



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC

NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS – NPDM

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA – PPGF

EFEITO DE UM NOVO INIBIDOR DOS CANAIS CO-TRANSPORTADORES
SÓDIO/GLICOSE (SGLT2) NA HOMEOSTASIA DA GLICOSE EM DIFERENTES
MODELOS EXPERIMENTAIS

LANDERSON LOPES PEREIRA

FORTALEZA – CE

2023

LANDERSON LOPES PEREIRA

EFEITO DE UM NOVO INIBIDOR DOS CANAIS CO-TRANSPORTADORES
SÓDIO/GLICOSE (SGLT2) NA HOMEOSTASIA DA GLICOSE EM DIFERENTES
MODELOS EXPERIMENTAIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia de Produtos Naturais.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marisa Jadna Silva Frederico Canuto

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Nylane Maria Nunes de Alencar

FORTALEZA – CEARÁ

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P492e Pereira, Landerson.

Efeito De Um Novo Inibidor Dos Canais Co-Transportadores Sódio/Glicose (SGLT2) Na Homeostasia Da Glicose Em Diferentes Modelos Experimentais / Landerson Pereira. – 2023.

130 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Marisa Jadna Silva Frederico.

Coorientação: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.

1. Diabetes Mellitus. 2. Inibidores do SGLT2. 3. Resistência à Insulina. I. Título.

CDD 615.1

LANDERSON LOPES PEREIRA

EFEITO DE UM NOVO INIBIDOR DOS CANAIS CO-TRANSPORTADORES
SÓDIO/GLICOSE (SGLT2) NA HOMEOSTASIA DA GLICOSE EM DIFERENTES
MODELOS EXPERIMENTAIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Farmacologia do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia de Produtos Naturais.

Aprovada em: 04 de Março de 2024

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Fátima Regina Mena Barreto Silva

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Lídia Moreira Lima

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Leonardo Reis Silveira

Universidade Estadual de Campinas

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus e aos meus mentores e guias espirituais que me conduziram ao longo dessa breve jornada, breve, mas intensa, que não somente me fez crescer como profissional, mas também como pessoa, por todas as lágrimas e sorrisos que colecionei ao longo do caminho, das lágrimas absorvi o aprendizado e dos sorrisos guardei as memórias que ficarão para sempre em meu coração.

Quero agradecer à minha família por sempre estar ao meu lado, me apoiando de todas as formas possíveis. Fátima, minha mãe, o grande amor da minha vida, esse título é para você, é seu, porque esse sucesso só foi possível devido a todo o seu esforço, dias e noites trabalhados para sempre poder me dar o melhor possível, sempre me encorajando a estudar e nunca desistir, pois como você mesma sempre me disse: “meu maior concorrente sou eu mesmo”. Leandro, meu pai, que sempre esteve comigo no meu coração, me ajudou das melhores maneiras possíveis durante a graduação e a pós-graduação, obrigado pelas conversas e exemplos de humildade que o senhor me ensinou, sempre levarei comigo suas palavras de amor. Dona Maria Uchoa, minha amada avó, obrigado simplesmente por existir na minha vida, muitas vezes nem sequer entendia a importância do caminho que eu estava seguindo, porém sempre me disse: “Se for pro seu melhor, que Deus te abençoe imensamente”, acho que não teria chegado tão longe sem suas orações. E, obrigado à Kiara, meu grande amor de quatro patas, você é a coisa mais importante da vida do seu pai, chegar em casa cansado e ter você segurando um pneu na boca e sempre feliz em me ver é a melhor sensação de todos os meus dias. Eu amo vocês.

Quero agradecer ao meu namorado, Marcos Faustino, sem você para me acalmar em todos os dias que cheguei chorando porque um experimento deu errado ou vibrando porque obtive bons resultados, foi no teu abraço que eu encontrei meu abrigo. Você fez parte dessa conquista junto comigo e espero que faça parte de todas as próximas conquistas. Obrigado por apenas me ouvir quando eu quis desabafar e por me puxar para a realidade quando eu precisava ouvir. Eu amo você.

Sacha, Thaís e Rayna, minhas irmãs dadas por Deus a mim, obrigado por sempre estarem próximas em vários momentos da minha vida, sempre se preocupando, cuidando de mim, vocês sempre foram peças chave na minha vida, pois como eu sempre digo, meus amigos são a família que eu escolhi ter.

Por falar nesta família, As Inês, meu grupo de amigos da faculdade, sem vocês não teria sequer suportado o caminho da graduação, quem dirá finalizar esta etapa. Faço questão de citar cada nome em forma de agradecimento: Ian, João Pedro, Beatriz, Thayane, Lara, Ingrid, Anderson, Helaynne, Carol, Allyson, Daniel, Brenda, OBRIGADO! Vocês foram e são meu alicerce. A cada vez que eu estava feliz, chateado, triste, eufórico, vocês sempre me deram os melhores conselhos e me policiaram quando eu errei. Obrigado por me tornar um profissional e um ser humano melhor.

Aos meus amigos que o NPDM me deu, agradeço do fundo do coração ao Rigoberto e Karen, em especial, por cada experimento que realizamos juntos, pelas conversas jogadas foras, pelas vezes em que ficamos até as 10 h da noite para obter nossos resultados, vocês foram minha âncora dentro e fora do NPDM. Obrigado Gabriela, Caio, Breno, Jean, Morgana, Victor, Patrick, Vicente e Marylane por estarem comigo ao longo destes dois anos, cada um de vocês tem um lugar especial guardado no meu coração. Obrigado Gabriela, a melhor médica veterinária que o NPDM poderia ter. Obrigado por todo o carinho e conversas que irei sentir muita falta, você é um ser humano de muita luz e agradeço a Deus por ter tido o prazer de compartilhar momentos com você. Obrigado Pedro Everson pela amizade ao longo desses anos, desde a graduação, pela força e apoio no mestrado e por toda a ajuda que você me deu, sempre serei muito agradecido. Além de agradecer, quero desejar o melhor dos caminhos em suas jornadas e que todos tenhamos ótimos frutos a colher pela frente.

Não tem como eu terminar os meus agradecimentos, sem mencionar dois grandes professores Pedro Filho e Marisa Frederico. Ao Pedro Filho, um dos professores mais inteligentes que tive o prazer de conhecer, muito obrigado por todas as conversas e por me fazer gostar de bioinformática, você foi e é minha inspiração. E à pessoa mais importante deste mestrado, minha orientadora Marisa Frederico, eu tenho tanto a te agradecer, por confiar em mim desde o início, sempre ao meu lado, sendo uma luz no meu caminho, sua amizade e seu carinho são lembranças que quero levar para toda a minha vida. Obrigado por sempre me receber com um sorriso no rosto e um abraço, mesmo quando as coisas não iam bem, você sempre enxergou um caminho em que seguíamos para fazer dar certo. Meu desejo a você é que sempre continue sendo esse ser humano incrível que és. Obrigado ao Laboratório de Farmacologia Bioquímica (LFB), coordenado pela prof^a.

Dr^a. Nylane Maria Nunes de Alencar por me permitir realizar minha pesquisa e alcançar um dos meus sonhos, serei sempre grato. E, por fim, mas não menos importante, agradeço a CAPES por financiar este projeto e meu sonho.

“Seu valor não diminui com base na
incapacidade de alguém de enxergá-lo”

Autor desconhecido

RESUMO

Introdução: O Ministério da Saúde aponta o Brasil como o 5º país com maior incidência de diabetes no mundo. Os tratamentos existentes para a doença possuem diversas limitações. Os inibidores do SGLT2 surgem com um mecanismo de ação independente da insulina, porém o tratamento é limitado devido ao aumento leve a moderado na incidência de infecções genitourinárias, dentre outras complicações menores. Desta forma, surge a importância de se investigar novas moléculas, de maneira a aperfeiçoar o tratamento cada vez mais. **Objetivo:** O presente estudo teve como objetivo determinar a atividade de um composto quimicamente sintetizado, LASSBio-1986, inibidor dos canais de sódio-glicose SGLT2, *in silico*, na regulação do metabolismo da glicose e em animais resistentes a insulina. **Metodologia:** A análise *in silico* se deu a partir de softwares especializados, onde a farmacocinética, toxicologia e farmacodinâmica preditiva foram avaliadas a partir do SwissADME, ProTox-II e DockThor e ClusPro, respectivamente. Experimentos em camundongos da linhagem C57BL/6 avaliaram o efeito do LASSBio-1986 na regulação da glicemia, níveis de glicogênio, estresse oxidativo, níveis de citocinas, resistência à insulina e expressão gênica de GLUT-4. **Resultados:** Em um modelo *in silico*, o composto LASSBio-1986 apresentou boa farmacocinética, com equilíbrio entre hidro e lipofilicidade adequado, além de impossibilidade de permear a barreira hemato-encefálica. No que se refere à toxicologia, o composto apresenta alto nível de segurança, entretanto com possibilidade de ação mutagênica e imunotóxica, exigindo testes *in vivo* crônicos para verificar tais dados. No TTG a dose de 3mg/kg por via i.p. reduziu notavelmente os níveis de glicose após 15, 30 e 60 min no teste de tolerância a glicose. LASSBio-1986 3 mg/kg aumentou o nível de glicogênio no fígado e músculo e elevou os níveis de glutatona no fígado, músculo e rins. Houve redução de substâncias ácidas reativas no fígado e rim. O composto reduziu os níveis de citocina pró-inflamatórias em tecidos musculares, hepático e renais. Além disso, o LASSBio-1986 3 mg/kg se mostrou eficaz no aumento da sensibilidade à insulina. O LASSBio-1986 possui notável ação na regulação da glicemia e na resistência à insulina, além de reverter e aumentar os níveis de mRNA de GLUT-4.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus; Inibidores do SGLT2; Resistência à Insulina.

ABSTRACT

Introduction: The Ministry of Health identifies Brazil as the 5th country with the highest incidence of diabetes in the world. The existing treatments for the disease have various limitations. SGLT2 inhibitors emerge with an insulin-independent mechanism of action, but the treatment is limited due to a slight to moderate increase in the incidence of genitourinary infections, among other minor complications. Thus, the importance of investigating new molecules arises, in order to refine treatment further. **Objective:** The present study aimed to determine the activity of a chemically synthesized compound, LASSBio-1986, an inhibitor of the SGLT2 sodium-glucose channels, *in silico*, in the regulation of glucose metabolism and in insulin-resistant animals. **Methodology:** The *in silico* analysis was conducted using specialized software, where predictive pharmacokinetics, toxicology, and pharmacodynamics were evaluated based on SwissADME, ProTox-II, DockThor, and ClusPro, respectively. Experiments in C57BL/6 strain mice evaluated the effect of LASSBio-1986 on blood glucose regulation, glycogen levels, oxidative stress, cytokine levels, insulin resistance, and GLUT-4 gene expression. **Results:** In an *in silico* model, the LASSBio-1986 compound showed good pharmacokinetics, with a balance between hydro and lipophilicity being adequate, in addition to the impossibility of permeating the blood-brain barrier. Regarding toxicology, the compound has a high level of safety, however with the possibility of mutagenic and immunotoxic action, requiring chronic *in vivo* tests to verify such data. In the GTT, the dose of 3mg/kg via *i.p.* notably reduced glucose levels after 15, 30, and 60 minutes in the glucose tolerance test. LASSBio-1986 3 mg/kg increased the level of glycogen in the liver and muscle and elevated glutathione levels in the liver, muscle, and kidneys. There was a reduction in reactive acid substances in the liver and kidney. The compound reduced the levels of pro-inflammatory cytokines in muscle, hepatic, and renal tissues. Furthermore, LASSBio-1986 3 mg/kg proved to be effective in increasing insulin sensitivity. LASSBio-1986 has remarkable action in regulating blood glucose and insulin resistance, in addition to reversing and increasing mRNA levels of GLUT-4.

Keywords: Diabetes Mellitus; SGLT2 Inhibitors; Insulin Resistance.

LISTA DE ABREVIações

Aa - aminoácido

ADA – Associação Americana de Diabetes

ADME – Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

AGL – Ácido Graxo Livre

ANOVA – Análise de Variância

ASC – Área Sob a Curva

AVC – Acidente Vascular Cerebral

BHE – Barreira Hematoencefálica

BOILED-Egg – Modelo de Estimativa de Absorção Intestinal e Cerebral

CEUA – Comitê de Ética e Uso de Animais

CT – Colesterol Total

DIB – Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes

DL – Dose Letal

DM – Diabetes *mellitus*

DM – Diabetes *mellitus* (Tipos 1 e 2)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DRC – Doença Renal Crônica

DTNB – Reagente de Ellman

DVC's – Doenças Cardiovasculares

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EGP – Produção Endógena de Glicose

FDA – Agência Regulação de Administração de Alimentos e Medicamentos

FG – Gangrena de Fournier

GHS – Sistema Global Harmonizado

GIP – Polipeptídeo Insulínico Dependente de Glicose

GLP-1 – Peptídeo 1 Glucagon-like

GLUT – Transportador de Glicose (Tipos 2 e 4)

GSH – Glutathione Peroxidase Reduzida

GSSB – Glutathione Peroxidase Oxidada

HDL - Colesterol de Lipoproteína de Alta Densidade

IA – Inteligência Artificial

IAPP – Polipeptídeos Amilóides de Ilhota

IC – Insuficiência Cardíaca

IDF – Federação Internacional de Diabetes

IGF – Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IMC – Índice de Massa Corporal

ITT – Teste de Tolerância à Insulina

kITT – Constante de Decaimento da Glicose

LASSBio – Laboratório de Análise e Síntese de Substâncias Bioativas

LDL – Colesterol de Lipoproteína de Baixa Densidade

NADPH – Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina

NO – Óxido Nítrico

NPDM – Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamento

PAHO – Organização Pan-Americana de Saúde

PAINS – Composto de Interferência em Pan-Ensaios

PEPCK - Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase

P-gp – Glicoproteína P

PIB – Produto Interno Bruto

PNS – Pesquisa Nacional de Saúde

RD – Retinopatia Diabética

RE – Retículo Endoplasmático

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SGLT – Co-transportador de Sódio/Glicose (Tipos 1 a 6)

SMILES – Sistema Simplificado de Linha de Entrada Molecular

SNC – Sistema Nervoso Central

TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TCA – Ácido Tricloroacético

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

TG – Triglicerídeos

TGF- β – Fator de crescimento transformador beta

TGI – Trato Gastrointestinal

TMP – Trimetoxipropano

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TOTG – Teste Oral de Tolerância à Glicose

TPSA – Área de Superfície Polar Topológica

TTG – Teste de Tolerância à Glicose

UFC – Universidade Federal do Ceará

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

VLDL – Colesterol de Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

WHO – Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Pessoas com Diabetes no Brasil, em milhares.

Figura 2 – Canais Co-Transportadores de Sódio/Glicose.

Figura 3 – Transporte de Glicose através dos canais SGLT2.

Figura 4 – Rota sintética empregada para a síntese da *N*-acilidrazona LASSBio-1986.

Figura 5 – Propriedades Físico-Químicos do composto LASSBio-1986 segundo SwissADME e pkCSM.

Figura 6 – Radar de Biodisponibilidade da molécula LASSBio-1986 apresentado pelo SwissADME

Figura 7 – Propriedades preditivas relacionadas à absorção do composto LASSBio-1986 fornecidas por SwissADME e pkCSM

Figura 8 – Propriedades preditivas relacionadas à distribuição do composto LASSBio-1986 fornecidas por SwissADME e pkCSM

Figura 9 – Propriedades preditivas relacionadas ao metabolismo do composto LASSBio-1986 fornecidas por SwissADME e pkCSM

Figura 10 – Propriedades preditivas relacionadas ao metabolismo do composto LASSBio-1986 fornecidas por pkCSM

Figura 11 – Propriedades preditivas da molécula LASSBio-1986 relacionadas ao seu potencial estrutural como fármaco e às suas características químicas no âmbito medicinal apresentadas pelo Swiss ADME

Figura 12 – Predição de ligação ao alvo através do *Swiss Targets Prediction*

Figura 13 – Toxicidade Oral Preditiva do composto LASSBio-1986

Figura 14 – Valor da DL₅₀ do composto LASSBio-1986 em comparação com os valores de DL₅₀ das moléculas “equivalentes” do banco de dados do ProTox II

Figura 15 – Relatório de Modelo de Toxicidade do composto LASSBio-1986

Figura 16 – Interação Molécula-Proteína SGLT1

Figura 17 – Interação Molécula-Proteína SGLT2

Figura 18 – Representação gráfica da rede de interações proteicas para as proteínas SGLT2 (SLC5A2) usando STRING v11.5.

Figura 19 – Re-docking proteína-proteína.

Figura 20A – Efeito da molécula LASSBio-1986 (3 mg/kg) e da Dapagliflozina (3 mg/kg) no teste de tolerância a glicose.

Figura 20B. Área sobre a curva da glicemia no grupo tratado com LASSBio-1986 (3 mg/kg) e com Dapagliflozina (3 mg/kg) no teste de tolerância a glicose.

Figura 21 – Efeito do LASSBio-1986 (3 mg/kg) sobre o conteúdo de glicogênio muscular e hepático

Figura 22 – Efeito do LASSBio-1986 sobre os níveis de GSH em tecidos muscular, hepático e renal.

Figura 23 – Efeito do LASSBio-1986 sobre os níveis de TBARS em tecidos muscular, hepático e renal.

Figura 24 – Níveis de IL-1 β em tecidos musculares (A), hepático (B) e renais (C) de camundongos C57Bl/6.

Figura 25 – Níveis de IL-6 em tecidos musculares (A), hepático (B) e renais (C) de camundongos C57Bl/6.

Figura 26 – Níveis de IL-10 em tecidos musculares (A), hepático (B) e renais (C) de camundongos C57Bl/6.

Figura 27 – Níveis de TNF- α em tecidos musculares (A), hepático (B) e renais (C) de camundongos C57Bl/6.

Figura 28 – Teste de Indução de Resistência à Insulina com Dexametasona em camundongos C57Bl/6.

Figura 29 – Expressão gênica relativa de GLUT-4 em células musculares de camundongos C57Bl/6 submetidos ao ITT.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Níveis de valores para diagnóstico de Diabetes.

Quadro 2 – Medicamentos e Classes utilizados no tratamento de DM2.

Quadro 3 – Interações polares entre as proteínas selecionadas para o re-docking e a proteína SGLT2.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Efeito do composto LASSBio-1986 e da Dapagliflozina na glicemia em jejum de camundongos C57Bl/6.

Tabela 02 – Atividade antioxidante do composto LASSBio-1986 pelo método ABTS e DPPH.

Tabela 03 – Efeito do composto LASSBio-1986 e no perfil lipídico de camundongos C57Bl/6.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo Geral	23
2.2. Objetivos Específicos.....	23
3. REFERENCIAL TEÓRICO	23
3.1. Definição do Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 2 (DM2).....	24
3.2. Fatores de Risco	24
3.3. Fisiopatologia do DM2.....	24
3.3.1. Ação da Insulina e Resistência à Insulina	26
3.4. Quadro clínico de indivíduos com DM2	27
3.5. Epidemiologia do DM2.....	28
3.5.1. Dados Epidemiológicos do DM2 no Brasil	29
3.6. Diagnóstico de DM2.....	30
3.7. Tratamentos Disponíveis para DM2	31
3.8. Papel fisiológico dos canais SGLT.....	34
3.9. Fármacos Inibidores dos Canais SGLT	36
3.9.1. Fármacos inibidores de canais SGLT1	37
3.9.2. Fármacos inibidores de canais SGLT2	38
3.9.3. Avanços nas pesquisas com fármacos inibidores de canais SGLT2	
39	
3.10. Design de novos fármacos e Estruturas Análogas.....	40
4. METODOLOGIA.....	41
4.1. Obtenção dos Inibidores de Canais SGLT2.....	41
4.2. Análises <i>in Silico</i>	43
4.2.1. Obtenção do Canonical SMILES.....	43

4.2.2.	Predição dos Parâmetros Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME).....	43
4.2.3.	Predição da toxicidade <i>in silico</i>	44
4.2.4.	Ensaio de Docking Molecular (MD)	44
4.2.5.	Rede de Interação Proteína-Proteína	45
4.2.6.	Re-Docking	45
4.3.	Testes In Vivo	45
4.3.1.	Experimentação animal.....	45
4.3.1.1.	Teste de tolerância à glicose (TTG).....	46
4.3.1.2.	Análise de Glicogênio	47
4.3.1.3.	Avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS e DPPH..	47
4.3.1.4.	Avaliação do estresse oxidativo em amostra de fígado, músculo e rim. 48	
4.3.1.4.1.	Determinação da concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)	48
4.3.1.4.2.	Determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARs).....	48
4.3.1.5.	Dosagem de citocinas	49
4.3.1.6.	Teste de Resistência à Insulina com Dexametasona	49
4.3.1.7.	Análise do Perfil Lipídico	50
4.3.1.8.	Análise da Expressão Gênica de GLUT-4 por RT-PCR.....	50
4.4.	Análise Estatística	51
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1.	Testes <i>in silico</i>	52
5.1.1.	Farmacocinética	52
5.1.1.1.	Parâmetros Físico-Químicos	52
5.1.1.2.	Absorção	56
5.1.1.3.	Distribuição	57

5.1.2.	Alvos moleculares fornecidos pela plataforma “ <i>Swiss Targets Prediction</i> ”	65
5.1.3.	Toxicidade	67
5.1.3.1.	ProTox-II	67
5.1.4.	Ensaio de Docking Molecular (MD)	71
5.1.1.	Rede de Interação Proteína-Proteína	80
5.2.	Teste Químico	85
5.2.1.	Avaliação da atividade antioxidante da molécula LASSBio-1986 pelo método ABTS e DPPH.....	85
5.3.	Testes <i>in vivo</i>	86
5.3.1.	Teste de Tolerância à Glicose em camundongos C57Bl/6 (TTG) ..	86
5.3.2.	Determinação do conteúdo de glicogênio.....	89
5.3.3.	Avaliação do estresse oxidativo em tecidos muscular, hepático e renal. 92	
5.3.3.1.	Avaliação dos níveis de GSH.....	92
5.3.3.2.	Avaliação dos níveis de TBARS	94
5.3.4.	Avaliação do Perfil Inflamatório	96
5.3.5.	Teste de Indução de Resistência à Insulina com Dexametasona	102
5.3.6.	Análise do Perfil Lipídico	104
5.3.7.	Expressão Gênica de GLUT-4.....	107
6.	CONCLUSÕES	110
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

1. INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos variados vêm demonstrando que mudanças relacionadas ao padrão de alimentação em todo o mundo associado ao sedentarismo compõem um dos fatores mais importantes para o aumento de peso que, por sua vez, está associado ao Diabetes Mellitus 2 (DM2). O Ministério da Saúde aponta o Brasil como o 5º país com maior incidência de diabetes no mundo (com cerca de 16,8 milhões de adultos de 20 a 79 anos), sendo a crescente urbanização e mudanças nos hábitos de vida creditados com os principais responsáveis por tais dados, visto que em áreas rurais a prevalência é menor (BVSMS, 2022).

A Federação Internacional de Diabetes (IDF) forneceu um dado quantitativo sobre a estimativa global de adultos diabéticos não diagnosticados em 2021, revelando variações entre 24,2% e 53,6% a depender da localidade, um dado preocupante por demonstrar que os dados reais podem ser muito maiores do que as estimativas (OGURTSOVA *et al.*, 2022). Ademais, os tratamentos existentes para o cuidado de doenças metabólicas em geral, incluindo o diabetes, a obesidade e as morbidades associadas, possuem diversas limitações (CEFALU *et al.*, 2015) o que caracteriza o caráter de prioridade em investimentos nesta área.

O lançamento de uma nova classe de fármacos – inibidores do canal co-transportador de sódio-glicose 2 (SGLT2) – foi aprovado, surgindo como um mecanismo de ação independente da insulina, contando com a dapagliflozina e a canagliflozina, como exemplos de fármacos comercialmente disponíveis. Estes medicamentos apresentam vantagens como a diminuição da hemoglobina glicada, diminuição da glicose em jejum e pós-prandial, diminuição do peso, melhoria da hiperuricemia (se presente), redução da pressão sanguínea e prevenção de complicações micro e macrovasculares (SINGH *et al.*, 2018).

A agência regulatória europeia EMEA (do inglês, *European Medicines Agency*) aprovou o uso terapêutico da dapagliflozina (BAUER; BRÖNSTRUP, 2013) em 2012 e a agência americana FDA aprovou apenas em 2014. A canagliflozina (TAHRANI *et al.*, 2013) foi o primeiro inibidor seletivo de SGLT2 a ser aprovado pelo FDA para uso terapêutico, o que ocorreu no ano de 2013 (BAUER *et al.*, 2014). O mecanismo de ação dos inibidores de SGLT2 consiste em inibir o canal SGLT2 impedindo a reabsorção de glicose, resultando em um efeito máximo de excreção

renal de cerca de 80 g/dia, o que representa menos de 50% da glicose filtrada diariamente (KATZUNG & TREVOR, 2017).

A limitação no tratamento se deve ao aumento leve a moderado na incidência de infecções genitourinárias (AGGARWAL *et al*, 2019). Entretanto, essa nova e promissora classe de fármacos, ainda, se apresenta como uma opção recente e pouco estudada para o tratamento do DM2. Desta forma, surge a importância de se investigar mais a fundo o mecanismo de ação dessas moléculas, bem como de que maneira elas podem ser mais “aperfeiçoadas”, a fim de reduzir ou, mesmo, eliminar estes efeitos adversos (DA CONCEIÇÃO *et al.*, 2017).

O presente projeto visa estudar novos análogos quimicamente sintetizados dos canais SGLT2 como novas formas terapêuticas para o tratamento do diabetes melito tipo 2. O projeto visa avaliar melhoramentos nos mecanismos de ação, alvos adicionais de ação terapêutica e redução dos efeitos adversos relatados atualmente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar a atividade do composto LASSBio-1986 – inibidor dos canais SGLT2 – através de predições *in silico* e *in vivo* – no metabolismo da glicose e na resistência à insulina em camundongos C57Bl/6.

2.2. Objetivos Específicos

- 2.2.1. Avaliar as características físico-químicas, farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicológicas da molécula, através de predições *in silico*, por meio de softwares especializados;
- 2.2.2. Avaliar as interações molécula-proteína (alvo) e proteína-proteína em rede de interação *STRING* em análises de *docking molecular* e *re-docking*;
- 2.2.3. Investigar efeito anti-hiperglicêmico do inibidor dos canais SGLT2 – LASSBio-1986 no teste de tolerância à glicose (TTG);
- 2.2.4. Avaliação do efeito do LASSBio-1986 sobre o conteúdo de glicogênio muscular e hepático pós TTG;
- 2.2.5. Avaliação do efeito do LASSBio-1986 na proteção contra o dano oxidativo (GSH) em tecidos muscular, hepático e renal de animais hiperglicêmicos e tratados pós TTG;
- 2.2.6. Avaliação do efeito do LASSBio-1986 sobre o estresse oxidativo a partir de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em tecidos muscular, hepático e renal de animais hiperglicêmicos e tratados pós TTG;
- 2.2.7. Avaliação do efeito do LASSBio-1986 sobre o estado inflamatório através da dosagem de citocinas (IL-1beta, IL-6, IL-10, TGF-beta e TNF-alfa) em tecidos muscular, hepático e renal de animais hiperglicêmicos e tratados pós TTG;
- 2.2.8. Avaliação da atividade do LASSBio-1986 sobre a capacidade de reverter a resistência à insulina pelo teste de tolerância a insulina (ITT);
- 2.2.9. Caracterizar a resposta do inibidor LASSBio-1986 sob os níveis de triglicerídeos séricos (TG), colesterol total (CT) e colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL) em animais resistentes a insulina;
- 2.2.10. Analisar a capacidade do inibidor LASSBio-1986 em aumentar a expressão gênica de GLUT-4 em tecido muscular de animais submetidos ao ITT.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Definição do Diabetes *Mellitus* Tipo 2 (DM2)

O DM2 é determinado pela desregulação do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, que resulta na secreção diminuída de insulina, resistência à insulina ou uma combinação de ambos, além de **uma deterioração progressiva** da tolerância à glicose, anterior a uma diminuição relativa na secreção de insulina por falha nas células β do pâncreas, associadas ao aumento de peso, estilo de vida sedentária e envelhecimento (DEFRONZO *et al.*, 2015; WHO, 2023).

Além disto, há uma forte influência genética, consistindo em uma doença com patogênese multifatorial, resultando em um quadro de hiperglicemia, que ao passar do tempo lesiona diversos tecidos como nervos, vasos, olhos, rins e coração, dentre outros. (CHATTERJEE *et al.*, 2017).

3.2. Fatores de Risco

Diversas características, comportamentos e/ou condições aumentam a probabilidade de um indivíduo a desenvolver o DM2, dentre os quais, pode-se destacar, o histórico familiar, visto que indivíduos que possuem parentes com histórico de DM2, tendem a desenvolver esta patologia de maneira precoce (GEETHA *et al.* 2017); a etnia, o que está relacionado não apenas diretamente às características genéticas das populações, mas também à cultura e ao estilo de vida destas (GOFF, 2019; SNIJDER *et al.*, 2017); a obesidade e gordura abdominal, por se caracterizarem como um processo inflamatório crônico, afetando de forma direta diversas vias de sinalização do metabolismo lipídico e da glicose, que promovem uma maior resistência à insulina (AMPOFO *et al.*, 2020; KLEIN *et al.*, 2022).

Além dos fatores supracitados, o hábito de fumar, pois a nicotina exerce efeitos negativos na função e na massa das células β das ilhotas pancreáticas e nas funções do trato gastrointestinal e sistema nervoso, além de favorecer um estado inflamatório (YUAN *et al.*, 2019); e outros, como a síndrome de ovários policísticos (ZHU *et al.*, 2021) e o uso de corticosteróides (ANDERSEN *et al.*, 2019).

3.3. Fisiopatologia do DM2

O DM2 é caracterizado como um distúrbio metabólico crônico causado por uma desregulação na secreção de insulina concomitante à uma resistência

periférica a este hormônio, culminando em quadros de hiperglicemia e dislipidemia (ADA, 2014). Enquanto, o DM1 corresponde uma completa falha na produção de insulina e é predominante em indivíduos mais jovens, o DM2 responde a 85% dos casos de diabetes e pode ocorrer em qualquer idade (GAW *et al.*, 2015).

As células β pancreáticas são responsáveis por sintetizar pré-pró-insulina, que é convertida posteriormente em pró-insulina por proteínas do retículo endoplasmático e, por fim, no aparelho de Golgi é clivada em insulina e peptídeo C, onde é armazenada em grânulos, cuja liberação é regulada, principalmente, pela concentração plasmática de glicose, pois, quando presente no sangue, as células absorvem a glicose através do receptor GLUT2, o que promove o fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP, devido ao aumento de ATP proveniente do catabolismo da glicose, levando a uma despolarização da membrana e consequente abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, aumentando a concentração intracelular de Ca^{2+} , resultando na exocitose de insulina armazenadas nos grânulos (BOLAND *et al.*, 2017).

A disfunção das células β é devida não apenas à morte destas, mas a uma rede complexa que envolve o ambiente e diversas vias moleculares, onde em um estado hiperglicêmico, estas células se encontram sujeitas a ambientes tóxicas, como inflamação, aumento do estresse oxidativo, podendo levar a uma perda de integridade das ilhotas, juntamente com o acúmulo de gordura e excesso de ácidos graxos livres (AGL's), há indução de estresse no retículo endoplasmático (RE) destas células e ativação da via UPR (Unfold Protein Response) que, na persistência do estímulo do estresse do RE, desencadeia mecanismos apoptóticos como medida de segurança, a fim de evitar maiores danos (YAMAMOTO *et al.*, 2019).

Além disso, altos níveis de glicose aumentam a síntese de pró-insulina e polipeptídeos amilóides de ilhota (IAAP) nas células, levando ao acúmulo de insulina com defeito de conformação e IAAP, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estes eventos alteram a homeostasia fisiológica de Ca^{2+} no RE e favorecem sinais pró-apoptóticos, degradam o mRNA da pró-insulina e induzem a liberação de IL-1, o que aumenta a inflamação local das ilhotas (CHRISTENSEN *et al.*, 2019).

Diversas citocinas, como TNF- α , IL-6, IL-1 β , desempenham um papel crucial na modulação da inflamação e na patogênese da resistência à insulina e do DM2,

impactando no metabolismo da glicose e na função das células beta pancreáticas. Níveis elevados de IL-6 e IL-1 β , por exemplo, são observados em indivíduos obesos e associados a um maior risco para o desenvolvimento de DM2, devido a um ciclo de inflamação crônica e dano celular, além disto, baixos níveis de IL-10 estão associados a um aumento da inflamação e podem contribuir para a progressão do diabetes tipo 2, enquanto, a diminuição dos níveis de TNF- α melhorou a sensibilidade à insulina em modelos animais (MACEDO, 2019).

3.3.1. Ação da Insulina e Resistência à Insulina

A resistência à insulina consiste em uma menor resposta metabólica à insulina circulante frente aos níveis glicêmicos elevados, que pode se dar por diminuição da secreção de insulina pelas células especializadas e resposta celular prejudicada em tecidos alvo. A ação da insulina é influenciada pela interação com o hormônio do crescimento e o IGF-1, no estado alimentado e é mitigada pelo glucagon, glicocorticóides e catecolaminas, durante o jejum, a fim de prevenir a hipoglicemia. Esta relação entre insulina e glucagon determina o grau de fosforilação de enzimas nas vias de sinalização regulatória, as catecolaminas promovem a lipólise e a glicogenólise e os glicocorticóides promovem o catabolismo muscular, a gliconeogênese e a lipólise. Desta forma, a secreção excessiva destas moléculas pode ser responsável pela indução de resistência à insulina (PEARSON *et al.*, 2016).

Durante o metabolismo da glicose, a insulina estimula vários tecidos consumidores de glicose a captar glicose, dentre eles, os principais são o músculo esquelético, o tecido hepático e o tecido adiposo (LEE *et al.*, 2021). A insulina secretada pelo pâncreas chega diretamente ao fígado através da veia porta, onde suprime a produção endógena de glicose (EGP), promove a glicogênese, reprime a gliconeogênese (por meio de inibição da lipólise de adipócitos) e ativa a lipogênese e, além disso, uma porção é degradada, de modo que apenas 30% a 40% chegue aos tecidos periféricos: no músculo esquelético, promove a eliminação da glicose, aumentando a captação de glicose e glicogênese, além de suprimir a glicogenólise; e no tecido adiposo, suprime a lipólise e a liberação de ácidos graxos livres (AGL) (Fig. 1). Uma ação defeituosa da insulina nesses tecidos muitas vezes precede o desenvolvimento de resistência sistêmica à insulina, levando progressivamente ao DM2 (GASTALDELLI *et al.*, 2022).

O tecido muscular esquelético é o principal local de captação de glicose, responsável pela absorção de aproximadamente 70%. Em uma condição de excesso calórico prolongada, o tecido muscular passa a acumular ácidos graxos intramiocelulares, sendo o diacilglicerol um ácido graxo intramiocelular que sinaliza o excesso de energia dentro da célula, que ativa a proteína quinase C teta, diminuindo a sinalização proximal da insulina, resultando na diminuição da translocação do transportador GLUT-4 para a membrana celular e, conseqüentemente, na redução da captação de glicose pelo tecido muscular, onde o excesso de glicose no sangue é desviado para o fígado para ser metabolizado ou armazenado, entretanto, quando o tecido hepático detecta um excesso de substrato energético, ocorre um processo semelhante ao do músculo esquelético. No fígado, o conteúdo de diacilglicerol ativa a proteína quinase C épsilon, que diminui a sinalização proximal da insulina e o excesso de glicose entra nos hepatócitos por vias independentes da insulina, criando mais ácidos graxos a partir do excesso de glicose, este excesso é depositado no fígado ou como lipídio ectópico nas vísceras (PETERSEN *et al.*, 2018).

Além disso, a supressão normal da gliconeogênese mediada pela insulina se torna defeituosa e o fígado continua a produzir glicose, aumentando o excedente de glicose circulante. Por fim, a falha da insulina em suprimir a lipólise no tecido adiposo resistente à insulina, aumenta os AGL's circulantes, que afetam diretamente o metabolismo hepático e muscular, acetuando o processo de resistência à insulina nestes tecidos e colaborando para a disfunção das células β induzida pela lipotoxicidade (SAMUEL *et al.*, 2016).

