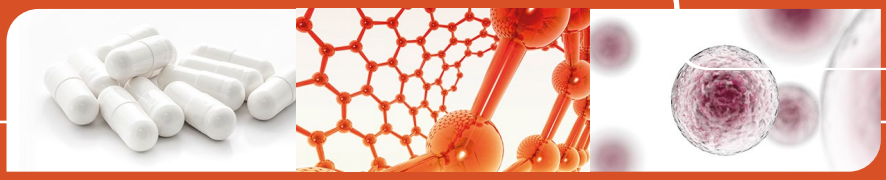
GLYCOXIL®



- **Anti AGEs**
- **Antiglicante e Desglicante Oral**
- **Suplementação Nutricional**

EXSYMOL
MONACO

BIOTEC

Índice

1	**Descrição**	03
1.1	Carcinina vs. Carnosina	05
1.2	Síntese e Metabolismo da L-carnosina	07
1.3	Carcinina: Um Derivado Ativo e mais Biodisponível que a Carnosina	09
2	**O Açúcar e o Envelhecimento Cutâneo**	11
3	**Glicação e Produtos de Glicação Avançada**	13
3.1	Reação de Maillard	13
3.1.1	AGEs e Implicações Clínicas	14
3.1.2	AGEs, Estresse Oxidativo e Inflamação	18
3.1.3	AGEs e Complicações do Diabetes Mellitus	20
3.1.4	Mecanismos Fisioterápicos Envolvendo a Glicação no Estado Hiperglicêmico	20
3.1.5	AGEs e Doenças Neurodegenerativas	21
3.1.6	AGEs e Doenças Cardiovasculares	22
4	**Glycoxil®: Um Peptidomimético Anti-AGEs**	24
5	**Glycoxil®: Um Peptidomimético Transglicante**	25
6	**Glycoxil®: Um Peptidomimético Antiglicante/Glicoxidante**	27
7	**Glycoxil®: Um Peptidomimético Multifuncional**	28
8	**Estudos de Eficácia**	29
8.1	Glycoxil® "melhora clínica e histológica em ratos com diabetes"	29
8.2	Glycoxil® "melhora da propriedade tensora dos fibroblastos, ativando-os metabolicamente"	31
8.3	Glycoxil® "Potente Protetor do DNA com Atividade Fotoprotetora"	33
8.3.1	Estudo Imuno-histoquímico: Avaliação da Formação de Dímeros de Pirimidina	33
8.3.2	Estudo Histológico: Monitoramento da Formação de Células Apoptóticas	34
8.3.3	Estudo *In Vitro*	35
9	**Glycoxil®: Aplicações na Nutrologia**	37
10	Avaliação Oral da Toxidade do Glycoxil® em Ratos	37
10.1	Introdução	37
10.2	Testes	37
10.3	Resultados	38
10.3.1	Mortalidade	38
10.3.2	Pesos	38
10.3.3	Consumo de Alimentos	38
10.3.3.1	Observação Clínica	38
10.3.4	Exames Oftalmológicos	39
10.3.5	Análises Hematológicas	39
10.3.5.1	Química Clínica	39
10.3.6	Peso dos Órgãos	40
10.3.7	Histologia	41
11	**Mutagenicidade**	41
12	**Conclusão**	41
13	**Especificações Farmacotécnicas**	42
14	**Referências Bibliográficas**	43

Denominação Química: *Decarboxy Carnosine HCL*

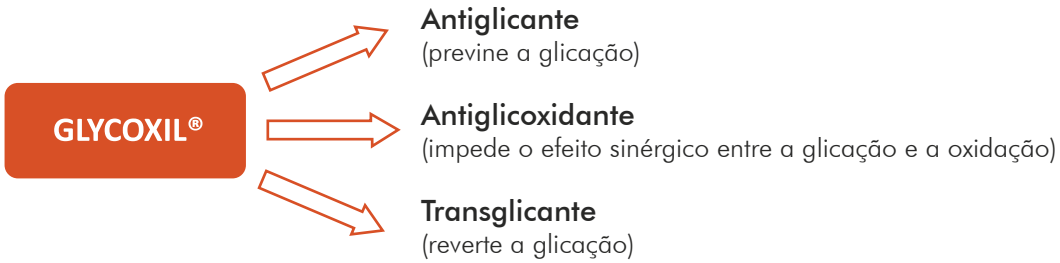
PATENTE EXSYMOL PUBLICAÇÃO Nº2799758 - REGISTRO Nº 9913062



