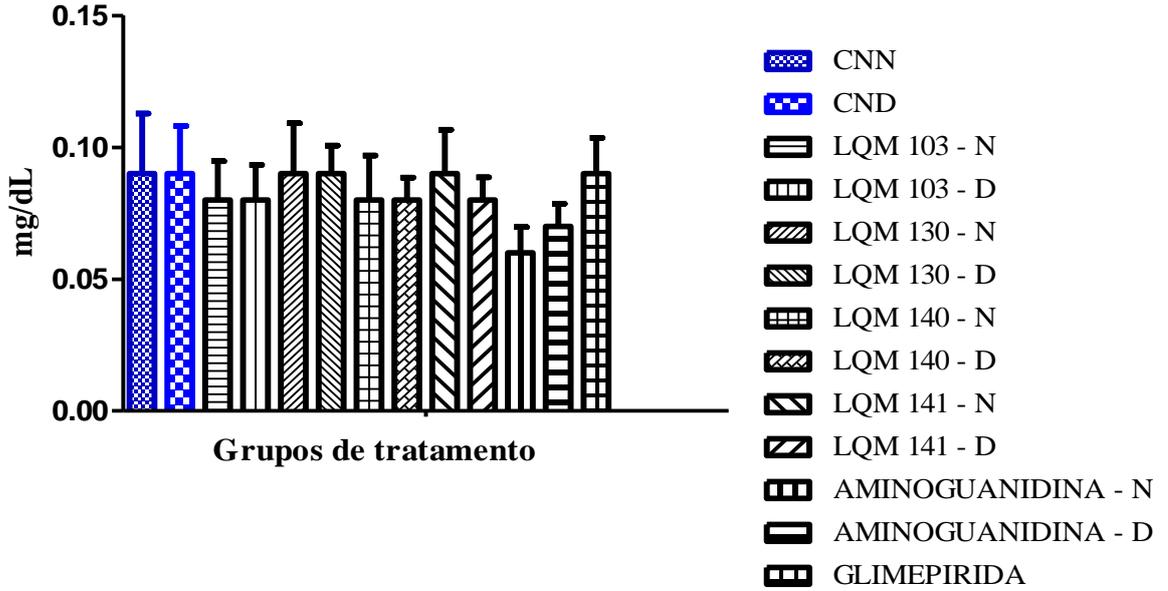
A GGT é uma enzima responsável pelo catabolismo extracelular da glutatona (EMDIN et al., 2005). Sendo produzida em diferentes tecidos, entretanto, a grande parte presente no soro é proveniente do fígado (EMDIN et al., 2005). Através de mecanismo ainda não muito bem esclarecido, pacientes com: diabetes, hipertireoidismo, artrite reumatóide e doença pulmonar obstrutiva crônica geralmente possuem concentrações elevadas de GGT. O nível aumentado de GGT nestes indivíduos está diretamente relacionado ao aumento do estresse oxidativo, uma vez que a glutatona é uma das principais enzimas antioxidantes (HAGHIGHI et al., 2011).

No que diz respeito às concentrações séricas de fosfatase alcalina (ALP) houve diferença estatística em todos os grupos diabéticos, exceto para o grupo tratado com o LQM 141, pode ser observado também que os grupos de animais normais apresentaram aumento na concentração sérica (**Figura 30**). Apesar da variação na concentração sérica da fosfatase alcalina em todos os grupos estudados, ainda assim encontram-se dentro do limite de normalidade (56 - 153 U/L) (LIMA et al., 2014).

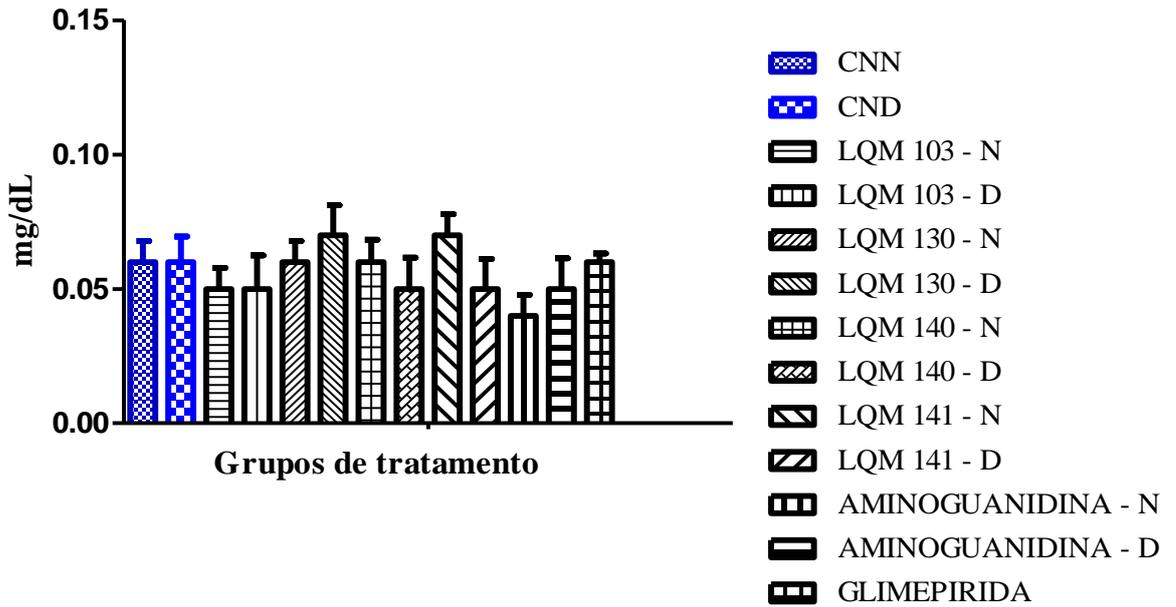
Figura 30 - Níveis plasmáticos de AST/TGO (aspartato aminotransferase), ALT/TGP (alanina aminotransferase), GGT (Gamaglutamiltranspeptidase), bilirrubina total e direta, fosfatase alcalina de ratos Wistar tratados com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.

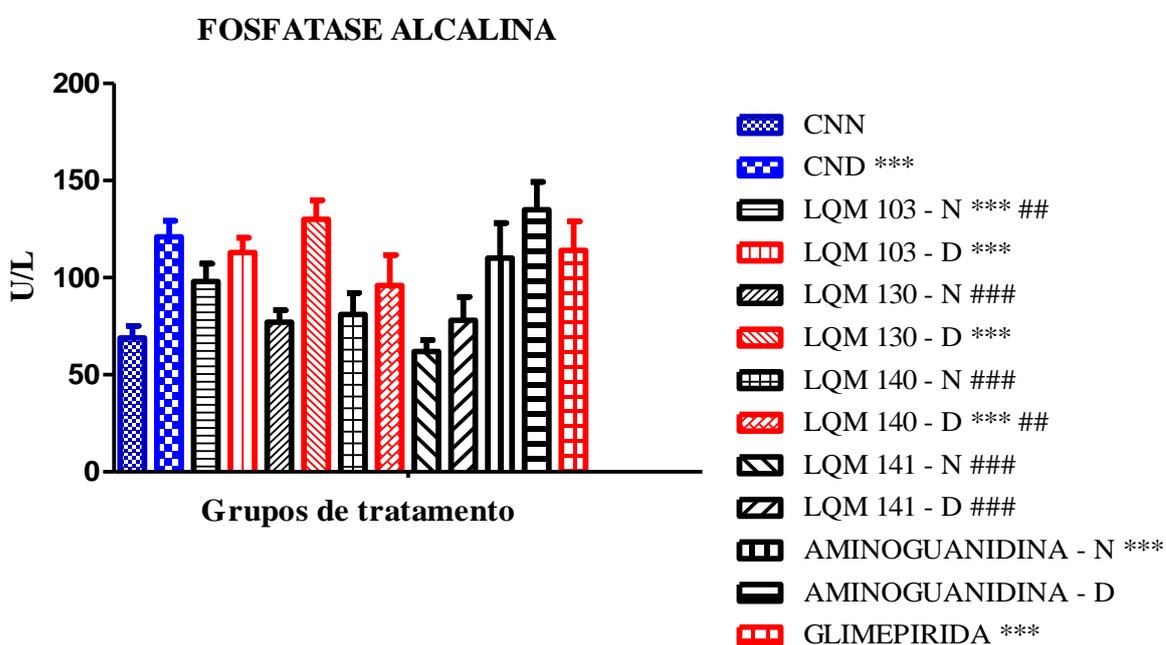
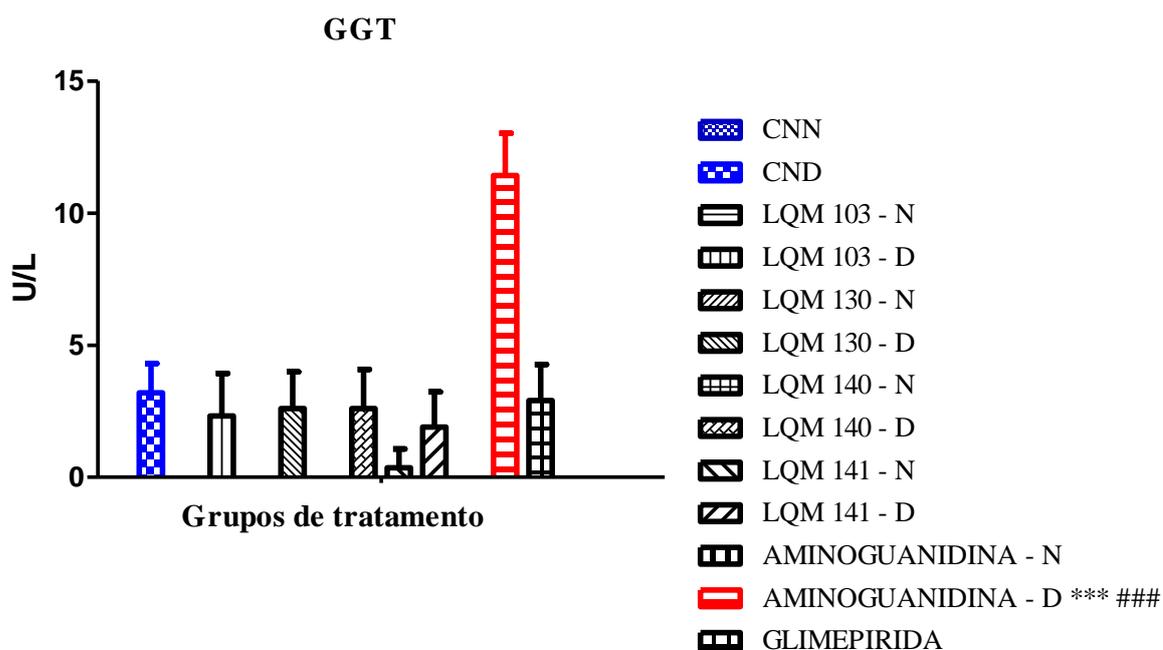


### BILIRRUBINA TOTAL



### BILIRRUBINA DIRETA





Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=5$ /grupo). ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls para comparação dos diferentes grupos. \* Diferente em relação ao grupo CNN. # Diferente em relação ao grupo CND, considerando  $p<0.05$ .

Fonte: GOMES, 2019.