3.4. Quadro clínico de indivíduos com DM2

Os casos de DM2, em sua maioria, se apresentam de forma assintomática o que está relacionado ao grande número de diagnósticos tardios, entretanto os sintomas mais comuns são referentes à hiperglicemia, sendo eles poliúria, polidipsia, polifagia, desfoque da visão, cansaço e sono excessivo e perda de peso (DE CASTRO *et al.*, 2021).

O DM2 está associado a uma série de complicações que afetam tanto vasos de maior calibre (complicações macrovasculares), quanto de menor calibre (complicações microvasculares) que culminam em uma variedade de problemas de saúde associados a esta patologia. Estas complicações são resultantes de diversos

fatores, dos quais estão envolvidos principalmente: produtos finais de glicação avançada, estresse oxidativo, inflamação de baixo grau e proliferação de *vasa vasorum*, que são pequenas artérias que penetram na parede arterial tanto pela superfície luminal, como pela superfície adventícia (CHAWLA *et al.*, 2016).

O principal mecanismo patológico no desenvolvimento de complicações macrovasculares é a aterosclerose, que leva ao estreitamento das paredes arteriais, associado a um estado pró-trombótico no indivíduo, devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que inativam o óxido nítrico (NO), contribuindo para a disfunção endotelial, resultando em doença cardíaca coronariana, insuficiência cardíaca (IC), arritmias, doença arterial periférica e risco aumentado de acidentes vasculares cerebrais (AVCs) (MANSOUR *et al.*, 2023; VIIGIMAA *et al.*, 2019).

A hiperglicemia intracelular crônica afeta a microvasculatura, levando a complicações principalmente nos rins, onde a nefropatia diabética (doença renal diabética) é a principal complicação microvascular, sendo obrigatório avaliar os pacientes quanto à presença desta complicação no momento do diagnóstico do DM2; nos olhos, a retinopatia diabética (RD) é a causa mais comum de cegueira no mundo e a perda de visão é geralmente atribuída ao edema macular diabético, que prejudica a visão central, ou à RD proliferativa, que pode levar à formação de novos vasos sanguíneos e tecido fibroso, resultando em descolamento fracionado da retina ou vítreo; e no sistema nervoso, sendo a polineuropatia simétrica sensório-motora distal a manifestação mais comum da neuropatia diabética e é resultante da exposição crônica à hiperglicemia em combinação com fatores de risco cardiovascular. Além disto, a disfunção sexual em pacientes com DM2 é também uma das complicações, cuja patogênese em pacientes diabéticos é muito complexa e resulta de uma mistura de alterações vasculares, neuropáticas e hormonais atribuídas ao DM (FASELIS *et al.*, 2020; MANSOUR *et al.*, 2023).

3.5. Epidemiologia do DM2

A incidência da obesidade atingiu proporções pandêmicas nos últimos anos, se tornando independente do *status* socioeconômico e/ou faixa etária. Esta proporção crescente de indivíduos com obesidade tem impulsionando os casos de diabetes, cuja incidência/prevalência está a aumentar a um ritmo mais rápido nos países menos desenvolvidos e subdesenvolvidos (FERNANDEZ *et al.*, 2021).

O pré-diabetes é uma condição metabólica crônica em que os níveis de glicose no sangue estão acima do limite superior considerado normal, porém abaixo do limite para um diagnóstico de diabetes. A prevalência global de tolerância diminuída à glicose foi estimada em 7,3% da população adulta em 2017, equivalente a 352,1 milhões de indivíduos, e até 2045, prevê-se que a prevalência aumente para 8,3% da população adulta global, o que equivale a cerca de 587 milhões de indivíduos (HOSTALEK, 2019).

Estima-se que havia cerca de 382 milhões de pacientes com DM2 em todo o mundo em 2013, contudo a incidência e prevalência de DM2 continuam a aumentar e, até 2035, estima-se que haverá mais de 590 milhões de pessoas com DM2 diagnosticadas, sendo a maior parte destes indivíduos pertencentes a países em desenvolvimento (REED *et al.*, 2022).

Sun *et al.* (2021) estima que até 2045 a prevalência global de diabetes em adultos de 20 a 79 anos passe para 783,2 milhões de pessoas, resultando em um aumento de gastos globais com saúde relacionados ao diabetes de 1,05 trilhões de dólares em 2045. Okunogbe *et al.* (2022) prevê que até 2060 que o impacto econômico do sobrepeso e da obesidade, em escala global (considerando 161 países), aumente devido a um crescimento na prevalência destas condições fisiológicas, mudanças populacionais e crescimento econômico, tendo como estimado um impacto econômico total em 2060 em torno de 3,29% do PIB de cada país, variando consoante o grau de desenvolvimento de cada um.

Existe uma crescente incidência de DM2 em idades mais precoces, onde um grande número de adultos jovens estão sendo diagnosticados com DM2, sendo a maioria destes indivíduos obesos, associados a quadros de dislipidemia, tabagismo, estilo de vida sedentário e inflamação de baixo grau (KHAN *et al.*, 2020).

O montante de despesas diretas com DM2 foi estimado em US\$ 232 bilhões no ano de 2007, enquanto, em 2019, este valor aumentou para US\$ 760 bilhões, o que representou por cerca de 12% das despesas com saúde (TINAJERO *et al.*, 2021).

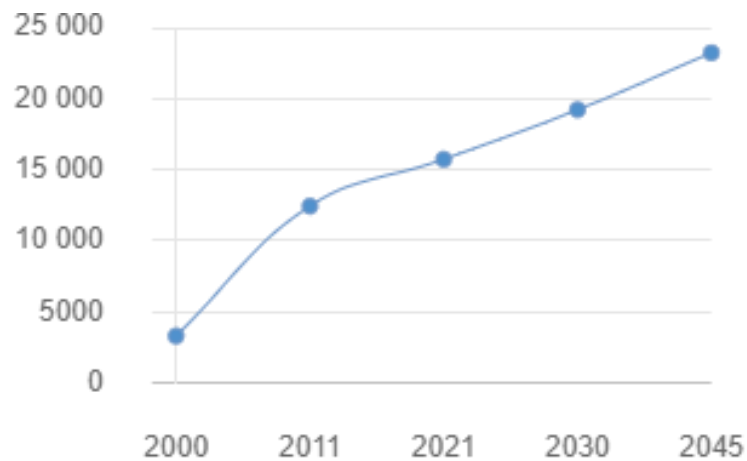
3.5.1. Dados Epidemiológicos do DM2 no Brasil

O Brasil é o país com o quarto maior número de pessoas com diabetes e em comparação com outros países, o Brasil apresentou maior proporção de anos de vida com incapacidade por diabetes. Além disto, há uma elevada prevalência de

diabetes entre os índios Xavante do estado de Mato Grosso (28,2%), evidenciando a população nativa como um grupo de risco para diabetes (SBD, 2019).

Segundo a Federação Internacional de Diabetes, em 2021, haviam 16 milhões de indivíduos brasileiros com diabetes, das quais, 5 milhões eram não diagnosticadas. A previsão para 2045 é que este número chegue a mais de 23 milhões de brasileiros (IDF, 2023).

Figura 1 – Pessoas com Diabetes no Brasil, em milhares.



Fonte: IDF, 2023.

Em relação aos óbitos, em números absolutos, foram registradas entre os anos de 2010 e 2021, 752.720 mortes causadas por diabetes, passando de 54.855 em 2010 para 75.438 em 2021 (BRASIL, 2022).

As despesas totais com saúde relacionadas ao diabetes no Brasil, em 2021, somaram aproximadamente 43 bilhões de dólares (2,7 bilhões por indivíduo), e estima-se que, em 2045, este número atinja os 51 bilhões de dólares (3,3 bilhões por indivíduo) (IDF, 2023).

3.6. Diagnóstico de DM2

A Sociedade Brasileira de Diabetes implica que o diagnóstico de DM2 deve ser baseado na identificação de hiperglicemia no indivíduo, o que ocorre por meio de testes que aferem a glicemia plasmática de jejum, o nível de tolerância oral à glicose (TOTG) e a hemoglobina glicada (HbA1c) (SBD, 2022).

Quadro 1 – Níveis de valores para diagnóstico de Diabetes.

	HbA1c (%)	Glicemia em jejum (mg/dL)	Teste Oral de Tolerância à Glicose (mg/dL)*
Normal	≤ 5,6	≤ 99	≤ 139
Pré-Diabetes	5,7 – 6,4	100 – 125	140 – 199
Diabetes	≥ 6,5	≥ 126	≥ 200

*A medição é realizada 2 horas após a ingestão da glicose.

Fonte: GOYAL *et al.*, 2023.

O TOTG mede a quantidade de açúcar no sangue antes e depois da ingestão um líquido contendo 75g de glicose, após um jejum noturno. E os níveis de glicose são aferidos em torno de 2 horas após a ingestão (SBD, 2022).

A Glicemia em jejum o nível de glicose no sangue é aferido após um jejum de 8 a 12 horas, sendo considerado < 100 mg/dL, o valor para um indivíduo normal, sem risco para diabetes (RIGALLEAU *et al.*, 2021).

A hemoglobina glicada, ou HbA1c, é não somente utilizado como o principal critério diagnóstico, mas também é o principal biomarcador utilizado para avaliar o controle glicêmico em longo prazo em indivíduos com diabetes e tem correlação com o desenvolvimento de complicações relacionadas a esta patologia. Em comparação com outros métodos de diagnóstico de DM2, a medição da HbA1c tem um custo mais alto, entretanto, não requer jejum antes da medição e não é afetada por situações de estresse (KAIAFA *et al.*, 2021).

3.7. Tratamentos Disponíveis para DM2

O diabetes mellitus é um problema de saúde pública crescente e afeta pessoas de todas as idades, por todo o mundo. A educação sobre diabetes deve ser a base do processo de tratamento, que inclui a dieta, exercícios e o tratamento farmacêutico, cujos resultados são observados, principalmente, no autocuidado do paciente e no controle metabólico do diabetes (ŚWIĄTONIOWSKA *et al.*, 2019).

O gerenciamento do DM2 é complexo por envolver múltiplos distúrbios fisiopatológicos. A prevenção de complicações microvasculares concentra-se no controle glicêmico, enquanto a prevenção de complicações macrovasculares requisita a correção dos fatores de risco cardiovasculares clássicos. A obtenção de um controle glicêmico eficaz necessita de medicamentos antidiabéticos que revertam as alterações fisiopatológicos presentes no DM2. Visto que nenhum

medicamento isolado reverte as múltiplas anomalias, a terapia combinada tem ampla aceitação e a prática é crescente nas prescrições médicas para o tratamento de DM2 (DEFRONZO *et al.*, 2015).

O uso de medicamentos antidiabéticos é de suma importância para o controle da doença e a garantia de uma melhor qualidade de vida, entretanto, o uso destes deve ser associado a práticas como educação e autogerenciamento, onde deve haver uma abordagem individualizada e personalizada para cada paciente, redução de peso como intervenção direcionada, acompanhamento sobre a persistência e adesão ao tratamento, terapia nutricional, prática de atividades físicas e melhorias na qualidade do sono, para que se obtenha um melhor resultado no gerenciamento do DM2 (DAVIES *et al.*, 2022).

Os medicamentos utilizados no tratamento de DM2 estão descritos a seguir (quadro 2):

Quadro 2 – Medicamentos e Classes utilizados no tratamento de DM2.

Medicamento/Classe	Descrição
Insulina	A terapia com insulina era o único tratamento medicamentoso para DM2 até a descoberta das sulfoniureias e das biguanidas, porém, como a principal característica de pacientes com DM2 é a insensibilidade à insulina ligada ao excesso de gordura, levaram a busca por outras opções, no entanto, a inércia terapêutica e a natureza progressiva da doença levam à necessidade de suplementação de insulina em cerca de metade dos pacientes com DM2. A combinação com agonistas do receptor GLP1 é uma das melhores combinações com insulina, que levam a um melhor controle da glicose com menos ganho de peso ou mesmo perda de peso e podem produzir menos hipoglicemia (ASCHNER, 2020);
Metformina	Medicamento de primeira linha para o tratamento do DM2, que atua inibindo a gliconeogênese hepática, entretanto, é contraindicada em pacientes

	predispostos à acidose láctica (SONG, 2016);
Secretagogos de insulina (Sulfoniureia e Meglinidas)	Estimulam as células beta pancreáticas a liberar insulina, porém, as sulfonilureias têm sido associadas ao aumento do risco cardiovascular, especialmente quando se trata de gliburida/glibenclamida (FERRANNINI <i>et al.</i> , 2015);
Inibidores da α-glicosidase	Inibem de forma reversível as enzimas alfa-glicosídeo hidrolase intestinais ligadas à membrana, causando um atraso na absorção e digestão de carboidratos, resultando em uma redução da hiperglicemia pós-prandial (KAO <i>et al.</i> , 2016);
Tiazolidinedionas	Aumentam a sensibilidade à insulina agindo nos músculos, no tecido adiposo e no fígado para aumentar a utilização da glicose e diminuir a produção de glicose, mas, o uso desta classe foi associado a ganho de peso e IC (LEBOVITZ <i>et al.</i> , 2019);
Inibidores da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4)	Inibem a enzima que inativa rapidamente as incretinas (GLP-1 e GIP, responsáveis por aumentar a secreção de insulina e inibir o glucagon em resposta à entrada de nutrientes), aumentando os níveis ativos desses hormônios e melhorando a função das ilhotas e o controle glicêmico no DM2 (GALLWITZ, 2019);
Agonistas do receptor de GLP-1	Podendo ser classificados por sua duração em ação curta ou ação prolongada, os agonistas de ação curta fornecem ativação do receptor GLP1 e tendem a ter um efeito mais acentuado na hiperglicemia pós-prandial e no esvaziamento gástrico, com menos efeito na glicemia de jejum, enquanto os agosnistas de ação prolongada ativam o receptor GLP1 continuamente (NAUCK <i>et al.</i> , 2021);
Inibidores dos canais SGLT2	Inibem a reabsorção renal de glicose, aumentando a excreção, reduzindo a hiperglicemia em pacientes com DM2. Além disto, o aumento da glicosúria e da diurese

	<p>produzida resulta na redução do peso e da pressão arterial. Estes medicamentos tem dentre os efeitos colaterais mais comuns as infecções micóticas genitais, como candidíase vulvovaginal, vulvite, vulvovaginite e infecção micótica vulvovaginal, em mulheres, e balanite e balanopostite, em indivíduos do sexo masculino. Outros efeitos colaterais envolvem hipotensão ortostática e a depleção de volume (SINGH <i>et al.</i>, 2018).</p>
--	--

3.8. Papel fisiológico dos canais SGLT

O cotransportador de sódio-glicose (SGLT) é responsável por mediar o transporte de sódio e glicose através das membranas celulares, este cotransporte é impulsionado pela extrusão ativa de sódio, facilitando a captação de glicose contra um gradiente intracelular (POULSEN *et al.*, 2015).

O SGLT1 é o principal responsável pela absorção de glicose e galactose no intestino delgado e pela reabsorção de uma pequena carga de glicose filtrada no segmento 3 do túbulo proximal renal, que escapa da absorção pelo canal SGLT2, que, por sua vez, é responsável pela reabsorção de glicose no segmento 1 e 2 do túbulo proximal, onde reabsorve mais de 90% da carga de glicose filtrada, (FERRANNINI, 2017).

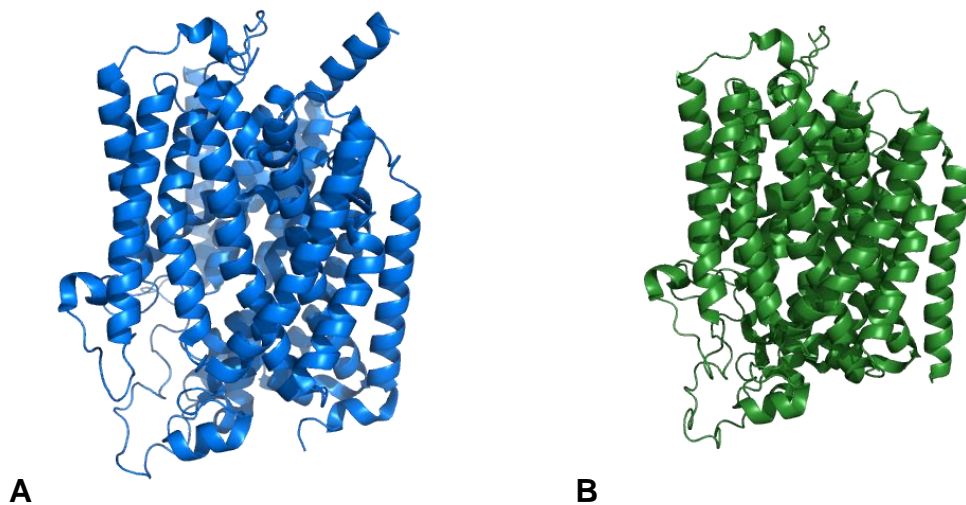
O processo inicia-se com a captura de íons sódio, aproveitando o gradiente eletroquímico gerado pela bomba de sódio-potássio, localizada na membrana basolateral, pois, ao capturar estes íons do filtrado glomerular, os canais SGLTs também internalizam glicose para a membrana apical, que após este processo é transportada à membrana basolateral via GLUT2, facilitando o movimento do citoplasma para o espaço intersticial, permitindo a entrada na corrente sanguínea novamente (WRIGHT *et al.*, 2017).

O SGLT1 comporta o transporte interno de dois íons de sódio e uma molécula de glicose em cada ciclo, onde a ligação do sódio aumenta a chance de abertura da porção externa para que a glicose possa se ligar. Consequente a isto, a porção externa se fecha para obstruir o substrato da solução externa e, em seguida, a porção interna é aberta para permitir que a glicose e o sódio escapem para o citosol. Concluindo o ciclo com o fechamento da porção interna fecha até a

conformação inicial. Embora os estudos cinéticos do SGLT2 não sejam tão avançados quanto os do SGLT1, o modelo de transporte é semelhante e a principal diferença entre SGLT2 e SGLT1 é que a proporção de acoplamento sódio:glicose é de 1:1 para SGLT2 (Fig. 3) e de 2:1 para SGLT1 (WRIGHT *et al.*, 2018).

Além destes canais, existem outros pertencentes à família SGLT, como o SGLT3 que é encontrada principalmente nos músculos esqueléticos, no intestino delgado, nos rins e em neurônios colinérgicos, sendo caracterizado como um canal iônico básico dependente de glicose, presente nas membranas celulares dos músculos e nas membranas neuronais, mas geralmente não atua como transportador de sódio/glicose. E, com relação aos outros canais desta família, as informações disponíveis sobre as proteínas SGLT4, SGLT5 e SGLT6 ainda são escassas (KSHIRSAGAR *et al.*, 2020).

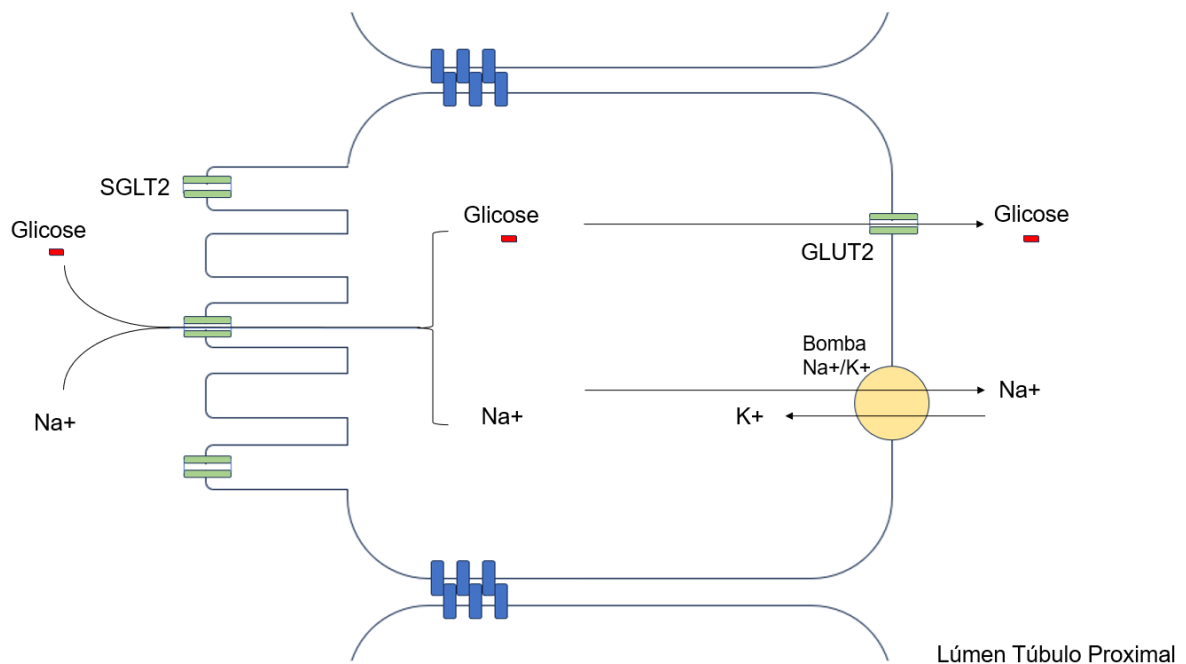
Figura 2 – Canais Co-Transportadores de Sódio/Glicose



Estruturas em 3D das proteínas SGLT1 (A) e SGLT2 (B).

Fonte: RCSB Protein Data Bank.

Figura 3 – Transporte de Glucose através dos canais SGLT2



Fonte: Adaptado de Heerspink, H.J.L. *et al*, 2016.

3.9. Fármacos Inibidores dos Canais SGLT

O primeiro inibidor de canais SGLT, foi a florizina, um composto de chalcona, identificada como um inibidor inespecífico de SGLT1 e SGLT2, isolada pela primeira vez da casca da macieira por pesquisadores franceses no século XIX. Pesquisas sobre este composto demonstraram que a inibição do SGLT poderia ter aplicação como uma possível estratégia no tratamento do diabetes, devido aos efeitos na diminuição da reabsorção renal de glicose e no, conseqüente, aumento da eliminação renal, reduzindo os riscos relacionados à hiperglicemia. Entretanto, a florizina não foi considerada um agente antidiabético apropriado por induzir efeitos colaterais a nível do TGI e ter baixa biodisponibilidade oral (BLASCHECK, 2017).

Os inibidores seletivos de SGLT2 e inibidores duplos do SGLT1/SGLT2 são uma proposta terapêutica para o diabetes devido o aumento da excreção urinária de glicose, que reduz a hiperglicemia e facilita a perda de peso. E, além de um lugar na terapia no DM2, diversas pesquisas pré-clínicas e clínicas apontam efeitos benéficos como terapia adjuvante no DM1, demonstrando resultados como redução na HbA1c, perda de peso e redução na dose diária total de insulina, além de não haver aumento nas taxas de hipoglicemia com a inibição do SGLT, entretanto denotam um risco aumentado associado de cetoacidose diabética (MCCRIMMOM *et al.*, 2018).

Em indivíduos normoglicêmicos, o papel dos canais SGLT1 nos rins é quantitativamente insignificante, porém, em indivíduos com DM2 não controlada e em pessoas que utilizam inibidores de canais SGLT2, a contribuição dos transportadores de SGLT1 torna-se considerável, com efeitos benéficos como redução na absorção de glicose no intestino, aumento da liberação de GLP-1, redução do risco de lesão renal aguda mediada por inibidor de SGLT2, limitação de geração das espécies reativas de oxigênio, além de possível proteção contra o desenvolvimento de cardiomiopatia diabética (TSIMIHODIMOS *et al.*, 2018).

No desenvolvimento de fármacos que inibem os canais SGLT, espera-se que o impacto da inibição intestinal do SGLT1 no controle da glicose no sangue seja aditivo aos efeitos renais, entretanto, são observados alguns efeitos negativos como maior risco de hipoglicemia com a inibição dupla do SGLT1/2, além de o efeito diurético mais forte aumentar o risco de hipotensão, complicações relacionadas com hemoconcentração e, principalmente, cetoacidose diabética (RIEG *et al.*, 2018). O aumento relativo na inibição do SGLT1, por estar relacionado à absorção intestinal de glicose, está associado à diarreia, por efeito osmótico da glicose (PITT *et al.*, 2021).

3.9.1. Fármacos inibidores de canais SGLT1

Os canais SGLT1 são expressos por diversos tecidos do corpo, como células intestinais, células endoteliais cardíacas e vasculares, células do sistema nervoso central, dentre outras. É notável que a inibição destes canais altera a metabolização de carboidratos a partir do intestino, reduzindo a absorção de glicose, além de induzir a liberação de GLP-1, reduzindo os níveis glicêmicos no sangue (SONG, *et al.*, 2016).

A inibição destes canais, entretanto, está associada à diminuição da captação de glicose por miócitos e neurônios expostos à hipoglicemia, este quadro, por sua vez, tem maior risco quando há inibição de ambos os canais (SGLT1/SGLT2). Além disto, a inibição destes canais também são associados a outros efeitos negativos, como diarreia osmótica, deterioração da isquemia miocárdica e exacerbação da lesão celular induzida por agentes nefrotóxicos (TSIMIHODIMOS, *et al.*, 2018).

A mizagliflozina, um inibidor seletivo de SGLT1, desenvolvido no Japão para uso como antidiabético, demonstrou outros efeitos em estudos clínicos, como o

aumento da frequência das fezes e redução da consistência destas, se caracterizando como uma nova opção terapêutica para constipação crônica (INOUE, *et al.*, 2017). Além deste efeito, foi observado em um recente estudo pré-clínico, que a mizagliflozina não afetou os níveis de glicose no sangue entre cinco grupos de animais, mas melhorou o comprometimento cognitivo vascular em modelos de rato com doença de pequenos vasos, através da inibição de SGLT1 neural, sugerindo uma ação preventiva da patologia em questão para este inibidor (ISHIDA, *et al.*, 2021).

3.9.2. Fármacos inibidores de canais SGLT2

O primeiro inibidor de SGLT2, denominado canagliflozina, foi aprovado em 2013 pela FDA, cujo mecanismo de ação se baseia na inibição da recaptação de glicose dentro dos túbulos proximais renais. O tratamento com canagliflozina e outros inibidores do SGLT2 apresenta alguns efeitos adversos, como polidipsia, poliúria e aumento do colesterol LDL, além de episódios de hipotensão e aumento da ocorrência de infecções urogenitais, sendo a canagliflozina, por exemplo, contraindicada em pessoas com insuficiência renal, diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) ou problemas renais (JAKHER *et al.*, 2019).

Os inibidores de SGLT2 são uma opção para pacientes obesos e hipertensos devido à efeitos positivos na perda de peso e aos benefícios anti-hipertensivos, e pacientes com risco elevado de hipoglicemia podem usar em combinação metformina e um inibidor de SGLT2, pois o risco é menor quando comparado com insulina e sulfonilureias. Ademais, são fármacos que independem da duração da diabetes, pois o mecanismo de ação não se relaciona à função das células β e/ou à secreção de insulina (HSIA *et al.*, 2017).

A inibição de SGLT2 melhora os resultados cardiovasculares e renais em indivíduos com DM2, tanto com função renal preservada, quanto com doença renal crônica (DRC) estabelecida, devido à diminuição da hiperfiltração glomerular por meio de alterações hemodinâmicas, que reduzem a carga de transporte tubular e preservam a TFG a longo prazo. A inibição do SGLT2 reduz o trabalho de transporte tubular ativo e, assim, reduz a demanda de energia e o consumo de oxigênio, principalmente no córtex renal, e ao reduzir a hiperfiltração glomerular e a hiperglicemia, a inibição do SGLT2 também reduz a albuminúria, o crescimento tubular e a inflamação tubulointersticial (NESPOUX *et al.*, 2020).

O uso de inibidores de SGLT2 são associado a muitos benefícios metabólicos e cardiovasculares em pacientes com DM2, logo, espera-se que a taxa de prescrição aumente consideravelmente, portanto, estabelecer um melhor perfil de segurança é de extrema importância. O efeito adverso mais comum relacionado a esta classe é o aumento do risco de infecções micóticas urogenitais (SINGH *et al.*, 2018), sendo mais frequente em mulheres, outros eventos são observados em menor grau, como alterações leves no metabolismo lipídico (aumento do LDL e HDL e diminuição dos níveis de triglicerídeos) (SZEKERES *et al.*, 2021), aumento dos níveis de fosfato, causando uma maior incidência de fraturas, e aumento dos casos de amputações, porém isto está relacionado ao uso de canagliflozina (FILIPPAS-NTEKOUAN *et al.*, 2017), e reações alérgicas como urticária, eritema e eczema (RASCHI *et al.*, 2017).

3.9.3. Avanços nas pesquisas com fármacos inibidores de canais SGLT2

Os inibidores de SGLT2 são conhecidos não apenas pela eficácia no controle glicêmico, mas também comprovadamente diminuem os riscos ateroscleróticos, as hospitalizações por IC, a mortalidade cardiovascular e o avanço da DRC (SANTULLI *et al.*, 2023).

Apesar da disponibilidade de evidências robustas sobre o uso da inibição do SGLT2 em IC e DRC com albuminúria, pesquisas clínicas sugerem o uso desta classe de medicamentos em nefropatia diabética em pacientes com DM1, DRC avançada e em estágio terminal e em transplantes renais (DHARIA *et al.*, 2023).

O efeito benéfico da inibição do SGLT2 vai além do controle glicêmico e não inclui apenas proteção contra IC, mas também melhora a pressão arterial, concentrações de ácido úrico, esteatose hepática, estresse oxidativo e inflamação, o que sugere a extensão da indicação destes inibidores a indivíduos com síndrome metabólica, devido à possibilidade de controlar múltiplas alterações metabólicas (OSTO *et al.*, 2023).

O uso de inibidores de SGLT2 pode estar associado a um efeito positivo após cirurgia bariátrica, através da redução do risco de hipoglicemia pós-prandial, uma complicação relatada após o procedimento, embora ainda sejam necessários mais estudos para confirmação de tal dado (SCHEEN, 2023).

A população idosa é um grupo mais passível de eventos adversos e efeitos colaterais associados aos inibidores de SGLT2, como depleção de volume, amputações de membros inferiores, infecções do trato urinário e agravamento da

incontinência urinária, podem ser mais comuns nesta população. Entretanto, esta classe foi notificada globalmente com um perfil de segurança semelhante em doentes mais velhos e mais jovens, se sobrepondo os eventos adversos relacionados à depleção de volume aumentam ligeiramente, mas a incidência permanece bastante baixa. Logo, a qualidade de vida não é alterada em pacientes idosos, podendo ser melhorada em pacientes com IC (SCHEEN *et al.*, 2023).

Em suma, os medicamentos inibidores de canais SGLT2 demonstraram diversos benefícios clínicos, principalmente em três grupos: (1) Pacientes com DM2; (2) pacientes com IC com qualquer fração de ejeção; (3) e pacientes com DRC. Tendo estas três doenças patologias sobrepostas, estes medicamentos se tornam uma estratégia de tratamento única para gerir estas três doenças crônicas (CHAN *et al.*, 2023).

3.10. Design de novos fármacos e Estruturas Análogas

O termo análogo é usado nas ciências naturais desde o século XVII para descrever similaridade estrutural e funcional. No que se refere aos medicamentos, esta definição indica que o análogo de uma molécula de medicamento existente partilha de semelhanças químicas e farmacológicas com o composto original. Os análogos podem ser diretos, isto é, possuem semelhanças estruturais e funcionais; estruturais, ou seja, possuem apenas semelhanças químicas, mas perfis farmacológicos diferentes; e funcionais, que são compostos quimicamente diferentes, mas que apresentam propriedades farmacológicas semelhantes (WERMUTH, 2006).

O processo de desenvolvimento de um medicamento consiste em três etapas: descoberta, desenvolvimento pré-clínico e ensaios clínicos. A descoberta do medicamento envolve diferentes abordagens, sendo ao acaso, a mais antiga e primitiva, novas técnicas envolvem modificações químicas de produtos naturais ou medicamentos conhecidos, triagem de bancos de dados e o design racional de medicamentos, que pode ser baseado em um ligante ou em estrutura. E, ainda mais recente, a inteligência artificial (IA) invadiu a descoberta de medicamentos, onde é usada para prever a estrutura 3D das proteínas, as interações droga-proteína e a atividade da droga, construindo novas moléculas (DOYTCHINOVA, 2022).

A busca por novas moléculas é crucial por diversas razões, como a

variedade nas opções de tratamento, pois nem todos os pacientes respondem da mesma forma a um determinado medicamento; segurança, visto que algumas pessoas podem experimentar efeitos colaterais indesejados com um medicamento específico, mesmo que ele seja eficaz para controlar a condição; resistência ou tolerância; maior eficácia, o que pode resultar em melhores resultados de tratamento para certos pacientes; menor toxicidade ou formas de administração mais convenientes, dentre outros. Sendo assim, a pesquisa de novas moléculas, mesmo dentro da mesma classe terapêutica é essencial ao avanço da medicina e à melhoria contínua dos tratamentos disponíveis para os pacientes (ZHOU *et al.*, 2017).

4. METODOLOGIA

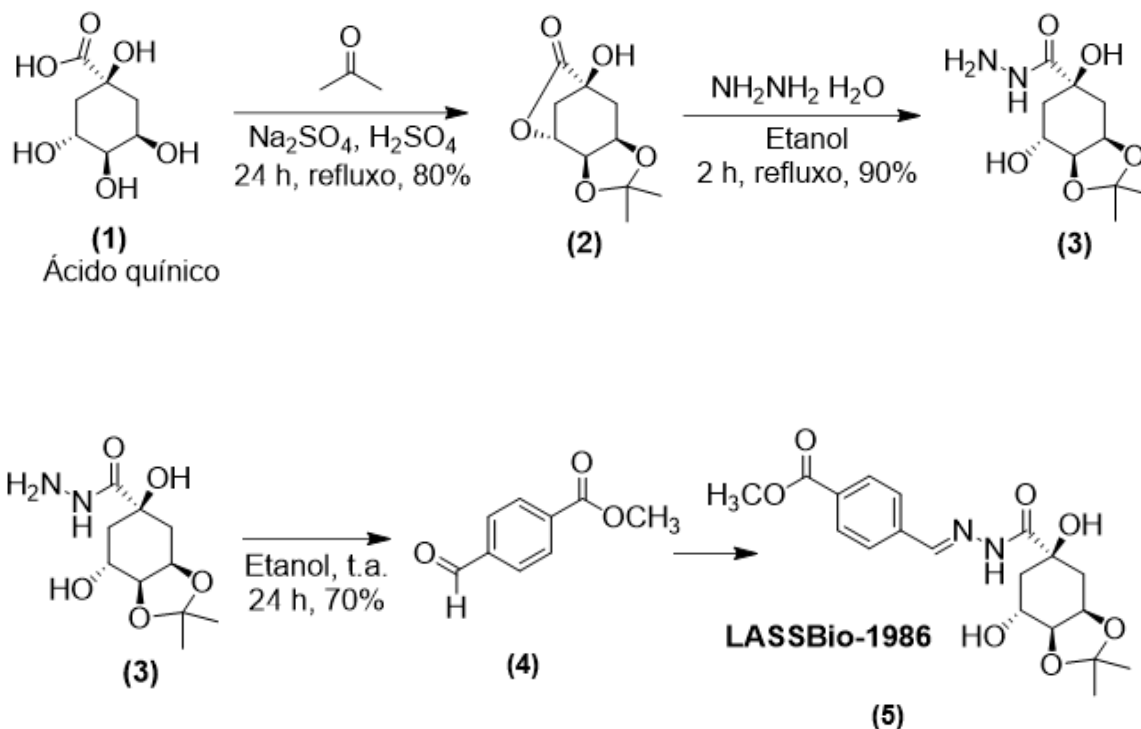
4.1. Obtenção dos Inibidores de Canais SGLT2

A molécula LASSBio-1986 é um derivado sintético *N*-acillidrazônicos, avaliada no presente trabalho, foi disponibilizada pelo Laboratório de Avaliação de Substâncias Bioativas - LASSBio®, localizado no Centro de Ciências da Saúde -

CCS da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ. A caracterização das estruturas químicas foi realizada no respectivo laboratório, como requisito para o cadastro na quimioteca do LASSBio[®], usando Ressonância Magnética Nuclear – RMN, e Infravermelho – IV. O derivado obtido foi submetido à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa para avaliação dos respectivos graus de pureza. Os resultados das análises mostraram que o novo composto foi obtido com grau de pureza superior a 97%.