- Anti-AGEs
- Cicatrizante
- Antiglicoxidante
- Antiglicante Via Oral
- Desglicante
- Redutor da Fadiga Neuromuscular
- Indicado para Suplementação Nutricional Esportiva

Glycoxil: Definição

Glycoxil® é um peptidomimético de estrutura dipeptídica patenteado pela Exsymol, capaz de exercer inúmeros benefícios à saúde. Atua na prevenção e tratamento coadjuvante de diversas desordens metabólicas e doenças associadas ao envelhecimento sistêmico. Glycoxil® apresenta propriedades antiglicação/glicoxidação demonstradas em estudos *in vitro*, além de propriedades transglicantes. [9]



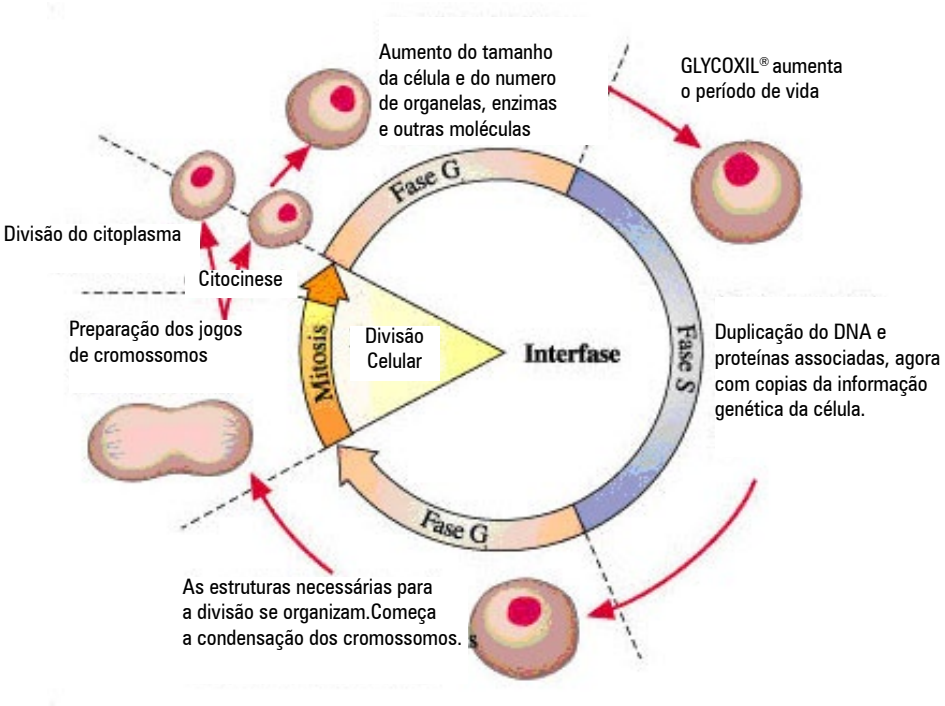


Figura 1: Processo de divisão celular.

O cientista russo W. S. Gulewich, no começo do século XX, descobriu a estrutura molecular da carcinina, iniciando-se os estudos simplificados dos peptídeos biologicamente ativos, ou seja, um dipeptídeo que hoje compõe uma longa lista de proteínas naturais reguladoras do metabolismo.

Nas primeiras décadas os estudos foram dedicados a estrutura, distribuição e propriedades de combinação. Gulewich concluiu concluiu que a carcinina atua na relação com a função de tecidos excitáveis como músculos e cérebro. [18]

Em 1953 outro cientista russo, S. E. Severin, demonstrou que a carcinina armazena e elimina o ácido láctico produzido por músculos em movimento, e que a suplementação de carcinina melhora substancialmente o desempenho e resistência dos músculos.

No metabolismo ativado, os músculos acumulam ácido láctico, o pH diminui e ocorre exaustão. Ao administrar carcinina os músculos responderam positivamente sem apresentar exaustão. Este processo é conhecido de "fenômeno de Severin". [11]

1.1 Carcinina vs. Carnosina

A L-carnosina e os dipeptídeos relacionados como a carcinina, são compostos que contêm histidina que ocorrem naturalmente. São encontrados em diversos tecidos, particularmente na musculatura esquelética. [14]

A carnosina é quimicamente definida como β–alanil-histidina e está presente em concentrações milimolares nos mamíferos. Encontra-se distribuída em diferentes concentrações na musculatura esquelética e no cérebro, sendo a quantidade média presente no organismo vivo variável entre 150 a 200mg/Kg.