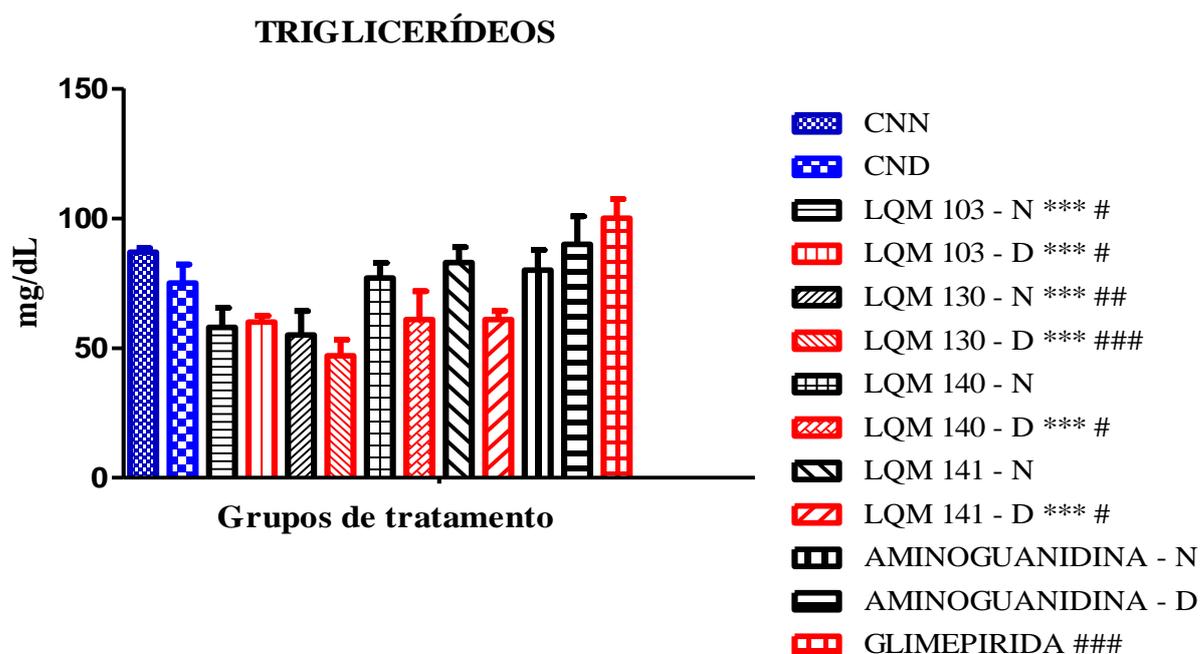
#### 5.4.3.2. Avaliação do perfil lipídico sérico

Os valores de colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos não diferiram estatisticamente na comparação entre os grupos diabéticos tratados com os derivados aminoguanidínicos (**Figura 31**).

No que reporta ao metabolismo de lipídeos a deficiência de insulina no diabetes, leva a uma alteração no metabolismo lipídico, provocando aumento de triglicerídeos plasmáticos, provavelmente em decorrência da elevada síntese de triglicerídeos a partir dos ácidos graxos que chegam ao fígado, em virtude de maior lipólise no tecido adiposo (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Com isso, uma das complicações mais encontradas nos portadores de DM são as dislipidemias, que levam a graves riscos para os problemas cardiovasculares, principal responsável pela redução da sobrevida de pacientes com DM, sendo considerada a causa mais frequente de mortalidade por englobar vários distúrbios vasculares (YADAV et al., 2005).

Neste estudo, todos os grupos diabéticos tratados com os derivados aminoguanidínicos, promoveram redução numérica do colesterol total e dos triglicerídeos quando comparados com os grupos normais. O estudo de Sarmiento (2016) verificou o efeito dos derivados aminoguanidínicos em ratos diabéticos, também reduzindo colesterol total e triglicerídeos ( $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo CND. Por meio desses resultados pode-se sugerir que os derivados aminoguanidínicos possam ter atividade protetora em relação ao perfil lipídico, uma vez que seu uso manteve os níveis do colesterol HDL (protetor contra doenças cardiovasculares) e diminuiu dos níveis de colesterol total e triglicerídeos séricos (níveis aumentados podem causar ou agravar as doenças cardiovasculares). Entretanto, esta hipótese necessita ser investigada de forma mais aprofundada nos modelos de animais de dislipidemia.





Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=5$ /grupo). ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls para comparação dos diferentes grupos. \* Diferente em relação ao grupo CNN. # Diferente em relação ao grupo CND, considerando  $p<0,05$ .

Fonte: GOMES, 2019.

#### 5.4.4. Avaliação do Hemograma

A avaliação das possíveis alterações dos parâmetros hematológicos pode ser utilizada para identificar os efeitos causados por substâncias químicas, sobre os constituintes do sangue. Estas servirão para identificar as possíveis alterações nos níveis de biomoléculas, tais como enzimas, produtos metabólicos, hematologia, funcionamento dos órgãos (MAGALHÃES et al., 2008; OYEDEMI et al., 2011).

O tratamento com estreptozotocina não levou ao aumento da contagem de hemácias e hematócito nos grupos diabéticos ou não diabéticos tratados com os derivados aminoguanidínicos (**Tabela 13**). Ao contrário do que ocorreu com as hemácias e hematócrito, o tratamento com estreptozotocina diminuiu a contagem de plaquetas na maioria dos grupos diabéticos e aumentou à quantidade de leucócitos nestes grupos, apesar destas alterações não ser estatisticamente significativa, o que pode estar relacionado ou não com o aumento dos níveis glicêmicos ou uma possível toxicidade induzida pela estreptozotocina.

Neste estudo todos os grupos foram manipulados da mesma forma a fim de evitar a interferência do estresse como possível variável, tendo em vista que o estresse e anestesia podem alterar significativamente alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos (ORTIZ, 2012).

Os resultados hematológicos mostraram que os valores de referência dos ratos da linhagem Wistar foram similares aos valores de referência para humanos, exceto a quantidade de hemácias e de plaquetas. Os quais possuem uma quantidade maior destes dois parâmetros, inferindo uma maior viscosidade ao sangue e conseqüentemente rápida coagulação.

Segundo Espeschit (2010), a hemoglobina sérica varia de 11 a 19 g/dL para os ratos Wistar, corroborando com os achados neste estudo. Assim como, os demais parâmetros estão dentro dos parâmetros descritos na literatura (MARTIS et al. 2009; ROCHA et al., 2012; VIVAS, 2014).

**Tabela 13 - Efeito da administração dos derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles sobre os parâmetros hematológicos de ratos Wistar (n=3) a) série vermelha e b) plaquetas e série branca.**

C) SÉRIE VERMELHA

GRUPOS	SÉRIE VERMELHA						
	HEMÁCIAS (x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	HEMOGLOBINA (g/dL)	HEMATÓCRITO (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	RDW (%)
CNN	9,13 ± 0,13	16,0 ± 0,10	51,0 ± 0,65	56,0 ± 0,28	17,6 ± 0,15	31,5 ± 0,21	15,3 ± 0,21**
CND	9,46 ± 0,32	16,4 ± 0,32	56,7 ± 2,12	60,0 ± 1,53**	17,4 ± 0,29	29,2 ± 0,68**	17,7 ± 0,29
LQM 103 – N	8,7 ± 0,16	15,6 ± 0,29	43,3 ± 4,50##	56,4 ± 0,21#	17,9 ± 0,14	31,8 ± 0,14###	14,0 ± 0,26
LQM 103 – D	9,5 ± 0,2	16,6 ± 0,25	55,8 ± 1,44	59,3 ± 0,48	17,5 ± 0,16	29,6 ± 0,27**	18,0 ± 0,28**
LQM 130 - N	8,9 ± 0,06	16,0 ± 0,17	51,2 ± 0,72	57,2 ± 0,46	17,9 ± 0,07	31,3 ± 0,14###	15,7 ± 0,21##
LQM 130 – D	9,3 ± 0,11	16,1 ± 0,17	54,4 ± 0,50	57,6 ± 0,58	17,3 ± 0,10	30,0 ± 0,29	18,8 ± 0,20***
LQM 140 - N	8,3 ± 0,24	13,6 ± 0,63***##	47,6 ± 1,61	57,3 ± 0,33	16,3 ± 0,35***##	28,4 ± 0,45***	15,7 ± 0,44##
LQM 140 – D	8,44 ± 0,40	14,7 ± 0,72	49,5 ± 1,33	59,4 ± 1,44	17,4 ± 0,22	28,8 ± 0,41***	19,0 ± 0,72***
LQM 141 - N	9,48 ± 0,48	17,1 ± 0,80	54,0 ± 2,92	57,0 ± 0,33	18,1 ± 0,16	31,7 ± 0,24###	15,5 ± 0,70##
LQM 141 – D	9,67 ± 0,29	16,8 ± 0,42	54,9 ± 1,54	56,8 ± 0,38	17,3 ± 0,15	30,5 ± 0,19	17,8 ± 0,53**
AMINO Guanidina – N	9,82 ± 0,19	15,6 ± 0,21	50,3 ± 0,99	56,4 ± 0,32#	17,3 ± 0,16	30,9 ± 0,25#	15,2 ± 0,37##
AMINO Guanidina – D	9,91 ± 0,29	17,5 ± 0,58	57,4 ± 1,90	58,5 ± 0,46	17,7 ± 0,13	30,2 ± 0,46	18,2 ± 0,18**
GLIMEPIRIDA	9,33 ± 0,11	16,3 ± 0,24	54,0 ± 0,90	57,9 ± 0,41	17,5 ± 0,07	30,2 ± 0,16	18,2 ± 0,18**

Os dados representam a média ± erro padrão da média (n=5/grupo). ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls para comparação dos diferentes grupos. \*

Diferente em relação ao grupo CNN. # Diferente em relação ao grupo CND, considerando  $p < 0,05$ .

## D) PLAQUETAS E SÉRIE BRANCA

GRUPOS	PLAQUETAS	SÉRIE BRANCA						
		WBC ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Bastão (%)	Segmentados (%)	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)
CNN	778 ± 41,4	6,2 ± 0,31	--	15	78	7	--	-
CND	811 ± 83,33	8,0 ± 0,56	--	21	73	4	--	-
LQM 103 – N	789 ± 21,73	4,3 ± 0,16	--	18	77	5	--	-
LQM 103 – D	670 ± 29,80	7,3 ± 1,82	--	15	79	6	--	-
LQM 130 - N	756 ± 32,80	4,6 ± 0,25	--	15	78	6	1	-
LQM 130 – D	689 ± 30,32	5,9 ± 0,57	--	20	74	6	--	-
LQM 140 - N	642 ± 62,70	5,6 ± 0,33	--	20	73	6	1	-
LQM 140 – D	820 ± 30,19	7,4 ± 1,59	--	24	70	6	--	-
LQM 141 - N	812 ± 38,28	4,8 ± 0,21	--	16	79	7	--	-
LQM 141 – D	613 ± 42,55	7,7 ± 1,50	--	26	70	4	--	-
AMINO Guanidina – N	773 ± 27,51	5,5 ± 0,42	--	20	77	3	--	-
AMINO Guanidina – D	656 ± 64,84	5,7 ± 0,51	--	20	78	2	--	-
GLIMEPIRIDA	614 ± 30,19	7,5 ± 0,80	--	17	80	3	--	-

Os dados representam a média ± erro padrão da média (n=5/grupo). ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls para comparação dos diferentes grupos. \*

Diferente em relação ao grupo CNN. # Diferente em relação ao grupo CND, considerando  $p < 0.05$ . Fonte: GOMES, 2019.

#### 5.4.5. Parâmetro histopatológico

Na análise macroscópica dos órgãos (fígado, rins e pâncreas) não foi observado alterações nos órgãos, como também alterações de peso dos animais diabéticos e não diabéticos tratados com os derivados aminoguanidínicos (**Tabela 14**). As diferenças de massa podem ser explicadas devido à variação do peso corporal dos animais de alguns grupos.

De acordo com Ortolan et al. (2010), ao estudar o rim de ratos induzidos ao diabetes por STZ observou que após 50 dias da indução, houve um aumento no peso dos rins, no comprimento dos túbulos contorcidos proximais e no comprimento dos túbulos contorcidos distais, os quais se revelaram anormais no córtex e na faixa externa da medula.