A *N*-acilidrazona descrita, foi sintetizada em três etapas, conforme indicado na Figura 3. A formação dos produtos partiu do ácido quínico (**1**), sendo este submetido a uma reação com acetona em meio ácido para a proteção das duas hidroxilas em *cis* e formação da respectiva lactona, fornecendo o produto lactona-cetal (**2**) correspondente, em 80% de rendimento. O produto foi submetido à reação de hidrazinólise, na presença de apenas um equivalente de hidrazina hidratada em etanol sob refluxo, para abertura da lactona e formação do intermediário-chave hidrazídico correspondente (**3**), em 90% de rendimento.² Devido à alta polaridade da hidrazida formada, o isolamento desta reação foi realizada apenas com a evaporação do solvente (etanol) sob pressão reduzida, e sem a adição de água. O derivado *N*-acilidrazônico LASSBio-1986 (**5**), foi obtido em bons rendimentos (70-72%) através da condensação da hidrazida (**3**) com o aldeído aromático selecionado e 4-formilbenzoato de metila (**4**) em etanol, sem a utilização de catálise ácida, para evitar a possível hidrólise do grupo de proteção do cetal.

Figura 4 – Rota sintética empregada para a síntese da *N*-acilidrazona LASSBio-1986.



Fonte: LASSBio, 2022.

4.2. Análises *in Silico*

4.2.1. Obtenção do Canonical SMILES

O desenho 2D da molécula foi fornecido pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), a partir do qual, se obteve o Canonical SMILES através do software ChemDraw, utilizando as ferramentas de desenho do software, foi construída a estrutura molecular do composto de interesse. O SMILES canônico resultante foi então colado em um documento de texto separado para registro e análise subsequente.

4.2.2. Predição dos Parâmetros Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME)

A ferramenta utilizada para análise de parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos foi o SwissADME, utilizando o Canonical SMILES como fonte de entrada. A ferramenta SwissADME, disponível em: <http://www.swissadme.ch/>, avalia a farmacocinética e a similaridade estrutural entre moléculas e as predições são baseadas em modelos que avaliam propriedades como lipofilicidade,

solubilidade, potencial de bioatividade, dentre outros. Esta ferramenta também permite calcular descritores físico-químicos, fornecendo acesso a modelos preditivos robustos e rápidos para similaridade com medicamentos e compatibilidade com química medicinal.

4.2.3. Predição da toxicidade *in silico*

A avaliação da toxicidade da molécula em estudo foi realizada através do servidor ProTox-II, que é uma plataforma online especializada na previsão *in silico* da toxicidade de compostos químicos, acessível através do endereço https://tox-new.charite.de/protox_II/, que fornece uma combinação de técnicas avançadas, como similaridade molecular, reconhecimento de farmacóforos, propensões de fragmentos e modelos de aprendizado de máquina, provendo diferentes parâmetros de toxicidade, que abrangem toxicidade aguda, hepatotoxicidade, citotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade, imunotoxicidade, vias de sinalização adversas (Tox21) e alvos específicos de toxicidade.

Os modelos preditivos utilizados pelo servidor ProTox-II são fundamentados em dados derivados de ensaios *in vitro* e esta é uma base de dados robusta que confere ao servidor uma capacidade preditiva significativa e relevante para análises toxicológicas preliminares. A análise do perfil de toxicidade da estrutura química do composto LASSBio-1986 se deu a partir do formato SMILES.

4.2.4. Ensaios de Docking Molecular (MD)

Para a análise, as estruturas 3D da proteína e da molécula LASSBio-1986 foram carregadas como um arquivo PDB na plataforma de acoplamento. O docking realizado foi o “blind docking” (docking cego), uma opção que gera uma caixa de grade centrada no centro de coordenadas da proteína com um tamanho que cobre todo o receptor. A predição da afinidade e energia total dos complexos proteína-ligante foi realizada utilizando o programa interno DockTScore. No final do ensaio de acoplamento molecular, os compostos (LASSBio-1986 e inibidores de SGLT2 existentes) foram classificados com base na energia de ligação alvo mínima. As ferramentas PyMOL Molecular Graphics System (versão 2.5.4, Schrödinger, LLC, San Diego, CA) e BIOVIA Discovery Studio 2021 foram utilizadas para analisar a conformação de acoplamento do complexo proteína-ligante e os tipos de conexão envolvidos (SANTOS *et al.*, 2020).

4.2.5. Rede de Interação Proteína-Proteína

Para identificar a rede de interação proteica da proteína SGLT2, foi utilizada a ferramenta STRING (versão 11.5). O recurso STRING está disponível online em <https://string-db.org/> (acessado em 29 de novembro de 2023). Os resultados obtidos com esta ferramenta permitiram a seleção de complexos proteicos que posteriormente serviram como controles para o ensaio de docking molecular (MD).

4.2.6. Re-Docking

Para o processo de re-docking foi necessário, inicialmente, selecionar um complexo proteína-proteína da rede de interação fornecida pela ferramenta STRING. Foi dada prioridade à escolha de complexos conhecidos com conforto a partir de bancos de dados selecionados e determinados experimentalmente. Então, os experimentos de docking molecular foram realizados utilizando o servidor ClusPro 2.0 (<https://cluspro.org/login.php?redir=/home.php>) (acessado em 29 de novembro de 2023), o servidor de melhor desempenho atualmente disponível para o desafio CAPRI. A opção GPU foi selecionada porque utiliza unidades de computação gráfica mais específicas do Massachusetts Green High-Performance Computing Center (MGHPC). Os melhores complexos gerados pelos estudos de docking molecular foram analisados quanto à energia de interface e interação entre os resíduos. Esta análise buscou avaliar e compreender como as proteínas interagem entre si, observando a pose de interação predominante e o valor energético mínimo (KOZAKOV *et al.*, 2013; KOZAKOV *et al.*, 2017; DESTA *et al.*, 2020; VAJDA *et al.*, 2017).

4.3. Testes In Vivo

4.3.1. Experimentação animal

Camundongos (*Mus musculus* – C57BL/6) machos, com três semanas de idade, foram adquiridos do Biotério de Produção do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, Brasil, cuja instalação é acreditada pela *Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International* (AAALAC, #1960).

Os animais foram alojados em gaiolas com ventilação individual (Lab Products, LLC) em ambiente controlado, com temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro-escuro de 12/12 horas e iluminação média de 300 lx, e aclimatados durante sete dias antes dos experimentos. A ração (NUVILAB CR1; QUIMTIA) e a água filtrada foram autoclavadas e fornecidas aos animais *ad libitum*.

O programa de enriquecimento ambiental foi realizado a partir do acasalamento dos animais em fase reprodutiva, seguido para os filhotes desde o nascimento até o desmame, considerando-se a complexidade do comportamento de cada espécie, de modo a permitir segurança e bem-estar aos animais. Neste programa, os materiais utilizados são trocados a cada 14 dias para camundongos. Material utilizado para camundongos: Plataforma para gaiolas de camundongos (Lab Products, LLC), uma folha de papel atóxico, relax para camundongos e enriquecimento tipo iglu de papel (Granja R.G. São Paulo, Brasil), envelope de papel para ninhos, bloco quadrado de algodão. Todos os protocolos do presente estudo foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-NPDM), número:(17010720-0), de acordo com os regulamentos e o Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica, bem como a diretriz internacional ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*). Os experimentos animais foram realizados no Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), na Universidade Federal do Ceará (UFC) quando os animais atingiram 7 semanas de idade.

4.3.1.1. Teste de tolerância à glicose (TTG)

O teste de tolerância à glicose foi realizado, como triagem dos compostos, seguindo a metodologia apresentada por Frederico *et al.* (2023) com modificações. Após um jejum de 6 horas, os camundongos foram divididos em diferentes grupos de 7 animais cada. Para o controle positivo, camundongos normoglicêmicos receberam Dapagliflozina [3 mg/kg, intraperitoneal (i.p.)]. A solução utilizada para solubilização do fármaco (água destilada, DMSO 0,1% e Tween-80 a 5%) foi utilizada como controle. Por fim, o último grupo recebeu doses de LASSBio-1986 (10, 3 e 1 mg/kg, via i.p. solubilizado água destilada estéril, DMSO (0,1%) e Tween 80 (5%). Antes do início do tratamento, a glicemia foi aferida com um medidor de glicose no sangue (Bioland G-500) através de corte na extremidade da cauda,

designado tempo zero (T0'). Os camundongos então receberam os tratamentos e, após 30 min, foram submetidos a uma carga de glicose (2 g/Kg). A curva de tolerância à glicose foi iniciada 15 minutos após a carga de glicose e as medições foram realizadas nos tempos de 15, 30, 60 e 120 min (FREDERICO *et al.* 2017; FREDERICO *et al.* 2023). Os valores de glicemia são expressos em mg/dL. O fígado, músculo, rins e o pâncreas, foram coletados para determinação dos parâmetros bioquímicos.

4.3.1.2. Análise de Glicogênio

As concentrações de glicogênio hepático e muscular foram determinadas por análise colorimétrica de acordo com o método de Krisman (1962) com modificações. Os tecidos foram pesados em, aproximadamente, 300 mg, e reservados em tubo de ensaio contendo KOH 30%, então foram fervidos por 30 min a 100°C e resfriados à temperatura ambiente. Foi acrescentado etanol absoluto, agitado no vórtex e aquecido por 10 min a 70°C e, após este tempo, colocados no gelo por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 9 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foi acrescentado 1 mL de H₂O destilada para o fígado e 500 µL para o músculo e agitado, retirou-se 10 µL das amostras e acrescentou-se 130 µL do reagente de cor. As amostras foram lidas no espectrofotômetro a 460 nm. Os valores são expressos em mg/mL.

4.3.1.3. Avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS e DPPH.

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) seguindo a metodologia descrita por Becker *et al.* (2019), com modificações, e pelo método de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)) descrito por Re *et al.* (1999). Ambos os testes foram realizados em microplaca de fundo chato de 96 poços em leitor Elisa BioTek, modelo ELX 800. As diluições das amostras e dos padrões positivos utilizados nas avaliações quantitativas em microplaca, partiram de solução mãe com concentração de 2,0 mg.mL⁻¹ foram: 100 µg.mL⁻¹, 50 µg.mL⁻¹, 25 µg.mL⁻¹, 12,5 µg.mL⁻¹, 6,25 µg.mL⁻¹, 3,12 µg.mL⁻¹. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição, calculada por $PI\% = [(AC-AS)/AC].100$, onde AC é a absorbância da solução de controle DPPH ou ABTS no tempo inicial e AS é a absorbância da solução de amostra contendo DPPH ou ABTS no tempo final. A absorbância foi aferida em 515

nm para o radical DPPH● após 60 min de incubação, e a 630 nm para o radical ABTS+● após de 10 minutos de incubação. Como padrão negativo foram utilizadas todas as soluções, excetuando-se a amostra. Foram extintos da análise os valores referentes às colorações naturais dos extratos. Os antioxidantes quercetina e ácido gálico foram utilizados para comparação.

4.3.1.4. Avaliação do estresse oxidativo em amostra de fígado, músculo e rim.

4.3.1.4.1. Determinação da concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)

A quantificação de GSH foi realizada usando o método de Sedlak e Lindsay (1968) modificado. Tal método se baseia no desenvolvimento da coloração amarela ao se adicionar o reagente de Ellman, a compostos de sulfidril. Já que DTNB e GSH reagem, formando ácido 2-nitro-5-tiobenzóico e GSSG. Para isso, uma curva padrão com concentrações conhecidas de GSH foi utilizada para calibração do método.

As amostras de tecido foram homogeneizadas a 10% (peso/volume) com solução de EDTA 0,02 M. Subseqüentemente, adicionou-se 60 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% a 40 µL de cada amostra, a fim de precipitar as proteínas presentes no material biológico. O material foi centrifugado (5000 rpm, 15 min., 4°C) e 60 µL do sobrenadante obtido foi plaqueado em placas de 96 poços.

No momento da leitura, adicionou-se 102 µL da solução de leitura (DTNB 0,01 M (ácido 5,5-ditobis(2-nitrobenzóico), Tris-EDTA). A absorbância foi medida imediatamente a 412 nm, em leitor de microplacas e todo o experimento ocorreu sob refrigeração monitorada. Os valores são expressos como µg de GSH por g de tecido.

4.3.1.4.2. Determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o TBARS foi realizada usando o método de Draper e Hadely (1998) com modificações. Inicialmente, preparou-se uma curva-padrão de TMP (Tetrametoxipropano) e, logo

após, foi preparado o homogenato a 10% (P/V) em tampão fosfato de potássio 0,05 M. Por fim, adicionou-se a solução de ácido perclórico a 35%. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 14.000rpm por 15 min (4°C), e 600 µl do sobrenadante foram retirados e homogeneizados com 200 µl de ácido tiobarbitúrico a 0,8%. A mistura foi levada ao banho-maria em eppendorfs envolvidos com papel alumínio e mantidos a 95-100°C por 30 minutos. Por fim, as amostras foram pipetadas em placa de 96 poços e o resultado foi obtido a partir da leitura da absorbância em comprimento de onda de 532nm usando um leitor de placas. Os valores são expressos como nmol de MDA por g de tecido.

4.3.1.5. Dosagem de citocinas

As amostras utilizadas foram as mesmas amostras usadas para avaliar o estresse oxidativo (tecidos muscular, hepático e renal). Foram dosadas as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α .

O anticorpo de captura foi incubado em placas NUNC a -20°C *overnight*, no dia seguinte as placas foram lavadas 3x com PBS e foi adicionado BSA 1% e incubado em temperatura ambiente por 1 h, logo após, as placas foram lavadas 3x com PBS, então foram adicionados as amostras e os padrões (para a curva) e as placas foram incubadas por 2 h na geladeira (2 – 8° C). As placas foram lavadas 3x com PBS e foi adicionado o anticorpo de detecção e as placas foram incubadas por 2 h na geladeira (2 – 8° C). As placas foram lavadas 3x com PBS e foi adicionado estreptavidina. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 20 min., cobertas por papel alumínio, logo após, foram lavadas 3x com PBS e, então, foram adicionados os reagentes de cor e as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 20 min., envoltas por papel alumínio. Após este tempo, foi adicionado uma solução de ácido sulfúrico 2N, para parar a reação. As placas foram lidas a 450 nm. Os valores são expressos em pg/mL (R&D Systems, 2024).

4.3.1.6. Teste de Resistência à Insulina com Dexametasona

Os camundongos foram divididos em cinco grupos: (1) camundongos receberam veículo (solução salina); (2) dexametasona (0,1 mg/kg, via subcutânea s.c.); (3) LASSBio-1986 (3 mg/kg, via i.p.) e dexametasona (0,1 mg/kg, via s.c.); (4) dapagliflozina (3 mg/kg, via i.p.) e dexametasona (0,1 mg/kg, via s.c.); e (5) LASSBio-1986 (3 mg/kg, via i.p.). Os camundongos foram induzidos com injeções

subcutâneas diárias das 8h30 às 9h30 da manhã, durante 5 dias consecutivos, de acordo com Frederico et al. (2023). No quinta dia os animais passaram por um jejum de 4 h e o teste de tolerância a insulina (TTI) foi realizado. Por meio de um corte na extremidade caudal do animal foi realizada a primeira coleta de sangue para dosagem de glicose (T0), em seguida, foi injetado por via I.P. 2 UI de insulina por quilo de animal e amostras de sangue foram coletadas pela cauda nos tempos 7, 14 e 28 minutos para a determinação da glicose sérica. A média da constante de decaimento da glicose (kITT) foi calculada usando a fórmula $0,693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear. O fígado, músculo, rins e o intestino delgado foram coletados para determinação dos parâmetros bioquímicos.

4.3.1.7. Análise do Perfil Lipídico

Dos animais submetidos ao teste de resistência à insulina, foram coletadas amostras de sangue e obtido o plasma, a partir do qual os níveis séricos de CT, HDL e TG foram avaliados com o uso de kits diagnóstico (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil) e o procedimento seguir de acordo com o descrito pelos fabricantes. Os valores são expressos em mg/mL.

4.3.1.8. Análise da Expressão Gênica de GLUT-4 por RT-PCR

Inicialmente, o RNA foi extraído de células ou tecidos utilizando Trizol, seguido de uma purificação que incluiu etapas de centrifugação e lavagens com álcool isopropanol e etanol, finalizando com a solubilização do RNA em água livre de RNase. Após a extração, a quantificação do RNA foi realizada por meio de um espectrofotômetro Nanodrop. Para a síntese de cDNA, utilizou-se um master mix específico e um termociclador programado para condições otimizadas. A reação de PCR foi conduzida adicionando-se primers específicos ao cDNA e utilizando um termociclador para a amplificação. Finalmente, os produtos de PCR foram analisados em um equipamento de PCR em tempo real (QuantStudio), seguindo um protocolo rigoroso que incluiu diluições específicas e preparação de misturas para assegurar a especificidade e eficiência da amplificação.

A expressão gênica de GLUT-4 foi quantificada por PCR em tempo real, utilizando o gene housekeeping PPIA como controle interno para normalização.

Após a extração e quantificação do RNA total, a síntese de cDNA foi realizada conforme descrito anteriormente. Para a amplificação de GLUT-4 e PPIA, foram utilizados primers específicos, com as seguintes etapas de PCR em tempo real: uma etapa inicial de desnaturação seguida de 40 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão. As condições de anelamento foram ajustadas de acordo com as sequências específicas dos primers. A quantificação relativa da expressão gênica foi calculada utilizando o método $\Delta\Delta Ct$, normalizando os valores de Ct de GLUT-4 pelos valores de Ct de PPIA para cada amostra.

4.4. Análise Estatística

A análise das variáveis, pesos dos animais, toxicidade e parâmetros bioquímicos foi expresso como média \pm erro padrão da média. Enquanto a observação das variáveis: peso de tecidos e glicemia em jejum foi expresso em média \pm desvio padrão da média e analisado por meio da comparação múltipla de resultados paramétricos utilizando ANOVA seguido de post-test de Bonferroni. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. O software GraphPad Prism 8.0 foi utilizado para análise de dados e desenho de gráficos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Testes *in silico*

5.1.1. Farmacocinética

Segundo o livro Farmacologia de Rang & Dale (2020), a farmacocinética estuda o movimento dos fármacos pelo corpo, o que inclui os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), conceito que é fundamental na clínica para entender como as doses dos fármacos devem ser ajustadas para atingir e manter as concentrações terapêuticas no plasma ou no sítio de ação, sem atingir níveis que possam causar toxicidade, ajudando a determinar a dosagem e a frequência de administração dos fármacos para otimizar a terapia medicamentosa, minimizando os efeitos colaterais e maximizando a eficácia.

Para a avaliação dos parâmetros preditivos na farmacocinética da molécula LASSBio-1986 foram utilizados dois servidores: “SwissADME” e “pkCSM”. O emprego de múltiplas plataformas *in silico*, como SwissADME e pkCSM, tenta fornecer uma abordagem mais robusta e complementar para a avaliação inicial das características da molécula LASSBio-1986, tendo como justificativa para a utilização conjunta dessas ferramentas a complementaridade dos métodos de predição e a diversidade dos parâmetros avaliados, focando em aumentar a confiabilidade dos resultados e proporcionar uma compreensão mais abrangente das propriedades farmacocinéticas da molécula em estudo, visando uma validação cruzada dos resultados.

5.1.1.1. Parâmetros Físico-Químicos

A SwissADME é uma ferramenta on-line de acesso gratuito em: <http://www.swissadme.ch> e possui fácil análise dos resultados, até mesmo para pesquisadores não especialistas. A sigla ADME vem do inglês e significa “Administração, Distribuição, Metabolismo e Excreção”. Os pontos fortes do SwissADME são diferentes métodos de entrada, computação para múltiplas moléculas e a possibilidade de exibir, salvar e compartilhar resultados por molécula individual ou através de gráficos globais intuitivos e interativos. Além disto, o SwissADME está integrado no espaço de trabalho SwissDrugDesign, um banco de

dados que centraliza informações sobre centenas de aminoácidos não naturais disponíveis comercialmente para design de peptídeos (DAINA *et al.*, 2017).

O pkCSM é uma ferramenta usada na previsão das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas de diversos compostos químicos, como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade com avaliação da hepatotoxicidade, cardiotoxicidade, toxicidade da reprodução, mutagenicidade, dentre outros parâmetros. No entanto, como qualquer ferramenta de modelagem computacional, suas predições devem ser validadas e complementadas com dados experimentais para garantir a confiabilidade dos resultados (PIRES *et al.*, 2015).

O código SMILES utilizado para a obtenção dos dados preditivos no SwissADME foi: “COC(=O)C1=CC=C(\C=N\NC(=O)[C@@]2(O)C[C@@H]3OC(C)(C)O[C@@H]3[C@@H](O)C2)C=C1”.

Figura 5 – Propriedades Físico-Químicas do composto LASSBio-1986 segundo SwissADME e pkCSM.

Absorção	SwissADME	pkCSM
Fórmula	C19H24N2O7	---
Peso molecular	392.40 g/mol	392.408 g/mol
Número de ligações rotáveis	6	4
Número de aceptores de ligações de H	8	8
Número de doadores de ligações de H	3	3
TPSA	126.68 Å	161.831 Å
Lipofilicidade (LogP)	0,33 (WLOGP)	0,3292
Hidrofilicidade (LogS)	-2,66 (Ali)	-2,835
Solubilidade	8,63e-01 mg/ml; 2,20e-03 mol/l	---
Classe	Solúvel	---

O composto LASSBio-1986 (Fig. 5) possui fórmula molecular C19H24N2O7, cujo peso molecular é 392,40 g/mol, que é menor que 500 g/mol – considerado ideal para fármacos, visto que compostos com altos pesos moleculares tendem a ter problemas de permeabilidade (LIPINSKI *et al.*, 2001).

Este composto possui, de acordo com o SwissADME, 6 (seis) ligações rotativas, indicando uma estrutura menos rígida, o que melhora a afinidade por alvos biológicos, com ligações rotáveis o suficiente que aprimora a solubilidade e farmacocinética. O SwissADME considera uma ligação rotável como qualquer ligação simples entre átomos que não sejam átomos terminais e que não façam parte de uma ligação dupla, um anel ou um grupo funcional rígido. Enquanto o pkCSM utiliza uma definição semelhante, podendo haver pequenas variações na forma como as ligações são contadas devido a diferenças nos algoritmos e na interpretação estrutural, o que pode justificar a discrepância entre os resultados, onde o pkCSM identificou apenas 4 ligações rotáveis na molécula, indicando uma menor flexibilidade quando comparada ao resultado do SwissADME.

Entretanto, mesmo com diferenças nos números exatos, ambos os resultados sugerem que a molécula tem uma quantidade moderada de flexibilidade, o que é um fator a ser considerado em seu perfil farmacocinético. Há oito aceitadores de ligações de hidrogênio e três doadores de ligações H nesta estrutura, estando dentro do limite aceitável para um bom candidato a fármaco, pois um excesso destes aceitadores/doadores afetaria adversamente a permeabilidade do composto (VEBER *et al.*, 2002; KENNY, 2022).

O valor de TPSA foi medida entre 126,68 e 161,83 Å², estando em conformidade com os valores ideais para um composto com boa biodisponibilidade oral, visto que se trata de um valor maior que 90 Å², cujos valores abaixo deste são encontrados em moléculas com boa permeabilidade à barreira hematoencefálica (BHE), o que não é interessante no caso do composto LASSBio-1986 (VISTOLI *et al.*, 2007).

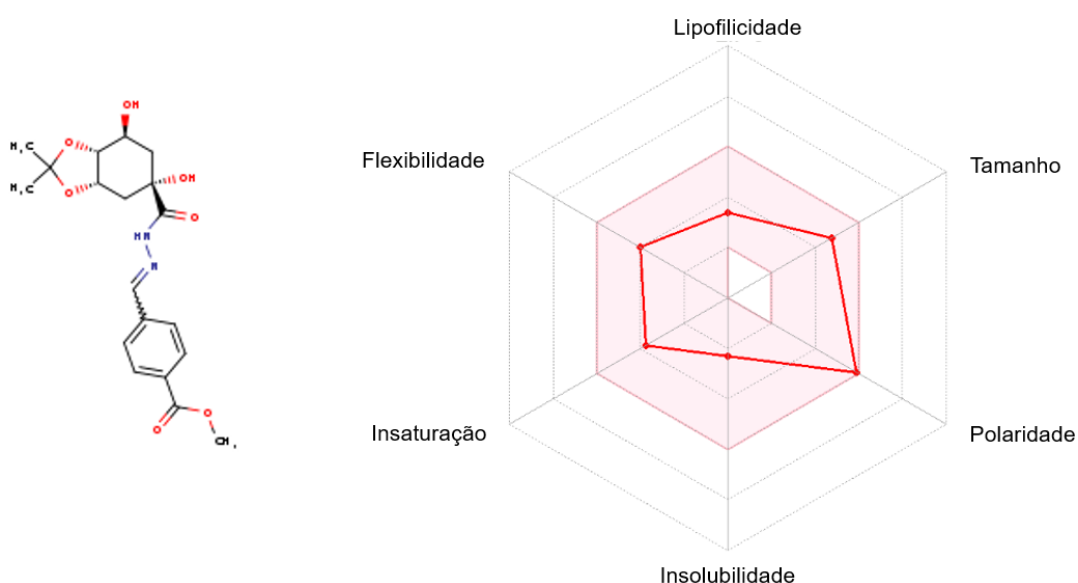
A lipofilicidade de um medicamento deve ser forte o suficiente para que este possa atravessar as membranas celulares de maneira eficiente e, conseqüentemente, ter boa atividade biológica. Para avaliar esta característica, existem vários métodos que podem ser utilizados, o WLOGP é uma implementação própria do Swiss ADME baseada em um método atomístico do sistema fragmentado de Wildman e Crippen e o pkCSM utiliza algoritmos de aprendizado de máquina, como redes neurais, árvores de decisão ou métodos de regressão, para

correlacionar os descritores moleculares com os valores experimentais de LogP. (PIRES *et al.*, 2015; DAINA *et al.*, 2017).

O valor de $\text{LogP}_{o/w}$ (WLOGP) foi 0,33, enquanto o valor fornecido pelo software pkCSM foi de 0,3292. Os valores logP sugerem que o LASSBio-1986 é uma molécula que tem uma leve preferência por um ambiente lipofílico (apolar) em comparação a um ambiente aquoso (polar), sendo razoavelmente solúvel em água, embora o LogP não seja alto, a molécula ainda possui alguma afinidade por fases lipídicas, o que pode permitir uma boa permeabilidade através de membranas celulares lipídicas.

Para uma boa absorção e biodisponibilidade oral, um medicamento, também, deve dispor de uma boa solubilidade aquosa, para avaliar isto, o Swiss ADME utiliza alguns métodos, onde o método ALI, que considera o efeito do TPSA, calculou a hidrosolubilidade do composto em torno de -2,66, enquanto o pkCSM calculou um valor de LogS para LASSBio-1986 de -2,835, desta forma, ambos sugerem que a molécula seja solúvel em meio aquoso, além disto, o SwissADME sugere um valor de solubilidade em mg/ml e em mol/l; (DAINA *et al.*, 2017). A escala Log S varia entre -10 (insolúvel), -6 (pouco solúvel), -4 (solúvel), -2 (muito solúvel) e 0 (altamente solúvel) (SHWETA *et al.*, 2019).

Figura 6 – Radar de Biodisponibilidade da molécula LASSBio-1986 apresentado pelo SwissADME



A Figura 6 mostra o radar de biodisponibilidade, indicando a zona colorida como o melhor espaço físico-químico para a biodisponibilidade oral de um fármaco, considerando fatores como lipofilicidade (LIPO – XLOGP3 entre -0,7 e + 5,0), tamanho da molécula (SIZE – Peso molecular entre 150 e 500 g/mol), flexibilidade (FLEX – Número de ligações rotativas menor que 9), saturação (INSATU – Fração Csp³ entre 0,25 e 1), polaridade (POLAR – TPSA entre 20 e 130 Å²) e solubilidade (INSOLU – LogS (ESOL) entre - 6 e 0) (DAINA *et al.*, 2017). A molécula LASSBio-1986 se encaixou totalmente dentro da zona colorida, indicando que, de forma geral, trata-se de uma molécula promissora para biodisponibilidade oral.

5.1.1.2. Absorção

A absorção de um fármaco é o processo que envolve a passagem do fármaco do local de administração para a corrente sanguínea e fatores como a solubilidade do fármaco, a sua lipofilicidade, o pH do ambiente gastrointestinal e a presença de alimentos podem influenciar significativamente a taxa desta absorção, cujo processo é influenciado por diversos mecanismos, incluindo difusão passiva, transporte ativo e endocitose, sendo a difusão passiva, o mecanismo mais comum para fármacos com características mais lipofílicas (RANG & DALE, 2020).

Figura 7 – Propriedades preditivas relacionadas à absorção do composto LASSBio-1986 fornecidas por SwissADME e pkCSM

Absorção	SwissADME	pkCSM
Permeabilidade Caco-2	----	0,486 (log Papp em 10e-06 cm/s)
Absorção no TGI	Alta	57,943%
Substrato da Glicoproteína-P	Sim	Sim
Inibidor da Glicoproteína-P I e II	---	Não/Não
LogKp	-8,39 cm/s	-3,03 cm/s

O composto LASSBio-1986 (Fig. 7) pode possuir moderado (57,94%) a alto grau de absorção no trato gastrointestinal (TGI), o que a reforçaria como uma molécula potencial para administração oral. Entretanto, o valor 0,486 de log Papp fornecido pelo software pkCSM para a permeabilidade Caco-2 de um fármaco

oferece uma abordagem sobre a potencial absorção no intestino humano, sendo um tópico importante para o desenvolvimento eficaz de medicamentos administrados por via oral e este resultado sugere uma taxa na qual um composto atravessa a monocamada de células Caco-2, que é um modelo *in vitro* usado para simular a barreira intestinal humana. O valor de 0,486 indica que a permeabilidade aparente do fármaco é aproximadamente $3,05 \times 10^{-6}$ cm/s, onde fármacos com um valor de Papp acima de 10^{-5} cm/s são considerados de alta permeabilidade, enquanto aqueles abaixo de 10^{-6} cm/s são de baixa permeabilidade. Portanto, um valor de $3,05 \times 10^{-6}$ cm/s situa-se no limite inferior da permeabilidade moderada, indicando que o fármaco pode ser absorvido de maneira razoável, mas talvez não tão eficientemente quanto compostos com maior permeabilidade (BITTERMANN & GOSS, 2017).

Ademais, o Log Kp indica o nível de permeabilidade da molécula na pele, uma vez que o Kp descreve a taxa de permeação química através da camada mais externa da epiderme, onde em uma faixa de -8 a 0, quanto maior o valor de Log Kp, melhor a permeabilidade através da pele, a molécula LASSBio-1986 apresentou um valor de Log Kp igual a -8,39, apontando, assim, que as administrações tópicas ou transdérmicas não são rotas viáveis (CHEN *et al.*, 2018).

Entretanto, a molécula provavelmente se trata de um substrato para a glicoproteína P (P-gp), o que pode limitar a biodisponibilidade da molécula, afinal a P-gp é uma glicoproteína transmembrana que é responsável pelo efluxo de muitos compostos nocivos dentro da célula para o espaço extracelular, mas, por outro lado, também eflui muitas drogas para fora das células, o que pode reduzir substancialmente a bioatividade de muitas drogas. Além disto, a molécula LASSBio-1986 provavelmente não inibe as glicoproteínas P I e II, o que em não interfere na função da P-gp e, conseqüentemente, a molécula não afetará a biodisponibilidade de medicamentos que são substratos da P-gp, conferindo menor risco de interações medicamentosas, contribuindo para um perfil de segurança mais favorável (CHANDRASEKARAN *et al.*, 2018).

5.1.1.3. Distribuição

A distribuição de fármacos é um processo que envolve a transferência dos medicamentos do compartimento central para os diversos tecidos e órgãos do corpo, que é influenciada por vários fatores, incluindo a perfusão sanguínea dos órgãos, a capacidade do fármaco de atravessar membranas celulares, a ligação às proteínas plasmáticas e aos tecidos, bem como as propriedades físico-químicas do próprio fármaco, como solubilidade e pKa (RANG & DALE, 2020).

Figura 8 – Propriedades preditivas relacionadas à distribuição do composto LASSBio-1986 fornecidas por SwissADME e pkCSM

Distribuição	SwissADME	pkCSM
VDss (humano)	---	-0,499 (log L/kg)
Fração não ligada (humano)	---	0,352 (Fu)
Permeabilidade na BHE	Não	-1,197 (Log BB)
Permeabilidade no SNC	---	-3,522 (Log PS)

O VDss indica o volume de distribuição no estado de equilíbrio, um parâmetro farmacocinético que indica a extensão na qual um fármaco se distribui pelos tecidos do corpo em relação ao plasma, após atingir um estado de equilíbrio. Um valor de VDss igual -0,499 em escala logarítmica (log L/kg), implica que, em média, para cada quilograma de peso corporal, o fármaco se distribui em um volume de aproximadamente 0,317 litros (revertendo a transformação logarítmica). Este valor de VDss indica uma molécula que tem uma distribuição limitada fora da corrente sanguínea, sugerindo que o fármaco permaneça predominantemente no plasma com menor penetração nos tecidos. Este tipo de composto químico tende a ser excretado mais facilmente por processos que atuam no sangue, como a excreção renal (LOMBARDO *et al.*, 2021).

A fração não ligada (Fu) de um fármaco é a proporção do fármaco que não está ligada às proteínas plasmáticas e está livre no sangue para exercer seu efeito terapêutico ou ser metabolizada e excretada. Um valor de Fu igual a 0,352 indica que 35,2% do fármaco está presente na forma livre, enquanto 64,8% está ligado às proteínas plasmáticas. Considerando que apenas a fração não ligada do fármaco é farmacologicamente ativa, um valor Fu de 0,352 sugere que uma parte relativamente

significativa do fármaco está disponível para interagir com seus alvos biológicos e produzir seu efeito terapêutico. É importante destacar que fármacos que possuem um alto percentual de fração ligada às proteínas plasmáticas (baixo F_u) podem deslocar ou ser deslocados por outros fármacos, levando a possíveis interações medicamentosas. Fármacos com uma fração não ligada de 0,352 têm uma duração de ação que é influenciada pela liberação gradual da porção ligada à medida que a fração não ligada é eliminada (WATANABE *et al.*, 2018).

A permeabilidade na barreira hematoencefálica (BHE) é um parâmetro importante para determinar se um fármaco pode alcançar o sistema nervoso central (SNC). A BHE é uma estrutura altamente seletiva que protege o cérebro de substâncias potencialmente nocivas, enquanto permite a passagem de nutrientes essenciais. Quando a permeabilidade na BHE de um fármaco é expressa como -1,197 em termos logarítmicos ($\log BB$), isto pode ser convertido para uma forma linear, obtendo-se um valor igual a 0,064, o que indica que a concentração do fármaco no cérebro é cerca de 6,4% da sua concentração no plasma, sugerindo, então, que a molécula tem uma baixa capacidade de atravessar a BHE. A baixa permeabilidade pode ser vantajosa para minimizar os efeitos adversos no SNC para fármacos destinados a tratar outras partes do corpo (WANG *et al.*, 2019). Isto é reforçado pelo dado fornecido pelo SwissADME, onde o composto LASSBio-1986 (Fig. 8) não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), o que sugere possibilidade nula de ação sobre o sistema nervoso central (SNC), que é ideal, no caso de um fármaco desenvolvido para o DM2.

Além disto, a permeabilidade no sistema nervoso central (SNC) é um parâmetro que indica a capacidade de um fármaco de penetrar nos tecidos do SNC, incluindo o cérebro. Esse parâmetro é frequentemente expresso como $\log PS$, onde PS representa a permeabilidade-suficiência. Uma permeabilidade no SNC de um fármaco no valor de -3,522 em termos logarítmicos ($\log PS$), indica uma permeabilidade extremamente baixa do fármaco no SNC (NEUMAIER *et al.*, 2021).

5.1.1.4. Metabolismo

O metabolismo de um fármaco envolve a biotransformação de substâncias químicas no organismo, resultando em metabólitos que podem ser mais facilmente

excretados, ocorrendo principalmente no fígado e é mediado por enzimas específicas, como as do citocromo P450. Este processo pode ser dividido em duas fases: a fase I, que inclui reações de oxidação, redução e hidrólise, e a fase II, que envolve reações de conjugação, aumentando a solubilidade dos metabólitos. O metabolismo dos fármacos não apenas facilita a eliminação, mas também influencia na duração e na intensidade do efeito terapêutico, além de ser uma etapa crucial para a desativação ou formação de compostos potencialmente tóxicos (RANG & DALE, 2020).