A carnosina vem sendo abordada na terapêutica como uma importante ferramenta para o controle de patologias de diferentes etiologias. Desde a sua descoberta em 1900 na Rússia muitas teorias, ainda não completamente elucidadas, têm sido propostas para suas funções biológicas. Todavia, atribui-se à carnosina importante ação antioxidante, tamponante, imunoestimulante e neurotransmissora. [29][35]

Apesar de apresentar propriedades antioxidantes, a atividade *in vivo* da carnosina é limitada pela hidrólise enzimática. A família dos peptidomiméticos contendo a histamina como a carcinina, a N-acetilcarcinina e a L-prolilhistamina, que apresentam significativa resistência às dipeptidases apresetam propriedade antioxidante apresentando importante função inibitória da foto-oxidação das moléculas biológicas. [2]

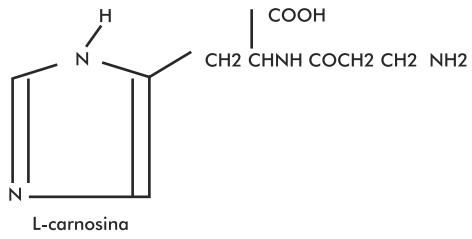


Figura 2: Estrutura química da Carnosina.

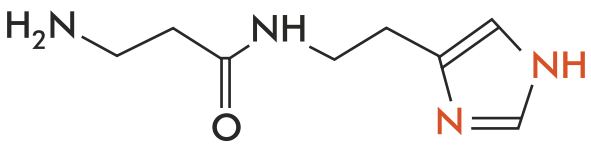


Figura 3: Estrutura química da Carcinina.

A carcinina foi descoberta no tecido cardíaco do crustáceo carcinus maenas em 1973 e desde então tem sido identificada em outras espécies de crustáceos.

A carcinina ou decarboxicarnosina, cujo nome químico é β-alanil-histamina, é um dipeptídeo imidazólico (Chen Z et al., 2004), metabolicamente relacionado à L-carnosina e resistente à hidrólise enzimática. É encontrada nas frações não-proteicas dos tecidos de mamíferos, especialmente nos tecidos ricos em histamina, tais como o coração, os rins, o estômago e intestino (Mark A. et al., 1994). Sua principal característica é apresentar taxa de hidrólise enzimática desprezível (Pegova et al., 2000) tornando-se, portanto, uma excelente alternativa à carnosina. [10][25][27]

A rápida incorporação de radioisótopos dentro das moléculas de carcinina, carnosina e histamina permite afirmar que existe um elo metabólico entre essas três moléculas e uma potencial função na síntese e na degradação da histamina. Dessa forma, a carcinina atua como um intermediário na via metabólica carnosina-histidina-histamina e pode representar uma alternativa para a síntese de histamina ou ainda ser um catabólito da histamina. [25]

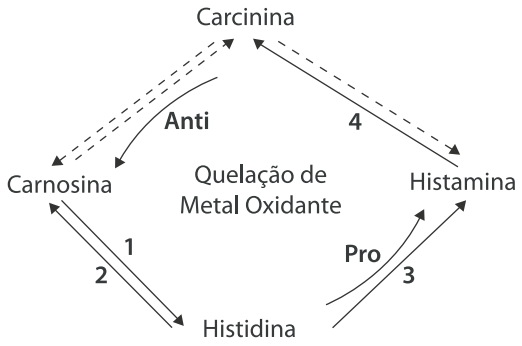


Figura 4: Envolvimento da carcinina na via metabólica carnosina-histidina-histamina. As enzimas correspondentes são: 1, carnosinase; 2, carnosina sintetase; 3, histidina descarboxilase e 4, carcinina sintetase.