**Tabela 14 - Peso absoluto (g) dos órgãos dos ratos Wistar tratados com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.**

GRUPOS	PESO DOS ÓRGÃOS		
	FÍGADO	RIM	PÂNCREAS
CNN	7,1 ± 0,15	1,0 ± 0,10	0,13 ± 0,04
CND	7,8 ± 0,57	0,97 ± 0,05	0,09 ± 0,02
LQM 103 - N	7,1 ± 0,77	1,05 ± 0,03	0,11 ± 0,03
LQM 103 - D	7,4 ± 0,21	0,99 ± 0,02	0,11 ± 0,01
LQM 130 - N	7,1 ± 0,18	1,05 ± 0,1	0,11 ± 0,03
LQM 130 - D	7,0 ± 0,24	1,02 ± 0,02	0,12 ± 0,02
LQM 140 - N	6,9 ± 0,36	1,02 ± 0,04	0,15 ± 0,05
LQM 140 - D	7,5 ± 0,25	0,99 ± 0,08	0,12 ± 0,07
LQM 141 - N	7,4 ± 0,32	1,08 ± 0,05	0,12 ± 0,03
LQM 141 - D	7,7 ± 0,18	0,97 ± 0,02	0,10 ± 0,01
AMINO Guanidina - N	7,1 ± 0,45	1,05 ± 0,04	0,15 ± 0,06
AMINO Guanidina - D	7,1 ± 0,18	1,05 ± 0,05	0,16 ± 0,02
GLIMEPIRIDA	7,9 ± 0,19	1,0 ± 0,04	0,18 ± 0,01

Os resultados dos grupos experimentais (n=5) foram representados como média ± erro padrão da média (E.P.M.). ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls, considerando  $p < 0.05$ . Fonte: GOMES, 2019.

O DM é um grupamento de distúrbios metabólicos resultante de uma interação variável de fatores hereditários e ambientais, sendo caracterizada por secreção anormal de insulina ou receptor de insulina ou eventos pós-receptores que prejudica o metabolismo, de carboidratos, proteínas e lipídeos, além de danificar o fígado, rim e células do pâncreas (BAYNES, 1991; CUPPARI, 2014; OBOH; ADEMILUYI; FALOYE, 2011; SINGH et al., 2005).

A STZ através da ação dos radicais livres causa toxicidade no fígado, rins e pâncreas, sendo muitas vezes difícil determinar se a hepatotoxicidade observada é ocasionada pela hiperglicemia, pelos efeitos tóxicos e específicos da STZ sobre o tecido hepático ou pela combinação desses dois fatores (SALES, 2011).

O pâncreas endócrino pode ser examinado através do exame histológico das ilhotas pancreáticas. As variações nos cortes histológicos corados por hematoxilina/eosina são sutis e a avaliação quantitativa, tecnicamente difícil. A parte endócrina (ilhotas de Langerhans) compreende cerca de 1% e 2% das células medindo entre 100 e 200  $\mu\text{m}$  de diâmetro, sendo, no pâncreas normal, 80% são células  $\beta$ , 15% células  $\alpha$  e 4% células  $\delta$ . As transformações regenerativas das ilhotas podem ser observadas em animais tratados com substâncias diabetogênicas, podendo ser observadas em neonatos, após agressão tóxica. A hiperplasia das ilhotas pode ser observada tanto em animais com idade avançada (espontaneamente) como em animais tratados com substâncias químicas (OLIVEIRA, 2015).

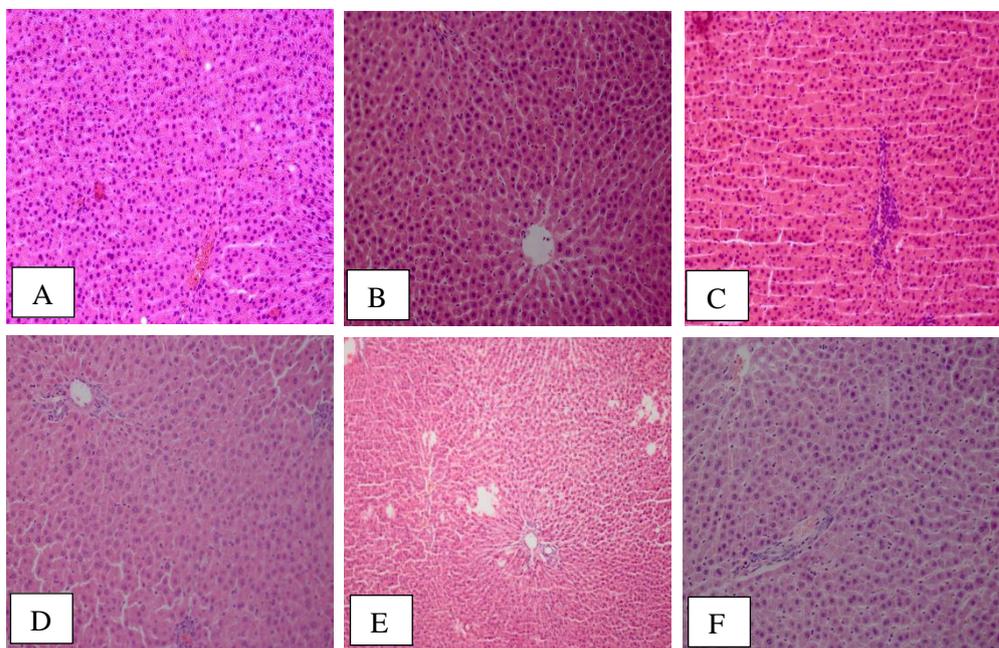
Apoptose é um evento comum em animais diabéticos insulino dependentes após o tratamento com múltipla dose de STZ. A administração da STZ acarreta lesão grave do pâncreas, tal como uma diminuição do diâmetro das ilhotas do pâncreas, provavelmente devido à diminuição do número  $\beta$  células (SEFI, 2011). Segundo Chávez et al. (2007), a administração de STZ em ratos produz uma diminuição no número de ilhotas no pâncreas.

Com o objetivo de avaliar as possíveis alterações nos animais induzidos com STZ e tratados com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles, o fígado, rim e pâncreas dos animais foram submetidos à análise histopatológica. A avaliação foi feita de maneira cega, ou seja, sem identificação dos grupos no momento da análise.

A avaliação histológica do fígado do grupo não diabético tratado com os derivados aminoguanidínicos mostrou focos de inflamação na maioria dos grupos não diabéticos, exceto para o LQM 103 que apresentou um quadro microscópico compatível com o observado no CNN (**Figura 32**). No grupo com diabetes induzida tratados com os derivados aminoguanidínicos apresentaram alterações semelhantes às observadas no grupo não diabético (**Figura 33**). O tratamento com os derivados aminoguanidínicos promoveu o aparecimento de

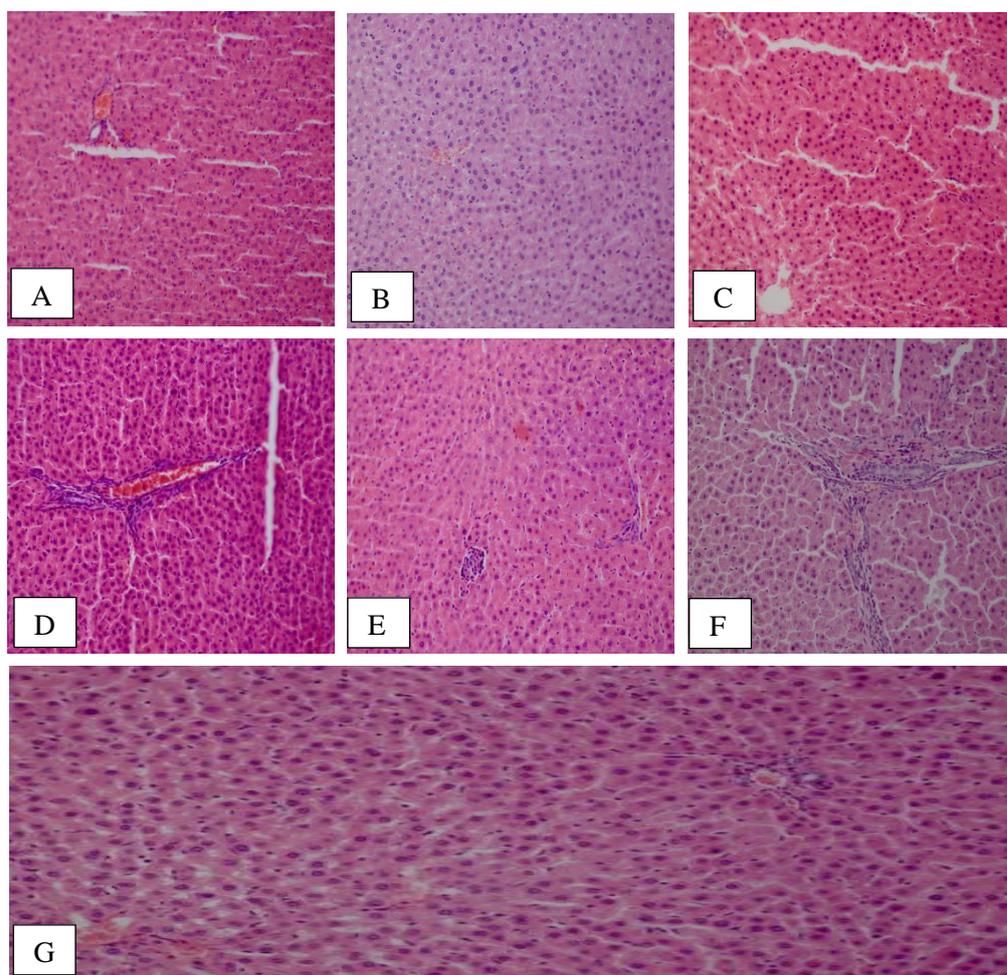
inflamação moderada no grupo não diabético LQM 130 e nos grupos diabéticos glimepirida e aminoguanidina.

**Figura 32 - Análise histológica hepática de ratos Wistar não diabéticos tratados com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.**



(A) CNN; (B) LQM 103 – 2 mg/kg; (C) LQM 130 – 2 mg/K=kg ; (D) LQM 140 – 2 mg/kg; (E) LQM 141 – 2 mg/kg ; (F) Aminoguanidina – 2 mg/kg. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento 20x/200x.  
Fonte: GOMES, 2019.

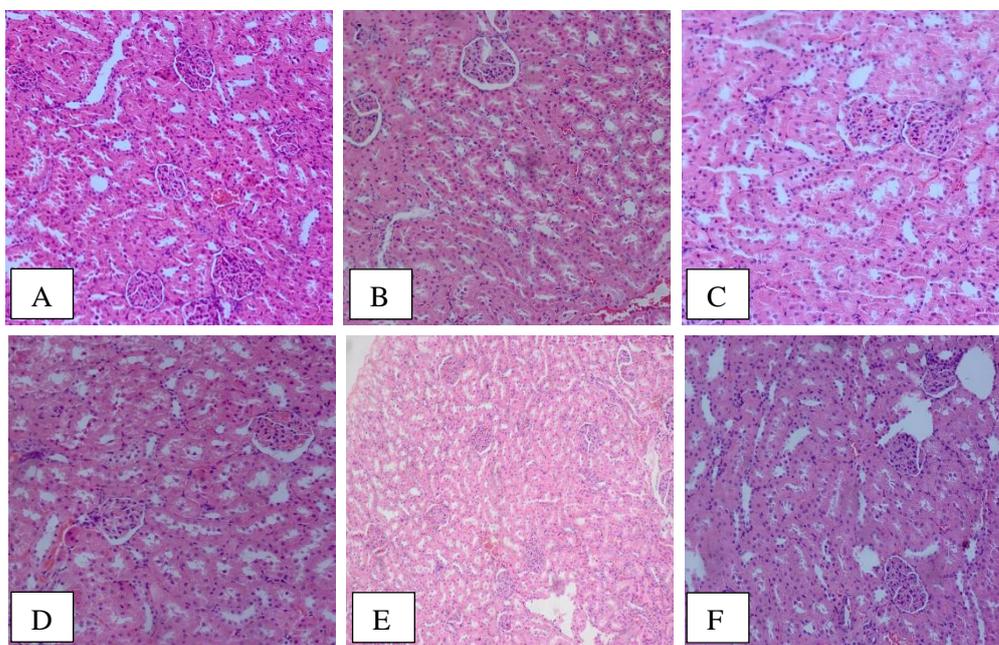
**Figura 33 - Análise histológica hepática de ratos Wistar diabéticos tratados com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.**



(A) CND; (B) LQM 103 – 2 mg/kg; (C) LQM 130 – 2 mg/kg ; (D) LQM 140 – 2 mg/kg; (E) LQM 141 – 2 mg/kg ; (F) Glimpirida – 2 mg/kg; (G) Aminoguanidina – 2 mg/kg. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento 20x/200x. Fonte: GOMES, 2019.