Figura 9 – Propriedades preditivas relacionadas ao metabolismo do composto LASSBio-1986 fornecidas por SwissADME e pkCSM

Metabolismo	SwissADME	pkCSM
Substrato CYP2D6	----	Não
Substrato CYP3A4	---	Não
Inibidor CYP1A2	Não	Não
Inibidor CYP2C19	Não	Não
Inibidor CYP2C9	Não	Não
Inibidor CYP2D6	Não	Não
Inibidor CYP3A4	Não	Não

A provável ausência de metabolismo por CYP2D6 e CYP3A4 significa que o fármaco não será significativamente metabolizado por essas vias enzimáticas específicas, podendo levar a uma menor variabilidade interindividual no metabolismo do fármaco, visto que a atividade dessas enzimas pode variar amplamente entre diferentes pessoas devido a fatores genéticos e condições fisiológicas, conferindo assim, menor risco de interações medicamentosas; perfil de metabolismo diferente, pois a molécula pode ser metabolizada por outras vias enzimáticas, como outras isoenzimas do citocromo P450 ou por enzimas não pertencentes à família do citocromo P450, como transferases ou esterases, podendo resultar em diferentes metabólitos e potencialmente influenciar a eficácia e segurança do fármaco. Com isto, é possível tornar a administração do fármaco mais previsível e segura em populações diversas (TYZACK *et al.*, 2019).

O composto provavelmente não interage com as principais isoformas do complexo P450 (CYP1A2, 2C19, 2C9, 2D6 e 3A4), o que dá a molécula mais um

ponto positivo, pois isto diminui a chance de interação com outros medicamentos administrados, principalmente, devido ao fato de esta molécula ser desenhada para uma disfunção metabólica em que não há cura e o tratamento é contínuo.

5.1.1.5. Excreção

A excreção de um fármaco é a etapa final no processo farmacocinético, envolvendo a remoção do fármaco e seus metabólitos do corpo, sendo a via renal a principal via de excreção, onde os fármacos são eliminados na urina após filtração glomerular, secreção tubular ativa e reabsorção passiva. Outras vias importantes incluem a biliar e eliminação nas fezes e, ainda, menos comumente, a excreção pulmonar e/ou através do suor ou saliva. A eficiência da excreção depende das propriedades físico-químicas da molécula, como solubilidade e ionização, assim como da função excretora dos órgãos envolvidos. A compreensão desses mecanismos é crucial para a determinação da meia-vida do fármaco, a frequência de dosagem e a minimização de possíveis efeitos tóxicos (RANG & DALE, 2020).

Figura 10 – Propriedades preditivas relacionadas ao metabolismo do composto LASSBio-1986 fornecidas por pkCSM

Excreção	SwissADME	pkCSM
Clearance total	---	1.159 (log ml/min/kg)
Substrato OCT2 Renal	---	Não

O clearance (ou depuração) total de um fármaco é a medida que indica a eficiência com que o fármaco é removido do corpo por uma via de excreção. Quando o clearance total de uma molécula é expresso como 1.159 em termos logarítmicos (log ml/min/kg), isso pode ser interpretado como um fármaco que é removido do corpo de forma relativamente eficiente. Valores mais altos de clearance significam que o fármaco é rapidamente eliminado, o que pode exigir administração mais frequente para manter níveis terapêuticos no sangue. Isto é importante no planejamento de regimes terapêuticos para garantir que os níveis do fármaco permaneçam eficazes sem quedas significativas. Um clearance total de 1.159 (log ml/min/kg), equivalente a aproximadamente 14.44 ml/min/kg, sugere uma eliminação relativamente rápida e a possível necessidade de dosagens frequentes para manter níveis terapêuticos (NAKAYAMA *et al.*, 2020).

O transportador catiônico orgânico 2 (OCT2) é uma proteína transportadora expressa principalmente nos túbulos proximais dos rins e desempenha papel significativo na captação renal de cátions orgânicos, incluindo muitos medicamentos e seus metabólitos. A molécula LASSBio-1986 se apresentou como possivelmente negativa para substrato de OCT2 renal, o que tem algumas implicações possíveis, como, por exemplo, a excreção renal dessa molécula não depende da captação mediada por OCT2, logo, ela será excretada pelos rins através de outros mecanismos, como filtração glomerular, secreção tubular por outros transportadores, ou pode nem ser significativamente excretada pelos rins; a ausência de interação com OCT2, também, pode reduzir o risco de interações medicamentosas relacionadas a esse transportador, afinal vários fármacos podem competir por transporte via OCT2, o que pode alterar as concentrações plasmáticas e os efeitos terapêuticos (WRIGHT, 2019).

5.1.1.6. Propriedades estruturais medicinais e relacionadas à fármacos (“Druglikeness”)

De acordo com Lipinski, há um conjunto de diretrizes, denominado “regra dos 5”, para selecionar candidatos com boas propriedades de biodisponibilidade oral, que define os seguintes parâmetros: (1) peso molecular ≤ 500 Da; (2) LogP (coeficiente de partição octanol-água) ≤ 5 ; (3) número de doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 ; e (4) número de aceptadores de ligação de hidrogênio ≤ 10 . Afinal, apesar das abordagens de formulação e síntese de novos medicamentos cada vez mais sofisticadas, deficiências nas propriedades físico-químicas representam a diferença entre o fracasso e o desenvolvimento de um medicamento oral bem-sucedido (LIPINSKI *et al.*, 2001).

O composto LASSBio-1986 possui um perfil físico-químico que demonstra ser adequado para um candidato a fármaco, com peso molecular, número de átomos pesados e área de superfície polar topológica (TPSA) dentro dos limites aceitáveis.

Figura 11 – Propriedades preditivas da molécula LASSBio-1986 relacionadas ao seu potencial estrutural como fármaco e às suas características químicas no âmbito medicinal apresentadas pelo Swiss ADME

Potencial Farmacêutico (“Druglikeness”)	
Lipinski	Sim; 0 violação
Ghose	Sim
Veber	Sim
Egan	Sim
Muegge	Sim
Escore de Biodisponibilidade	0.55

A

Química Medicinal	
PAINS	0 alerta
Brenk	1 alerta: imina_1
Potencial Medicamento	Não; 1 violação: PM>350
Acessibilidade de Síntese	4.69

B

A. “Druglikeness” – Semelhança estrutural a Fármacos; B. Análise Medicinal da Química da Molécula LASSBio-1986.

Fonte: SwissADME, 2023.

A semelhança com o fármaco (Fig. 11) foi estabelecida a partir de análises estruturais e/ou físico-químicas do composto, a partir de uma filtração de bibliotecas químicas que exclui moléculas com propriedades incompatíveis com um perfil farmacocinético aceitável. Estes filtros são originados de análises feitas por grandes empresas farmacêuticas cujo objetivo é melhorar a qualidade das coleções químicas. O filtro Lipinski (Pfizer) é o filtro pioneiro implementado, seguido pelos métodos Ghose (Amgen), Veber (GSK), Egan (Pharmacia) e Muegge (Bayer).

Enquanto o escore de biodisponibilidade procura prever a probabilidade de um composto ter pelo menos 10% de biodisponibilidade oral em ratos ou permeabilidade mensurável de Caco-2 e esta pontuação semiquantitativa baseia-se na carga total, TPSA e violação do filtro Lipinski (DAINA *et al.*, 2017).

Com um escore de biodisponibilidade de 0,55, o parâmetro de semelhança ao medicamento é considerado alto, pois se enquadra em todas as regras citadas, sendo uma molécula com moderada biodisponibilidade oral e um perfil farmacocinético aceitável.

PAINS (compostos de interferência de pan-ensaio) são moléculas contendo subestruturas que mostram resposta potente em ensaios, independentemente da proteína alvo, produzindo resultados biológicos falso positivos, por interagirem de maneiras indesejáveis com outras proteínas ou interferirem com as condições de ensaio (DAINA *et al.*, 2017). Zero alertas para PAINS (Fig. 5G) é uma condição favorável, pois a molécula, então, não possui subestruturas comumente encontradas em interferentes conhecidos, o que a torna ideal para o desenvolvimento desta como fármaco.

Entretanto, em relação aos critérios de Brenk *et al.*, houve um alerta “imine_1”, que aponta a presença de uma imina, que pode ser reativa ou instável em condições biológicas. Iminas são compostos orgânicos contendo uma ligação dupla entre carbono e nitrogênio e a presença destas pode comprometer a estabilidade e/ou a segurança do fármaco, pois estes grupos podem hidrolisar em meio aquoso, limitando a meia-vida do medicamento, além do potencial de se ligar covalentemente a macromoléculas do organismo como proteínas e o DNA, o que poderia levar a efeitos tóxicos e mutagênicos.

As regras de Brenk *et al.* apenas direcionam para uma maior cautela e necessidade de testes mais específicos, não se tratando de uma regra factual (BRENK *et al.*, 2008; KLOPČIČ *et al.*, 2019).

O “Leadlike” é um conceito usado na química medicinal para identificar compostos que são bons pontos de partida para a otimização em programas de descoberta de fármacos, que visam identificar moléculas mais simples e menores, e são analisados três critérios – peso molecular (deve ser entre 250 e 350 g/mol), XLOGP (menor ou igual a 3,5) e o número de ligações rotáveis (menor ou igual a 7) – por este motivo, foi identificado um alerta no que diz respeito ao peso molecular, que é de 392,40 g/mol, ultrapassando os limites estabelecidos por Teague *et al.* (1999), mas isto não descarta o composto como um potencial medicamento.

A pontuação de acessibilidade sintética (SA) da SwissADME é baseada na ideia de que a ocorrência de fragmentos moleculares em moléculas sintetizadas está relacionada à facilidade da síntese, onde os valores variam de 1 (muito fácil) a 10 (muito difícil) (DAINA *et al.*, 2017). A pontuação de SA foi de 4,69, sugerindo que a molécula não é extremamente simples de ser sintetizada, porém, também não é considerada complexa ou desafiadora, tendo custo e tempo de síntese moderados.

5.1.2. Alvos moleculares fornecidos pela plataforma “Swiss Targets Prediction”

Através do “Swiss Target Prediction” foi possível obter uma lista de potenciais alvos proteicos, que são classificados com base na probabilidade da proteína ser o alvo da molécula de interesse (Fig. 12). Esta base de dados se baseia na observação de moléculas bioativas, que possuem semelhanças estruturais com a molécula de interesse, que têm maior probabilidade de compartilhar alvos semelhantes. Desta forma, os alvos da molécula são previstos através da identificação de proteínas com ligantes conhecidos que são semelhantes ao composto de interesse (GFELLER *et al.*, 2014).

Figura 12 – Predição de ligação ao alvo através do Swiss Targets Prediction

Alvo	Nome Comum	ID Uniprot	ID ChEMBL	Classe do Alvo	Probabilidade	Atividades conhecidas (2D/3D)
Co-transportador Sódio/Glicose 2	SLC5A2	P31639	ChEMBL3884	Transportador Eletroquímico	0.11573667475	623 / 0
Co-transportador Sódio/Glicose 1	SLC5A1	P13866	ChEMBL4979	Transportador Eletroquímico	0.11573667475	121 / 0
Receptor Adenosina A3	ADORA3	P0DMS8	ChEMBL256	Receptor da família A acoplado à proteína G	0.11573667475	611 / 0
Receptor Adenosina A1 (por homologia)	ADORA1	P30542	ChEMBL226	Receptor da família A acoplado à proteína G	0.11573667475	755 / 0
Receptor Adenosina A2a (por homologia)	ADORA2A	P29274	ChEMBL251	Receptor da família A acoplado à proteína G	0.11573667475	527 / 0
Domínio transmembrana contendo proteína TMIGD3	TMIGD3	P0DMS9	ChEMBL3712907	Proteína não classificada	0.11573667475	30 / 0
Adenosina quinase	ADK	P55263	ChEMBL3589	Enzima	0.11573667475	70 / 0
Galectina-1	LGALS1	P09382	ChEMBL4915	Outra proteína citosólica	0.11573667475	7 / 0
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase hepática	GAPDH	P04406	ChEMBL2284	Oxidoreductase	0.11573667475	5 / 0
Proteína regulada por glicose de 78 kDa	HSPA5	P11021	ChEMBL1781865	Proteína não classificada	0.11573667475	9 / 0

ALVO: Alvo molecular; NOME COMUM: Nomenclatura comum de acordo com a base de dados GeneCards; ID UNIPROT: Código do alvo de acordo com a maior base de dados de sequência de

proteínas – Uniprot; ID ChEMBL: Código do alvo de acordo com o banco de dados de moléculas bioativas com propriedades semelhantes a drogas – ChEMBL; CLASSE DO ALVO: Classe do alvo; PROBABILIDADE: Probabilidade da molécula ligar-se ao alvo; ATIVIDADES CONHECIDAS (3D/2D): Moléculas conhecidas que possuem similaridade 2D e 3D com atividade sobre o alvo em questão.

Fonte: SwissTargetsPrediction, 2023

Os valores de probabilidade são calculados usando pontuações combinadas dos compostos similares à molécula (por similaridade 2D e 3D) que possuem atividade na proteína em questão. A determinação 2D de compostos consiste em analisar a similaridade química usando impressões digitais moleculares, enquanto a similaridade 3D, se baseia na similaridade estrutural, onde são geradas diversas conformações diferentes de cada molécula, a partir das quais são calculados valores de similaridade em uma regressão logística destes valores, que, ao final, representam a probabilidade da molécula bioativa ter uma determinada proteína como alvo, mas não exprimem a probabilidade desta molécula ser bioativa (GFELLER *et al.*, 2014; DAINA *et al.*, 2019).

Os alvos identificados por “by homology” são proteínas que são detectadas devido à semelhança com outros receptores ativos com estruturas muito similares entre si (homologia) e isto se baseia na ideia de que proteínas com estruturas semelhantes geralmente desempenham funções semelhantes ou relacionadas (DAINA *et al.*, 2017).

A figura 12 mostra os 10 primeiros alvos projetados para a molécula LASSBio-1986, onde é possível ver em primeiro lugar o alvo real – SGLT2, a partir do qual a molécula foi sintetizada a fim de se ligar a este, entretanto a probabilidade de ligação do composto a este alvo é a mesma para os alvos subsequentes, o que pode indicar falta de especificidade ao ligante-alvo e pode representar possibilidade de interação com outros alvos, na mesma medida, levando a efeitos colaterais desconhecidos a depender do tipo de interação deste composto com a proteína, como discutido anteriormente, por exemplo, a interação com SGLT1 leva à diminuição da glicose plasmática, entretanto, ao inibir o SGLT1 provoca efeitos colaterais como a diarreia (PITT *et al.*, 2021). Os receptores para adenosina, por exemplo, estão envolvidos em diversas vias fisiológicas, como processos inflamatórios, tendo uma resposta diferente para cada tipo de receptor (A3, A1 ou

A2) e para cada tipo de interação com a molécula (ativação ou inibição). Um exemplo clássico de inibidor destes receptores é cafeína, onde ao inibir receptores A1, aumenta a liberação de neurotransmissores que promovem o estado de vigia, diminuindo a sensação de fadiga, enquanto ao inibir o receptor A2A, impede a ação da adenosina, promovendo, além do efeito psicoestimulante, alterações cardiovasculares como vasoconstrição (AGUIAR JR. *et al.*, 2020).

5.1.3. Toxicidade

A avaliação das propriedades tóxicas de um composto químico é de suma importância na descoberta de novos medicamentos. O ProTox-II é um servidor (https://tox-new.charite.de/protox_II/) que prevê a toxicidade e outros parâmetros toxicológicos para diversas moléculas, desenvolvido por Drwal *et al.* (2014) e Banerjee *et al.* (2018). A plataforma possui cinco etapas de classificação: (1) toxicidade aguda; (2) toxicidade orgânica; (3) parâmetros toxicológicos; (4) vias toxicológicas e (5) alvos de toxicidade (DRAWL *et al.*, 2014; GOSH *et al.*, 2019). Além disto, o pkCSM também forneceu alguns parâmetros preditivos relacionados à toxicidade do composto LASSBio-1986, que foram utilizados para complementar alguns dados obtidos pelo ProTox-II.

5.1.3.1. ProTox-II

O modelo de toxicidade aguda é baseado nas semelhanças estruturais entre compostos com efeitos tóxicos conhecidos e na presença de fragmentos tóxicos (Fig. 13).

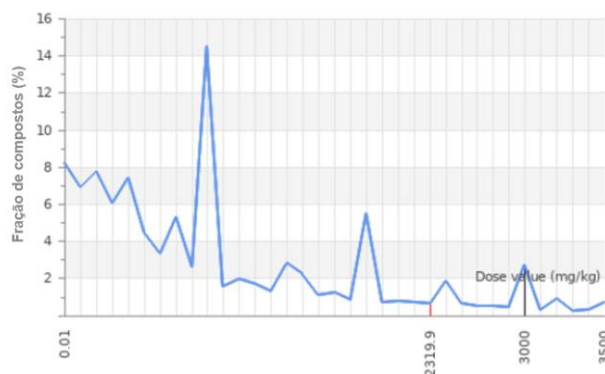
Figura 13 – Toxicidade Oral Preditiva do composto LASSBio-1986



Fonte: ProTox-II, 2023.

A DL_{50} expressa a dose letal média, onde 50% dos indivíduos sujeitos à administração do composto morrem após a exposição e é calculado em mg/kg de peso corporal (BANERJEE *et al.*, 2018). A molécula LASSBio-1986 apresentou uma DL_{50} de 3000 mg/kg, se tratando de uma dose relativamente elevada, sugerindo uma toxicidade baixa, principalmente quando comparada à molécula – Dapagliflozina – já presente no mercado, cuja DL_{50} foi calculada pelo mesmo servidor no mesmo valor de 3000 mg/kg. Além disso, quando confrontado com os valores de DL_{50} das moléculas do banco de dados do servidor, as quais foram comparados ao valor de DL_{50} do composto (Fig. 8), é notável que o valor em questão é maior que os das outras moléculas, sugerindo uma maior segurança com relação à toxicidade do LASSBio-1986.

Figura 14 – Valor da DL_{50} do composto LASSBio-1986 em comparação com os valores de DL_{50} das moléculas “equivalentes” do banco de dados do ProTox II



- Valor médio da DL_{50} dos compostos da base de dados
- Valor da DL_{50} do composto LASSBio-1986

Fonte: ProTox-II, 2023.

A classificação da toxicidade é definida de acordo com o sistema global de classificação de rotulagem de produtos químicos (GHS). A classificação de DL_{50} é: I – fatal por ingestão ($DL_{50} \leq 5$); II – fatal por ingestão ($5 < DL_{50} \leq 50$); III – tóxico por ingestão ($50 < DL_{50} \leq 300$); IV – prejudicial se ingerido ($300 < DL_{50} \leq 2.000$) V – pode ser prejudicial se ingerido ($2.000 < DL_{50} \leq 5.000$); e VI – não tóxico ($DL_{50} > 5000$) (BANERJEE *et al.*, 2018). Neste caso, o composto LASSBio-1986 apresentou uma segurança toxicológica classe V, evidenciando que pode ser prejudicial se ingerido, entretanto, quando comparado à Dapagliflozina, esta possui a mesma classificação, o que reforça a capacidade da molécula como uma terapia promissora.

A similaridade média refere-se à semelhança da molécula de interesse com outras moléculas e fragmentos moleculares tóxicos conhecidos. Uma similaridade de 45,74% sugere que o composto, embora tenha algumas características em comum com outras moléculas do banco de dados, não possui uma porção realmente significativa, o que revela tanto um lado positivo, pois permite a busca por novas propriedades farmacológicas, quanto um lado negativo, visto que esta molécula pode possuir propriedades toxicológicas desconhecidas.

A precisão desta previsão foi de 54,26%, indicando que o modelo tem confiabilidade moderada, logo, são necessários testes *in vitro* e *in vivo* para confirmar as predições *in silico*, visto que o nível de confiança não é tão alto.

Na figura 15 é possível ver modelos: (1) de toxicidade de órgãos (hepatotoxicidade), afinal a toxicidade hepática induzida por medicamentos é umas das principais causas de insuficiência hepática aguda e uma das razões para a retirada de vários medicamentos do mercado; (2) de “*end points*”, que aborda carcinogenicidade, imunotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade, apontando moléculas que podem induzir tumores ou aumentar a incidência destes, promover efeitos adversos no sistema imunológico, causar mutações genéticas anormais, como alterações no DNA de uma célula, e causar danos celulares indesejados, respectivamente; e (3) de “*pathways*” ou vias toxicológicas, através de vias de sinalização de receptores nucleares e de vias de resposta ao estresse. Todos os modelos possuem precisão balanceada acima de 80% em validações cruzadas e

externas, com exceção do modelo de “*end points*” de imunotoxicidade que possui valor de precisão acima de 70% (BANERJEE *et al.*, 2018).

Figura 15 – Relatório de Modelo de Toxicidade do composto LASSBio-1986

Classificação	Alvo	Abreviação	Predição	Probabilidade
Toxicidade de órgãos	Hepatotoxicidade	dili	Inativo	0.55
Pontos finais de toxicidade	Carcinogenicidade	carcino	Inativo	0.53
Pontos finais de toxicidade	Imunotoxicidade	immuno	Ativo	0.96
Pontos finais de toxicidade	Mutagenicidade	mutagen	Ativo	0.50
Pontos finais de toxicidade	Citotoxicidade	cyto	Inativo	0.59
Vias de sinalização do receptor nuclear tox-21	Receptor de hidrocarboneto de arila	nr_ahr	Inativo	0.90
Vias de sinalização do receptor nuclear tox-21	Receptor de andrógeno	nr_ar	Inativo	0.95
Vias de sinalização do receptor nuclear tox-21	Domínio de ligação ao ligante do receptor de andrógeno	nr_ar_lbd	Inativo	0.94
Vias de sinalização do receptor nuclear tox-21	Aromatase	nr_aromatase	Inativo	0.86
Vias de sinalização do receptor nuclear tox-21	Receptor alfa de estrogênio	nr_er	Inativo	0.83
Vias de sinalização do receptor nuclear tox-21	Domínio de ligação ao ligante do receptor de estrogênio	nr_er_lbd	Inativo	0.93
Vias de sinalização do receptor nuclear tox-21	Receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma	nr_ppar_gamma	Inativo	0.96
Vias de resposta ao estresse tox-21	Fator nuclear 2 (derivado de eritróide 2)-semelhante / elemento responsivo a antioxidante	sr_are	Inativo	0.90
Vias de resposta ao estresse tox-21	Elemento de resposta do fator de choque térmico	sr_hse	Inativo	0.90
Vias de resposta ao estresse tox-21	Potencial de membrana mitocondrial	sr_mmp	Inativo	0.71
Vias de resposta ao estresse tox-21	Fosfoproteína (supressor de tumor) p53	sr_p53	Inativo	0.84
Vias de resposta ao estresse tox-21	Proteína 5 contendo o domínio AAA da família ATPase	sr_atad5	Inativo	0.92

Fonte: ProTox-II, 2023.

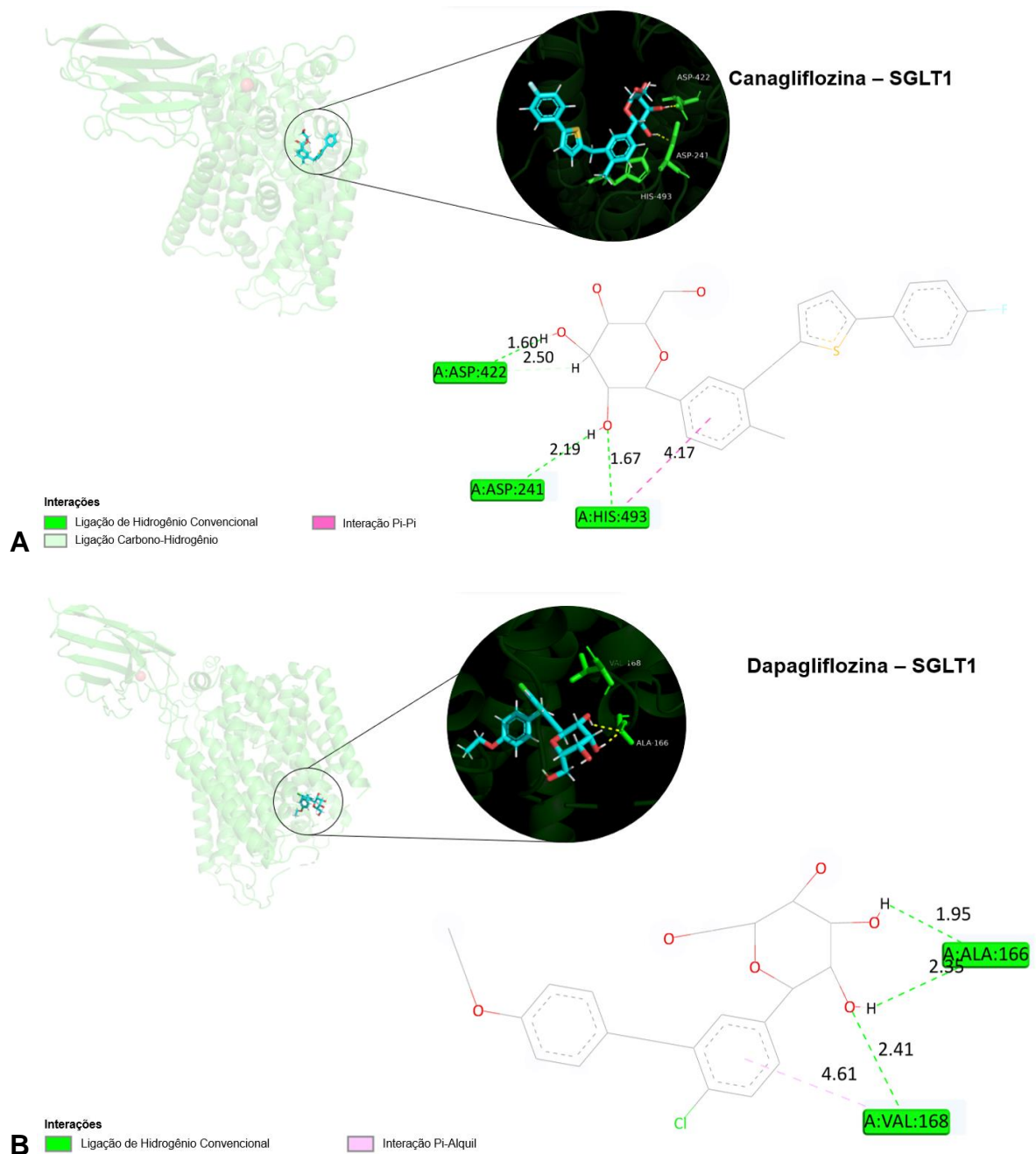
A molécula LASSBio-1986 apresentou-se como “ativa” para imunotoxicidade, com probabilidade de 96%, isto sugere que este composto pode causar uma gama de efeitos sobre o sistema imunológico, desde supressão imune, aumentado a susceptibilidade do indivíduo a infecções e doenças oportunistas, até modulação e ativação desregulada deste sistema, promovendo o desenvolvimento de reações de hipersensibilidade. Entretanto, deve-se levar em consideração que esta previsão é baseada em características da molécula que são equivalentes a outras moléculas com atividade imunotóxica, apesar disto ser um fator crucial e preocupante para o desenvolvimento deste composto, enquanto candidato promissor a fármaco, são necessários ensaios *in vitro* com células imunológicas e ensaios crônicos *in vivo* para que se possa confirmar ou refutar este dado.

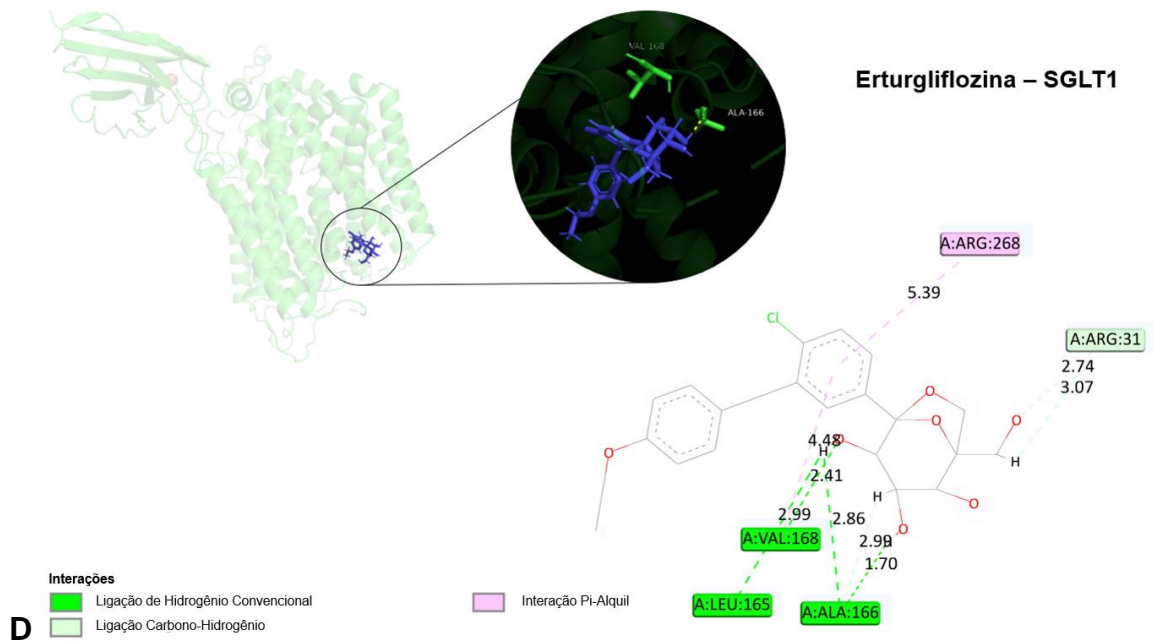
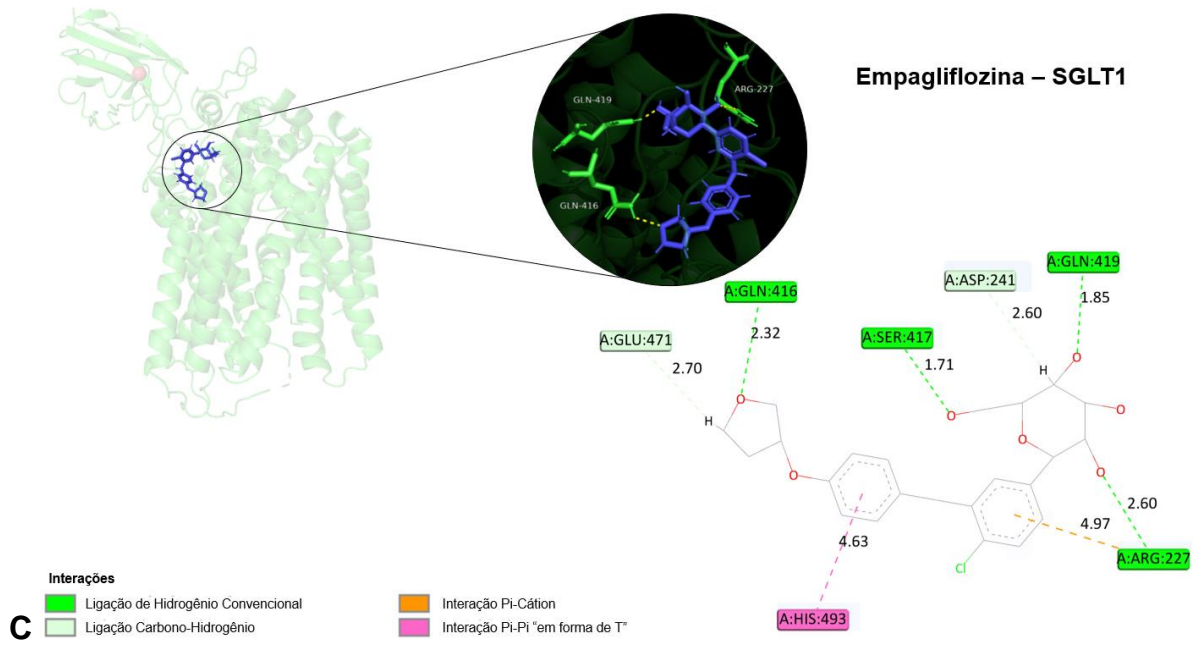
A molécula LASSBio-1986, também, apresentou-se como “ativa” para mutagenicidade, com probabilidade de 50%, indicando que este composto pode induzir mutações genéticas, podendo causar danos às células e resultar em doenças, como o câncer. Todavia, é necessário observar que esta previsão, além

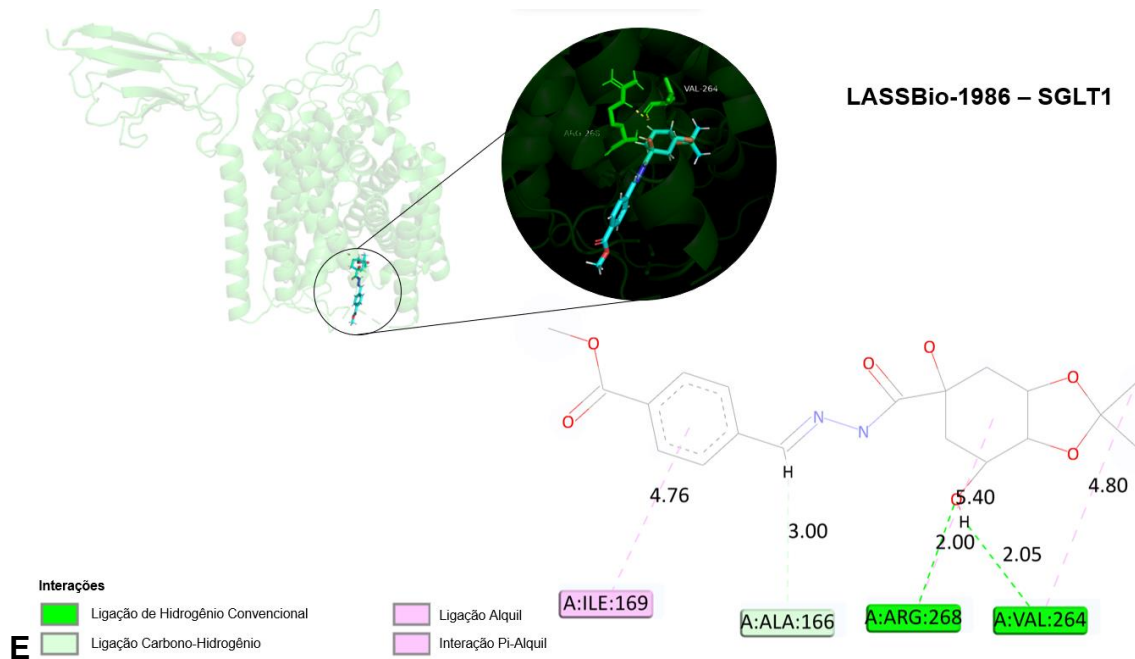
de ser baseada em características de outras moléculas com atividade mutagênicas, também possui uma probabilidade moderado, sendo as chances de a molécula realmente ser mutagênica iguais as chances desta não possuir tais efeitos tóxicos, portanto, são necessários ensaios de mutagenicidade *in vitro* e ensaios crônicos *in vivo* para que se possa anuir ou rebater esta previsão.

5.1.4. Ensaios de Docking Molecular (MD)

Figura 16 – Interação Molécula-Proteína SGLT1







(A) Análise de acoplamento molecular da proteína SGLT1 e da molécula Canagliflozina; (B) Análise de acoplamento molecular da proteína SGLT1 e da molécula Dapagliflozina; (C) Análise de acoplamento molecular da proteína SGLT1 e da molécula Empagliflozina; (D) Análise de acoplamento molecular da proteína SGLT1 e da molécula Ertugliflozina; (E) Análise de acoplamento molecular da proteína SGLT1 e da molécula LASSBio-1986.

A Figura 16 mostra a análise 2D e 3D da interação. Na representação 3D, os três compostos estão em formato *stick*; as proteínas são representadas em formato *cartoon*, enquanto os resíduos envolvidos nas ligações de hidrogênio são mostrados em formato de *stick*. As linhas pontilhadas representam ligações de hidrogênio. O diagrama 2D mostra os resíduos de aminoácidos envolvidos nas interações entre a proteína SGLT1 e os compostos inibidores (Canagliflozina, Dapagliflozina, Empagliflozina, Ertugliflozina e LASSBio-1986) e o comprimento da ligação é expresso na unidade de medida Angstrom (Å). O presente tipo de interação é representado por cores, que são identificadas pela legenda da figura.