Efeitos fisiológicos e farmacológicos da carcinina têm sido sistematicamente abordados. Segundo resultados de um estudo a carcinina apresenta importante efeito antioxidante natural e regula o estresse e o choque, sendo seu efeito hipotensivo 1000 vezes menor que o da histamina, sugerindo que a carcinina pode apresentar uso terapêutico. [25]

A Carcinina:

- Previne a glicação e apresenta atividade transglicante;
- É antiglicoxidante;
- Varre os radicais livres, ânions superóxido e hidroxila;
- Suprime o oxigênio singleto;
- Quela metais;
- Atua como agente tamponante de acido láctico no citosol. [14][1]

A carcinina, como outros derivados peptídicos da carnosina, previne a peroxidação lipídica protegendo as membranas do estresse oxidativo. A inibição da oxidação lipídica se dá pela combinação da propriedade varredora de radicais livres e da propriedade quelante de metais. [15]

1.2 Síntese e Metabolismo da L-carnosina

A carnosina foi primeiramente isolada a partir de um extrato de carne e subsequentemente identificada como β–alanil-histidina. Desde então, vários aminoácidos como os derivados metilados, anserina (β–alanil-metilhistidina), homocarnosina (gama-aminobutiril-histidina) e outros, como a carcinina (β–alanil-histamina), têm sido isolados de tecidos excitáveis.
A metilação da carnosina promove a formação da anserina e ofidina. Sua hidrólise leva à formação de histidina e β–alanina. Durante a descarboxilação da histidinahá a formação da histamina que reage com a β–alanina para formar a carcinina. A β–alanina, além de ser um componente indispensável da coenzima A, é um produto de degradação da base pirimidina e pode apresentar função estimuladora da síntese de colágeno nos tecidos. [27]

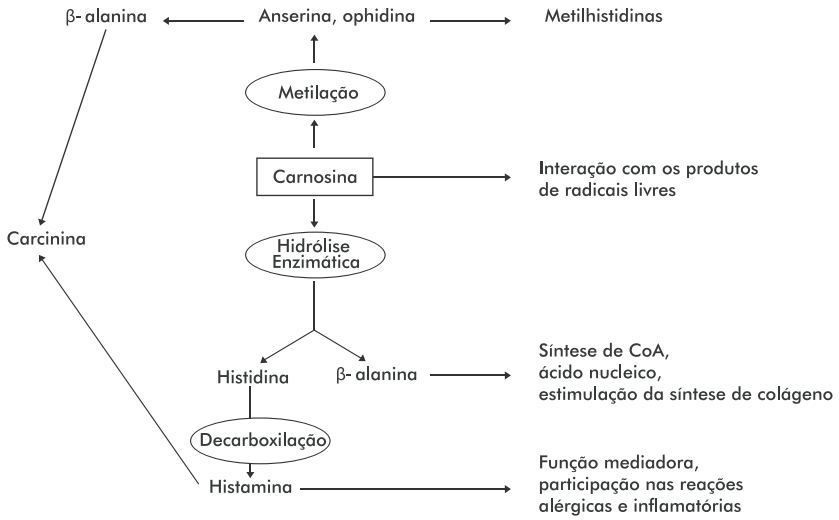


Figura 5: A figura mostra a cascata metabólica da carnosina e indica as diversas funções biológicas da carnosina e seus produtos de metabolismo. [4]

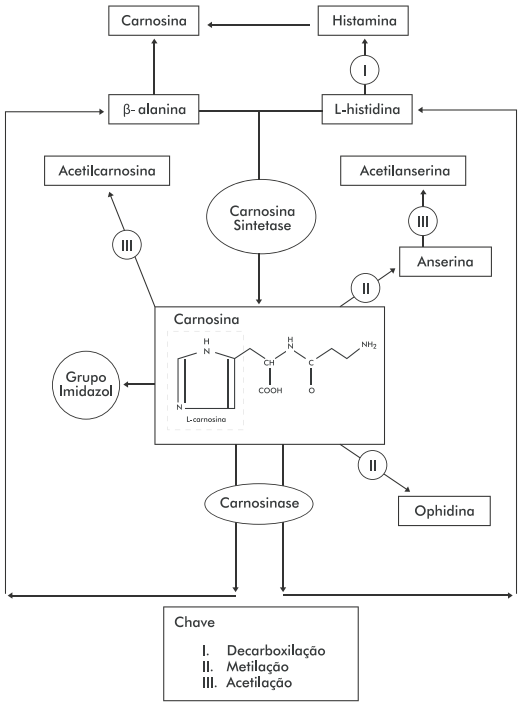


Figura 6: A figura mostra a cascata metabólica da carnosina e indica as reações de descarboxilação, metilação e acetilação. [6]