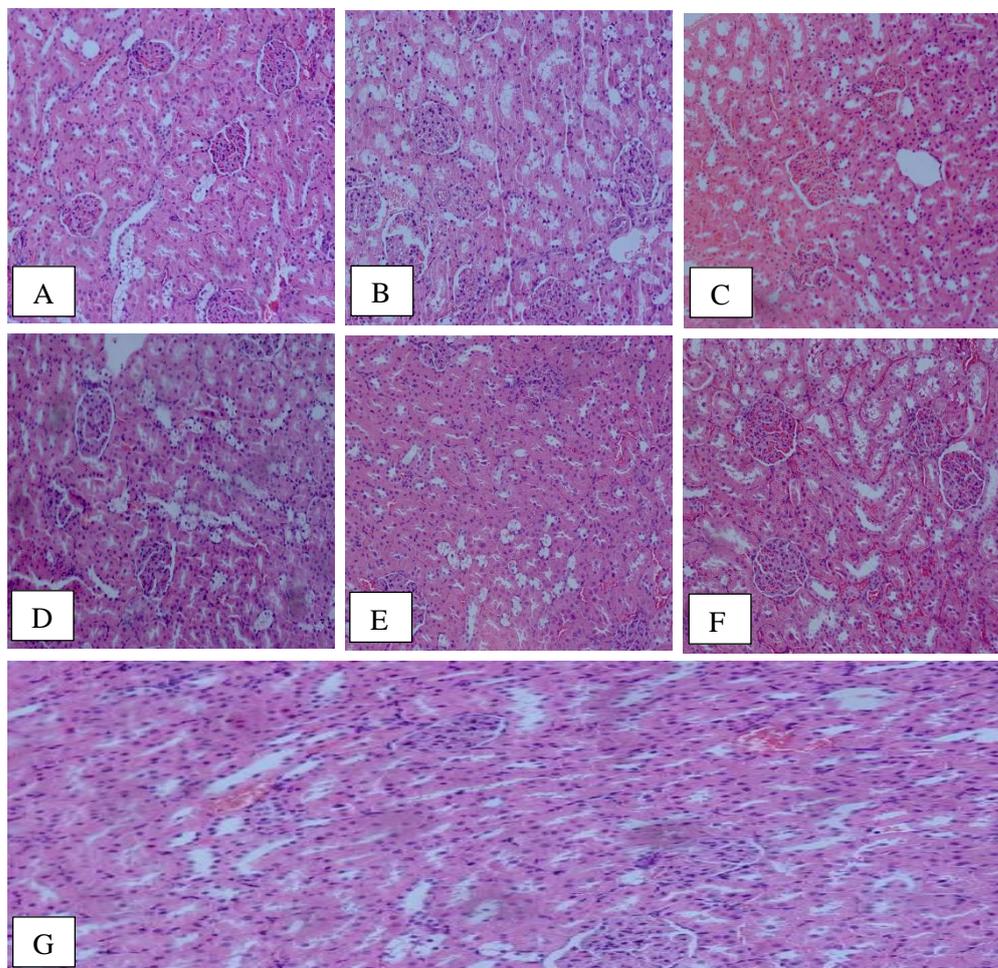
Nas **figuras 34 e 35** estão apresentados as fotomicrografias do rim de animais normais e portadores de diabetes induzida, respectivamente, submetidos ao tratamento com diferentes derivados aminoguanidínicos. A avaliação do rim mostrou padrão sem alterações nos animais normais, exceto para os grupos LQM 130, LQM 140 e aminoguanidina não diabético que apresentou um processo inflamatório. Já nos animais com diabetes induzida verificou processo inflamatório em todos os grupos tratados com os derivados aminoguanidínicos, até mesmo para o grupo tratado com glimepirida, além de áreas de alterações glomerular no grupo aminoguanidina diabético.

**Figura 34 - Análise histológica renal de ratos Wistar não diabéticos tratados com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.**



(A) CNN; (B) LQM 103 – 2 mg/kg; (C) LQM 130 – 2 mg/kg ; (D) LQM 140 – 2 mg/kg; (E) LQM 141 – 2 mg/kg ; (F) Aminoguanidina – 2 mg/kg. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento 20x/200x.  
Fonte: GOMES, 2019.

**Figura 35 - Análise histológica renal de ratos Wistar diabéticos tratados com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.**



(A) CND; (B) LQM 103 – 2 mg/kg; (C) LQM 130 – 2 mg/kg ; (D) LQM 140 – 2 mg/kg; (E) LQM 141 – 2 mg/kg ; (F) Glimepirida – 2 mg/kg; (G) Aminoguanidina – 2 mg/kg. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento 20x/200x. Fonte: GOMES, 2019.

De acordo estudo de Silva, Lobo e Bastos (2015), as alterações histopatológicas dos rins de ratos wistar diabéticos, incluem a presença de alterações na morfologia renal, sendo caracterizadas por degenerações glomerulares e nos túbulos distais. Além disso, há a presença de núcleos picnóticos, tamanho reduzido e cromatina extremamente condensada. Como consequência, há perda da função celular e provável morte celular, acarretando, em longo prazo, a nefropatia diabética.

As alterações nos órgãos em estudo não foram características de alterações renais, uma vez que a diabetes é uma doença crônica, e as manifestações patológicas sobre os rins estão

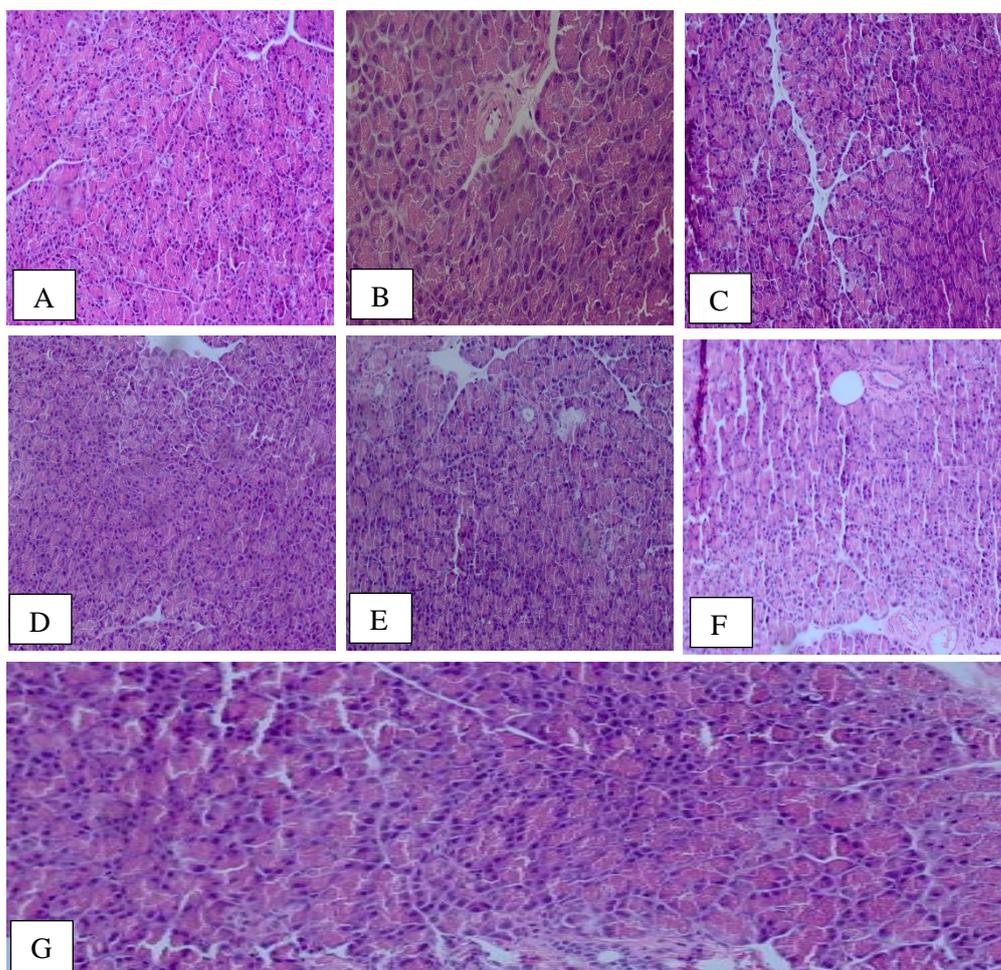
nitidamente relacionadas ao tempo do hospedeiro às anormalidades metabólicas causadas pela doença, sendo então necessária prolongada hiperglicemia para produzir mudanças histológicas características da nefropatia diabética, corroborando com os achados de outros pesquisadores, os quais encontraram alterações nos rins de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina em tempo superior ao período experimental realizado neste estudo (GREEVSKA & POLENKOVIC, 2001; MENSAHBROWN et al., 2005; OBINECHE et al., 2001).

As características histológicas do pâncreas dos grupos analisados estão ilustradas nas **figuras 36 e 37**. Nos grupos experimentais este órgão, mostrou-se envolvido por cápsula de tecido conjuntivo denso que originou septos, dividindo-o em lóbulos constituídos por ácinos serosos, ilhotas de Langerhans e por ductos intercalares revestidos por epitélio simples cúbico, tributários de ductos interlobulares maiores forrados por epitélio simples cilíndrico. Nos septos interlobulares, evidenciavam-se ductos interlobulares, arteríolas, capilares, vênulas, vasos linfáticos, adipócitos. As ilhotas de Langerhans apresentavam-se como aglomerados imersos no tecido pancreático exócrino, constituídos por células epiteliais poligonais ou arredondadas, dispostas em cordões separados por capilares fenestrados que recebem os hormônios por elas produzidos, classificando-se assim como glândula endócrina cordonal. Estas evidências estão em conformidade com as descrições de Junqueira e Carneiro (2008).

No que diz respeito à indução do Diabetes *mellitus*, Furlan (2001) relatou que grande parte das alterações que aparecem após o tratamento com estreptozotocina é decorrente de sua ação tóxica sobre as células  $\beta$ , ao se acumular nas porções centrais das ilhotas pancreáticas.