A canagliflozina possui escore de afinidade de -7,966 (kcal/mol) e interage com os aminoácidos (aa) ASP-422, ASP-241 e HIS-493 por ligações de hidrogênio convencionais e o aa HIS-493 por ligação carbono-hidrogênio também, a dapagliflozina possui escore de afinidade de -8,077 e interage com os aminoácidos ALA-166 e VAL-168 por ligação carbono-hidrogênio, a empagliflozina possui um escore de afinidade de -8,129 e interage com os aminoácidos GLN-416, GLN-419, SER-417 e ARG-227 por ligações de hidrogênio convencionais, ARG-227 por

ligação pi-cation, também, ASP-241 e GLU-471 por ligação carbono-hidrogênio e HIS-493 por ligação Pi-Pi T-shaped, a Ertugliflozina tem escore de afinidade equivalente a -8,196 e interage com os aminoácidos ALA-166, VAL-168 e LEU-165 por ligações de hidrogênio convencionais, ARG-31 por ligação carbono-hidrogênio e ARG-268 por ligação pi-alquil, e o composto teste LASSBio-1986 possui um escore de afinidade igual a -8,196 e interage com os aminoácidos VAL-264 e ARG-268 por ligações de hidrogênio convencionais, VAL-264 por ligação alquil, também, ALA-166 por ligação carbono-hidrogênio e ILE-169 por ligação pi-alquil.

O escore de afinidade é dado em kcal/mol e indica a força de ligação entre um ligante e um receptor, onde valores mais baixos (mais negativos) indicam uma ligação mais forte. Com relação ao receptor SGLT1, as moléculas que possuem maior força de ligação são a Ertugliflozina e a LASSBio-1986. Cada tipo de ligação contribui de maneira diferente para a estabilidade e a especificidade da interação ligante-receptor (LU *et al*, 2020).

As ligações de hidrogênio convencionais são essenciais para a estabilidade e a especificidade da ligação da droga ao receptor, enquanto ligações carbono-hidrogênio e pi-alquil contribuem para a afinidade, mas são menos específicas, e ligações Pi-cátion e “Pi-Pi *T-Shapped*” evidenciam ligações mais complexas e específicas, que acabam sendo decisivas na seletividade do fármaco (DOUGHERTY *et al*, 2013; ITOH *et al*, 2019; ZHAO *et al*, 2015).

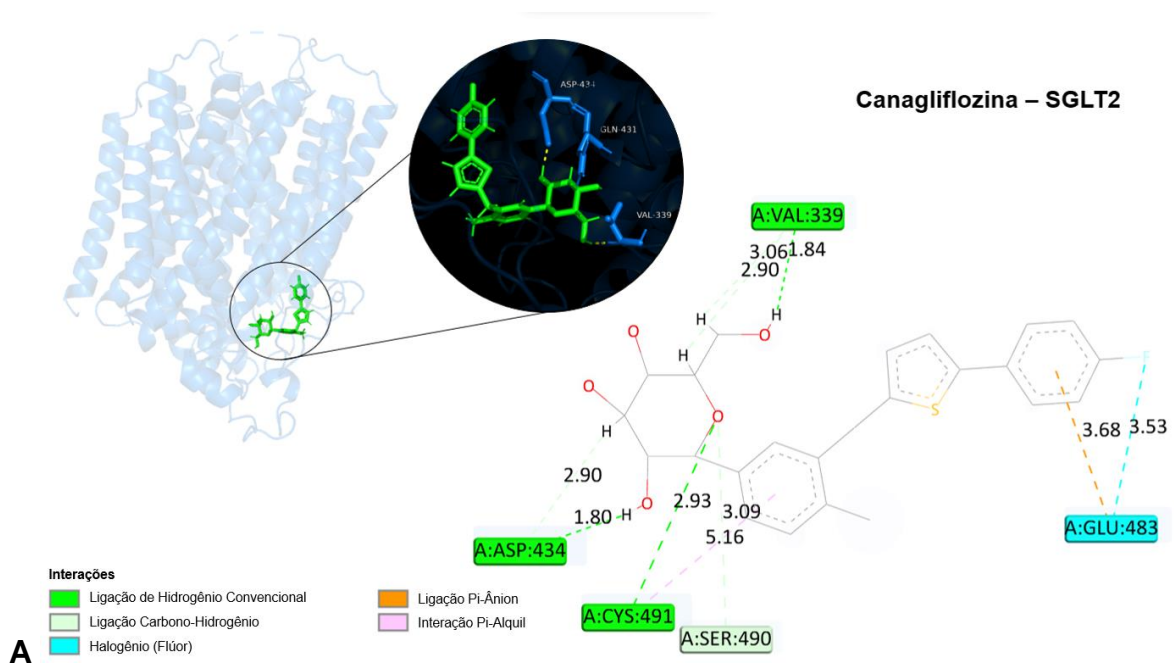
Cada fármaco utilizado como comparativo possui um perfil próprio de interação com os aminoácidos do receptor SGLT1 e, como evidenciado na figura 10, a molécula LASSBio-1986 provavelmente possui o mesmo sítio ativo (área de ligação ao receptor SGLT1) que os fármacos Ertugliflozina e Dapagliflozina, insinuando que a molécula tem a capacidade de se encaixar na mesma porção de ação de outros inibidores e exercer um efeito potencial neste receptor.

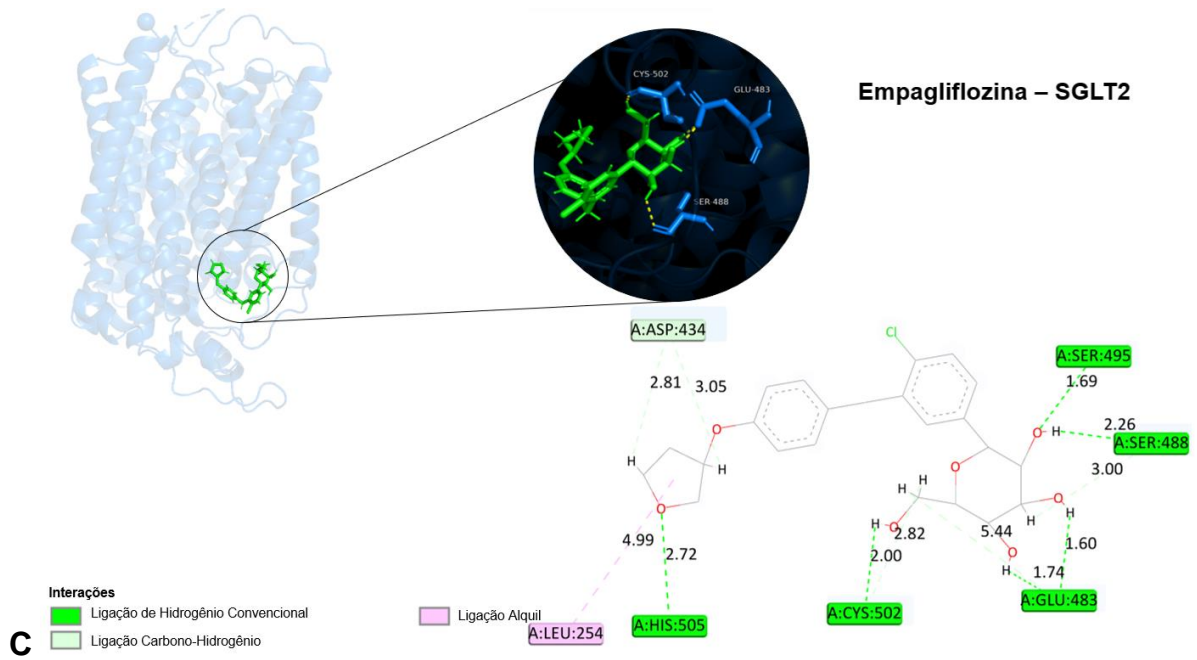
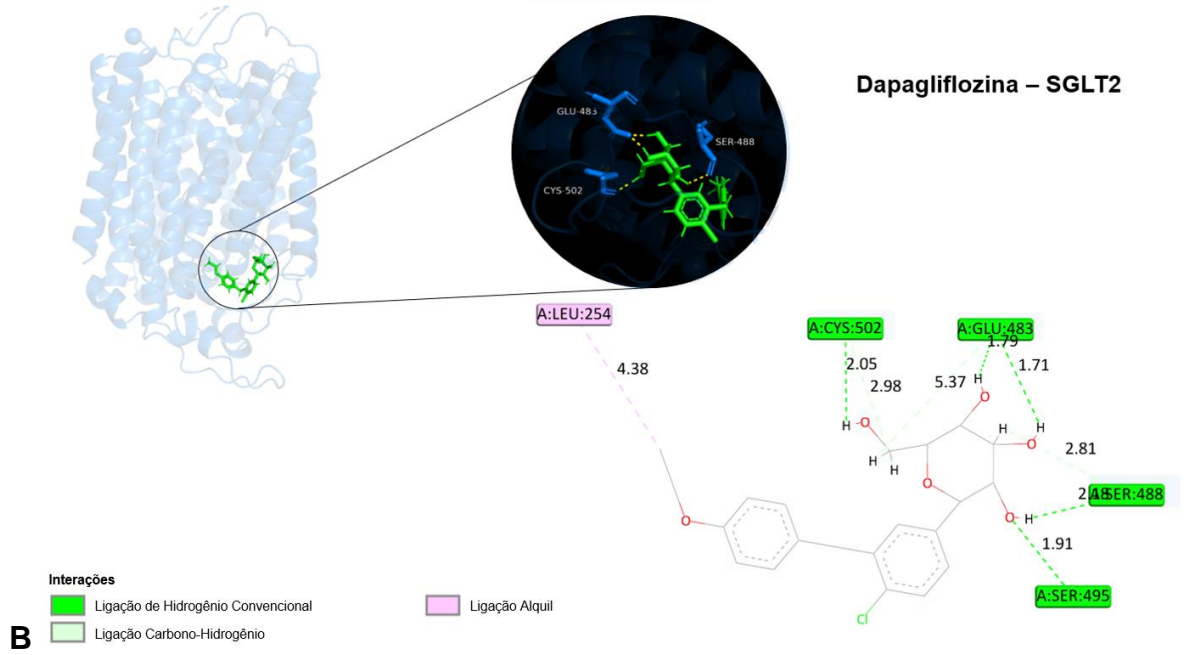
A sobreposição nas interações com o aa ALA-166, baseada na mesma ligação da Dapagliflozina e da Ertugliflozina, e com o aa ARG-268, na interação com a Ertugliflozina, sugere que o composto LASSBio-1986 pode compartilhar parcialmente o mesmo sítio de ação que estes inibidores de SGLT2. Entretanto, a presença de interações exclusivas da LASSBio-1986, como com os aa's VAL-264 e ILE-169, sugere também características distintas no modo de ligação. Esta

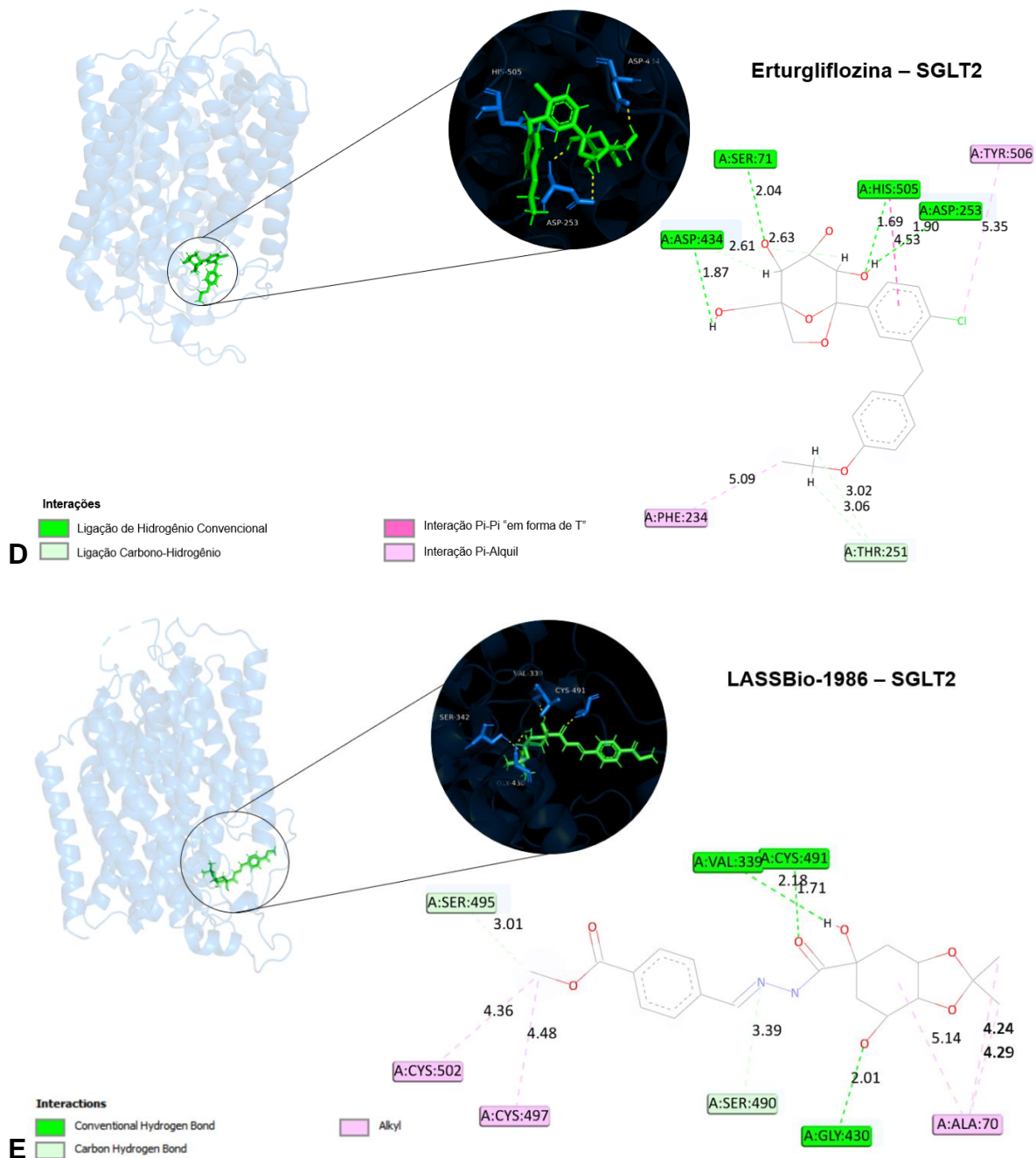
sobreposição parcial de sítios de ligação pode ter implicações significativas para o perfil farmacológico da LASSBio-1986, especialmente em termos de seletividade, eficácia e possíveis efeitos adversos. Além disso, a interação com aminoácidos específicos pode indicar um mecanismo de ação novo, que pode ser explorado para tratar indivíduos que não respondem adequadamente aos fármacos existentes desta classe.

O composto LASSBio-1986 mostra uma afinidade comparável aos controles positivos utilizados para o receptor SGLT1 e apresenta, assim, um perfil de interação molecular diversificado, desta forma, a chave para um potencial como terapia inovadora reside na especificidade e eficácia relativas à capacidade de inibir o receptor SGLT2 em comparação ao SGLT1, o que necessita ser explorado em estudos adicionais.

Figura 17 – Interação Molécula-Proteína SGLT2







(A) Análise de acoplamento molecular da proteína SGLT2 e da molécula Canagliflozina; (B) Análise de acoplamento molecular da proteína SGLT2 e da molécula Dapagliflozina; (C) Análise de acoplamento molecular da proteína SGLT2 e da molécula Empagliflozina; (D) Análise de acoplamento molecular da proteína SGLT2 e da molécula Erturgliflozina; (E) Análise de acoplamento molecular da proteína SGLT2 e da molécula LASSBio-1986.

A Figura 17 mostra a análise 2D e 3D da interação. Na representação 3D, os três compostos estão em formato *stick*; as proteínas são representadas em formato *cartoon*, enquanto os resíduos envolvidos nas ligações de hidrogênio são mostrados em formato de *stick*. As linhas pontilhadas representam ligações de

hidrogênio. O diagrama 2D mostra os resíduos de aminoácidos envolvidos nas interações entre a proteína SGLT2 e os compostos inibidores (Canagliflozina, Dapagliflozina, Empagliflozina, Ertugliflozina e LASSBio-1986) e o comprimento da ligação é expresso na unidade de medida Angstrom (Å). O presente tipo de interação é representado por cores, que são identificadas pela legenda da figura.

A canagliflozina tem escore de afinidade igual a -8,707 (kcal/mol) e interage com os aa'd VAL-339, ASP-434, CYS-491 e GLN-431 por ligações de hidrogênio convencionais e, também, com CYS-491 por ligação halogênio (flúor), com o aa SER-490 por ligação carbono-hidrogênio e com GLU-483 por ligação halogênio (flúor), a dapagliflozina possui escore de afinidade de -7,486 e interage com os aminoácidos SER-488, SER-495, GLU-483 e CYS-502 por ligação de hidrogênio convencional e ligação carbono-hidrogênio, com exceção desta última ligação para o aa SER-495, e LEU-254 por ligação alquil, a empagliflozina tem escore de afinidade igual a -7,882 e interage com os aminoácidos SER-495, SER-488, GLU-483, CYS-502 e HIS-505 por ligações de hidrogênio convencionais e CYS-502, GLU-483 e SER-488 por ligação carbono-hidrogênio, também, enquanto se liga ao aa ASP-434 por ligação carbono-hidrogênio e ao aa LEU-254 por ligação alquil, a ertugliflozina possui escore de afinidade equivalente a -8,528 e interage com os aminoácidos ASP-434, SER-71, HIS-505 e ASP-253 por ligações de hidrogênio convencionais, THR-251 e ASP-434 por ligação carbono-hidrogênio, PHE-234 por ligação pi-alquil e TYR-506 por ligação Pi-Pi T-shaped, enquanto, o composto teste LASSBio-1986 possui um escore de afinidade de -8,431 e interage com os aminoácidos VAL-339, CYS-491, GLY-430 e SER-342 por ligações de hidrogênio convencionais, SER-490 e SER-495 por ligação carbono-hidrogênio e ALA-70, CYS-497 e CYS-502 por ligação alquil.

Os escores de afinidade avaliados sugerem que, dentre as moléculas analisadas, as que possuem maior afinidade com o receptor SGLT2 são a canagliflozina (-8,707 kcal/mol), ertugliflozina (-8,528) e a molécula LASSBio (-8,431), sugerindo que a molécula alvo desta pesquisa possui alta afinidade com o receptor para o qual foi desenvolvida, superando, em modelagem *in silico*, fármacos como dapagliflozina (usada como controle positivo nos testes *in vivo*) e empagliflozina. Isto aponta uma forte afinidade e um perfil de ligação diversificado, potencialmente com alta eficácia e especificidade pelo receptor SGLT2.

Além das ligações supracitadas, as ligações halogênio (flúor) sugerem uma interação mais robusta e potencialmente específica, devido à capacidade do flúor em formar ligações fortes e únicas com aminoácidos específicos (JIANG *et al*, 2016).

A molécula LASSBio-1986 possui um escore de afinidade competitivo e um perfil diversificado de interações, o que uma eficácia melhorada e um perfil de segurança aprimorado em comparação com os fármacos existentes. Este perfil de interação da LASSBio-1986 sugere que o composto pode ter um mecanismo de ação único ou melhorado em comparação com os fármacos existentes.

A figura 17 aponta que todas as moléculas ocupam o mesmo sítio ativo no receptor SGLT2, entretanto, cada molécula possui uma interação específica com tal receptor, havendo sobreposição apenas nas interações da LASSBio-1986 com os aa's VAL-339 e CYS-491, que também são alvos da Canagliflozina, sugerindo uma possível similaridade no modo de ligação ou na especificidade da LASSBio-1986 em relação a esse receptor, o que indica que o composto pode ter um mecanismo de ação único ou melhorado em comparação aos fármacos existentes.

O composto LASSBio-1986 apresentou um escore de afinidade de -8,431 kcal/mol, apontando uma forte ligação ao receptor SGLT2 e as interações com aminoácidos específicos, incluindo ligações de hidrogênio, carbono-hidrogênio e alkil, sugerem um mecanismo de ligação eficiente e potencialmente específico, entretanto, uma ligação, também, significativa com o receptor SGLT1 pode levar ao surgimento de efeitos colaterais gastrointestinais. As interações com diferentes tipos de ligações podem indicar uma capacidade de formar um complexo estável com o receptor SGLT2. O composto LASSBio-1986 parece promissor em termos de afinidade e especificidade para SGLT2 e representa uma contribuição valiosa no tratamento de doenças relacionadas ao SGLT2, como o DM2.

O composto LASSBio-1986 possui escore de afinidade de -8,196 kcal/mol para o receptor SLGT1, sugerindo interação forte com esta proteína, além disto, o composto interage com aa's como VAL-264 e ARG-268 por ligações de hidrogênio e ALA-166 por ligação carbono-hidrogênio, sugerindo uma capacidade de formar ligações estáveis e específicas. Em comparação aos fármacos (Canagliflozina, Dapagliflozina, Empagliflozina e Ertugliflozina), a molécula se encontra no mesmo patamar em termos de afinidade por este receptor.

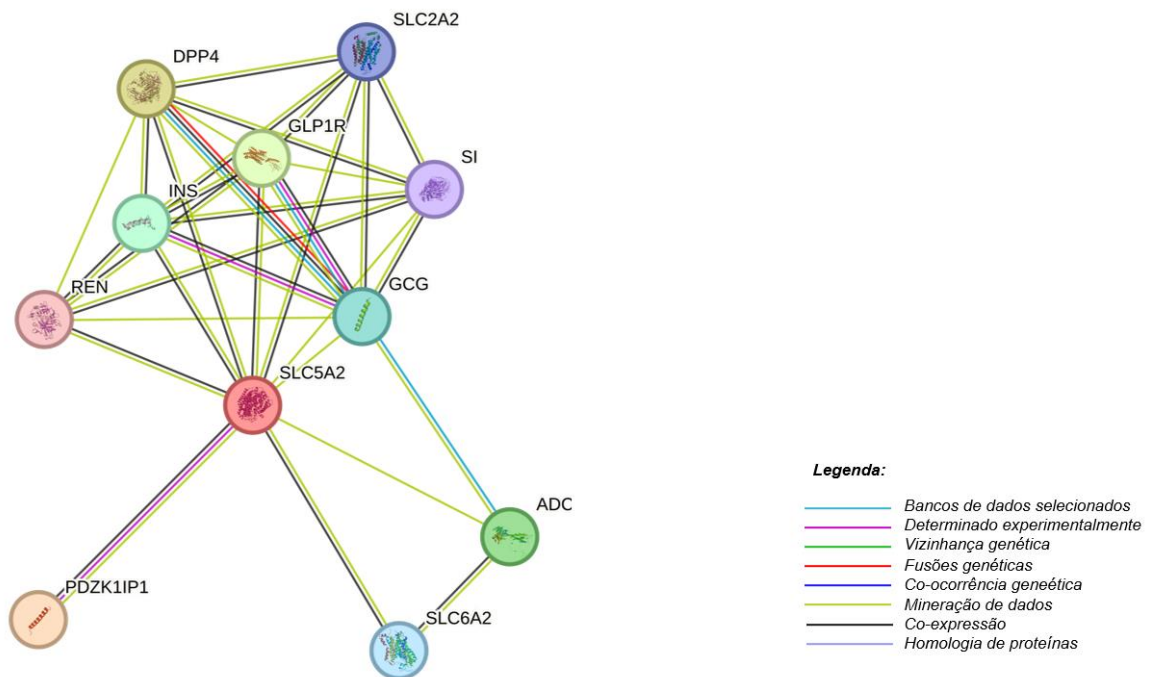
O composto LASSBio-1986, com relação ao receptor SGLT2, demonstrou afinidade significativa (-8,431 kcal/mol), indicando uma forte ligação a este receptor, com interações que sugerem uma forte capacidade de ligação específica ao SGLT2 e, que em comparação com os fármacos existentes, a LASSBio-1986 mostra uma afinidade comparável ou superior para SGLT2, o que é promissor para a eficácia terapêutica da molécula.

O perfil de interação da molécula LASSBio-1986 sugere uma afinidade considerável por ambos os receptores, podendo ser uma vantagem ou desvantagem, dependendo da proporção desta afinidade. Sendo assim, mais estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para determinar a eficácia clínica da LASSBio-1986, avaliando a atividade terapêutica e o perfil de segurança, especialmente em relação à interação do composto com SGLT1 e SGLT2.

5.1.1. Rede de Interação Proteína-Proteína

A análise realizada no banco de dados STRING (Figura 18) revelou que a proteína SGLT2 (SLC5A2) está envolvida em uma via complexa com diversas outras proteínas, como DDP-IV e GLP1R, que possuem papel fundamental no metabolismo da glicose. Com base nessas análises, foram selecionadas estas proteínas, por ambas se relacionarem com a proteína alvo com pontuação de 0,909, sugerindo uma forte evidência, baseada em literatura científica, de que estas proteínas interagem ou estão relacionadas de alguma maneira, por meio de “textmining”, que envolve a análise de grandes volumes de literatura científica para encontrar menções de interações entre proteínas.

Figura 18 – Representação gráfica da rede de interações proteicas para a proteínas SGLT2 (SLC5A2) usando STRING v11.5.



Cada nó representa uma proteína e cada linha representa uma interação. As linhas coloridas entre as proteínas indicam os vários tipos de evidências de interações.

As proteínas presentes nesta rede possuem diversas funções e estão relacionadas a uma gama de efeitos no organismo, e, no contexto de diabetes, estas proteínas têm papel fundamental, como a DPP-4, que é responsável pela degradação de incretinas como o GLP-1 (FILIPPATOS *et al.*, 2014) e o GLP1R, que é ativado por GLP-1 que, por sua vez, possui efeitos múltiplos, incluindo o aumento da secreção de insulina pelas células β -pancreáticas, a prevenção da apoptose de células β e indução à formação de novas células, redução da secreção de glucagon, dentre outros (CAMPBELL *et al.*, 2023).

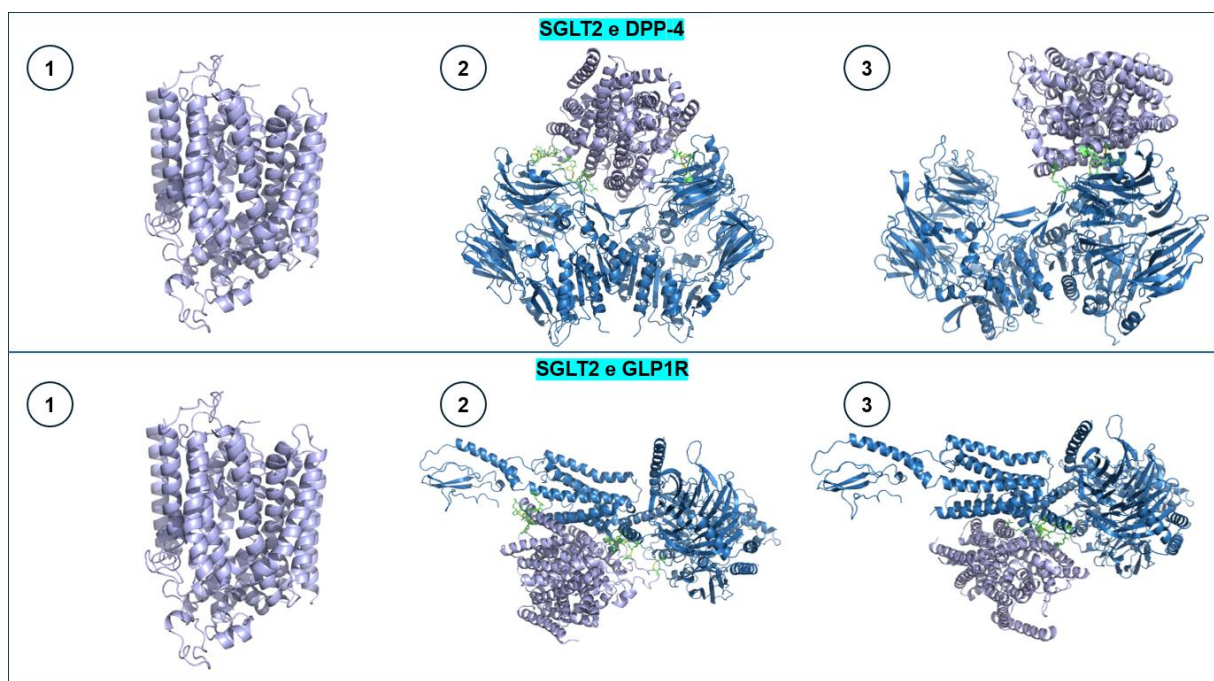
Além das proteínas escolhidas para análise de re-docking, as outras proteínas presentes na rede possuem efeitos diretos e indiretos sobre o metabolismo da glicose, o SLC2A2 (ou GLUT-2) é um transportador de glicose encontrado, principalmente, no fígado, pâncreas, intestino e rins, que desempenha papel crucial na absorção e na regulação da glicose (SUN *et al.*, 2023), a INS (Insulina) é o hormônio fundamental na regulação da glicose, responsável por promover a absorção de glicose pelas células e reduzir a glicemia e o GCG (Glucagon) atua de forma oposta à insulina, elevando a glicose no sangue, principalmente, através da glicogenólise hepática (ROBERTSON *et al.*, 2023), a SI (sucrase-isomaltase) é uma

enzima localizada no intestino que participa da digestão de carboidratos, como sacarose e isomaltose (LE *et al.*, 2022) e a REN (Renina) é uma enzima envolvida na regulação da pressão arterial e do equilíbrio eletrolítico e embora não haja uma relação direta com o controle glicêmico, alterações na função renal causadas pela renina podem afetar a reabsorção de glicose via SGLT2 (FAVRE *et al.*, 2015).

As proteínas selecionadas para a análise de *re-docking* foram DPP-4 e GLP1R, pois ambas possuem escore de 0,909 (que varia de 0 a 1) na plataforma *Bio STRING*, indicando que ambas as proteínas foram mencionadas juntas com o SGLT2 em resumos de artigos disponíveis no PubMed, conferindo maior confiança. Logo, isto sugere que as proteínas (ou genes) em questão são frequentemente mencionadas juntas em publicações científicas.

Na análise de *re-docking*, o controle utilizado foi a interação entre a proteína antes do *docking* com a molécula LASSBio-1986. Depois da análise de *re-docking* da proteína pós *docking* com as proteínas selecionadas, ficou claro que a interação acontece em um local diferente em comparação ao controle (Fig. 20). Estes resultados sugerem fortemente que a interação entre estas proteínas é afetada pela presença da molécula LASSBio-1986, o que pode indicar uma interferência na via de sinalização entre essas.

Figura 19 – Re-docking proteína-proteína.



1. Proteína-alvo SGLT2; 2. Interação entre a proteína-alvo e a proteína na respectiva via selecionada no *STRING*; 3. Análise do complexo formado pela proteína-alvo pós interação com a molécula LASSBio-1986 com a proteína selecionada na respectiva via.

Na análise de *re-docking* no *ClusPro* foram geradas 30 conformações possíveis entre as proteínas (SGLT2/DPP-4 e SGLT2/GLP1R) e a melhor conformação foi selecionada baseada na menor energia de ligação (maior estabilidade). Os resultados evidenciam que a molécula LASSBio-1986 consegue alterar de alguma forma a interação entre estas proteínas, visto que a energia de ligação entre SGLT2 (antes da interação com LASSBio-1986) e DPP-4 é igual a -1688,6, aumentando para -1441,1 após a interação (*docking*), enquanto o valor da energia de ligação entre SGLT2 (antes da interação com LASSBio-1986) e GLP1R é igual a -2423,3, aumentando para -1984,7, após o *docking*.

Ao avaliar as interações polares entre estas proteínas pelo PyMol foi verificado que todas as interações, também, foram modificadas (Quadro 3):

Quadro 3 – Interações polares entre a proteínas selecionadas para o *re-docking* e a proteína-alvo SGLT2.

A. DPP-4

SGLT2 (antes do <i>docking</i>) x DPP4	SGLT2 (depois do <i>docking</i>) x DPP4
ARG136 – GLU191	LEU189 – GLN286
ARG137 – GLU191	SER207 – LYS190
ARG137 – LYS190	TYR198 – ASN281
ARG412 – GLY189	TYR299 – ASP297
ARG412 – TRP187	
ARG414 – ALA282	
ARG414 – ASN281	
ARG414 – THR283	
ARG416 – ASN281	
ARG416 – SER278	
ARG416 – VAL279	
HIS268 – GLU146	
HIS268 – TYR166	
THR271 – GLU146	

B. GLP1R

SGLT2 (antes do <i>docking</i>) x GLP1R	SGLT2 (após o <i>docking</i>) x GLP1R
ALA247 – ASN268	ALA426 – LYS346
ALA519 – ASN407	ARG116 – GLU418
ARG564 – GLU139	ARG392 – GLN410
ARG564 – GLN410	ARG392 – ARG414
ASN51 – GLU138	LEU393 – ARG414
GLN56 – GLU138	SER485 – LYS336
GLY523 – GLN410	VAL423 – LYS346
HIS52 – GLU138	
ILE46 – LYS202	
LYS351 – PHE520	
SER253 – ARG421	

O número de interações entre a proteína SGLT2 antes do *docking* e as proteínas DPP-4 e GLP1R foram de 14 e 11, respectivamente, e após o *docking* com o composto LASSBio-1986 este número foi reduzido para 4 e 7, respectivamente. Além da redução do número de aminoácidos envolvidos na interação, também houve mudança no sítio de interação entre estas proteínas.

A redução no número de interações polares após o *docking* com LASSBio-1986 sugere uma mudança considerável na conformação ou na superfície de interação destas proteínas, indicando que o composto LASSBio-1986 não apenas inibe o canal SGLT2, como também altera a capacidade desta proteína de interagir com outras, podendo, então, afetar a funcionalidade do canal SGLT2 e suas interações no ambiente celular.

Os resultados do *re-docking* indicam que a molécula LASSBio-1986, ao interagir com o canal SGLT2, pode promover alterações na rede de interações proteicas e afetar o metabolismo da glicose de outras maneiras não previstas.

A depender da alteração provocada e do efeito final, estas interações podem ser benéficas, afinal a coadministração de um inibidor de DPP-4 e um inibidor de SGLT2 é uma opção de tratamento desejável para DM2 devido aos seus mecanismos de ação complementares e efeito reduzido/nulo no perfil de segurança de cada agente farmacológico. Estudos futuros adicionais devem ser

realizados para que possa alcançar uma visão mais clara sobre uma possível interação entre estes agentes (GU, *et al.*, 2020).

O uso concomitante de agonistas de GLP-1 e os inibidores do canal SGLT2 também abrem novos caminhos para o sucesso no tratamento de pacientes com DM2, pensando não apenas nos alvos glicêmicos, mas também em resultados cardiovasculares, cerebrovasculares e renais, que resultarão em maior sobrevida e qualidade de vida melhorada, devido seus efeitos sinérgicos sobre o estresse oxidativo e o caráter inflamatório (WINIARSKA, *et al.*, 2021).

5.2. Teste Químico

5.2.1. Avaliação da atividade antioxidante da molécula LASSBio-1986 pelo método ABTS e DPPH

Com base na literatura (KUETE; EFFERTH, 2010), pode-se afirmar que o material exibe uma elevada atividade antioxidante ($CI_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$). A avaliação desse potencial antioxidante foi realizada por meio da medição da inibição dos radicais DPPH e ABTS, amplamente reconhecidos como modelos para avaliar a capacidade de uma substância em neutralizar os radicais livres (FROTA *et al.*, 2023).