1.3 Carcinina: Um Derivado Ativo, mais Biodisponível e Estável que a Carnosina

A hidrólise da carnosina é efetuada pela enzima carnosinase. Segundo resultados de um estudo conduzido por Pegova et al., a taxa de hidrólise da carnosina foi 3 a 4 vezes maior quando comparada aos derivados anserina e ofidina. Já as taxas de hidrólise da carcinina, homocarnosina e N-acetilcarnosina foram desprezíveis. Os dados do estudo demonstraram que a metilação, descarboxilação ou a acetilação da carnosina aumenta a resistência da molécula frente à hidrólise enzimática. Com isso, a modificação metabólica da carnosina em carcinina ou outros derivados pode aumentar sua meia-vida nos tecidos. [24]

Segundo Babizhayev e colaboradores, a mínima modificação estrutural da carnosina em carcinina, com a retirada do grupamento ácido carboxílico (-COOH), promove a resistência à hidrólise enzimática. [32]

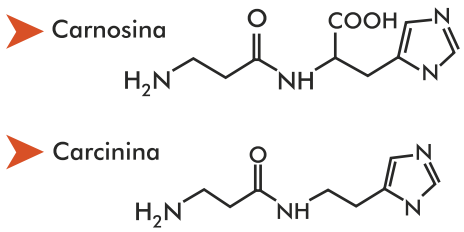


Figura 7: A modificação na estrutura da carnosina, com a retirada do grupo ácido carboxílico (-COOH), resulta em carcinina promovendo a resistência às enzimas hidrofílicas.

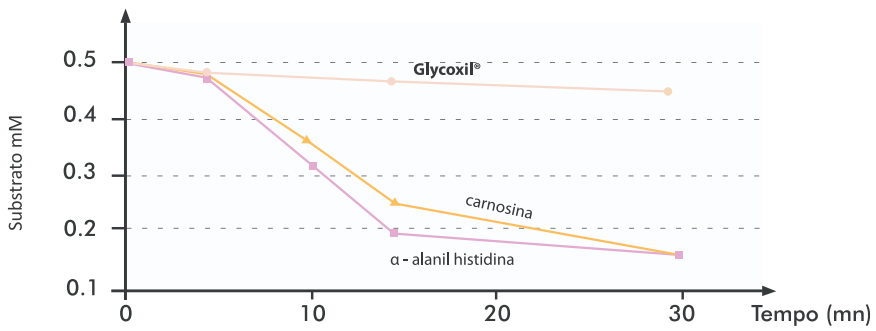


Figura 8: Comparação entre o metabolismo do carcinina carnosina e α-alanil-histidina, mostrando a maior estabilidade da carcinina a desativação enzimática.

Carcinina vs. Carnosina: Vantagens da Carcinina sobre a Carnosina

- Resistência à degradação enzimática promovida pelas carnosinases promovendo biodisponibilidade significativamente superior;
- Maior tempo de meia-vida e tempo de atividade celular;
- Ausência de liberação de histidina que reage com à histidina descarboxilase promovendo a liberação da histamina, um mediador das reações alérgicas no organismo. [14][27][10][13]

(Gariballa SE et al., 2000; Pegova et al., 2000; Chen Z et al., 2004; Exsymol, Mônaco. Age Ageing 2000; 29: 207-10. Nol Biol. 2000 Dec; 127 (4): 443-6. Br J Pharmacol. 2004 Nov; 143(5):573-80. Epub 2004 Oct. 4)

2 O Açúcar e o Envelhecimento Cutâneo



Atualmente, depois dos radicais livres, do estresse oxidativo e dos raios UV, o novo alvo contra o envelhecimento é a glicação (processo de ligação entre uma molécula de glicose maléfica com uma proteína saudável) e que resulta os AGEs (*Advanced Glycation End Products*).

Ao ingerirmos açúcar, são liberadas pelo corpo várias substâncias em nosso organismo que entram na corrente sanguínea. A glicose em excesso ativo o processo glicolítico, e por consequência, aumenta os nives de aetyl-Coa responsável pela formação de ácidos graxos que em excesso se acumulam no tecido adiposo e no figado.