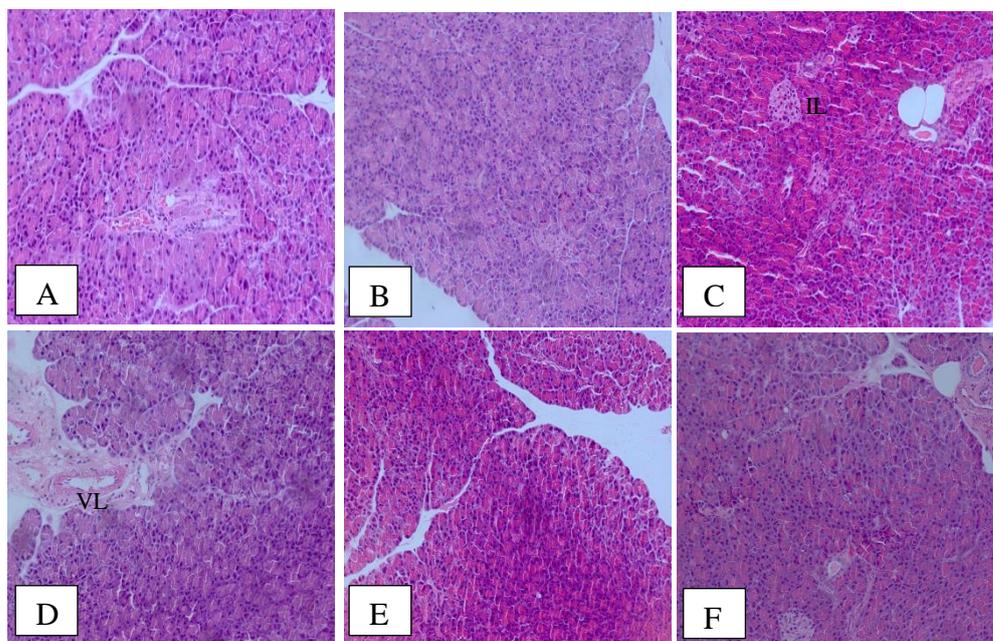
A análise histológica do pâncreas, à microscopia de luz, não permitiu a observação de diferenças morfológicas entre os grupos, o que pode ser justificado pelo período experimental possivelmente curto para o aparecimento de alterações visíveis neste tipo de avaliação, o que justifica a realização de pesquisas mais aprofundadas.

**Figura 36 - Análise histológica do pâncreas de ratos Wistar diabéticos tratados com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.**



(A) CND; (B) LQM 103 – 2 mg/kg; (C) LQM 130 – 2 mg/kg ; (D) LQM 140 – 2 mg/kg; (E) LQM 141 – 2 mg/kg ; (F) Glimepirida – 2 mg/kg; (G) Aminoguanidina – 2 mg/kg. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento 20x/200x. Fonte: GOMES, 2019.

**Figura 37 - Análise histológica do pâncreas de ratos Wistar não diabéticos tratados com os derivados aminoguanidínicos e seus respectivos controles.**



(A) CNN; (B) LQM 103 – 2 mg/kg; (C) LQM 130 – 2 mg/kg ; (D) LQM 140 – 2 mg/kg; (E) LQM 141 – 2 mg/kg ; (F) Aminoguanidina – 2 mg/kg. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento 20x/200x . Ilhota de Langerhans (IL) e vaso linfático (VL). Fonte: GOMES, 2019.

# CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

---

---

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As substâncias derivadas da aminoguanidina apresentaram uma grande diversidade de substituintes, podendo fazer-se uma boa relação estrutura atividade identificar padrões estruturais simples e importantes, uma vez que ainda é incipiente a relação entre a estrutura química e a atividade antiglicante dos derivados aminoguanidínicos. Procurou-se planejar moléculas que fossem sinteticamente simples e que, por consequência, pudessem gerar processos industriais economicamente viáveis.

Os compostos LQM 103, LQM 130, LQM 140 e LQM 141 apresentaram os melhores resultados antiglicante, com respectivamente 95, 94, 98 e 99% de inibição dos AGEs durante os 56 dias de incubação, demonstrando terem um forte potencial anti-AGE. Os resultados do MTT indicaram que dos derivados aminoguanidínicos testados não apresentaram citotoxicidade frente à fibroblatos 3T3 nas concentrações de 10 e 100  $\mu$ M. Apenas o composto LQM 98 LQM 98 apresentou citotoxicidade na concentração de 10  $\mu$ M frente a células de macrófagos J774A.1, apesar deste composto está entre os que apresentaram 70% de inibição da formação de produtos finais de glicação avançada.

Os compostos mais promissores foram selecionados para o estudo *in vivo* de toxicidade aguda e antidiabética. Não foi observado evidências de toxicidade aguda em níveis comportamentais ponderais, hematológicos, bioquímicos sorológicos e histológicos.

No ensaio antidiabético os derivados aminoguanidínicos promoveram uma redução glicêmica nos animais tratados em até 60%. Desta forma, pode-se inferir que os derivados aminoguanidínicos LQM 140 e LQM 141 foram os mais promissores voltados à atividade antiglicante e antidiabética. No entanto, mais estudos necessitam ser realizados para compreender melhor a relação entre DM, atividade antiglicante dos derivados aminoguanidínicos, visando elucidar os mecanismos de ação e estabelecer o potencial terapêutico desses compostos para os pacientes diabéticos e prevenir as complicações crônicas que acompanham a hiperglicemia.

Dentre as perspectivas da continuação do trabalho destacam-se:

- Avaliar a cicatrização *in vitro* dos derivados aminoguanidínicos;
- Avaliar a cicatrização *in vivo* dos derivados aminoguanidínicos em ratos Wistar;
- A partir dos compostos que apresentaram resultados promissores novas estratégias de planejamento;
- Avaliar a atividade biológica destes novos compostos através dos métodos empregados neste estudo.

# REFERÊNCIAS

---

---

## REFERÊNCIAS

AGBAJE, I. M. et al, Increased concentrations of the oxidative DNA adduct 7,8-dihydro-8-oxo-2-deoxyguanosine in the germ-line of men with type 1 diabetes. **Reproductive biomedicine online**, 16, 401-409, 2008.

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. S796-2, 2006.

AHMED, M. U. et al. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Ne- carboxymethyl- lysine- and Ne- (1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. **Biochem. J.** v. 364, p. 1-14, 2002.

AHMED, N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Res Clin Pract.** 2005; 67(1): 3-21, 2005.

AHMED, N. Synthesis and Biological Evaluation of Tricyclic Guanidine Analogues of Batzelladine K for Antimalarial, Antileishmanial, Antibacterial, Antifungal, and Anti-HIV Activities. **Chem. Biol. Drug Des**, v.81, p. 491-498, 2013.

AJITA, M. et al. Periodontal disease and type 1 diabetes *mellitus*: associations with glycemic control and complications: an Indian perspective. **Diabetes & Metabolic Syndrome**, Amsterdam, v. 7, n. 2, p. 61-63, Jan. 2013.

AKBARZADEH, A. et al. Rad 2induction of diabetes by streptozotocin in rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, 22 (2) 60-64, 2007.

ALVAREZ, E. O. et al. Cognitive dysfunction and hippocampal changes in experimental type 1 diabetes. **Behavioural brain research**, São Paulo, v. 198, n. 1, p. 224-230, jan, 2009.

ALMEIDA, J. A. et al. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cádmium contamination. **Environ Int**, v. 27, p. 673-679, 2002.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**. 36(Supp): S11-66, 2013.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION . Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care.**, Alexandria, v. 38, s.1, p. 1-99, 2015.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Diabetes Statistics**. Virginia, 18maio. 2015. Disponível em :<<http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diabetes-statistics>> Acesso em 15 junho. 2017.

ANDREANI, A. et al. Potential antitumor agents. Part 29: Synthesis and potential coanthracyclinic activity of imidazo [2,1-b] thiazoleguanylhydrazones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.8, n.9, p.2359–2366, 2000.

ANDRIOLO, A.; VIEIRA, J. G. H. Diagnóstico e acompanhamento laboratorial do diabetes mellitus. In: ANDRIOLO, A. (org.). **Guias de medicina ambulatorial e hospitalar/medicina laboratorial**. 1. ed. São Paulo: Manole, p. 37-42, 2008.

ANVISA. **Guia para condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília: ANVISA, 2010.

ARAUJO, L. M. B; BRITTO, M. M. S; PORTO DA CRUZ, T. R. Tratamento do diabetes mellitus do tipo 2: novas opções. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 44, n. 6, p. 509- 518, 2000.

ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. et al. Sequential regio and chemoselective crosscoupling 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 regiospecifically polysubstituted pyridazinones. **Tetrahedron letters**, v. 48, p. 7817-7820, 2007.

ARKKILA, P.E. et al. Diabetic complications are associated with liver enzyme activities in people with type 1 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**; 52:113–8, 2001.

ARYA, A.; YADAV, H. N.; SHARMA, P. L., Involvement of vascular endothelial nitric oxide synthase in development of experimental diabetic nephropathy in rats. **Mol. Cell Biochem**, 354, 57-66, 2011.

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.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **Lancet**, London, v. 383, n. 9911, p. 69-82, Jan. 2014.

BAILEY, C. J.; DAY, C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. **Diabetes Care**, v. 12, p. 553-564, 1989.

BAILEY, C. J.; TURNER, R. C. Metformin. **N Engl J Med.**, v. 334, p. 574-579, 1996.

BANSAL, V., KALITA, J. MISRA, UK. Diabetic neuropathy. **Postgrad Med J.** 82 (964):95-100, 2006

BANKS, W. A.; OWEN, J. B.; ERICKSON, M. A., Insulin in the brain: There and back again. **Pharmacology & Therapeutics**, 136, 82-93, 2012.

BARBOSA, J. H. et al. O Papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, 52(6):940-50, 2008.

BARBOSA, J. H. P. et al.. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. **Rev Nutr.** 22 (1). 113-24, 2009.

BARLOVIC, D. P. et al. RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. **Clin. Sci.**, v.121, n.2, p.43-55. 2011.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal - As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 2a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed. 2015.

BARNETT, D. M.; KRALL L. P. **A história do diabetes**. In KAHN, C.R. et al. Joslin: Diabetes Melito. 14a. ed., Porto Alegre: Artmed, 2009. cap. 1, p. 15-31.

BAZZOTE, R. B. **Paciente diabético: Cuidados Farmacêuticos**. Rio de Janeiro: MedBook, 2010.

BAYNES, J. W., THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. **Diabetes**. 48(1):1-9, 1999.

BAYNES, J.W. Role of oxidative stress in development of complication of diabetes. **Diabetes**; 40:405– 12, 1991.

BEAULIEU, L. P. et al. Inhibitory effect of the cree traditional medicine wiishchimanaanh (Vaccinium vitis-idaea) ond advanced glycation endproduct formation: Identification of Active Principles. **Phytother Res.**, v.24, p. 741-747, 2010.

BEM, A. F.; KUNDE, J. A importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento das complicações crônicas do diabetes mellitus. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 42 (3), 185-191, 2006.

BENDERITTER, P. et al. 2-Amino-6-iodo-4-tosyloxypyrimidine: a versatilekey intermediate for regioselective functionalization of 2-aminopyrimidines in 4- and 6-positions. **Tetrahedron**, v.63, p.12465-12470, 2007.

BENNETT, P. H.; KNOWLER, W. C., **Definição, diagnóstico e classificação do diabetes melito e da homeostasia da glicose**. In KAHN, C.R. et al. Joslin: Diabetes Melito. 14a. ed., Porto Alegre: Artmed, cap. 19, p. 345-353, 2009.

BOLTON, W. K. et al. Randomized trial of na inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. **Am. J. Nephrol**, 24, 32-40, 2004.

BORGES, M. N.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. NMR interaction studies of aromatic guanylhydrazones with micelles: model for mechanism of action of cationic antibiotics. **Biopolymers**, v. 62, n.1, p. 9–14, 2001.

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

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

\_\_\_\_\_. Secretaria Vigilância Sanitária. **Portaria nº 116 de 08 de agosto de 1996**. Publica proposta de norma para estudo da toxicidade e eficácia de produtos fitoterápicos. Brasília, 1996.

BRITO, A. S. **Manual de Ensaio Toxicológicos *In Vivo***. Campinas: UNICAMP, 1994.

BROWNLEE, M.; CERAMI, A; VLASSARA, H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. **N Engl J Med**, v.318, p. 1315–1321, 1988.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**. 414 (6865): 813-20, 2001.

BRZOWSKI, Z.; SACZEWSKI, F.; SLAWINSKI, J. Synthesis of novel 3-amino-2-(4-chloro-2-mercaptobenzenesulfonyl)-guanidine derivatives as potential antitumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 1218-1225, 2007.

BUSH, B. M. **Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro:Roca, Caps 5,6 e 7, 2004.