Tabela 02 –Atividade antioxidante do composto LASSBio-1986 pelos métodos ABTS e DPPH

Amostras	CI_{50} DPPH• ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{50} ABTS+• ($\mu\text{g/mL}$)
Quercetina (Padrão)	$2,74 \pm 0,08$	$3,98 \pm 0,13$
Ácido Gálico (Padrão)	$1,94 \pm 0,27$	$13,01 \pm 0,03$
LASSBio-1986	$10,59 \pm 0,51$	$14,73 \pm 0,28$

CI_{50} – Concentração Inibitória Média

A atividade antioxidante do LASSBio-1986 demonstra ser promissora, cujos resultados indicam uma eficácia potente ($> 50 \mu\text{g/mL}$). Isto aponta o LASSBio-1986 como um composto que não possui apenas uma capacidade significativa de neutralizar radicais livres em testes *in vitro*, mas também tem um grande potencial para confirmar esses resultados em estudos *in vivo*, conforme será discutido mais

adiante. A eficácia do LASSBio-1986 em baixas concentrações é um indicativo de sua alta potência e eficiência, o que pode resultar em uma menor dosagem necessária para alcançar efeitos antioxidantes desejados, visto que a hiperglicemia, presente no DM2, ativa as vias que promovem o estresse oxidativo, levando a um quadro de inflamação crônica e, conseqüentemente, danos teciduais.

5.3. Testes *in vivo*

5.3.1. Teste de Tolerância à Glicose em camundongos C57Bl/6 (TTG)

Os animais hiperglicêmicos tiveram uma notável hiperglicemia nos tempos 15, 30 e 60 min., em relação ao tempo 0, conforme o esperado após a sobrecarga de glicose (tabela 01).

O LASSBio-1986, na dose de 3 mg/kg, reduziu a glicemia de maneira semelhante à dapagliflozina, na mesma dose, em torno de 38%, 40%, 24% e 34% nos tempos 15, 30, 60 e 120 min., respectivamente, quando comparado ao grupo hiperglicêmico.

Por outro lado, nas doses de 1 e 10 mg/kg, o composto LASSBio-1986 reduziu a glicemia em torno de 21% e 23% e; 17% e 27 nos tempos 15 e 30 min respectivamente, quando comparado ao grupo controle.

Tabela 01 – Efeito do composto LASSBio-1986 e da Dapagliflozina na glicemia em jejum de camundongos C57Bl/6

Grupos	Glicemia (mg/dL) Tempo (min.)				
	0	15	30	60	120
Hiperglicêmico (2g/kg) + Veículo	192.4 ± 10.82	444.7 ± 15.82	341.6 ± 7.29	236.3 ± 12.22	193.6 ± 12.87
Hiperglicêmico (2g/kg) + Dapagliflozina 3 mg/kg	208.7 ± 10.53	264.1 ± 6.33 ^a	222.1 ± 8.18 ^a	163.1 ± 15.35 ^a	112.7 ± 6.38 ^a
Hiperglicêmico (2g/kg) + LASSBio-1986 1 mg/kg	174.6 ± 5.28	349.4 ± 13.40 ^a	283.6 ± 10.91 ^d	215.9 ± 10.45	174.1 ± 9.36
Hiperglicêmico (2g/kg) + LASSBio-1986 3 mg/kg	154.7 ± 7.94	274.9 ± 23.77^a	204.0 ± 14.10^a	178.7 ± 13.93^d	126.3 ± 8.11^c
Hiperglicêmico (2g/kg) + LASSBio-1986 10 mg/kg	161.9 ± 10.07	339.9 ± 13.29 ^a	249.7 ± 8.63 ^a	185.4 ± 13.17	179.3 ± 8.99

Os valores representam as médias ± E.P.M. das sete determinações. ^ap ≤ 0.05, ^bp ≤ 0.01, ^cp ≤ 0.001, ^dp ≤ 0.001 comparado ao grupo hiperglicêmico.

Fonte: Autor, 2023.

O efeito da molécula sobre a homeostasia da glicose corrobora com pesquisas anteriores envolvendo a inibição de SGLT2 por derivados N-acilidrazonas, com menor seletividade para SGLT1 (MACCARI *et al.*, 2022).

A dose de 3 mg/kg do composto LASSBio-1986 demonstrou uma eficácia semelhante à dapagliflozina, administrada na mesma dose, na redução da glicemia, sem diferenças ao comparar os resultados obtidos entre estas moléculas nos tempos 15, 30, 60 e 120 min., o que sugere que a LASSBio-1986 pode atuar com uma alternativa promissora para o tratamento da hiperglicemia em indivíduos diabéticos.

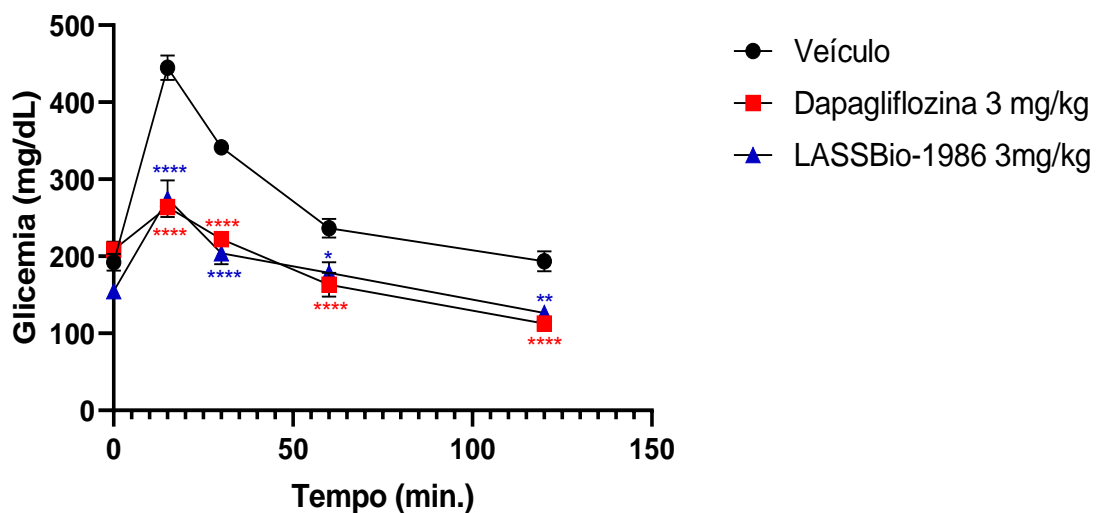
O efeito da LASSBio-1986 variou de acordo com a dose administrada, onde doses mais baixas parecem ter um efeito menos pronunciado na redução da glicemia, enquanto doses mais altas mostraram um efeito maior nos primeiros 30 minutos, o que pode indicar uma ação rápida do composto no controle da glicose.

A molécula LASSBio-1986, desta forma, demonstrou capacidade antidiabética excelente, especialmente na dose de 3 mg/kg, com eficácia

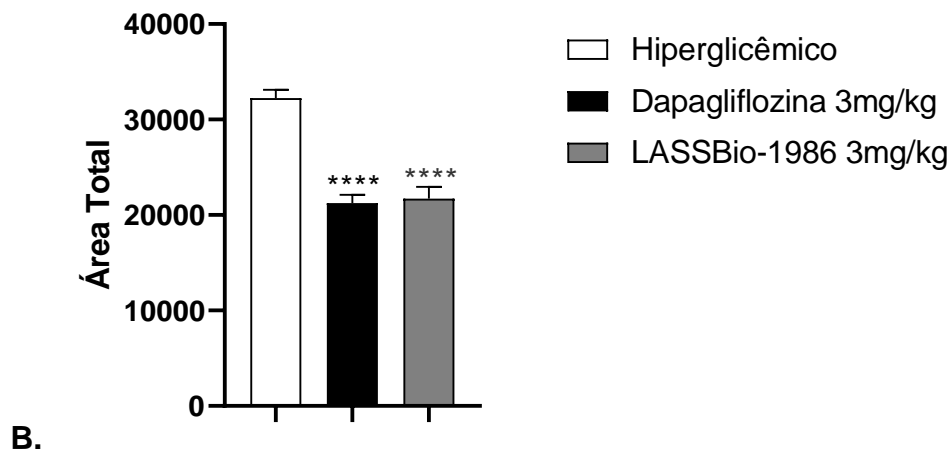
equivalente à dapagliflozina, entretanto, a eficácia do composto se mostra dependente da dose administrada, e demonstrando agir de maneira mais pronunciada nos primeiros 30 minutos após a administração.

O efeito de uma droga no organismo depende da concentração desta no local de ação, independentemente de como ocorra a ação desta, seja por ligação ou interação química, e a resposta à concentração pode ser complexa e é frequentemente não linear. Uma curva dose-resposta tem características que variam, como por exemplo, a inclinação, que configura uma mudança na resposta por dose unitária, e variação biológica, onde há variação da magnitude da resposta entre os indivíduos testados na mesma população em que se administrou a mesma dose do fármaco (FARINDE, 2021). Isto explica a capacidade de determinadas moléculas atingirem a eficácia máxima de sua ação em uma determinada dose, enquanto em doses menores e/ou maiores, a resposta é inferior.

Figura 20 – A. Efeito da molécula LASSBio-1986 (3 mg/kg) e da Dapagliflozina (3 mg/kg) no teste de tolerância a glicose. B. Área sobre a curva da glicemia no grupo tratado com LASSBio-1986 (3 mg/kg) e com Dapagliflozina (3 mg/kg) no teste de tolerância a glicose.



A.



Cada valor representa a média \pm E.P.M. das sete determinações. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p < 0,0001$.

Fonte: Autor, 2023.

Na Figura 20A, é possível observar o comportamento da molécula LASSBio-1986 e da Dapagliflozina ocorrem de forma relativamente similar, não havendo diferenças estatísticas entre si, nos tempos de 15, 30, 60 e 120 min. Na Figura 20B, é demonstrada a área sob a curva (ASC) referente à curva glicêmica, indicando a resposta glicêmica ao longo do tempo após a sobrecarga de glicose (2 g/kg). Uma ASC com maior pico indica uma resposta glicêmica elevada, o que é indesejável para indivíduos com diabetes ou resistência à insulina, logo a diminuição da ASC promovida pela administração de LASSBio-1986 aponta uma funcionalidade como molécula alternativa promissora para o tratamento de DM2, onde a mesma não apresentou diferença quando comparada à ASC da Dapagliflozina. Outros estudos que avaliaram com compostos quimicamente sintetizados no teste de tolerância a glicose também apresentaram redução da área sobre a curva quando comparado ao grupo hiperglicêmico (FREDERICO *et al.*, 2023).

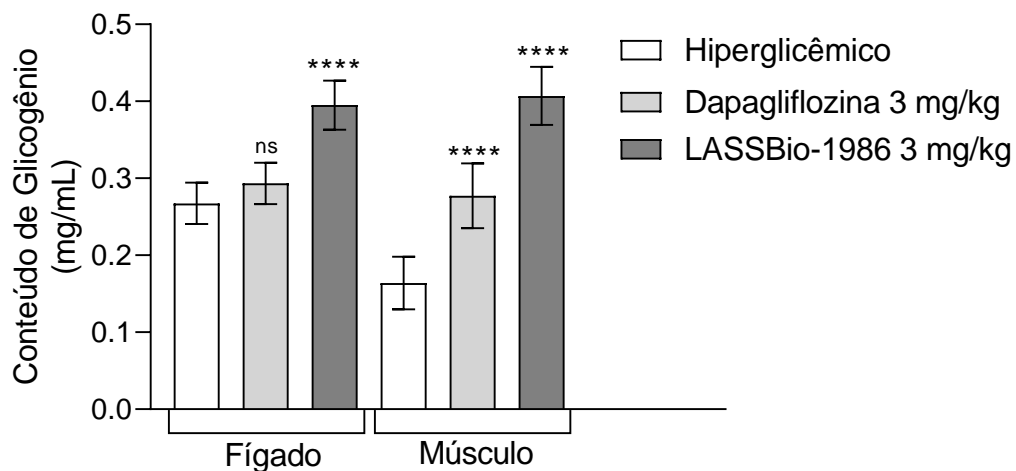
5.3.2. Determinação do conteúdo de glicogênio

O glicogênio é a principal forma de reserva de glicose no corpo, agindo como uma fonte acessível de glicose para manter os níveis glicêmicos dentro da normalidade, principalmente em períodos de jejum ou entre as refeições. O fígado age em períodos de jejum curto, promovendo a glicogenólise, a fim de fornecer glicose para o organismo, enquanto o músculo armazena glicogênio como fonte

rápida, principalmente, durante a realização de atividades físicas, além disto, o fígado fornece glicose para todo o organismo, enquanto o músculo a armazena para uso próprio, porém, em indivíduos com DM2, há uma diminuição das reservas de glicose, com diminuição da síntese de glicogênio, principalmente devido ao fato de a insulina ser uma das principais responsáveis pela indução de produção de glicogênio, promovendo efeitos anabólicos, e como estes indivíduos são resistentes à insulina, esta resposta fisiológica é deficiente (BERG *et al.*, 2002; KRSSAK *et al.*, 2002; RODER *et al.*, 2016; ARAUJO *et al.*, 2022). A partir destes dados, foram avaliados os conteúdos de glicogênio em tecidos hepáticos e musculares em camundongos submetidos ao tratamento com LASSBio-1986.

A análise revelou que, comparado ao grupo hiperglicêmico, o tratamento com LASSBio-1986 aumentou em 47,75% o conteúdo de glicogênio hepático e em 148,32% o conteúdo de glicogênio muscular, enquanto a Dapagliflozina, na mesma dose, elevou o conteúdo de glicogênio hepático e muscular em 9,72% e 69,24%, respectivamente (Fig. 14). Outros estudos que avaliaram com compostos quimicamente sintetizados no metabolismo da glicose também observaram um aumento do glicogênio hepático e muscular em ratos wistar (MENDES *et al.* 2018; SULIS *et al.*, 2019; FREDERICO *et al.* 2023).

Figura 21 – Efeito do LASSBio-1986 (3 mg/kg) sobre o conteúdo de glicogênio muscular e hepático



Cada valor representa a média \pm E.P.M. das sete determinações. $^{\wedge}p \leq 0.05$, $^{**}p \leq 0.01$, $^{***}p \leq 0.001$, $^{****}p < 0,0001$.

Fonte: Autor, 2023.

Indivíduos normoglicêmicos conseguem reabsorver cerca de 90% da glicose filtrada nos rins, ao inibir o canal SGLT2, os inibidores deste canal aumentam a excreção de glicose via urinária, reduzindo os níveis plasmáticos de glicose, em resposta a este mecanismo, o fígado aumenta a produção de glicogênio para manter a homeostasia (FERRANNINI *et al.*, 2017). Nos músculos, o conteúdo de glicogênio sofre o mesmo processo em situações em que há alteração nos níveis de glicose, logo, fármacos que reduzem estes níveis, também acabam promovendo uma maior captação de glicose do músculo para que seja armazenada em forma de glicogênio (HE *et al.*, 2004). A molécula LASSBio-1986 foi capaz de aumentar os conteúdos de glicogênio hepático e muscular em 34,66% e 46,72% em relação à Dapagliflozina, demonstrando que o fármaco possui evidente ação sobre a excreção urinária de glicose e, ao provocar a depleção de glicose, leva ao aumento do conteúdo de glicogênio, entretanto, são necessários testes *in vitro* para verificar através de quais mecanismos este efeito ocorre.

Os resultados encontrados, ainda, corroboram com dados pré-clínicos de outro inibidor do SGLT2 – Empagliflozina – que foi capaz de aumentar a síntese de glicogênio pela via de sinalização AMPK/CREB/GSK3 β , sugerindo um possível mecanismo de ação pode levar ao aumento do conteúdo de glicogênio hepático e muscular (YU *et al.*, 2022). Outros possíveis mecanismos que justificam o aumento do conteúdo de glicogênio no músculo e no fígado podem estar ligados ao fato de inibidores de canais SGLT2 aumentarem a sensibilidade à insulina, isto associado a uma melhora na função das células β pancreáticas, causando uma ação mais eficaz deste hormônio, promovendo um maior transporte de glicose para as células musculares, sendo armazenada como glicogênio (XU *et al.*, 2022).

Além disto, estes inibidores, como a Dapagliflozina, suprimem a sinalização hepática do glucagon através de um mecanismo de “*down-regulation*” do receptor hepático do glucagon, ao fazer isto, há uma diminuição da glicogenólise promovida por glucagon, a partir da qual ocorreria a quebra do glicogênio hepático em glicose-1-fosfato, que seria convertida em glicose-6-fosfato e, por fim, em glicose, e o glucagon também é responsável por suprimir a glicogênese (formação de glicogênio a partir de glicose), logo, ao ter o efeito diminuído, há, conseqüentemente, um aumento da glicogênese (WANG *et al.*, 2017).

5.3.3. Avaliação do estresse oxidativo em tecidos muscular, hepático e renal.

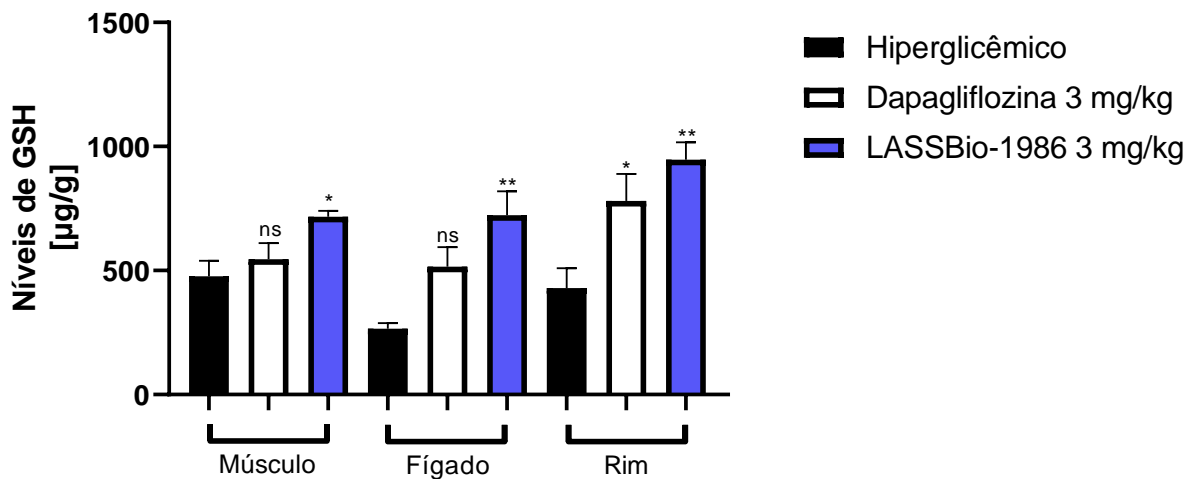
A hiperglicemia, presente no DM, quando se mantém por períodos prolongados, é responsável por diversas complicações associadas ao DM, onde o estresse oxidativo possui papel fundamental nestas complicações. O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a geração e a eliminação de ROS, que são moléculas geradas através do metabolismo celular, entretanto, possuem alta reatividade química, permitindo a interação com diversas macromoléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, danificando-as. Por este motivo, são necessários mecanismos intrínsecos de defesa afim de evitar lesões oxidativas, como a Glutathione Peroxidase (GSH – forma reduzida da enzima), Superóxido Dismutase (SODs), dentre outras (BURGOS-MORÓN *et al.*, 2019). O controle glicêmico inadequado no DM2 aumenta níveis elevados de ROS e NO, induzindo o aumento da peroxidação lipídica e diminui a capacidade antioxidante do organismo (MANDAL, M. *et al.*, 2019).

5.3.3.1. Avaliação dos níveis de GSH

A glutathione é um tripeptídeo composto por ácido glutâmico, cisteína e glicina e é uma das principais moléculas que constituem os antioxidantes, agindo como desintoxicante e regente do sistema imunológico, participando diretamente na neutralização de radicais livres e ROS e mantendo antioxidantes exógenos, como as vitaminas C e E, em suas formas reduzidas (ADEOYE *et al.*, 2018).

Em indivíduos com DM2, os níveis de GSH podem estar comprometidos devido ao aumento do estresse oxidativo associado à hiperglicemia crônica (Fig. 15), sendo o estresse oxidativo uma característica comum no DM2 e estando relacionado à disfunção das células β pancreáticas e à resistência à insulina (MARITIM *et al.*, 2003).

Figura 22 – Efeito do LASSBio-1986 sobre os níveis de GSH em tecidos muscular, hepático e renal.



Cada valor representa a média \pm E.P.M. das sete determinações. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Fonte: Autor, 2023.

Os resultados do ensaio de determinação dos níveis de GSH, em tecidos muscular, hepático e renal, indicam uma redução no estresse oxidativo nestes tecidos, provavelmente devido à melhora no controle da glicemia. O composto LASSBio-1986 foi capaz de aumentar em 50,5%, 172,6% e 120,3% os níveis de GSH em tecidos muscular, hepático e renal, respectivamente. Enquanto a Dapagliflozina, na mesma dose, aumentou em 14,5%, 94,5% e 81,6% os níveis de GSH em tecidos muscular, hepático e renal, respectivamente. Estes dados sugerem uma possível ação antioxidante do composto LASSBio-1986 superior à dapagliflozina.

No tecido renal, este dado se torna clinicamente relevante, visto que uma das principais complicações do DM2, é a nefropatia diabética (FARMAKI *et al.*, 2020), onde o estresse oxidativo desempenha papel importante na patogênese do DM2, portanto, reduzir o estresse oxidativo nos rins pode ser benéfico na prevenção ou na desaceleração da progressão desta complicação e a capacidade desse composto em melhorar o equilíbrio nos tecidos renais pode ser fundamental para preservar a função renal em pacientes diabéticos.

No tecido hepático, este dado também é relevante, afinal o DM2 está associado ao desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica (NASH) (HU *et al.*, 2017), situação patológica em que há acúmulo de gordura e inflamação no fígado e reduzir o estresse oxidativo neste órgão é benéfico na prevenção e na desaceleração da progressão deste quadro clínico.

Estes resultados, logo, apontam que o tratamento com LASSBio-1986 levou a um maior aumento nos níveis de GSH, quando comparado ao grupo tratado com Dapagliflozina na mesma dose, o que pode indicar uma eficácia superior do ponto de vista de atividade antioxidante.

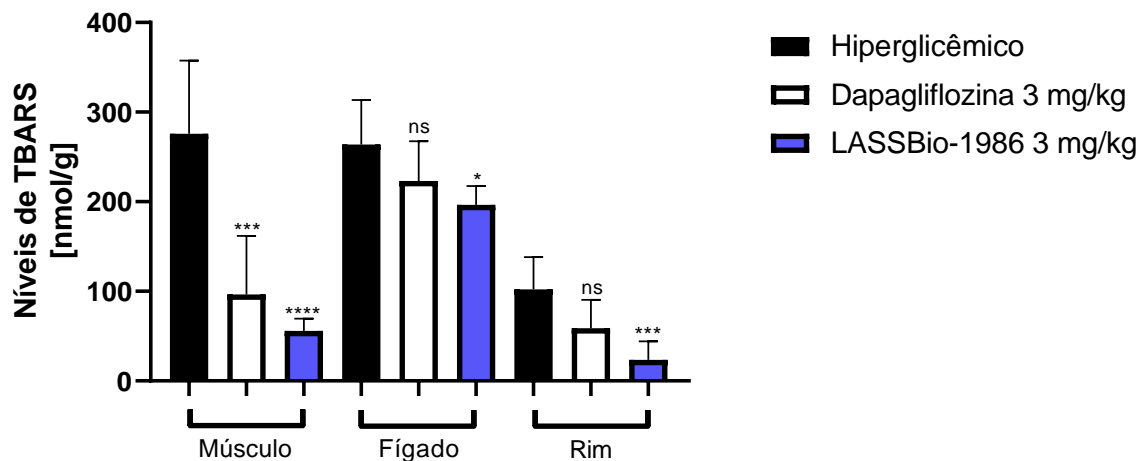
Os inibidores dos canais SGLT2 demonstram ter efeitos como antioxidantes indiretos, pois podem reduzir o estresse oxidativo elevado induzido pela glicose e efeitos diretos na redução do estresse oxidativo, agindo como agentes antioxidantes que atuam protegendo diferentes tecidos contra o dano oxidativo diretamente, eliminando os radicais livres e aumentando o sistema antioxidante biológico (YARIBEYGI *et al.*, 2019; WINIARSKA *et al.*, 2021). A partir destes dados, encontra-se uma consonância entre os resultados obtidos e a literatura acerca dos inibidores dos canais SGLT2.

Um possível mecanismo de ação que corrobora com este efeito foi associado ao potencial da Canagliflozina – fármaco inibidor do SGLT2 – em ações antioxidantes, antiinflamatórias e antiapoptóticas *in vivo* que previnem lesões causadas. Estas ações podem envolver mecanismos como a via AMPK – Akt – eNOS, que interfere diretamente no estresse oxidativo, pois, estes componentes possuem papel importante na regulação do equilíbrio redox celular (HASAN *et al.*, 2020).

5.3.3.2. Avaliação dos níveis de TBARS

As Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) são produtos que resultam da degradação de lipídios formados durante a peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA), um processo no qual os lipídios são danificados pela ação de EROs, desta forma, as TBARS são, então, usadas como marcadores de peroxidação lipídica e estresse oxidativo. Indivíduos com DM2, têm aumento na peroxidação lipídica, resultado direto do aumento dos níveis de glicose no sangue (Fig. 24). A peroxidação lipídica está relacionada a danos celulares e teciduais que contribuem para as complicações diabéticas, como doença cardiovascular, retinopatia diabética e neuropatia diabética (GHANI *et al.*, 2017).

Figura 23 – Efeito do LASSBio-1986 sobre os níveis de TBARS em tecidos muscular, hepático e renal.



Cada valor representa a média \pm E.P.M. das sete determinações. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p < 0,0001$.

Fonte: Autor, 2023.

Os resultados da determinação dos níveis de TBARS, em tecidos muscular, hepático e renal, apontam uma redução no estresse oxidativo nestes tecidos, visto que o composto LASSBio-1986 foi capaz de reduzir em 79,7%, 25,6% e 76,9% os níveis de TBARS em tecidos muscular, hepático e renal, respectivamente. Enquanto a Dapagliflozina, na mesma dose, reduziu em 65%, 15,4% e 42,5% os níveis de TBARS em tecidos muscular, hepático e renal, respectivamente, reforçando a ação antioxidante superior do composto LASSBio-1986 quando comparada à dapagliflozina, corroborando, assim, com o resultado encontrado no teste de GSH.

Os valores de TBARS no grupo hiperglicêmico refletem a condição de hiperglicemia, onde os níveis elevados de TBARS indicam um aumento da peroxidação lipídica, o que é comum em condições de estresse oxidativo. A Dapagliflozina, sendo um inibidor do SGLT2, que atua no rim para reduzir a reabsorção de glicose e aumentar a excreção de glicose na urina, resultando em uma redução nos níveis de glicose no sangue, é capaz de reduzir os níveis de TBARS nos tecidos muscular, hepático e renal, indicando uma possível redução da peroxidação lipídica em resposta ao tratamento com este fármaco. Da mesma forma o composto LASSBio-1986, sendo um inibidor do mesmo canal, atua de maneira similar à Dapagliflozina, levando a uma redução dos níveis de TBARS no tecido muscular, indicando uma redução neste processo de peroxidação lipídica.

Os inibidores do SGLT2 têm efeitos positivos sobre o estresse oxidativo e a molécula LASSBio-1986 apresentou resultados promissores e concordantes com a literatura, por se tratar de uma molécula desenhada para inibir o canal SGLT2. O mecanismo de ação da LASSBio-1986 ainda é desconhecido, entretanto é possível que se assemelhe a alguns mecanismos de outros inibidores:

- Inativação da NADPH Oxidase, suprimindo a produção de ROS e redução de AGE's;
- Regulação negativa da expressão de Nox4 e de fatores pró-inflamatórios; inibição do dano celular mediado por H₂O₂;
- Diminuição de TBARS juntamente com citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 e TNF- α ;
- Eliminação elevada de radicais ABTS (uma medida da capacidade antioxidante);
- Promoção da translocação do fator 2 relacionado ao NFE2 (Nrf2) para o núcleo e a ativação da sinalização Nrf2/ARE, onde Nrf2 constitui um fator de transcrição que ativa a resposta inata do corpo humano contra EROs (LAMBADIARI *et al.*, 2021; LLORENS-CEBRIÀ *et al.*, 2022).

Todos estes mecanismos neutralizam os potenciais efeitos oxidativos da cetogênese induzida pela hiperglicemia. Sendo assim, são necessários estudos *in vitro* mais complexos que possibilitem a descoberta do mecanismo de ação do composto LASSBio-1986 sobre o estresse oxidativo.

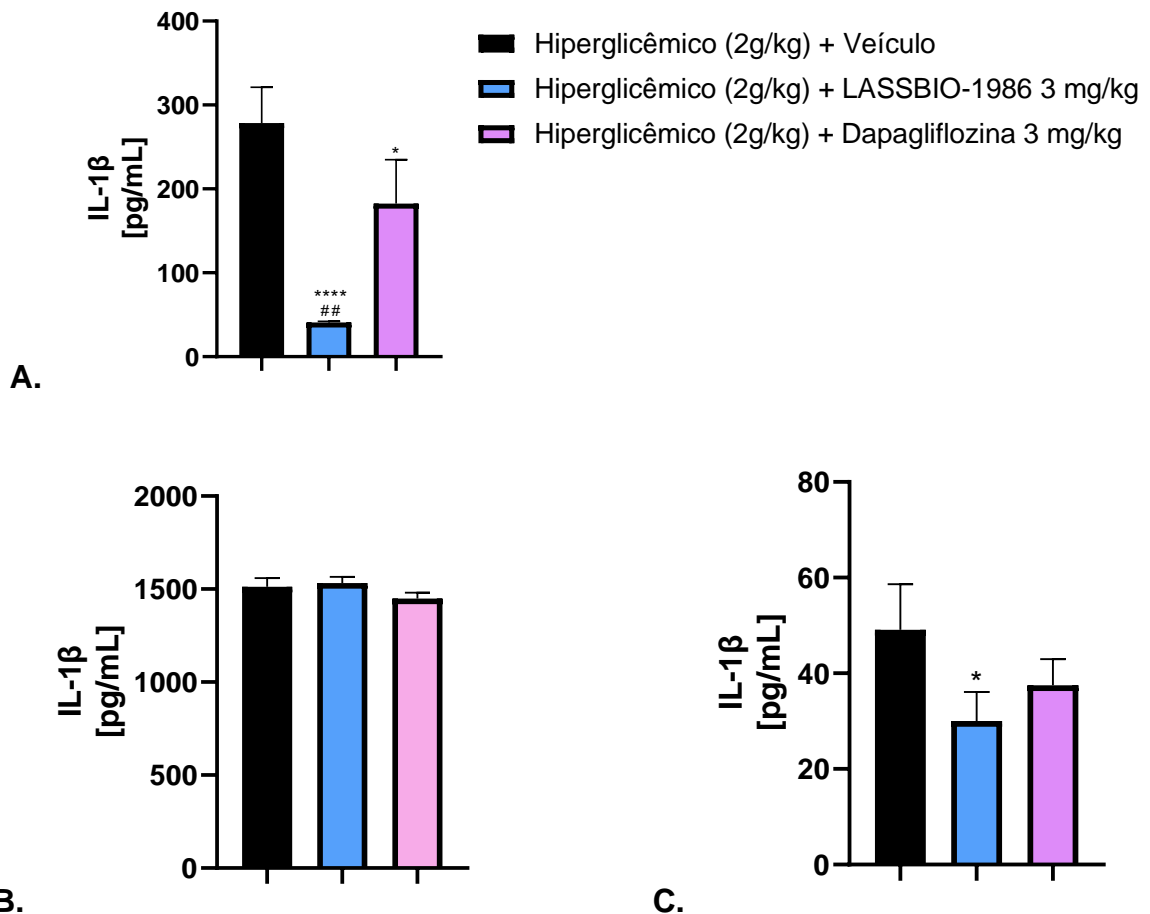
Em suma, tendo em vista o importante papel do estresse oxidativo no DM2, o uso de agentes terapêuticos com ações antioxidantes, como a molécula LASSBio-1986, representa uma estratégia terapêutica promissora, uma vez que agentes antioxidantes têm efeitos benéficos diversos, prevenindo e/ou melhorando complicações macro e microvasculares no DM2.

5.3.4. Avaliação do Perfil Inflamatório

A chave entre a obesidade e as suas complicações é a inflamação, diversas citocinas pró-inflamatórias e fatores de transcrição nuclear associados à inflamação estão relacionados à secreção deficiente de insulina, contribuindo para

a patogênese do DM2, como IL-1 β , TNF- α e NF- κ B, dentre outras. Afinal, a glicose em alta concentração pode induzir a produção e secreção destas citocinas pró-inflamatórias a partir de células β pancreáticas humanas (LI *et al.*, 2023).

Figura 24 – Níveis de IL-1 β em tecidos musculares (A), hepáticos (B) e renais (C) de camundongos C57Bl/6.



*Amostras comparados ao grupo hiperglicêmico (controle negativo)

#Amostras comparados ao grupo Dapagliflozina (controle positivo)

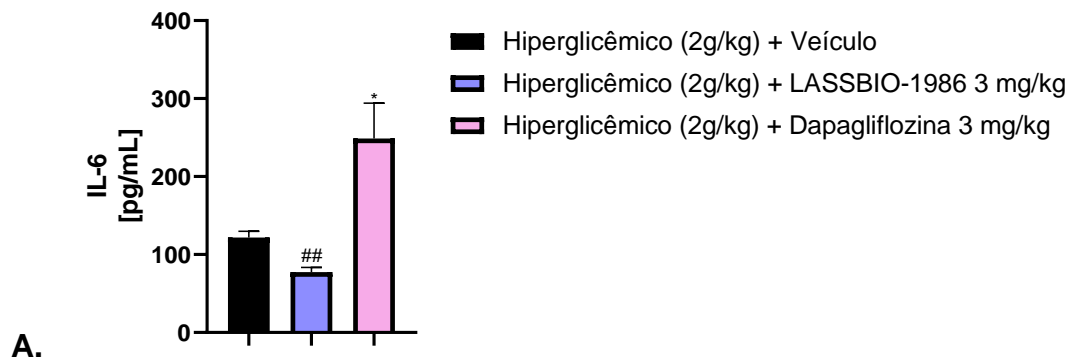
A administração do composto LASSBio-1986 conseguiu reduzir os níveis de IL-1 β em tecidos musculares e renais, superando o efeito da Dapagliflozina administrada na mesma concentração, cuja ação foi eficaz em reduzir a concentração de IL-1 β apenas no tecido muscular.

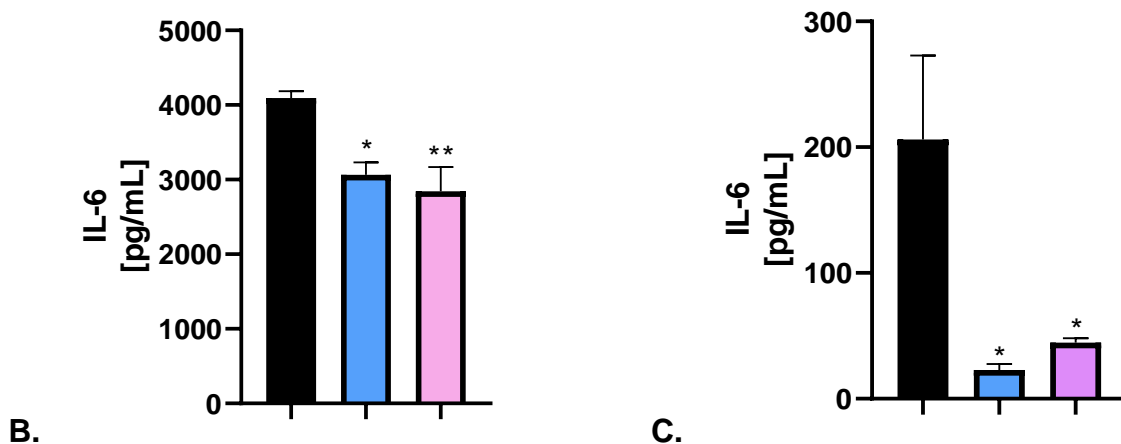
A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória que contribui para a resistência à insulina e à destruição das células β pancreáticas, induzindo a inflamação, exacerbando as condições do DM2 e suas complicações associadas, como a

nefropatia diabética, esteatose hepática e disfunção muscular, alterando de forma negativa a homeostasia da glicose (DONATH, *et al.*, 2011).

O LASSBio-1986 demonstrou capacidade notável de atuar sobre múltiplos tecidos alvo, o que pode ser atribuído à sua eficácia em reduzir a inflamação sistêmica, um fator chave no DM2 e suas complicações associadas. A inflamação crônica, marcada por elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , contribui para o desenvolvimento de resistência à insulina e disfunção tecidual, logo, a eficácia da molécula LASSBio-1986 em reduzir os níveis desta citocina em tecidos renais e musculares pode oferecer uma abordagem mais abrangente no tratamento do DM2, pois essa dualidade de ações sugere um perfil farmacológico potencialmente mais amplo, podendo conferir vantagens no tratamento de pacientes diabéticos com altos níveis de inflamação ou em risco de desenvolver complicações renais.