A glicose em excesso acumula-se no tecido adiposo e causa envelhecimento precoce. O açúcar branco , o mais maléfico de todos, passa por um processo de refinamento. Ele não possui nutriente sendo 100% calórico e ainda responsável pela formação da gordura visceral. A sacarose em nosso organismo aumenta rapidamente os níveis de glicose e faz disparar a produção de insulina. Quando ocorre acúmulo de insulina na corrente sanguínea a gordura se acumula. Lembramos que devemos sempre levar em consideração o índice glicêmico do açúcar para avaliar seus malefícios.

Além de causar o acúmulo de gordura, o açúcar em excesso também desrregula o metabolismo roubando cálcio e sais mineriais prejudica a absorção de selênio, magnésio e zinco, agravando o envelhecimento precoce. O consumo exagerado deste alimento causa fermentação do sistema digestivo destrói as bactérias intestinais e enfraquece o sistema imunológico.

O índice glicêmico foi criado para diferenciar os alimentos de acordo com a quantidade de moléculas de glicose. O IG está diretamente ligado à glicemia o nível de açúcar circulante no sangue.

Os alimentos estão classificado em três categorias e refletem a resposta insulínica: (colocar (2) os índices que tem acima da tabela)

A recomendação em carboidratos representa 60% do valor calórico total, isso é, 300 g de carboidratos para um adulto e 200g para crianças.

É importante consumir as quantidades adequadas de cada grupo alimentar dando preferência os produtos com carga glicêmica de moderada para baixa para garantir um equilíbrio de hormônio como insulina, glucagon e cortisol.

3 Glicação e Produtos de Glicação Avançada (AGEs)

A glicose e outros açúcares redutores (frutose, maltose, lactose) apresentam a capacidade de reagir não-enzimaticamente com as proteínas iniciando um processo de modificação pós-translacional conhecido como glicosilação não-enzimática ou glicação.

Essa reação, cujo nome é Reação de Maillard (Hartog et al., 2007), ocorre entre o grupamento aldeído da glicose como o metilglioxal, glioxal ou glicoaldeído e as aminas nucleofílicas dos aminoácidos. A condensação que forma a Base de Schiff é seguida de uma série de rearranjos para produzir estruturas denominadas AGEs advanced glycation end-products, produtos finais de glicação avançada (Moheimani et al., 2010; Lohwasser et al., 2005). Dos vários tipos de AGEs que podem ser formados, tem sido demonstrado que são gerados os AGEs *cross-linked* quanto os não *cross-linked* são gerados. [19][23][30]

Os AGE's podem causar crosslinking do colágeno (é uma ligação que liga a cadeia de um polímero a uma outra cadeia), cuja consequência é uma rigidez desses cross-linking é uma rigidez vascular e uma retenção de LDL nas paredes arteriaispropiciando o desenvolvimento da arteriosclerose.

Nos alimentos, quando o leite e açúcar são submetidos a altas temperaturas, é o processo de glicação que confere à mistura um tom dourado (caramelização das proteínas), as proteínas do leite foram glicadas tornando se mais escurecidas e rijas. [21]

No nosso corpo, algo semelhante acontece ao longo do tempo: a incorporação de glicose às proteínas altera e modifica as funções nos tecidos. A hemoglobina glicada, por exemplo, tem menor capacidade de transporte de oxigênio que a hemoglobina comum. As proteínas glicadas que comemos também prejudicam a saúde, pois não temos capacidade de eliminá-las completamente no metabolismo. Elas podem causar desarranjo estrutural, como no colágeno da pele e nos ossos além de doenças como o Mal de Alzheimer e a degeneração macular.

Nos últimos anos, a glicação vem sendo apontada como um processo altamente nocivo à saúde, relacionado às altas concentrações de radicais livres. A glicação compõe uma das mais fortes teorias para explicar o envelhecimento por seu poder de modificar de maneira permanente os processos metabólicos do organismo.