CALIXTO-LIMA, L; REIS, N. T. **Interpretação de exames laboratoriais aplicados à nutrição clínica**. Rubio: Rio de Janeiro. 2012.

CAMARGO, J.L.; GROSS, J.L. Glico-Hemoglobina (HbA1c): Aspectos Clínicos e Analíticos. **Arq Bras Endocrinol Metab** vol 48 nº 4 Agosto 2004.

CAMPOS, A. C. L. et al. Cicatrização de feridas. **ABCD, arq. bras. cir. dig**, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.

CANICEIRO, B.D. et al. HEMATOTOXICIDADE INDUZIDA POR TRATAMENTO AGUDO COM CICLOFOSFAMIDA EM RATOS JOVENS (Trabalho de evento-Resumo). São Paulo: **FMZ/USP**, p. 117-118, 2007. Disponível em: <<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalho> VisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=3985&numeroEdicao=15>.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 46, n. 4, p. 419-425, ago. 2002.

CASANOVA, L.; HUGHES, F. J.; PRESHAW, P. M. Diabetes and periodontal disease: a two-way relationship. **British Dental Journal**, London, v. 217, n. 8, p. 433-437, 2014.

CASTRO, B. B. A. et al. Standardization of renal function evaluation in Wistar rats (*Rattus norvegicus*). **J. Bras. Nefrol.**, v. 36, n. 2, p. 139-149, 2014.

CHÁVEZ, A.A. et al. Evaluación de un modelo de diabetes tipo 2 para estudiar la actividad hipoglicémica de la glibenclamida. **Revista Mexicana de Ciências Farmacêuticas**, Benito Juárez, v.38, n.3, p.5-11, 2007.

CHEN, L.; MAGLIANO, D. J.; ZIMMET, P. Z. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes *mellitus*--present and future perspectives. **Nature Reviews. Endocrinology**, London, v. 8, n. 4, p. 228-236, 2012.

CHENG, A. Y. Y.; FANTUS, I. G. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, p.213-226, 2005.

CLAYDEN, J. et al. **Organic Chemistry**. New York: Oxford University Press, 2009.

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.

COQUEIRO, A. et al. *In Vitro* Antibacterial Activity of Prenylated Guanidine Alkaloids from *Pterogyne nitens* and Synthetic Analogues. **J. Nat. Prod**, v. 77, p.1972–1975, 2014.

CORBETT, J. A. et al. Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. **Diabetes**, v. 41, p. 552–556, 1992.

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. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2a, jun. 2009.

CUPPARI, L. **Guia de nutrição clínica no adulto**. 3ed. Barueri – SP : Manole, 2014.

DANTAS, J. G. et al. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos *Wistar* e camundongos *Swiss* do biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v. 15, p. 209-214, 2011.

DEEDS, M. C. et al. Single Dose Streptozotocin Induced Diabetes: Considerations for Study Design in Islet Transplantation Models. **Lab Anim.**, London, v. 45, n. 3, p. 131-40, 2011.

DEL-FABRO, L. D. **Determinação de alumínio e ferro em fluidos pós-hemodiálise empregando voltametria e decomposição de amostras com radiação ultravioleta.** Tese de Doutorado - Universidade Federal de Santa Maria no Programa de Pós-Graduação em Química. Santa Maria, RS, 2007.

DI BERNARDO, P. et al. Complex formation of N-donor ligands with group 11 monovalent ions. **Coordination Chemistry Review.** (252) 1270-1285, 2008.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes SBD** (2015-2016). São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.

DOUGAN, S.; TURKOGLU, I. Iron-deficiency anemia detection from hematology parameters by using decision trees. **International Journal of Science & Technology**, v. 3, n. 1, p. 85-92, 2008.

EDMONT, D. et al. Synthesis and evaluation of quinoline carboxyguanidines as antidiabetic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n.16, p.1831-1834, 2000.

EMDIN, M.; POMPELLA, A.; PAOLICCHI, A. Gamma-glutamyltransferase, atherosclerosis, and cardiovascular disease: triggering oxidative stress within the plaque. **Circulation.**; 112: 2078–2080, 2005.

EPIFÂNIO, W. A. N. **Síntese e avaliação citotóxica de derivados aminoguanidínicos como protótipos de fármacos antineoplásicos.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Alagoas, 2011.

ESPESCHIT, A. C. R. **Efeitos da ingestão de farinha integral de linhaça sobre fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis em ratos Wistar adultos.** Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa, MG, 2010.

EVANS, G.O. **Introduction.** In:\_\_\_\_\_. Animal hematotoxicology: a practical guide for toxicologists and biomedical researchers, cap. 1, P. 1-8, 2008

FAILACE, R. **Hemograma:** manual de interpretação. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

FARIA, P. P. et al. Avaliação de parâmetros físicos e biológicos de ratos Wistar após administração de decanoato de nadolona. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 32, n. 2, 2012.

FERREIRA, L.T. et al. Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. **Arq Bras Ciên Saúde**. 36 (3). 182-8, 2011.

FERNANDES, A. A. H. et al. Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. **Biomed. Pharmacother**. 64, 214–219, 2010.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

FOYE, W. O. et al. Synthesis and biological activity of guanylhydrazones of 2-pyridine and 4-pyridine and 4-quinoline carboxaldehydes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, n. 6, p. 527–530, 1990.

FUCHS, D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C., **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**, 3<sup>a</sup>. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

FRANÇA, P. H. et al. Preliminary in vitro evaluation of the anti-proliferative activity of guanylhydrazone derivatives. **Acta Pharm**. 66 (1): 129-37. 2016.

FRIDLAND, L. E.; TAMARINA, N.; PHILIPSON, L. H. Bursting and calcium oscillations in pancreatic  $\beta$ -cells: specific pacemakers for specific mechanisms. **Endocrinology and Metabolism**. v. 299, p. 517-532, 2010.

FRÖDE, T. S.; MEDEIROS, Y. S. Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.115, n.2, p.173-83, 2008

FRYE, E. B. et al. Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. Advanced glycation end product-dependent increase in imidazolium cross-links in human lens proteins. **J. Biol Chem**. 273 (30):18714-9, 1998.

FURLAN, M. M. D. P. A estreptozotocina como agente diabetogênico. **Arquivo de Ciências da Saúde Unipar**, v. 5, n. 2, p. 197-201, 2001.

GADAD, A. K. et al. Synthesis and antibacterial activity of some 5 guanylhydrazono/thiocyanato-6- arylimidazo[2,1-b]-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.35, n.9, p.853–857, 2000.

GÁMEZ, R.; MÁZ, R. Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados. **Ciencias Biológicas**, v. 38, n. 3, p. 204-208, 2007.

GARETH, T. **Fundamental of Medicinal Chemistry**. University of Portsmouth, UK, Wiley, 2003.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circ. Res.**, 107, 1058-1070, 2010.

GIESTAS, S; GIESTAS, A; AGOSTINHO, C. Doença Hepática e Diabetes Mellitus – Uma Relação Bi-Direcional. **Revista Portuguesa de Diabetes**, v. 10, n. 4, 2015.  
GOMES, M. B. Glitazonas e Síndrome Metabólica: Mecanismos de Ação, Fisiopatologia e Indicações Terapêuticas. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 50, n.2, p. 271-280, 2006.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2.ed. Porto Alegre:UFRGS, p. 313-355, 2006.

GROTO, H. Z. W. Diferenciação das anemias microcíticas utilizando a determinação do RDW. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 2, 2008.

GREEVCKA L, POLENAKOVIC. Early histopathological changes in diabetic nephropathy. **Neohrol Dial Transplant** ;16(Suppl 6):88-89, 2001.

GUARIGUATA, L. et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v. 103, p. 137-149, 2014.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia humana e mecanismo das doenças**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 10ª ed., p.973, 2002.

HAGHIGHI, S. et al. Relationship between gamma-glutamyl transferase and glucose intolerance in first degree relatives of type 2 diabetics patients. *Journal of Research in Medical Sciences*, 16(2):123-129, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**, 4. ed. New York: Oxford, 2007.

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

HIRSCH, J.; BAINES, C. L.; FEATHER, M. S. X-ray structure of 3-amino 5 substituted triazines produced by the reaction of 3-deoxyglucose with aminoguanidine. **J. Carb. Res.** v.11, p. 891-901, 1992.

HOFFMAN, B. B.; Catecolaminas, fármacos simpaticomiméticos e antagonistas dos receptores adrenérgicos. In: GILMAN, A.G.; HARDMAN J.G.; LIMBIRD L.E. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 10a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; pág. 163-203, 2003.

HONEYMAN, M. C. et al. Evidence for molecular mimicry between human T cell epitopes in rotavirus and pancreatic islet autoantigens. **J Immunol.**, Baltimore, v.184, p. 2204-10, 2010.

HORI, M. et al. Experimental models for advanced glycation end products formation using albumin, collagen, elastin, keratin and proteoglycan. **Anti-aging Medicine**. v.9, n.6, p. 125-134, 2012.

HSU, Y. J.; LEE, T. H.; CHANG, C. L. T. Anti-hyperglycemic and mechanism of *Bidens pilosa* water extract. **J Ethnopharmacol.**, v. 122, p. 379- 383, 2009.

HUANG, X. et al. Possible link between the cognitive dysfunction associated with diabetes mellitus and the neurotoxicity of methylglyoxal. **Brain Research**, 1469, 82-91, 2012.

HUSSAIN; R. F.; NOURI, A. M.; OLIVER, R. T. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. **J. Immunol. Method.**, v. 160, n. 1, p. 89-96, 1993.

IKEDA, K. et al. Ne-(carboxymethyl)lysine protein adduct in a major immunological epitope in protein modified with advanced glycation em products of the Maillard reaction. **Biochem.** v. 35, p. 8075-8083, 1996.

IMAEDA, A. et al. DNA damage and the effect of antioxidants in streptozotocintreated mice. **Food Chem Toxicol.**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 979-87, 2002.

INAGAKI, S. et al. Isolation of tryptophol as an apoptosis-inducing component of vinegar produced from boiled extract of black soybean in human monoblastic leukaemia U937 cells. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, n. 2, p. 371-379, 2007.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas, 5th edn.** Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2011. Disponível em:<<http://www.idf.org/diabetesatlas>>. Acesso em 22 junho 2017.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **South and Central America**, Brasília, 5jan. 2015. Disponível em:< <http://www.idf.org/diabetes>>. Acesso em: 20 maio. 2017.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, London, v. 444, n. 7121, p. 840-846, Dec. 2006.

KAHN, S. E.; COOPER, M. E.; DEL PRATO, S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. **Lancet**, London, v. 383, n. 9922, p. 1068-1083, 2014.

KARGES, B. et al., Injection of acidic or Neutral Insulin and Pain: A Single-Center, Prospective, Controlled, Noninterventional Study in Pediatric Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. **Clinical Therapeutics**, 28, 2094-2101, 2006.

KERR, M. G. **Exames laboratoriais em Medicina Veterinária: Bioquímica Clínica e Hematologia**. 2. ed. São Paulo: Roca, parte II, p. 81-163, 2003.

KHANDOKER, A. H. et al. QT variability index changes with severity of cardiovascular autonomic neuropathy. **IEEE Trans Inf Technol Biomed.** 16(5):900-6, 2012.

KIKUCHI, S. et al. Glycation - a sweet tempter for neuronal death. **Brain Res. Rev.** v.41, p.306-323, 2003.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. **Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull (Lange)**. 2ª ed. São Paulo: Artmed, 2012.

KLOET, A. D.; KRAUSE, E. G.; WOODS, S. C. The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. **Physiol. Behav.** v.100, n. 5, p. 525-534, 2010.

KNIP, M.; SIMELL, O. Environmental triggers of type 1 diabetes. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, New York, v. 2, n. 7, p. 1-15, 2012.

KOSCHINSKY, T. et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 94(12): 6474-9, 1997.