Figura 25 – Níveis de IL-6 em tecidos musculares (A), hepáticos (B) e renais (C) de camundongos C57Bl/6.





*Amostras comparados ao grupo hiperglicêmico (controle negativo)

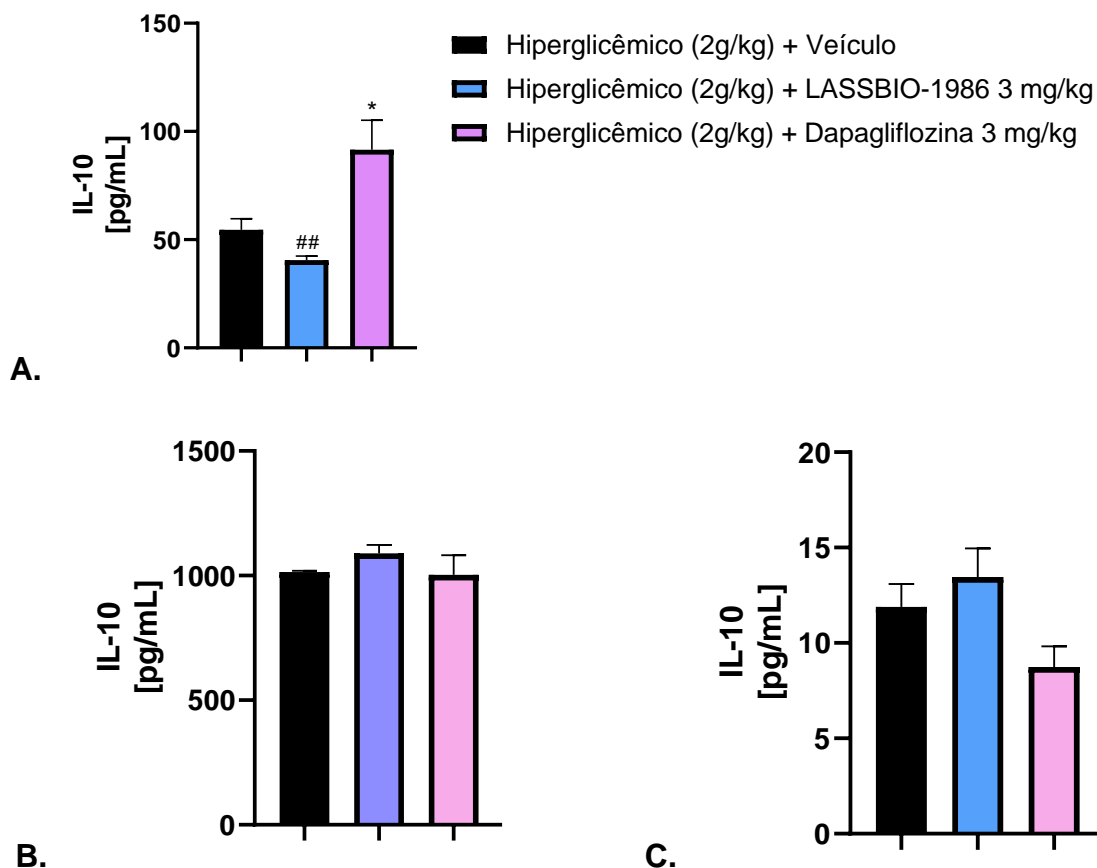
#Amostras comparados ao grupo Dapagliflozina (controle positivo)

A administração do composto LASSBio-1986 conseguiu reduzir os níveis de IL-6 em tecidos hepático e renais, assim como a Dapagliflozina administrada na mesma concentração, entretanto, o fármaco Dapagliflozina aumentou os níveis de IL-6 em tecido muscular.

A IL-6 desempenha um papel ambíguo no metabolismo da glicose, embora inicialmente considerada apenas pró-inflamatória, pesquisas recentes sugerem que esta citocina também pode ter efeitos anti-inflamatórios e protetores em determinados contextos. No DM2, níveis elevados de IL-6 estão associados à resistência à insulina e à inflamação sistêmica, entretanto, no músculo, a IL-6 pode contribuir de forma positiva para o controle da homeostasia da glicose e da sensibilidade à insulina (ELLINGSGAARD *et al.*, 2011; FEBBRAIO, 2014).

O resultado da administração do composto LASSBio-1986 na diminuição dos níveis de IL-6, alinha este novo inibidor de SGLT2 com os efeitos anti-inflamatórios desejados para o tratamento do DM2 e suas complicações. Esta redução nos tecidos hepático e renal sugere que a molécula pode oferecer benefícios sobre a inflamação sistêmica, contribuindo potencialmente para a prevenção da nefropatia diabética e da esteatose hepática, que são complicações comuns, mas graves, do diabetes.

Figura 26 – Níveis de IL-10 em tecidos musculares (A), hepáticos (B) e renais (C) de camundongos C57BI/6.



*Amostras comparados ao grupo hiperglicêmico (controle negativo)

#Amostras comparados ao grupo Dapagliflozina (controle positivo)

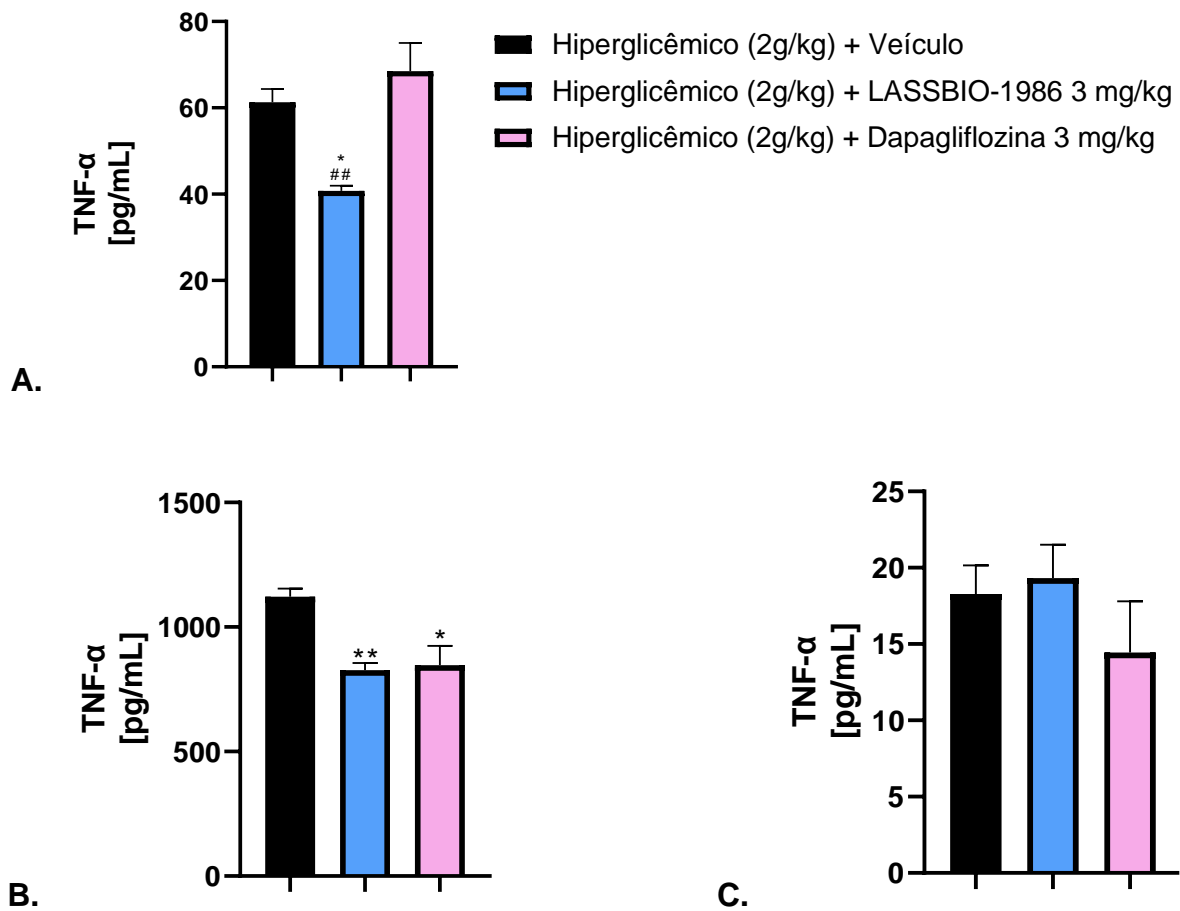
O composto LASSBio-1986 não demonstrou efeitos sobre os níveis de IL-10 em ambos os tecidos, apenas a Dapagliflozina conseguiu aumentar os níveis de IL-10 no tecido muscular.

IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que desempenha um papel importante na limitação da resposta inflamatória e na prevenção de danos teciduais. No contexto do DM2, a IL-10 ajuda a mitigar a inflamação em tecidos chave, promovendo uma melhora na sensibilidade à insulina e protegendo contra complicações diabéticas, como danos renais e hepáticos (OUCHI *et al.*, 2011).

É essencial uma abordagem metodológica mais aprofundada do composto LASSBio-1986 para compreender suas potenciais vantagens e limitações como terapia para o DM2. A capacidade de modular a inflamação é um componente

crítico do tratamento do diabetes e de suas complicações, entretanto a falta de efeito sobre a IL-10 não desqualifica o LASSBio-1986 como um candidato terapêutico valioso, apenas destaca a necessidade de uma compreensão mais profunda de seus alvos farmacológicos.

Figura 27 – Níveis de TNF- α em tecidos musculares (A), hepáticos (B) e renais (C) de camundongos C57Bl/6.



*Amostras comparados ao grupo hiperglicêmico (controle negativo)

#Amostras comparados ao grupo Dapagliflozina (controle positivo)

O composto LASSBio-1986 reduziu os níveis de TNF- α nos tecidos muscular e hepático, superando, mais uma vez, o efeito do controle positivo (Dapagliflozina administrada na mesma dose), visto que este fármaco reduziu os níveis de TNF- α apenas no tecido hepático.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que tem papel bem definido na patogênese da resistência à insulina e do DM2, contribuindo para a inflamação e a

resistência à insulina. A redução dos níveis desta citocina tem demonstrado melhorias na sensibilidade à insulina e na função metabólica de vários tecidos (HOTAMISLIGIL, 2006).

A superioridade do efeito do composto LASSBio-1986 em reduzir os níveis de TNF- α em múltiplos tecidos pode ser atribuída a possíveis vantagens farmacológicas, como um efeito anti-inflamatório mais amplo, quando comparado à Dapagliflozina ou a mecanismos de ação diferenciados, pois além de inibir o canal SGLT2, o composto LASSBio-1986 pode estar interagindo com outras vias ou células imunológicas que a Dapagliflozina pode não interagir, o que poderia explicar a redução mais ampla dos níveis de TNF- α .

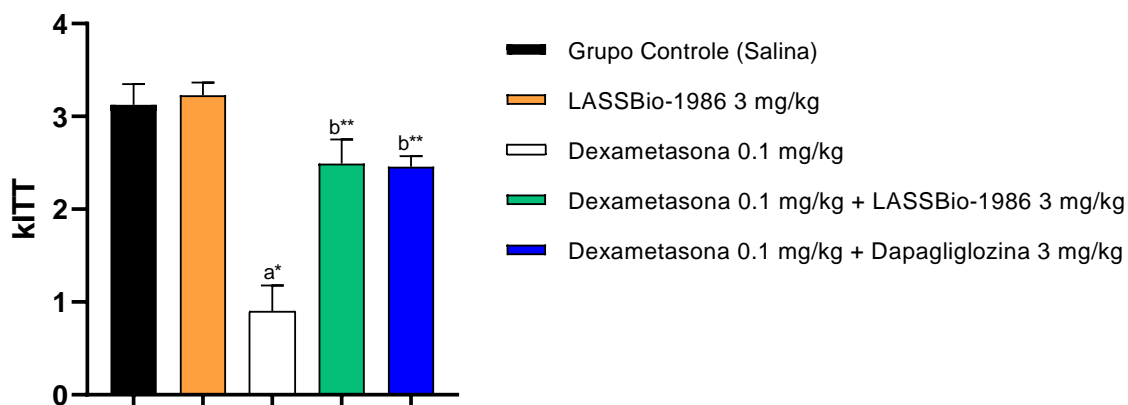
O composto LASSBio-1986, de forma geral, demonstrou um perfil farmacológico promissor em comparação com o controle positivo (Dapagliflozina), especialmente em relação à modulação dos níveis de citocinas inflamatórias. A capacidade do LASSBio-1986 de influenciar positivamente os níveis de IL-1 β , IL-6, TNF- α , e TGF- β , sem afetar negativamente os níveis de IL-10, destaca seu potencial como uma terapia promissora para o manejo do DM2 e suas complicações associadas.

Estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos exatos através dos quais o composto LASSBio-1986 exerce seus efeitos anti-inflamatórios, incluindo efeitos além da inibição dos canais SGLT2.

5.3.5. Teste de Indução de Resistência à Insulina com Dexametasona

Os glicocorticóides são bastante utilizados devido aos efeitos imunomoduladores, entretanto, têm uso limitado em razão de efeitos adversos consideráveis, que incluem a resistência à insulina, pois perturbam a homeostasia da glicose, ao estimular enzimas gliconeogênicas hepáticas PEPCK e glicose-6-fosfatase (G6Pase) e interferir na sinalização da insulina no músculo esquelético, além de aumentar a lipólise nos depósitos subcutâneos, a adipogênese e o acúmulo de lipídios na gordura visceral no tecido adiposo branco (GASPARINI *et al.*, 2019). O modelo de resistência à insulina induzida por dexametasona é padrão ouro para avaliação da resistência à insulina no musculo esquelético (SEVERINO *et al.*, 2002).

Figura 28 – Teste de Indução de Resistência à Insulina com Dexametasona em camundongos C57Bl/6.



ITT (teste de tolerância à insulina) e KITT (queda da taxa de glicose durante o teste de tolerância à insulina por minuto). N= 6/grupo. *compara a significância ao grupo controle. **compara a significância ao grupo Dexametasona (0.1 mg/kg). Cada valor representa a média ± E.P.M. das sete determinações. ^d $p \leq 0.05$, ^c $p \leq 0.01$, ^b $p \leq 0.001$, ^a $p < 0,0001$.

Fonte: Autor, 2023.

O grupo controle serviu como referência para a função normal do metabolismo da glicose, onde valores altos da KITT indicam sensibilidade normal à insulina, com rápida absorção de glicose pelos tecidos. No grupo Dexametasona houve redução em torno de 71,26% na sensibilidade a insulina em comparação ao grupo controle, indicando uma menor eficiência na captação de glicose em resposta à insulina, após administração de dexametasona, na dose de 0,1 mg/kg, por cinco dias consecutivos, o que está consonância com a literatura, que relata a capacidade da dexametasona de interferir em diversos processos metabólicos, incluindo a captação de glicose nos tecidos periféricos e a promoção da gliconeogênese hepática (HARVEY *et al.*, 2018).

A administração do composto LASSBio-1986 ao tratamento com dexametasona demonstrou ter efeito positivo na sensibilidade à insulina em torno de 177,54% comparado ao grupo dexametasona. O grupo Dapaglifozina também aumentou a sensibilidade à insulina, em torno de 173,75% comparado ao grupo dexametasona. Estes resultados demonstram que ambos LASSBio-1986 e a

Dapagliflozina, possuem ações semelhantes quanto a sensibilidade a insulina, e assim podem melhorar o metabolismo da glicose e dos lipídeos. Além disso, ambas as drogas poderiam diminuir a hemoglobina glicada em longo prazo.

O grupo tratado apenas com o composto LASSBio-1986 apresentou valores de KITT semelhantes aos do grupo controle negativo, ligeiramente superiores (+3,3%), apontando que o composto tem um efeito positivo na sensibilidade à insulina. Além disto, este grupo permitiu observar efeitos intrínsecos e possíveis efeitos tóxicos e/ou adversos durante os 5 dias de administração e não foram notados quaisquer efeitos adversos observáveis.

Os resultados acima indicam o composto LASSBio-1986, que foi desenhado como um inibidor de SGLT2, tem um potencial promissor no combate à resistência insulínica, quando comparado à Dapagliflozina, uma droga bem estabelecida no mercado e com o mesmo mecanismo de ação bem definido.

Este efeito observado se dá devido ao fato de o composto, assim como a Dapagliflozina, ao inibir o canal SGLT2, permitir que a glicose seja excretada na urina ao invés de ser reabsorvida para a corrente sanguínea, resultando em uma redução na concentração de glicose no sangue, ajudando a melhorar a sensibilidade à insulina.

5.3.6. Análise do Perfil Lipídico

O perfil lipídico refere-se a um painel de diferentes tipos de gorduras presentes no sangue, como colesterol total (e frações – VLDL, LDL e HDL) e triglicerídeos. Indivíduos com DM2, frequentemente, apresentam um quadro de dislipidemia diabética", uma condição caracterizada por níveis elevados de TG, HDL reduzido, LDL normal ou elevado e colesterol total, geralmente, elevado devido ao aumento das frações VLDL e LDL. Este quadro clínico está associado a um risco aumentado de eventos cardiovasculares, como a aterosclerose e outras DCV's (WU *et al.*, 2014).

No DM, a glicose não é utilizada pelos tecidos de forma adequada, o que resulta em um quadro de hiperglicemia, desta forma, os ácidos graxos do tecido adiposo são utilizados para fins energéticos e o excesso destes ácidos é

acumulado no fígado, sendo convertidos em triglicerídeos (SABAHELKHIER *et al.*, 2016).

No caso da dislipidemia diabética, o manejo clínico se trata de uma terapia combinado com adição de um agente para otimizar o perfil lipídico e esta estratégia baseia-se no pressuposto de que melhorias adicionais no perfil lipídico produzem benefícios adicionais em relação às DCV's (SOLANO *et al.*, 2006). Um fármaco que pudesse atuar a nível de redução dos níveis de glicose e normalização dos níveis lipídicos no sangue, seria de extrema valia para o mercado farmacêutico, reduzindo a necessidade de um terapias combinadas, melhorando e aumentando, assim, a adesão do paciente ao tratamento.

A tabela 03 representa os níveis lipídicos avaliados em plasma de animais submetidos ao ITT, onde, após a finalização do teste, foram recolhidas as amostras de sangue para posterior análise bioquímica.

Tabela 03 – Efeito do composto LASSBio-1986 e no perfil lipídico de camundongos C57Bl/6

Grupos	Valores (mg/dL)		
	Colesterol Total	HDL-Colesterol	Triglicerídeos
Salina	91.02 ± 15.87	56.34 ± 11.17	85.37 ± 14.43
Dexametasona 0,1 mg/kg	95.36 ± 24.25	35.52 ± 3.93 ^{a*}	109.4 ± 44.18
Dexametasona 0,1 mg/kg + LASSBio-1986 3 mg/kg	56.14 ± 22.57 ^{b**}	54.15 ± 14.35	68.65 ± 12.96 ^{a**}
Dexametasona 0,1 mg/kg + Dapagliflozina 3 mg/kg	64.40 ± 16.93 ^{a**}	54.64 ± 15.61	78.77 ± 14.55
LASSBio-1986 3 mg/kg	67.70 ± 6.10	58.07 ± 8.06	78.55 ± 24.14

Os valores representam as médias ± E.P.M. das sete determinações. ^ap ≤ 0.05, ^bp ≤ 0.01, ^cp ≤ 0.001, ^dp ≤ 0.001 comparado ao grupo hiperglicêmico. *Grupo comparado ao grupo salina. **Grupo comparado ao grupo dexametasona.

Fonte: Autor, 2023.

O metabolismo lipídico em modelos murinos de resistência à insulina é agravado por glicocorticóides, havendo aumento do acúmulo de gordura intratecidual, juntamente a uma mudança no perfil lipídico em direção a gorduras mais saturadas e monoinsaturadas, que é consistente com a resistência aumentada à insulina (GOUNARIDES *et al.*, 2008).

O grupo Dexametasona foi capaz de aumentar em 4,8% e 28,1% os níveis de CT e TGs, respectivamente, e reduzir em 37,0% os níveis de HDL, quando comparada ao grupo salina (controle negativo), e isto se deve ao fato de a dexametasona, quanto ao perfil lipídico, ser capaz de aumentar os níveis de TGs, o que pode ser atribuído a uma combinação do aumento da síntese hepática de TGs e da diminuição da lipólise periférica; aumentar os níveis de CT, que é acompanhado por um aumento no LDL, que, por sua vez, está associado a um risco aumentado de aterosclerose; e reduzir os níveis de HDL, contribuindo para um risco aumentado de DCV's. E todos estes efeitos são dose-dependentes (DOLATABADI *et al.*, 2015).

A dexametasona promoveu alterações apenas na redução dos níveis do HDL, provavelmente devido ao efeito ser dose-dependente, a dose de 0,1 mg/kg foi suficiente para provocar resistência à insulina, porém não para promover alterações no metabolismo lipídico de maneira significativa.

O composto LASSBio-1986 quando administrado concomitantemente com a dexametasona, não somente reverteu os efeitos da resistência à insulina, como, também, promoveu a melhora no perfil lipídico, apresentando, em média, níveis mais baixos de colesterol total em comparação com o grupo dexametasona, representando uma redução de 41,1%. Com relação ao HDL, este grupo mostrou uma variação positiva nos níveis de HDL, com aumento de 52,4%, apresentando valores mais próximos do grupo salina ou até mesmo superiores, revelando um possível efeito benéfico no aumento dos níveis de HDL. E, por fim, o composto também reduziu os níveis de triglicerídeos em 37,1%, o que indica um potencial terapêutico na modulação do metabolismo lipídico.

Estes resultados se tornam potenciais, principalmente, quando comparados aos resultados obtidos com o tratamento com a dapagliflozina, na mesma dose,

onde este fármaco apresentou redução de 32,5% e 28,0% nos níveis de CT e TGs, respectivamente, e um aumento de 53,8% nos níveis de HDL, apresentando efeito apenas sobre a redução do colesterol total.

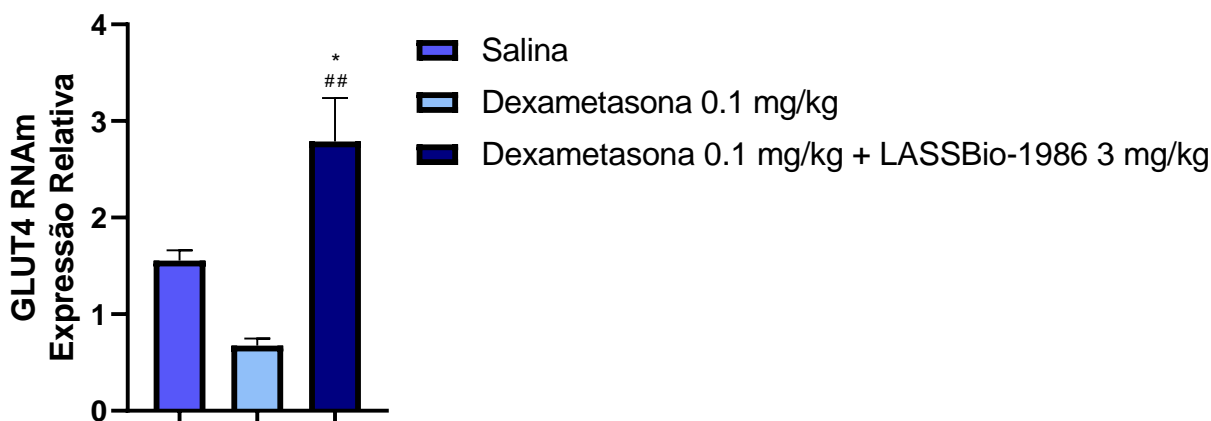
O composto LASSBio-1986, desta forma, se apresenta como um potencial novo inibidor do SGLT2, demonstrando uma possível capacidade em oferecer proteção contra a dislipidemia diabética, sendo ligeiramente mais eficaz neste aspecto do que um inibidor do SGLT2 já estabelecido, como a dapagliflozina, e isto pode culminar em benefícios cardiovasculares para pacientes com DM2, além dos próprios benefícios intrínsecos em relação ao diabetes.

Os resultados obtidos a partir do grupo tratado apenas com o composto LASSBio-1986 não demonstraram diferenças quando comparado ao grupo salina, apontando que este fármaco não promove alterações anormais no metabolismo lipídico, ao contrário, o composto promoveu, embora que ligeiramente, uma pequena melhora no perfil lipídico com redução de 25,6% e 8,0% nos níveis de CT e TGs, respectivamente, e um aumento de 3,1% nos níveis de HDL.

Em suma, os resultados estão de acordo com a literatura, visto que os inibidores do SGLT2 têm demonstrado impacto sobre o perfil lipídico, e estudos mostram que estes inibidores podem aumentar os níveis de HDL e reduzir os níveis de TGs, além disto, alguns inibidores como a empagliflozina e a canagliflozina são capazes de aumentar os níveis de CT e do LDL, respectivamente. Entretanto, é importante notar que, apesar das alterações no perfil lipídico, os inibidores de SGLT2 demonstraram possuir benefícios cardiovasculares em ensaios clínicos, reduzindo o risco de eventos cardiovasculares adversos em pacientes com DM2, sendo o uso, de qualquer forma, benéfico do ponto de vista cardiovascular (SANCHÉZ-GARCIA *et al.*, 2020).

5.3.7. Expressão Gênica de GLUT-4

Figura 29 – Expressão gênica relativa de GLUT-4 em células musculares de camundongos C57Bl/6 submetidos ao ITT.



Cada valor representa a média \pm E.P.M. das sete determinações. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p < 0.0001$. *Amostras comparados ao grupo Salina (controle negativo). #Amostras comparados ao grupo Dexametasona.

O composto LASSBio-1986 não somente reverteu a diminuição da expressão gênica de GLUT-4 em relação ao grupo resistente à insulina (aumento de 313%), como também foi capaz de aumentar a expressão gênica em relação ao grupo controle negativo (aumento de 79%). Isto sugere algumas implicações como uma melhoria na sensibilidade à insulina, visto que a reversão da diminuição da expressão de GLUT-4 em tecidos que são alvo da insulina, como o músculo, indica uma melhoria na sensibilidade a esse hormônio, e com sua expressão aumentada há maior facilidade na absorção de glicose pelas células, reduzindo a glicemia.

Esses resultados destacam o potencial do LASSBio-1986 como um agente terapêutico promissor para o tratamento do DM2 e possivelmente outras condições metabólicas associadas à resistência à insulina. A capacidade da molécula LASSBio-1986 em modular positivamente a expressão de GLUT-4 abre caminho para que pesquisas futuras possam explorar outros mecanismos de ação e novos potenciais alvos terapêutico para mitigar complicações associadas ao diabetes.

Isto corrobora os resultados encontrados na literatura que avaliaram a capacidade de compostos inibidores dos canais SGLT2 em alterar a expressão gênica de GLUT-4. Estudos sugerem que os inibidores de SGLT2 podem influenciar indiretamente a expressão de GLUT4, potencialmente melhorando a captação de glicose e a sensibilidade à insulina nesses tecidos. De acordo com Packer (2023) demonstrou que o tratamento com inibidores de SGLT2 pode aumentar a utilização de glicose pelos tecidos através de mecanismos

independentes da ação da insulina, implicando um possível aumento na expressão ou na eficiência de GLUT4.

O composto LASSBio-1986 apresenta-se, então, como uma molécula com um mecanismo de ação benéfico, oferecendo não apenas uma reversão da resistência à insulina, mas também promovendo um estado metabólico potencialmente mais saudável, o que destaca seu valor como um candidato promissor ao tratamento do DM2.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos concluímos que LASSBio-1986 apresenta efeitos inéditos na homeostasia da glicose e em animais resistentes a insulina. Dados *in silico* demonstram que LASSBio-1986 apresenta possíveis efeitos favoráveis em ADMET e nas interações com seu alvo biológico; menor afixidade para SGLT1 e maior para SGLT2. Além disso, este fármaco regulou a glicemia no teste de tolerância a glicose em animais; resultando em melhora do metabolismo da glicose em diversos aspectos. O tratamento com LASSBio-1986 melhorou o dano oxidativo em tecidos alvo do metabolismo da glicose mensurados por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e níveis de glutatona. Em adição tratamento com LASSBio-1986 levou à diminuição de níveis de importantes de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos muscular, hepático e renal. Ainda, neste aspecto, reduziu TGF- β e aumentou citocina anti-inflamatória (IL-10), demonstrando efeito redutor na inflamação causada devido a hiperglicemia. O tratamento com LASSBio-1986 aumentou a sensibilidade à insulina e a expressão gênica de GLUT-4 em animais resistentes a insulina. Desta forma, este conjunto de dados nos mostram que o composto LASSBio-1986 além de regular a glicemia, pode modular o estado redox, a inflamação, a resistência à insulina e ter uma boa disponibilidade por via oral. O LASSBio-1986 pode ser urgentemente necessário para o tratamento do diabetes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADA – American Diabetes Association. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes – 2021. **Diabetes Care**. Vol. 44 (supp. 1), p. 111 – 124. 2021.
- ADA – American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. Vol. 37 (supp. 1), p. 81 – 90. 2014.
- ADEOYE, O.; OLAWUMI, J.; OPEYEMI, A. *et al.* Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. **JBRA Assist Reprod**. Vol. 22, ed. 1, p. 61 - 66. 2018.
- AGGARWAL, A.; WADHWA, R.; KAPOOR, D. *et al.* High Prevalence of Genital Mycotic Infections with Sodium-glucose Co-transporter 2 Inhibitors among Indian Patients with Type 2 Diabetes. **Indian J Endocrinol Metab**. Vol. 23, ed. 1, p. 9 – 13. 2019.
- AGUIAR JR. A.S.; SPECK, A.E.; CANAS, P.M. *et al.* euronal adenosine A2A receptors signal ergogenic effects of caffeine. **Sci Rep**. Vol. 10. 2020.
- AMPOFO, A.G.; BOATENG, E.B. Beyond 2020: Modelling obesity and diabetes prevalence. **Diabetes Research and Clinical Practice**. Vol. 167, p. 1 – 16. 2020.
- ANDERSEN, Y.M.F.; EGEBERG, A.; BAN, L. *et al.* Association Between Topical Corticosteroid Use and Type 2 Diabetes in Two European Population-Based Adult Cohorts. **Diabetes Care**. Vol. 42, ed. 6, p. 1095 – 1103. 2019.
- ARAUJO, F.M.L.; DA SILVA, L.R.B.; DE SOUZA, M.L.R. Modulação dos níveis de insulina pelo consumo de carboidratos e os efeitos no tecido adiposo durante o emagrecimento: uma revisão. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**. Vol. 16, ed. 100, p. 200 – 216. 2022.
- ASCHNER, P. Insulin Therapy in Type 2 Diabetes. **American Journal of Therapeutics**. Vol. 27, p; 79 – 90. 2020.
- BANERJEE, P.; ECKERT, A.O.; SCHREY, A.K. *et al.* ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Res**. Vol. 46, ed. W1, p. W257 – W263. 2018.
- BAUER, A.; BRÖNSTRUP, M. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. **Nat. Prod. Rep**. Vol. 31, ed. 1, p. 35 – 60. 2014.

BECKER, M.M.; NUNES, G.S.; RIBEIRO, D.B. *et al.* Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. Vol. 3, ed. 4, p. 223 – 227. 2019.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. Biochemistry. 5th edition. W. H. Freeman Custom Publishing Program. 2002.

BERSOFF-MATCHA, S.J.; CHAMBERLAIN, C.; CAO, C.; *et al.* Fournier Gangrene Associated With Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors: A Review of Spontaneous Postmarketing Cases. **Ann Intern Med**. Vol. 170, ed. 11, p. 764 – 769. 2019.

BILAL, U.; AUCHINCLOSS, A.H.; DIEZ-ROUX, A.V. Neighborhood Environments and Diabetes Risk and Control. **Curr Diab Rep**. Vol. 18, ed. 9, n. 62, p. 1 – 10. 2018.

BITTERMANN, K.; Goss, K.U. Predicting apparent passive permeability of Caco-2 and MDCK cell-monolayers: A mechanistic model. **PLOS ONE**. Vol. 12, ed. 12, e0190319. 2017.

BLASCHECK, W. Natural Products as Lead Compounds for Sodium Glucose Cotransporter (SGLT) Inhibitors. **Planta Med**. Vol. 83, ed. 12/13, p. 985 – 993. 2017.

BOLAND, B.B.; RHODES, C.J.; GRIMSBY, J.S. The dynamic plasticity of insulin production in β -cells. **Mol Metab**. Vol. 6, ed. 9, p. 958 – 973. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**. Brasília. Vol. 53. Dez/2022. Disponível em: <https://www.gov.br/>. Acesso em: 21 set. 2023.

BRENK, R.; SCHIPANI, A.; JAMES, D. *et al.* Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. **Chem Med Chem**. Vol. 3, ed. 3, p. 435 – 444. 2008.

BURGOS-MORÓN, E.; ABAD-JIMÉNEZ, Z.; DE MARAÑÓN, A.M. *et al.* Relationship between Oxidative Stress, ER Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetes: The Battle Continues. **J. Clin. Med**. Vol. 8, ed. 9. 2019.

BVSMS, 2009. Obesidade. Dicas em Saúde. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/dicas/215_obesidade.html. Acesso em: 13 mar. 2023.

BVSMS, 2022. 26/6 – Dia Nacional do Diabetes. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/26-6-dia-nacional-do-diabetes-4/>. Acesso em: 09 mar. 2023.

CAMPBELL, J.E.; MÜLLER, T.D.; FINAN, B. *et al.* GIPR/GLP-1R dual agonist therapies for diabetes and weight loss—chemistry, physiology, and clinical applications. **Cell Metabolism**. Vol. 35, ed. 9, p. 1519 - 1529. 2023.

CEFALU, W.T.; BRAY, G.A.; HOME, P.D. *et al.* Advances in the Science, Treatment, and Prevention of the Disease of Obesity: Reflections From a Diabetes Care Editors' Expert Forum. **Diabetes Care**. Vol. 38, ed. 8, p. 1567 – 1582. 2015.

CHAN, J.C.H; CHAN. M.C.Y. SGLT2 Inhibitors: The Next Blockbuster Multifaceted Drug? **Medicina**. Vol. 59, ed. 2, p. 1 – 13. 2023.

CHANDRASEKARAN, B.; ABED, S.N.; AL-ATTRAQCHI, O. *et al.* Computer-Aided Prediction of Pharmacokinetic (ADMET) Properties. **Dosage Form Design Parameters**. Vol. 2, p. 731 – 755. 2018.

CHATTERJE, S.; KHUNTI, K.; DAVIES, M.J. Type 2 Diabetes. **Lancet**. Vol. 389, p. 2239 – 2251. 2017.

CHAWLA, A.; CHAWLA, R.; JAGGI, S. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**. Vol 20, ed. 4, p. 546 – 553. 2016.

CHEN, C.P.; CHEN, C.C.; HUANG, C.W. *et al.* Evaluating Molecular Properties Involved in Transport of Small Molecules in Stratum Corneum: A Quantitative Structure-Activity Relationship for Skin Permeability. **Molecules**. Vol. 23, ed. 4, p. 2 – 17. 2018.

CHRISTENSEN, A.A.; GANNON, M. The Beta Cell in Type 2 Diabetes. **Curr Diab Rep**. Vol. 19, ed. 9, p. 1 – 8. 2019.

CONWAY, B.; MILLER, R.G.; COSTACOU, T. *et al.* Temporal patterns in overweight and obesity in Type 1 diabetes. **Diabet Med**. Vol. 27, ed. 4, p. 398 – 404. 2010.

DA CONCEIÇÃO, R.A.; DA SILVA, P.N.; BARBOSA, M.L.C. Fármacos para o Tratamento do Diabetes Tipo II: Uma Visita ao Passado e um Olhar para o Futuro. **Rev. Virtual Quim**. Vol. 9, ed. 2, p. 514 - 534. 2017.