3.1 Reação de Maillard

Num primeiro momento, o grupamento aldeído da glicose reage com o grupamento amina do aminoácido, formando a Base de Schiff. Essa reação ocorre de forma rápida e

é reversível, dependendo das concentrações dos substratos. A Base de Schiff converte esse produto intermediário em um produto mais estável, o chamado produto de Amadori (por exemplo, a HbA1c, hemoglobina glicada e a frutosamina). O subsequente rearranjo dos produtos de Amadori leva à formação dos compostos estáveis e irreversíveis AGEs. [19]

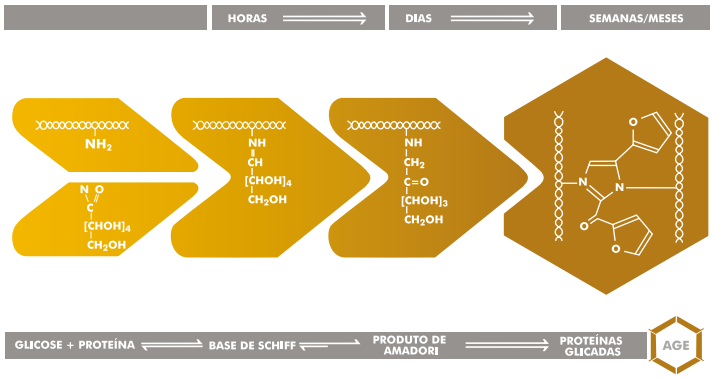


Figura 9: Reação de Maillard.

Adicionalmente a essa reação clássica (figura 9), a oxidação das dicarbonilas catalisada pelos metais de transição exerce papel importante no processo de glicação. A glicoxidação, ou seja, a ação sinérgica entre a glicação e a oxidação, é responsável pela liberação de ROS (espécies reativas de oxigênio), compostos dicarbonílicos proteína-reativos e extensa degradação protéica/*cross-linking*.[20]

A cascata que forma os compostos dicarbonílicos, também conhecida como via do estresse carbonílico, na qual a oxidação de lipídios ou de açúcares geram compostos dicarbonílicos intermediários altamente reativos (Hartog et al., 2007), é extremamente importante neste processo, uma vez que os compostos dicarbonílicos chegam a ser 20 mil vezes mais reativos do que a glicose e são os principais intermediários durante a formação de AGEs *in vivo* e nos alimentos. [26]

A formação dos AGEs está associada a alterações na estrutura e função de proteínas como o colágeno e, particularmente, em tecidos onde esses produtos são acumulados.

(Cárdenas-Léon et al., 2009)

3.1.1 AGEs e Implicações Clínicas

Os AGEs acumulam-se com o envelhecimento e o aumento desse acúmulo tem sido reportado em pacientes com diabetes. [19]

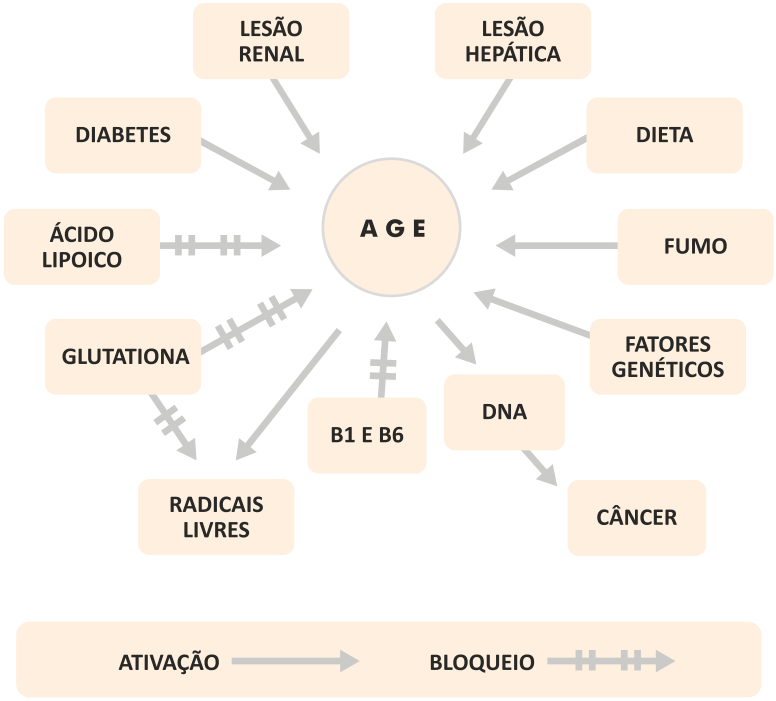


Figura 10: Causas, efeitos e meios de combate aos AGEs.