JENMEY, A. et al. Low-dose acarbose improves glycemic control in NIDDM patients without change in insulin sensitivity. **Diabetes Care**, v. 16, p. 499-502, 1993.

JENSEN R.A. et al. Genomewide association study of retinopathy in individuals without diabetes. **PLoS One.** 8(2): e 54232, 2013.

JESUS, N. Z. T. et al. Hippocratic screening and subchronic oral toxicity assessments of the methanol extract of *Vatairea macrocarpa* heartwood in rodents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 6, p. 1308-1314, 2012

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.

JUNQUEIRA, L. C, CARNEIRO, J. **Sistema imunitário e órgãos linfáticos**. In: Junqueira L. C, Carneiro J. *Histologia básica*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 11ª ed., 2008. 524 p.

LAGRANHA, C. J. et al. Bases moleculares da glomerulopatia diabética. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 51 (6): 901-12, 2007.

LAPOLLA, A.; TRALDI, P.; FEDELE, D. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. **Clin Biochem, Padova**, v. 38, p. 103-115, Oct. 2004.

LARSEN, S. D. et al. Synthesis and Biological Activity of Analogues of the Antidiabetic/Antiobesity Agent 3-Guanidinopropionic Acid: Discovery of a Novel Aminoguanidinoacetic Acid Antidiabetic Agent. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.44, n.8, p.1217–1230, 2001.

LENZEN, S., The mechanisms of alloxan and streptozotocin - induced diabetes. **Diabetologia**, 51, 216-226, 2008.

LERCO, M. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de diabetes mellitus induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 132-42, 2003.

LEWIS, B. S.; HARDING, J. J. The effects of aminoguanidine on the glycation (non-enzymatic glycosylation) of lens proteins. **Exp. Eye Res.**, v. 50, p.463-467, 1990.

LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 126-129, 2002.

LIMA, A. P. **Análise Bioquímica e Histológica da toxicidade do *Symphytum officinale* fitoterápico e homeopático em fígado e rins de ratos**. Dissertação (Mestrado em Biopatologia). Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, São José dos Campos, 2009.

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.

LOPES, C. O. **Composição química e influência do consumo de farinhas de quinoa (*Chenopodium quinoa*) processadas nos níveis glicêmicos e lipídêmicos de ratos wistar**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Lavras, Lavras: UFLA, 2011.

MAGALHÃES, P.; APPELL, H.; DUARTE, J. Involvement of advanced glycation end products in the pathogenesis of diabetes complication: the protective role of regular physical activity. **Eur Rev Aging Phys Act**; 5(1): 17-29, 2008.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A hippocratic screening for pure or drug materials. **Lloydia**, v. 25, p.23-53, 1962.

MALONE, M. H., ROBICHAUD, R. C. The pharmacological evaluation of natura products - General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **J Ethnopharmacol.**, 8: 127-147, 1983.

MANIGRASSO M.B. et al. Unlocking the biology of RAGE in diabetic microvascular complications. **Trends Endocrinol Metab**. 25(1):15-22, 2014.

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. **Phytochemistry**, Stuttgart, v. 2, p. 137-189, 1995.

MARTINS, T. L. C. et al. Synthesis of Guanyldrazones Under Microwave Irradiation. **Synthetic Communications**, v. 34, n. 21, p. 3891–3899, 31 dez. 2004.

MATHEUS, C. E.; LEITER, E. H. Modelos de roedores para o estudo do Diabetes. In KAHN, C. R. et al. **Joslin: Diabetes Melito**. 14a. ed., Porto Alegre: Artmed, cap. 18, p. 305-342, 2009.

MATOS, L. C.; MARTINS, B. Hepatites tóxicas:revisão da literatura. **Ver Soc Port Med Int.**, v. 12 (4), p. 239-258, 2005.

MCVICAR C. M. et al. Role of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in retinal vasodegenerative pathology during diabetes in mice. **Diabetologia**. 2015.

MENSAH-BROWN, E. P. K. et al. Streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats: the role of inflammatory cytokines. **Cytokine**, v. 31, n. 3, p. 180-190, 2005.

MEERWALDT, R. et al. The clinical relevance of assessing advanced glycation end products accumulation in diabetes. **Cardiovasc. Diabetol.**, v.7, n. 29, p.1-8, 2008.

MELLO, A. S.; QUINCOZES-SANTOS, A.; FUNCHAL, C. Correlação entre hiperglicemia e células do SNC, com enfoque na atividade glial. **Rev. Neurocienc.**, 20 (2), 294-301, 2012.

MELO, M. G. D. et al., Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena** 8, vol. 8, num. 9, 2012.

MENDES, R. F. **Avaliação do potencial terapêutico do extrato metanólico dos frutos de *Xylopiá sericea* A. St. – Hil. Frente a eventos relacionados ao processo inflamatório e ao estresse oxidativo**. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2019.

MESSEDER, J. C. et al. Aromatic guanyl hydrazones: Synthesis, structural studies and in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.5, n.24, p. 3079–3084, 1995.

MITCHELL B.A.; BROWN M.H.; SKURRAYR, A. QacA Multidrug Efflux Pump from *Staphylococcus aureus*: Comparative Analysis of Resistance to Diamidines, Biguanidines, and Guanylhydrazones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p.475–477, 1997.

MOULTON, C. D. et al. Meta-analyses of structural regional cerebral effects in type 1 and type 2 diabetes. **Brain imaging and behavior**, London, v. 9, n. 4, p. 651-662, 2015.

MONESI, L. et al. Elevated risk of death and major cardiovascular events in subjects with newly diagnosed diabetes: findings from an administrative database. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**. v. 24, p. 263-270, 2014.

MONNIER, M. N. Intervention against the Maillard reactions in vivo. **Archives of Biochemistry and Biophys**, New York, v. 419, n. 1, p. 1-15, 2003.

MORI, M.D. et al. Temporal response pattern of biochemical analytes in experimental diabetes. **Biotechnol Appl Biochem**; 38:183–91, 2003.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório – Princípios e Interpretações**. Editora Médica Missau, 4 edição, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Method.**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MURALI, R. et al. Antihyperglycemic effect of fraxetin on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochimie**, 95, 1848 e 1854, 2013.

MURUSSI, M. et al. Detecção precoce da nefropatia diabética. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, 52(3):442-51, 2008.

NAGAI, R. et al. Significance of advanced glycation end products in aging-related disease. **Anti-Aging Medicine**. v. 7, p. 112-119, 2010.

NENNA, A. et al. Pharmacologic Approaches Against Advanced Glycation End Products (AGEs) in Diabetic Cardiovascular Disease. **Res Cardiovasc Med**. v. 4, n. 2, e26949, 2015.

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.**, 45 (1), 31-48, 2009.

NICHOLL, I. D.; BUCALA, R. Advanced glycation endproducts and cigarette smoking. **Cell Mol Biol** (Noisy-le-grand). 44 (7):1025-33, 1998.

NILSSON, B. O. Biological effects of aminoguanidine: an update. **Inflammation Review**, Oxford, v. 48, n. 10, p. 9030-9036, 1999.

OBINECHE, E. N. et al. Morphological changes in the rat kidney following longterm diabetes. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 109, p. 241-245, 2001.

OBOH, G.; ADEMILUYI, A. O.; FALOVE, Y. M. Effect of combination on the antioxidant and inhibitory properties of tropical pepper varieties against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities in vitro. **Journal of Medicinal Food**. v. 12, n. 10, p. 1152-1158, 2011.

ODUOLA, T.; ADENIYI, F. A. A.; OGUNYEMI, E. O.; BELLO, I. S.; IDOWU, T. O.; SUBAIR, H. G. Toxicity studies on an un ripe *Carica papaya* aqueous extract: biochemical and haematological effects in Wistar albino rats. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 1, n. 1, p. 001-4, 2007.

OECD. **GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS**: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure, OECD/OCDE 420, 2001.

OECD - **Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing**, 2002.

OLIVEIRA, C. S. et al. Syntesis, Molecular Properties Prediction, and Anti-staphylococcal Activity of N-Acylhydrazones and New 1,3,4-Oxadiazole Derivates. **Molecules**, v.17, p. 5095-5107, 2012.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

OLIVEIRA, M. P. **Análise in vitro da citotoxicidade e proliferação celular em equivalentes de pele humana**. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2009.

OLIVEIRA, M.C.M. **Caracterização do extrato aquoso de alpiste (*Phalaris canariensis* L.) e avaliação dos efeitos antioxidantes e hipoglicemiantes**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, 2015.

ORNES, B. P.; HAMILTON, A. D. The Guanidinium Group in Molecular Recognition: Design and Synthetic Approaches. **Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry**, v. 41, p. 141-147, 2001.

ORTIZ, S.A.R. “**Evaluacion de la actividad hipoglicemiante del extracto acuoso de semillas de alpiste (*Phalaris canariensis*) en ratones (*Mus musculus*) con iperglicemia inducida**” Tesis de Grado Previa La Obtencion Del Titulo de Bioquimico Farmaceutico. Escuela Superior Politecnica de Chimborazo Facultad de Ciencias Escuela de Bioquimica Y Farmacia Riobamba – Ecuador 2012.

ORTOLAN, M. D. D. V. et al. Avaliação Morfométrica dos Túbulos Contorcidos Proximais de Ratos Diabéticos Tratados com Neem (*Azadirachta Indica*, A. Juss) e Estrepto-zotocina 6 Ch. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.18, n. 2, p. 81-100. 2011.

OYEDEMI, S. O. et al. Antidiabetic and haematological effect of aqueous extract of stem bark of *Azadirachta indica* (Smith) on streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 353-358, 2011.

PAN, H.; FU, X.; HUANG, W., Molecular Mechanisms of Liver Cancer. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, 11, 493-499, 2011.

PAPANASTASIOU et al. Design, Synthesis, and Trypanocidal Activity of New Aminoadamantane Derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51; p. 1496–1500, 2008.

PARVING, H. H. Diabetic nephropathy: prevention and treatment. **Kidney Int.**, 60, 2041 – 2055.2001.

PATEL, D.K.; KUMAR, R.; PRASAD, S.K.; SAIRAM, K.; HEMALATHA, S. Antidiabetic and in vitro antioxidant potential of *Hybanthus enneaspermus* (Linn) F. Muell in streptozotocin-induced diabetic rats. **Asian Pac J Trop. Biomed**; 1: 316-322, 2011.

PEPPA, M.; VLASSARA, H. Advanced glycation end products and diabetic complications: a general overview. **Hormones (Athens)**. 4(1):28-37, 2005.

PEREZ-GUTIERREZ, R. M. Inhibition of advanced glycation end-products 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.

PIRES, A. C.; CHACRA, A. R. A evolução da insulinoterapia no diabetes melito tipo 1. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, 52 (2), 268-278, 2008.

PIRES JUNIOR, H.B. et al. Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (MELIACEAE) em camundongos. **Ciência Animal Brasileira**, 13(4): 512-519, 2012.

RACZYNSKA, E. D. et al. Consequences of próton transfer in guanidine. **J. Phys. Org. Chem.**, v. 16, p. 91-106, 2003.

RAHBAR, S. et al. Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. **Clin. Chim. Acta.** v. 301, p. 65–77, 2000.

RAMKISSOON, J. S. et al. Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs. **Asian Pac. J. Trop. Med.** 561-569, 2013.

RAZA, M. et al. Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Scientia Pharmaceutica**, v. 70, n. 2, p. 135-145, 2002.

REPETTO, M. **Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad *in vitro***. 3 ed. Sevilla: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group, p. 303-305, 2002.

RICHARDSON, S. J. et al. Expression of the enteroviral capsid protein VP1 in the islet cells of patients with type 1 diabetes is associated with induction of protein kinase R and downregulation of Mcl-1. **Diabetologia**, New York, v. 56, n. 1, p. 185-193, Jan. 2013.

RICHARDSON, S. J.; HORWITZ, M. S. Is type 1 diabetes “going viral”? **Diabetes**, New York, v. 63, n. 7, p. 2203-2205, 2014.