- DAHRIA, A.; KHAN, A.; SRIDHAR, V.S. *et al.* SGLT2 Inhibitors: The Sweet Success for Kidneys. **Annual Review of Medicine**. Vol. 74, p. 369- 384. 2023.
- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Sci Rep**. Vol. 7. 2017.
- DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **Chem Med Chem**. Vol. 11, ed. 11, p. 1117 – 1121. 2016.
- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. **Nucleic Acids Research**. Vol. 47, ed. W1, p. W357 – W364. 2019.
- DAVIES, M.J.; ARODA, V.R.; COLLINS, B.S. *et al.* Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2022. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). **Diabetes Care**. Vol. 45, ed. 11, p. 2753 – 2786. 2022.
- DE CASTRO, R. M. F. *et al.* Diabetes mellitus e suas complicações-uma revisão sistemática e informativa. **Brazilian Journal of Health Review**. Vol. 4, ed. 1, p. 3349 – 3391. 2021.
- DEED, G.; BARLOW, J.; KAWOL, D.; *et al.* Diet and diabetes. **Aust Fam Physician**. 2015 May;Vol. 44, ed. 5, p. 2 – 6.
- DEFRONZO, R.A.; FERRANNINI, E.; GROOP, L. *et al.* Type 2 Diabetes. **Disease primers**. Vol. 1, p. 1 – 22. 2015.
- DESTA, I.T.; PORTER, K.A.; XIA, B. *et al.* Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. **Structure**. Vol. 28, ed. 9, p. 1071 – 1081. 2020.
- DIB, S.A. Heterogeneidade do Diabetes Melito Tipo I. **Arq Bras Endocrinol Metab**. Vol. 52, ed. 2, p. 205 – 218. 2008.
- DOLATABADI, A.A.; MAHBOUBI, M. A study of the influence of dexamethasone on lipid profile and enzyme lactate dehydrogenase. **J Med Life**. Vol. 8, ed. 3, p. 72 - 76. 2015.

DONATH, M.; SHOELSON, S. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. **Nat Rev Immunol**. Vol. 11, p. 98 – 107. 2011.

DOUGHERTY, D.A. The cation- π interaction. **Acc Chem Res**. Vol. 16; ed. 46, n. 4, p. 885 – 893. 2013.

DOYTCHINOVA, I. Drug Design – Past, Present, Future. **Molecules**. Vol. 27, ed. 5, p. 1 – 9. 2022.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. **Methods Enzymol**. Vol. 186, p. 421 – 431. 1990.

DRAWL, M.N.; BANERJEE, P.; DUNKEL, M. *et al.* ProTox: a web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. **Nucleic Acids Res**. Vol. 42, p, W53 – W58. 2014.

ELLINGSGAARD H, HAUSELMANN I, SCHULER B, *et al.* Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. **Nat Med**. Vol. 17, ed. 11, p. 1481 - 1489. 2011.

FARINDE, A. Relações Dose-Resposta. Manual MSD, 2021. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/farmacologia-cl%C3%ADnica/farmacodin%C3%A2mica/rela%C3%A7%C3%B5es-dose-resposta>. Acesso em: 03 out. 2023.

FARMAKI, P.; DAMASKOS, C.; GARMPIIS, N. *et al.* Complications of the Type 2 Diabetes Mellitus. **Curr Cardiol Rev**. Vol. 16, ed. 4, p. 249 - 251. 2020.

FASELIS, C.; KATSIMARDOU, A.; IMPRIALOS, K. *et al.* Microvascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. **Current Vascular Pharmacology**. Vol. 18, p. 117 – 124. 2020.

FAVRE, G.A.; ESNAULT, V.L.M.; VAN OBBERGHEN, E. Modulation of glucose metabolism by the renin-angiotensin-aldosterone system. **American Journal of Physiology-endocrinology and Metabolism**. Vol. 308, ed. 6, p. 435 - 449. 2015.

FEBBRAIO, M.A. Role of interleukins in obesity: implications for metabolic disease. **Trends Endocrinol Metab**. Vol. 25, ed. 6, p. 312 - 319. 2014.

FERNANDEZ, C.J.; GEORGE, A.S.; SUBRAHMANYAN, N.A. *et al.* Epidemiological link between obesity, type 2 diabetes mellitus and cancer. **World J Methodol.** Vol. 11, ed. 3, p. 23 – 45. 2021.

FERRANNINI, E. Sodium-Glucose Co-transporters and Their Inhibition: Clinical Physiology. **Cell Metabolism.** Vol. 26, p. 27 – 38. 2017.

FERRANNINI, E.; DEFRONZO, R.A. Impact of glucose-lowering drugs on cardiovascular disease in type 2 diabetes. **Eur Heart J.** Vol. 36, p. 2288 – 2296. 2015.

FILIPPAS-NTEKOUAN, S.; FILIPPATOS, T.D.; ELISAF, M.S. SGLT2 inhibitors: are they safe? **Postgraduate Medicine.** Vol. 130, ed. 1, p. 72 – 82. 2017.

FILIPPATOS, T.D.; ATHYROS, V.G.; ELISAF, M.S. The pharmacokinetic considerations and adverse effects of DPP-4 inhibitors. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.** Vol. 10, ed. 6, p. 787 – 812. 2014.

FREDERICO, M.J.S.; CASTRO, A.J.G.; MENEGAZ, D. *et al.* Mechanism of Action of Novel Glibenclamide Derivatives on Potassium and Calcium Channels for Insulin Secretion. **Curr Drug Targets.** Vol. 18, ed. 6, p. 641 – 650. 2017.

FREDERICO, M.J.S.; CIPRIANI, A.; HEIM, J.B.A. *et al.* Electrophilic Agonists Modulate the Transient Receptor Potential Ankyrin-1 Channels Mediated by Insulin and Glucagon-like Peptide-1 Secretion for Glucose Homeostasis. **Pharmaceuticals (Basel).** Vol. 16, ed. 8. 2023.

FROTA, L.S.; ALVES, D.R.; MARINHO, M.M. *et al.* Antioxidant and anticholinesterase activities of amentoflavone isolated from *Ouratea fieldingiana* (Gardner) Engl. through in vitro and chemical-quantum studies. **J Biomol Struct Dyn.** Vol. 41, ed. 4, p. 1206 – 1216. 2023.

GALLWITZ, B. Clinical Use of DPP-4 Inhibitors. **Front. Endocrinol.** Vol. 10, n. 389, p. 1 – 10. 2019.

GASPARINI, S.J.; SWARBRICK, M.M.; KIM, S. *et al.* Androgens sensitise mice to glucocorticoid-induced insulin resistance and fat accumulation. **Diabetologia.** Vol. 62, p. 1463 – 1477. 2019.

GASTALDELLI, A. Measuring and estimating insulin resistance in clinical and research settings. **Obesity**. Vol. 30, p. 1549 – 1563. 2022.

GAW, A.; MURPHY, M.J.; SRIVASTAVA, R. *et al.* Clinical Biochemistry. 5th edition. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

GEETHA, A.; GOPALAKRISHNAN, S; UMADEVI, R. Study on the impact of family history of diabetes among type 2 diabetes mellitus patients in an urban area of Kancheepuram district, Tamil Nadu. **Int J Community Med Public Health**. Vol. 4, ed. 11, p. 4151 – 4156. 2017.

GFELLER, D.; GROSDIDIER, A.; WIRTH, M. *et al.* SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. **Nucleic Acids Research**. Vol. 42, p. 32 - 38. 2014.

GHANI, A.; BARRIL, C.; BEDGOOD JR., D.R. *et al.* Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. **Food Chemistry**. Vol. 230, p. 195 - 207. 2017.

GOFF, L. M. Ethnicity and Type 2 diabetes in the UK. **Diabet. Med**. Vol. 36, p. 927 – 938. 2019.

GOMES, M.B.; CONTE, D.; DRUMMOND, K.R.G. *et al.* Overweight/obesity in adolescents with type 1 diabetes belonging to an admixed population. A Brazilian multicenter study. **Diabetology & Metabolic Syndrome**. Vol. 14, p. 1 – 10. 2022.

GOSH, S.; TRIPATHI, P.; TALUKDAR, P. *et al.* In silico study by using ProTox-II webserver for oral acute toxicity, organ toxicity, immunotoxicity, genetic toxicity endpoints, nuclear receptor signalling and stress response pathways of synthetic pyrethroids. **World Scientific News**. Vol. 132, p. 32 – 51. 2019.

GOUNARIDES, J.S.; KORACH-ANDRÉ, M.; KILLARY, K. *et al.* Effect of Dexamethasone on Glucose Tolerance and Fat Metabolism in a Diet-Induced Obesity Mouse Model. **Endocrinology**. Vol. 149, ed. 2, p. 758 - 766. 2008.

GOYAL, R.; SINGHAL, M.; JIALAL, I. Type 2 Diabetes. **StatPearls**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513253/>. Jun/ 2023. Acesso em: 21 set. 2023.

- GU, N.; PARK, S.I.; CHUNG, H. *et al.* Possibility of pharmacokinetic drug interaction between a DPP-4 inhibitor and a SGLT2 inhibitor. **Transl Clin Pharmacol**. Vol. 28, ed. 1, p. 17 – 33. 2020.
- HARVEY, I.; STEPHENSON, E.J.; REDD, J.R. *et al.* Glucocorticoid-Induced Metabolic Disturbances Are Exacerbated in Obese Male Mice. **Endocrinology**. Vol. 159, ed. 6, p. 2275 – 2287. 2018.
- HE, J.; KELLEY, D.E. Muscle glycogen content in type 2 diabetes mellitus. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. Vol. 287, ed. 5, p. 1002- 1007. 2004.
- HAMMAN, R.F.; WING, R.R.; EDELSTEIN, S.L. *et al.* Effect of weight loss with lifestyle intervention on risk of diabetes. **Diabetes Care**. Vol. 29, ed. 9, p. 2102 – 2107. 2006.
- HASAN, F.M.; ALSAHLI, M.; GERICH, J.E. SGLT2 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**. Vol. 104, ed. 3, p. 297 – 322. 2014.
- HOSTALEK, U. Global epidemiology of prediabetes - present and future perspectives. **Clin Diabetes Endocrinol**. Vol. 5, p. 1 – 5. 2019.
- HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**. Vol. 14, ed. 444 (7121), p. 860 - 867. 2006.
- HOWELL, N.A.; BOOTH, G.L. The Weight of Place: Built Environment Correlates of Obesity and Diabetes. **Endocr Rev**. Vol. 43, ed. 6, p. 966 – 983. 2022.
- HSIA, D.S.; GROVE, O.; CEFALU, W.T. An Update on SGLT2 Inhibitors for the Treatment of Diabetes Mellitus. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**. Vol. 24, ed. 1, p. 73 – 79. 2017.
- HU, M.; PHAN, F.; BOURRON, O. *et al.* Steatosis and NASH in type 2 diabetes. **Biochimie**. Vol. 143, p. 37 - 41. 2017.
- IDF – INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF DIABETES ATLAS 10th EDITION. Diabetes Atlas, 2021. Disponível em: <https://diabetesatlas.org/data/en/country/27/br.html>. Acesso em: 21 set. 2023.

INOUE, T.; TAKEMURA, M.; FUSHIMI, N. *et al.* Mizagliflozin, a novel selective SGLT1 inhibitor, exhibits potential in the amelioration of chronic constipation.

European Journal of Pharmacology. Vol. 806, p. 25 - 31. 2017.

ISHIDA, N.; SAITO, M.; SATO, S. *et al.* Mizagliflozin, a selective SGLT1 inhibitor, improves vascular cognitive impairment in a mouse model of small vessel disease.

Pharmacol Res Perspect. Vol. 9, ed. 5, p. e00869. 2021.

ITOH, Y., NAKASHIMA, Y., TSUKAMOTO, S. *et al.* N⁺-C-H...O Hydrogen bonds in protein-ligand complexes. **Sci Rep**. Vol. 9, n. 767. 2019.

JAKHER, H.; CHANG, T.; TAN, M. *et al.* Canagliflozin review – safety and efficacy profile in patients with T2DM. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity**. Vol.12, p. 209 – 221. 2019.

JIANG, S.; ZHANG, L.; CUI, D. *et al.* The Important Role of Halogen Bond in Substrate Selectivity of Enzymatic Catalysis. **Sci Rep**. Vol. 6, p. 347 – 350. 2016.

Johns Hopkins University. 2023. Página Inicial. Disponível em:

<https://github.com/CSSEGISandData>. Acesso em: 09 mar. 2023.

KAIIFA, G.; VENETI, S.; POLYCHRONOPOULOS, G. *et al.* Is HbA1c an ideal biomarker of well-controlled diabetes? **Postgraduate Medical Journal**. Vol. 97, ed. 1148, p. 380 – 383. 2021.

KAO, C.C.; WU, P.C.; WU, C.H. *et al.* Risk of liver injury after α -glucosidase inhibitor therapy in advanced chronic kidney disease patients. **Sci Rep**. Vol. 6, p. 189 - 196. 2016.

KATZUNG, B.G.; TREVOR, A.J. (Orgs.). *Farmacologia básica e clínica*. Ed. 13. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2017.

KENNY, P.W. Hydrogen-Bond Donors in Drug Design. **J Med Chem**. Vol. 65, ed. 21, p. 14261 – 14275. 2022.

KHAN, M.A.B., HASHIM, M.J.; KING, J.K. *et al.* Epidemiology of Type 2 Diabetes – Global Burden of Disease and Forecasted Trends. **Journal of Epidemiology and Global Health**. Vol. 10, ed. 1, p. 107 – 111. 2020.

KLEIN, S.; GASTALDELLI, A.; YKI-JÄRVINEN, H. *et al.* Why does obesity cause diabetes? **Cell Metabolism**. Vol. 34, ed. 1, p. 11 – 20. 2022.

KLOPČIČ, I.; DOLENC, M.S. Chemicals and Drugs Forming Reactive Quinone and Quinone Imine Metabolites. **Chem. Res. Toxicol.** Vol. 32, ed. 1, p. 1 – 34. 2019.

KOZAKOV, D.; BEGLOV, D.; BOHNUUD, T. *et al.* How good is automated protein docking? **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**. Vol. 81, ed. 12, p. 2159 – 2166. 2013

KOZAKOV, D.; HALL, D.R.; XIA, B. *et al.* The ClusPro web server for protein-protein docking. **Nature Protocols**. Vol. 12, ed. 2, p. 255 – 278. 2017.

KRISMAN, C. R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with Iodine. **Analytical biochemistry**. Vol. 4, ed. 1, p. 17 – 23. 1962.

KRSSAK, M.; BREHM, A.; BRENROIDER, E. *et al.* Alterations in Postprandial Hepatic Glycogen Metabolism in Type 2 Diabetes. **Diabetes**. Vol. 53, ed. 12, p. 3048 – 3056. 2004.

KSHIRSAGAR, R.P.; KULKARNI, A.A.; CHOUTHE, R.S. *et al.* SGLT inhibitors as antidiabetic agents: a comprehensive review. **RSC Adv**. Vol. 10, p. 1733 – 1756. 2020.

KUETE, V.; EFFERTH, T. Cameroonian medicinal plants: pharmacology and derived natural products. **Frontiers in pharmacology**. Vol. 1, p. 123. 2010.

LAMBADIARI, V.; THYMIS, J.; KOURETAS, D. *et al.* Effects of a 12-Month Treatment with Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonists, Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors, and Their Combination on Oxidant and Antioxidant Biomarkers in Patients with Type 2 Diabetes. **Antioxidants**. Vol. 10, ed. 9, n. 1379. 2021.

LE, J.; JANG, C. Genetic Variation in Sugar Metabolism Confers a Protective Metabolic Profile. **Gastroenterology**. Vol. 162, ed. 4, p. 1033 - 1035. 2022.

LEBOVITZ, H.E.; BAHTIYAR, G. Thiazolidinediones: the Forgotten Diabetes Medications. **Curr Diab Rep**. Vol. 19, n. 151, p. 1 – 13. 2019.

LEE, S.; PARK, S.; CHOI, C.S. Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. **Diabetes Metab J.** Vol. 46, ed. 1, p. 15 – 37. 2021.

LI, D.; ZHONG, J.; ZHANG, Q. *et al.* Effects of anti-inflammatory therapies on glycemic control in type 2 diabetes mellitus. **Front. Immunol.** Vol 14. 2023.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev.** Vol. 46, ed. 3, p. 3 – 26. 2001.

LLORENS-CEBRIÀ, C.; VAN DEN BOSCH, M.M.; VERGARA, A. *et al.* Antioxidant Roles of SGLT2 Inhibitors in the Kidney. **Biomolecules.** Vol. 12, ed. 1, n. 143. 2022.

LOMBARDO, F.; BENTZIEN, J.; BERELLINI, G.; MUEGGE, I. In Silico Models of Human PK Parameters. Prediction of Volume of Distribution Using an Extensive Data Set and a Reduced Number of Parameters. **Journal of Pharmaceutical Sciences.** Vol. 110, ed. 1, p. 500 - 509. 2021.

LU, H., ZHOU, Q., HE, J. *et al.* Recent advances in the development of protein–protein interactions modulators: mechanisms and clinical trials. **Sig Transduct Target Ther.** Vol. 5, n. 213. 2020.

MACCARI, R.; OTTANA, R. Sodium-Glucose Cotransporter Inhibitors as Antidiabetic Drugs: Current Development and Future Perspectives. **J. Med. Chem.** Vol. 65, ed. 16, p. 10848 – 10881. 2022.

MACEDO, R.G. The Immune System and Inflammation in Type 2 Diabetes. **The Diabetes Textbook.** P. 145–167. 2019.

MANDAL, M.; VARGHESE, A.; GAVIRAJU, V.K. *et al.* Impact of hyperglycaemia on molecular markers of oxidative stress and antioxidants in type 2 diabetes mellitus. **Clinical Diabetology.** Vol. 8, ed. 4, 215 – 222. 2019.

MANSOUR, A.; MOUSA, M.; ABDELMANNAN, D. *et al.* Microvascular and macrovascular complications of type 2 diabetes mellitus: Exome wide association analyses. **Front. Endocrinol.** Vol. 14, p. 1 – 11. 2023.

MARITIM, A.C.; SANDERS, R.A.; WATKINS III, J.B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**. Vol. 17, ed. 1, p. 24 – 38. 2003.

MAYO CLINIC. 2023. Diseases & Conditions – Diabetes. Disponível em: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/diabetes/diagnosis-treatment/drc-20371451>. Acesso em: 29 mar. 2023.

MCCRIMMON, R.J.; HENRY, R.R. SGLT inhibitor adjunct therapy in type 1 diabetes. **Diabetologia**. Vol. 61, p. 2126 – 2133. 2018.

MENDES, C.P.; POSTAL, B.G.; OLIVEIRA, G.T.C. *et al.* Insulin stimulus-secretion coupling is triggered by a novel thiazolidinedione/sulfonylurea hybrid in rat pancreatic islets. **J Cell Physiol**. Vol. 234, ed. 1, p. 509 - 520. 2018.

MENG, X.M.; NIKOLIC-PATERSON, D.J.; LAN, H.Y. TGF- β : the master regulator of fibrosis. **Nat Rev Nephrol**. Vol. 12, ed. 6, p. 325 - 338. 2016.

NAGY, C.; EINWALLNER, E. Study of In Vivo Glucose Metabolism in High-fat Diet-fed Mice Using Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) and Insulin Tolerance Test (ITT). **J Vis Exp**. Vol. 131, p. 566 – 572. 2018.

NAKAYAMA, K.; KAMIMURA, H.; SUEMIZU, H. *et al.* Predicted values for human total clearance of a variety of typical compounds with differently humanized-liver mouse plasma data. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**. Vol. 35, ed. 4, p. 389 – 396. 2020.

NAUCK, M.A.; QUAST, D.R.; WEFERS, J. *et al.* GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes – state-of-the-art Author links open overlay panel. **Molecular Metabolism**. Vol. 46, p. 1 - 26. 2021.

NESPOUX, J.; VALLON, V. Renal effects of SGLT2 inhibitors: an update. **Curr Opin Nephrol Hypertens**. Vol. 29, ed. 2, p. 190 – 198. 2020.

NEUMAIER, F.; ZLATOPOLSKIY, B.D.; NEUMAIER, B. Drug Penetration into the Central Nervous System: Pharmacokinetic Concepts and In Vitro Model Systems. **Pharmaceutics**. Vol. 13, ed. 10, n. 1542, 2021.

OKUNOGBE, A.; NUGENT, R.; SPENCER, G. *et al.* Economic impacts of overweight and obesity: current and future estimates for 161 countries. **BMG Global Health**. Vol. 7, p. 1 – 17. 2022.

OGURTSOVA, K.; GUARIGUATA, L.; BARENGO, N.C. *et al.* IDF diabetes Atlas: Global estimates of undiagnosed diabetes in adults for 2021. **Diabetes Res Clin Pract**. Vol. 183, p. 109 – 118. 2022.

OSTO, E.; BONACINA, F.; PIRILLO, A. *et al.* Neutral effect of SGLT2 inhibitors on lipoprotein metabolism: From clinical evidence to molecular mechanisms. **Pharmacological Research**. Vol. 188, p. 1 – 8. 2023.

OUCHI, N.; PARKER, J.L.; LUGUS, J.J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**. Vol. 11, ed. 2, p. 85 - 97. 2011.

PACKER, M. SGLT2 inhibitors: role in protective reprogramming of cardiac nutrient transport and metabolism. **Nat Rev Cardiol**. Vol. 20, p. 443 – 462. 2023.

PAHO. Dia Mundial da Obesidade 2022: acelerar ação para acabar com a obesidade. OPAS. 4 de mar. de 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/4-3-2022-dia-mundial-da-obesidade-2022-acelerar-acao-para-acabar-com-obesidade>. Acesso em: 09 mar. 2023.

PEARSON, T.; WATTIS, J.A.D.; KING, J.R. *et al.* The Effects of Insulin Resistance on Individual Tissues: An Application of a Mathematical Model of Metabolism in Humans. **Bull Math Biol**. Vol. 78, ed. 6, p. 1189 – 1217. 2016.

PEDRO, P. F.; TSAKMAKI, A.; BEWICK, G. A. The glucose tolerance test in mice. **Animal Models of Diabetes: Methods and Protocols**. Vol. 2128, p. 207-216, 2020.

PETERSEN, M.C.; SHULMAN, G.I. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. **Physiol Rev**. Vol. 98, ed. 4, p. 2133 – 2223. 2018.

PIRES, D.E.V.; BLUNDELL, T.L.; ASCHER, D.B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. **J. Med. Chem**. Vol. 58, ed. 9, p. 4066 – 4072. 2015.

PITT, B.; BHATT, D.L. Does SGLT1 Inhibition Add Benefit to SGLT2 Inhibition in Type 2 Diabetes? **Circulation**. Vol. 44, ed. 1, p. 4 – 6. 2021.

POULSEN, S.B.; FENTON, R.A.; RIEG, T. Sodium-glucose cotransport. **Curr Opin Nephrol Hypertens**. Vol. 24, ed. 5, p. 463 – 469. 2015.

RANG, H. P.; DALE, M. M. **Farmacologia** de Rang & Dale. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2020.

RASCHI, E.; PARISOTTO, M.; FORCESI, E. *et al.* Adverse events with sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors: A global analysis of international spontaneous reporting systems. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**. Vol. 27, ed. 12, p. 1098 – 1107. 2017.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**. Vol. 26, ed. 9 – 10, p. 1231 – 1237. 1999.

REED, J.; BAIN, S.; KANAMARLAPUDI, V. A Review of Current Trends with Type 2 Diabetes Epidemiology, Aetiology, Pathogenesis, Treatments and Future Perspectives. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**. Vol. 14, p. 3567 – 3602. 2022.

RIEG, T.; VALLON, V. Development of SGLT1 and SGLT2 inhibitors. **Diabetologia**. Vol. 61, p. 2079 – 2086. 2018.

RIGALLEAU, V., *et al.* Diagnóstico de diabetes. **EMC-Tratado de Medicina**. Vol. 25, ed. 2, p. 1 – 7. 2021.

ROBERTSON, R.P. Brief overview: glucagon history and physiology. **Journal of Endocrinology**. Vol. 258, ed. 2, p. 1 – 5. 2023.

RÖDER, P.V.; WU, B.; LIU, Y. *et al.* Pancreatic regulation of glucose homeostasis. **Exp Mol Med**. Vol. 48, ed. 3. 2016.

R&D SYSTEMS. Data sheet: R&D Systems® ELISA Kits. Publicação Eletrônica, 2024. Disponível em: <https://www.rndsystems.com/products/elisas>. Acesso em: 19 Jan 2024.

SABAHELKHIER, M.K.; AWADLLAH, M.A.; IDREES, A.S.M. *et al.* A Study of Lipid Profile Levels of Type II Diabetes Mellitus. **Nova Journal of Medical and Biological Sciences**. Vol. 5, ed. 2, p. 1 - 9. 2016.

SAMUEL, V.T.; SHULMAN, G.I. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. **J Clin Invest**. Vol. 126, ed. 1, p. 12 – 22. 2016.

SÁNCHEZ-GARCÍA, A.; SIMENTAL-MENDÍA, M.; MILLÁN-ALANÍS, J.M. *et al*. Effect of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors on lipid profile: A systematic review and meta-analysis of 48 randomized controlled trials. **Pharmacological Research**. Vol. 160, p. 1 – 40. 2020.

SANTOS, K.B.; GUEDES, I.A.; KARL, A.L.M. *et al*. Highly Flexible Ligand Docking: Benchmarking of the DockThor Program on the LEADS-PEP Protein-Peptide Data Set. **J Chem Inf Model**. Vol. 60, ed. 2, p. 667 - 683. 2020.

SANTULLI, G.; VARZIDEH, F.; FORZANO, I. *et al*. Functional and Clinical Importance of SGLT2-inhibitors in Frailty: From the Kidney to the Heart. **Hypertension**. Vol. 80, ed. 9, p. 1800 – 1809. 2023.

SBD – SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. DIRETRIZES 2019 – 2020. São Paulo: **Sociedade Brasileira de Diabetes**. 2019.

SBD – SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diagnóstico do Diabetes e Rastreamento do Diabetes Tipo 2. São Paulo: **Sociedade Brasileira de Diabetes**. 2022.

SCHEEN, A.J.; BONNET, F. Efficacy and safety profile of SGLT2 inhibitors in the elderly: How is the benefit/risk balance? **Diabetes & Metabolism**. Vol. 49, ed. 2, p. 1 – 9. 2023.

SCHEEN, A.J. Use of SGLT2 inhibitors after bariatric/metabolic surgery: Risk/benefit balance. **Diabetes & Metabolism**. Vol. 49, ed. 4, p. 1 – 9. 2023.

SCULLY, T.; ETELA, A.; LEROITH, D. *et al*. Obesity, Type 2 Diabetes, and Cancer Risk. **Frontiers in Oncology**. Vol. 10, p. 1 – 20. 2021.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**. Vol. 25, p. 192 – 205. 1968.

SEVERINO, C.; BRIZZI, P.; SOLINAS, A.; et al. Low-dose dexamethasone in the rat: a model to study insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Vol. 283, ed. 2, p. 367 - 373. 2002.

SHAH, V.N.; PRATTICIZZO, F.; CERIELLO, A. Obesity and Diabetes. **Diabetes Technology and Therapeutics.** Vol. 25, p. 217 – 226. 2023.

SHWETA, M.; RASHMI, D. In-vitro ADME studies of TUG-891, a GPR-120 inhibitor using Swiss ADME predictor. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics.** Vol. 9, ed. 2, p. 266 – 369. 2019.

SINGH, M.; KUMAR, A. Risks Associated with SGLT2 Inhibitors: An Overview. **Current Drug Safety.** Vol. 13, ed. 2, p. 84 – 91. 2018.

SNIJDER, M.B.; AGYEMANG, C.; PETERS, R.J. *et al.* Case Finding and Medical Treatment of Type 2 Diabetes among Different Ethnic Minority Groups: The HELIUS Study. **Journal of Diabetes Research.** Vol. 17, p. 1 – 10. 2017.

SOLANO, M.P.; GOLDBERG, R.B. Lipid Management in Type 2 Diabetes. **Clin Diabetes.** Vol. 24, ed. 1, p. 27 - 32. 2006.

SONG, P.; ONISHI, A.; KOEPSSELL, H. *et al.* Sodium glucose cotransporter SGLT1 as a therapeutic target in diabetes mellitus. **Expert Opinion on Therapeutic Targets.** Vol. 20, ed. 9, p. 1109 - 1125. 2016.

SONG, R. Mechanism of Metformin: A Tale of Two Sites. **Diabetes Care.** Vol. 39, p. 187 – 189. 2016.

SULIS, P.M.; DAMBRÓS, B.F.; MASCARELLO, A. *et al.* Sulfonyl(thio)urea derivative induction of insulin secretion is mediated by potassium, calcium, and sodium channel signal transduction. **J Cell Physiol.** Vol. 234, ed. 7, p. 10138 - 10147. 2019.

SUN, B.; CHEN, H.; XUE, J. *et al.* The role of GLUT2 in glucose metabolism in multiple organs and tissues. **Molecular Biology Reports.** Vol. 50, p. 6963 - 6974. 2023.

SUN, H.; SAEEDI, P.; KARURANGA, S. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. **Diabetes Res Clin Pract.** Vol. 183, p. 109 – 119. 2022.

SUN, J.; LIU, Z.; ZHANG, Z. *et al.* The Correlation of Prediabetes and Type 2 Diabetes With Adiposity in Adults. **Frontiers in Nutrition**. Vol. 9, p. 1 – 9. 2022.

ŚWIĄTONIOWSKA, N.; SARZYŃSKA, K.; SZYMAŃSKA-CHABOWSKA, A. *et al.* The role of education in type 2 diabetes treatment. **Diabetes Research and Clinical Practice**. Vol. 151, p. 237 – 246. 2019.

SZEKERES, Z.; TOTH, K.; SZABADOS, E. The Effects of SGLT2 Inhibitors on Lipid Metabolism. **Metabolites**. Vol. 11, ed. 2, p. 87 – 95. 2021.

TAHRANI, A.; BARNETT, A.H.; BAILEY, C.J. SGLT inhibitors in management of diabetes. **The Lancet - Diabetes & Endocrinology**. Vol. 1, ed. 2, p. 140 - 151. 2013.

TEAGUE, S.J.; DAVIS, A.M.; LEESON, P.D. *et al.* The Design of Leadlike Combinatorial Libraries. **Angewandte Chemie International Edition**. Vol. 38, ed. 24, p. 3743 – 3748. 1999.

TINAJERO, M.G.; MALIK, V.S. An Update on the Epidemiology of Type 2 Diabetes: A Global Perspective. **Endocrinol Metab Clin N Am**. Vol. 50, p. 337 – 355. 2021.

TSIMIHODIMOS, V.; FILIPPAS-NTEKOUAN, S.; ELISAF, M. SGLT1 inhibition: Pros and cons. **European Journal of Pharmacology**. Vol. 838, p. 153 – 156. 2018.

TYZACK, J.D.; KIRCHMAIR, J. Computational methods and tools to predict cytochrome P450 metabolism for drug discovery. **Chem Biol Drug Des**. Vol. 93, ed. 4, p. 377 – 386. 2019.

VAJDA, S.; YUEH, C.; BEGLOV, D. *et al.* New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**. Vol. 85, ed. 3, p. 435 – 444. 2017.

VEBER, D.F.; JOHNSON, S.R.; CHENG, H.Y. *et al.* Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **J Med Chem**. Vol. 45, ed. 12, p. 2615 – 2623. 2002.

VIIGIMAA, M.; SACHINIDIS, A.; TOUMPOURLEKA, M. *et al.* Macrovascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. **Current Vascular Pharmacology**. Vol. 17, p. 1 – 7. 2019.

VISTOLI, G.; PEDRETTI, A. Molecular Fields to Assess Recognition Forces and Property Spaces. **Comprehensive Medicinal Chemistry II**. Vol. 5, p. 577 - 602. 2007.

WANG, Y., GALLAGHER, E., JORGENSEN, C. et al. An experimentally validated approach to calculate the blood-brain barrier permeability of small molecules. **Sci Rep**. Vol. 9, ed. 6117. 2019.

WATANABE, R.; ESAKI, T.; KAWASHIMA, H. et al. Predicting Fraction Unbound in Human Plasma from Chemical Structure: Improved Accuracy in the Low Value Ranges. **Mol. Pharmaceutics**. Vol. 15, ed. 11, p. 5302 - 5311. 2018.

WERMUTH, C.G. Similarity in drugs: reflections on analogue design. **Drug Discovery Today**. Vol. 11, ed. 7/8, p. 348 – 354. 2006.

WERMUTH, C.G.; CIAPETTI, P.; GIETHLEN, B. et al. 2.16 – Bioisosterism. **Comprehensive Medicinal Chemistry II**. Vol. 2, p. 649 – 711. 2007.

WERMUTH, C.G.; VILLOUTREIX, B.; GRISONI, S. et al. Chapter 4 - Strategies in the Search for New Lead Compounds or Original Working Hypotheses. **The Practice of Medicinal Chemistry**. Academy Press Ed. 4, p. 73 – 99. 2015.

WILDING, J.P.; WOO, V.; ROHWEDDER, K. et al. Dapagliflozin in patients with type 2 diabetes receiving high doses of insulin: efficacy and safety over 2 years. **Diabetes Obes Metab**. Vol. 16, ed. 2, p. 24 – 36. 2014.

WINIARSKA, A.; KNYSAK, M.; NABRDALIK, K. et al. Inflammation and Oxidative Stress in Diabetic Kidney Disease: The Targets for SGLT2 Inhibitors and GLP-1 Receptor Agonists. **Int. J. Mol. Sci**. Vol. 22, ed. 19, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Physical Status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva: WHO. **WHO Technical Report Series**, n. 854. 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diabetes. WHO. 5 de abr. de 2023. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>. Acesso em: 02 mai. 2023.

WRIGHT, E.M.; GHEZZI, C.; LOO, D.D.F. Novel and Unexpected Functions of SGLTs. **Physiology**. Vol. 32, p. 435 – 443. 2017.

WRIGHT, E.M.; GHEZZI, C.; LOO, D.D.F. Physiology of renal glucose handling via SGLT1, SGLT2 and GLUT2. **Diabetologia**. Vol. 61, p. 2087 – 2097. 2018.

WRIGHT, S.H. Molecular and cellular physiology of organic cation transporter 2. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**. Vol. 137, ed. 6, p. F1669 - F1679. 2019.

WU, L.; PARHOFER, K.G. Diabetic dyslipidemia. **Metabolism**. Vol. 63, ed. 12, p. 1469 - 1479. 2014.

XU, B.; LI, S.; KANG, B. *et al.* The current role of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in type 2 diabetes mellitus management. **Cardiovasc Diabetol**. Vol. 21, ed. 83. 2022.

YAMAMOTO, W.R.; BONE, R.N.; SOHN, P. *et al.* Endoplasmic reticulum stress alters ryanodine receptor function in the murine pancreatic β cell. **J Biol Chem**. Vol. 294, ed. 1, p. 168 – 181. 2019.

YARIBEYGI, H.; ATKIN, S.L.; BUTLER, A.E. *et al.* Sodium-glucose cotransporter inhibitors and oxidative stress: An update. **J Cell Physiol**. Vol. 234, ed. 4, p. 3231 - 3237. 2019.

YU, X.; MENG, Z.; FANG, T. *et al.* Empagliflozin Inhibits Hepatic Gluconeogenesis and Increases Glycogen Synthesis by AMPK/CREB/GSK3 β Signalling Pathway. **Front Physiol**. Vol. 13, p. 1 – 10. 2022.

YUAN, S.; LARSSON, S.C. A causal relationship between cigarette smoking and type 2 diabetes mellitus: A Mendelian randomization study. **Scientific Reports**. Vol. 9, p. 1 – 4. 2019.

ZANG, B.Y.; HE, L.X.; XUE, L. Intermittent Fasting: Potential Bridge of Obesity and Diabetes to Health? **Nutrients**. 2022. Vol. 14, ed. 5, n. 981, p. 1 – 21. 2022.

ZHAO, Y.; LI, J.; GU, H. *et al.* Conformational Preferences of π - π Stacking Between Ligand and Protein, Analysis Derived from Crystal Structure Data Geometric Preference of π - π Interaction. **Interdiscip Sci**. Vol. 7, ed. 3, p. 211 – 220. 2015.

ZHOU, SF.; ZHONG, WZ. Drug Design and Discovery: Principles and Applications. **Molecules**. Vol. 22, ed. 2, p. 1 – 6. 2017.

ZHU, T.; CUI, J.; GOODARZI, M.O. Polycystic Ovary Syndrome and Risk of Type 2 Diabetes, Coronary Heart Disease, and Stroke. **Diabetes**. Vol 70, p. 627 – 637. 2021.