ROBINSON, A.B. et al. RAGE and tobacco smoke: insights into modeling chronic obstructive pulmonary disease. **Front Physiol.** 3:301, 2012.

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.

RODRIGUES, M. R. et al. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun*; 292: 869-873, 2012.

ROGLIC, G. et al. The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care*. 28(9):2130-5, 2005.

ROOS, M.; SIQUEIRA, R.; CLAUDIO, I., *Abordagem Farmacológica no Diabetes*. São Paulo: Ed. Rubio, 2009.

RUIZ, R.; AVIADO, M. Pharmacology of new antimalarial drugs – 3 guanylhydrazones. *Pharmacology*, v.4, n.1, p.45, 1970.

SACKS, D. B. Carbohydrates. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. **Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics**. St. Louis: Elsevier Saunders, p. 837-901, 2006.

SANTOS, R. F. et al. Changes in insulin receptor tyrosine kinase activity associated with metformin treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metabol.*, v. 21, p. 274-280, 1995.

SANTOS-FILHO, O. A.; FIGUEROA-VILLAR, J. D.; ARAÚJO, M. T. Molecular modeling of the interaction of trypanocidic guanylhydrazones with B-DNA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 7, n. 13, p. 1797–1802, 1997.

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

SARAVANAN, G. et al. Modulatory effect of S-allylcysteine on glucose metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. *J. Funct Foods* 1:336–340, 2009.

SARKHAIL, P. et al. Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: Effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Pharmacol Res*; 56:261–6, 2007.

SARMENTO, P. A. **Avaliação da atividade antidiabética e/ou inibidora sobre os produtos finais de glicação avançada de derivados aminoguanidínicos em ratos diabéticos**. Tese de doutorado, Instituto de Química e Biotecnologia, RENORBIO, Universidade Federal de Alagoas, 2016.

SCHLEICHER, E. D. et al. Chemistry and pathobiology of advanced glycation end products. **Contrib. Nephrol.** v.131, p.1-9, 2001.

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.

SEGAL, P. Efficacy and safety of miglitol therapy compared with glibenclamide in patients with NIDDM inadequately controlled by diet. **Diabetes Care**, v. 20, p. 687 -691 , 1997.

SEMBA, R.D. et al. Fat mass is inversely associated with serum carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, in adults. **J. Nutr.** 141 (9):1726-30, 2011.

SEMBA, R. D. et al. Dietary intake of advanced glycation end products did not affect endothelial function and inflammation in healthy adults in a randomized controlled trial. **J Nutr.** 144(7): 1037-42, 2014.

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.

SHEETZ, M. J.; KING, G. L. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. **JAMA.** 288 (20):2579-88, 2002.

SILVA, A. M. O. et al., Efeito do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos. **Revista de Nutrição**, 24 (1), 121-130, 2011.

SILVA, S. N. et al. The toxicity evaluation of *Syzygium cumini* leaves in rodents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 102-108, 2012.

SILVA, M. B. L.; LOBO, S.; BASTOS, M. F. Avaliação histológica comparativa dos rins de ratos Wistar normais e diabéticos. **Revista Saúde**, v. 9, n. 1, 2015.

SKUDELSKI, T., The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B Cells of the rat pancreas. **Physiology Research**, 50, 536-546, 2001.

SLIMAN, S. et al. Hyperglycemic oxoaldehyde, glyoxal, causes barrier dysfunction, cytoskeletal alterations, and inhibition of angiogenesis in vascular endothelial cells: aminoguanidine protection. **Mol. cell. biochem.**, v. 333, n.1, p. 9-26, 2010.

SODRÉ, F. L.; COSTA J. C. B.; LIMA J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 43 (5), 329-337, 2007.

SOEDAMAH-MUTHU, S. S. et al. The Eurodiab Prospective Complications Study Group: Risk factors for coronary heart disease in type 1 diabetic patients in Europe. **Diabetes Care**, v.27, p.530–537, 2004.

SPERA, K. D. **Avaliação da atividade antioxidante, fotoprotetora e antiglicação dos extratos de folhas e frutos de espécies da Família Annonaceae**. Dissertação de mestrado, da Faculdade de Ciências e Letras de Assis da Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2014.

SUBRAMANI, S. et al. Ameliorating effect of eugenol on hyperglycemia by attenuating the key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. **Mol Cell Biochem**, 385:159–168, 2014.

SUMITA, N. M.; ANDRIOLO, A. Importância da hemoglobina glicada no controle do diabetes mellitus e na avaliação de risco das complicações crônicas. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 44, n. 3, p.169-191, 2008.

SUN, Z. et al. Inhibitory effects of microalgal extrates on the formation of advanced glycation products – AGEs. **Food Chemistry**, v. 120, p. 261-267, 2010.

SUNDBERG, R. J. et al. Cationic antiprotozoal drugs—trypanocidal activity of 2-(40-formylphenyl) imidazo[1,2-A]pyridinium guanylhydrazones and related derivatives of quaternary heteroaromatic-compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.33, n.1, p. 298-307, 1990.

SZABÓ, C. et al. Mercaptoethylguanidine and guanidine inhibitors of nitric-oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 14, p. 9030-9036, 1997.

TAVARES, L.C. QSAR: A abordagem de Hansch. **Química Nova**, v.27, p.631- 639, 2004.

TEO, S. et al. A 90 day oral gavage toxicity study of D-methylphenidate and D, L-methylphenidate in Sprague dawley rats. **Toxicology**, v. 179, p. 183-96, 2002.

THEML, H. et al. **Practical Microscopic and Clinical Diagnosis. Color Atlas of Hematology**. 2 ed., Editora Thieme Stuttgart/New York, 2001.

THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. Caps 21, 22, 23 e 26. São Paulo: Roca, 2007.

THORNALLEY, P. J. A.; YUREK-GEORGE, O. K. Argirov, **Biochem. Pharmacol.**, v. 60, p. 655–665, 2000.

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

THORNALLEY, P. J. A. Dicarbonyl Intermediates in the Maillard reaction. **New York Academy of Sciences**, 1043, 111-117, 2005.

ULRICH, P.; CERAMI, A. Trypanocid 1,3-arylene diketone bis (guanylhydrazone). Structure-activity relationships among substituted and heterocyclic analogues. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 27, p. 35-40, 1984.

URIBARRI, J. et al. Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. **Ann N Y Acad Sci**. 1043:461-6, 2005.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: Estratégias após a “Era do Teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 93-98, 2006.

VALENTE, T. et al. Immunohistochemical study of semicarbazide-sensitive amine oxidase/vascular adhesion protein-1 in the mellitus. **Journal of Neuroscience Research**, 90, 1989-1996, 2012.

VÁZQUEZ, G. R.; GUERRERO, G. A. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Tissue & Cell**, v. 39, n. 3, p. 151-160, 2007.

VITAL, F. A. C. Avaliação da toxidade aguda e das atividades citotóxica, antimicrobiana e antiinflamatória de 7-aryl-2,3-diidrothiazolo[3,2- $\alpha$ ] pirimidin-5-ona-6-carbonitrila. **Latin American Journal Pharmacy**, v. 28, p. 507-512, 2009.

VIVAS, W. L. P. Manual prático de hematologia, 2014. Disponível em: <  
[www.aa.med.br/upload/biblioteca/manual20%de20%hematologia.pdf](http://www.aa.med.br/upload/biblioteca/manual20%de20%hematologia.pdf) . Acessado em 20 de janeiro de 2019.

WALZER, P. D. et al. Guanylhydrazones in therapy of *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunosuppressed rats. **Antimicrob Agents Chemother**, v.38, p. 2572-2576, 1994.

WAJCHENBERG, B. L.  $\beta$ -Cell Failure in Diabetes and Preservation by Clinical treatment. **Endocrine Reviews**, 28, 187-218, 2007.

WANG, X. et al. Attenuation of Hypertension Development by Aminoguanidine in Spontaneously Hypertensive Rats: Role of Methylglyoxal. **The American Journal of Hypertensio**. 20: 629–636. 2007.

WEYER, C. et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Stanford, v. 86, n. 5, p. 1930-1935, 2001.

WICENIEWSKI, K. et al. Influence of NMDA, a potente agonist of glutamate receptors, on behavioral activity in 4-week streptozotocin-induced diabetic rats. **Polish Journal of Pharmacology**, 55, 345-351, 2003.

WHITING, D. R. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes research and Clinical Practice**.v.94, p. 311-321, 2011.

Xie, J. et al. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). **Cell Signal**. 25(11):2185-97, 2013.

YADAV, U. C.; MOORTHY, K.; BAQUER, N. C. Combined treatment of sodium orthovanadate and *Mormodica charantia* fruit extract prevents alterations in lipid profile and lipogenic enzymes in alloxan diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 268, n. 1, p. 111–120, Jan. 2005.

YAKUBU, M. T.; AKANJI, M. A.; OLADIJI, A. T. Alterations in serum lipid profile of male rats by oral administration of aqueous extract of *Fadogia agrestis* stem. **Res. J. Med. Plant.**, v. 2, p. 66-73, 2008.

YONEKURA H. Novel Splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and putative roles in diabetes-induced vascular injury. **Biochem. J.**, Kanazawa, v. 370, p. 1097-1109, 2003.

YOSHIUCHI, K. T et al. Glycated albumin is a better indicator for glucose excursion than glycated hemoglobina in type 1 and type 2 diabetes. **Endocr. J.**, v. 55, p. 503-507, 2008.

ZATTA, D.T. et al. Estudo da atividade antibacteriana contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e da Toxicidade aguda das folhas da *Jacaranda decurrens*. **Latin American Journal of Pharmacy**, 28(4):485-489, 2009.

ZAUPA, C. et al. Estudo toxicológico pré-clínico (agudo e sub-agudo) do produto Propovit Plus® em roedores. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 4, p. 265-72, 2002.

ZHANG, H. Z. et al. Discovery and structure-activity relationships of (2-arythio)benzylideneamino)guanidines as a novel series of potente apoptosis inducers. **Bioorganic & Med. Chemistry**, v. 17, p. 2852-8, 2009.

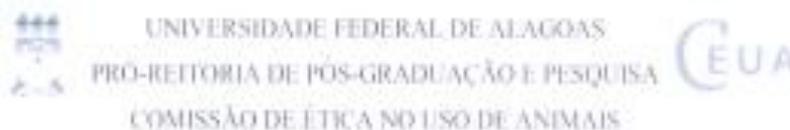
ZHANG, Y. et al. New Antiglycative Compunds from Cumin (*Cuminum cyminum*) Spice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63, n. 46, p. 10097-10102, 2015.

ZHU, J. Y. et al. The traditional Chinese herbal compound rocaglamide preferentially induces apoptosis in leukemia cells by modulation of mitogen-activated protein kinase activities. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 8, p. 1839-1846, 2007.

# ANEXO



## ANEXO - Parecer da Comissão Ética no uso de animais da Universidade Federal de Alagoas

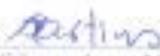


## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do potencial antiglicante e atividade antidiabética de novas aminoguanidinas e derivados planejados no modelo de Diabetes induzida pela estreptozotocina", registrada com o nº 100/2016, sob a responsabilidade da pesquisadora **Profa. Patrícia de Albuquerque Sarmiento**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 17.03.2017.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa científica
Vigência da autorização	02.06.2017 a 01.12.2018
Espécie linhagem/raça	Rato heterogêneo / Wistar
Nº de animais	123
Peso idade	160 a 200g
Sexo	Machos
Origem/Local de manutenção	Biotério Central da UFAL / Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da ESENFAR/UFAL

Maceió, 19 de abril de 2017.

  
 Prof. Dr. Silvana Ayres Martins  
 Coordenadora CEUA/UFAL

Prof. Dr. Silvana Ayres Martins  
 Coordenadora da Comissão de  
 Ética no uso de Animais  
 SUAPE 1120004