Os efeitos patológicos dos AGEs estão relacionados à capacidade destes compostos de modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas. Por meio de geração de radicais livres, da formação de ligações cruzadas com proteínas ou de interações com receptores celulares os AGEs promovem, respectivamente, estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios. *[4]*

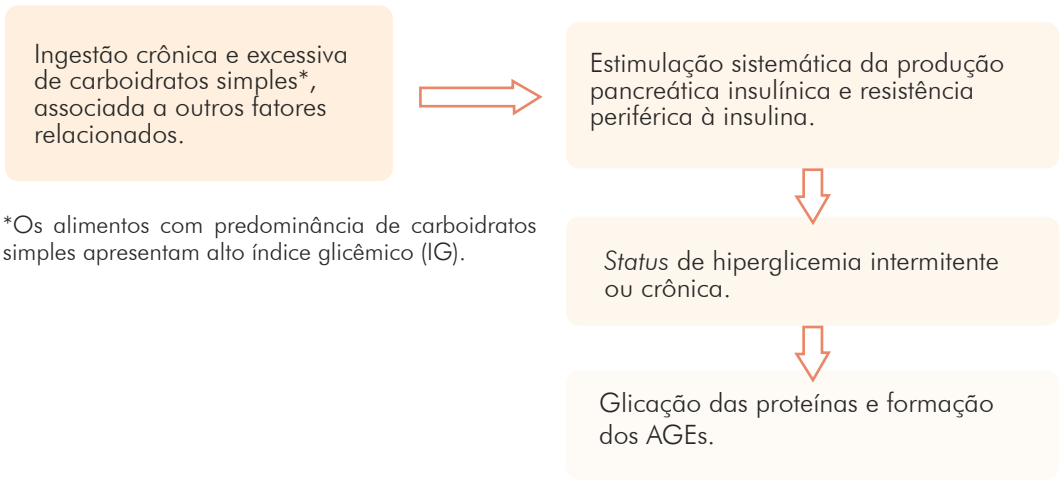
Os mecanismos alternativos de formação de AGEs incluem a chamada via do estresse carbonílico, na qual a oxidação de lipídeos ou açúcares gera compostos dicarnonílicos intermediários altamente reativos. A glicólise e a autoxidação de glicose, por exemplo, produzem metilglioxal e glioxal que interagem com aminoácidos para formar os AGEs.

Os AGEs formados a partir da oxidação de açúcares ou de lipídeos podem também ser denominados, respectivamente, produtos de glicoxidação ou da lipoxidação avançada. Deve-se ressaltar que, durante algumas das reações que levam à formação de AGEs, espécies reativas do oxigênio (ROS) são geradas e concorrem paralelamente com o estresse oxidativo e com os danos estruturais e funcionais às macromoléculas. [7]

O acúmulo dos AGEs ocorre em várias partes do organismo, incluindo o tecido cutâneo, nervoso, vascular, renal e cardíaco, podendo ocorrer dentro ou fora da célula. A falência renal, o estresse, o tabagismo, alimentos queimados ou tostados favorecem o aumento do acúmulo dos AGEs. O aumento concomitante do estresse oxidativo favorece o aumento do acúmulo dos AGEs. O tabagismo, assim como alimentos queimados ou tostados, são outras possíveis fontes dacúmulo desses produtos de glicação avançada. [19]

O estudo da Dozio. E.; et al mostra que o aumento dos receptores dos AGEs chamados de RAGE no tecido adiposo foi associado com a inflamação, a hipertrofia dos adipócitos, e uma disfunção do sinal insulínico. Outro estudo de Ottum MS.; et al demonstrou os malefícios dos AGEs produzidos pelos alimentos processados sobre os produtos do metabolismo, promovendo danos oxidativos nas proteínas, lipídeos e nucleotídeos. A idade e as doenças crônicas são também extremamente associados aos marcadores do estresse oxidativos especialmente os AGEs.Esse acumúlo de AGEs aumenta os riscos de insulina resistência.[37][38]

A longa exposição à hiperglicemia tem sido associada ao desenvolvimento de doenças vasculares em pacientes com ou sem diabetes. Muitos desses efeitos são mediados pela glicação das proteínas e a formação dos AGEs. Esse fenômeno é acelerado em condições cuja concentração de glicose está cronicamente elevada, como acontece no diabetes. [8]
O consumo crônico de açúcares, especialmente os carboidratos simples, podem promover um *status* de hiperglicemia, que resultará na formação acelerada dos AGEs. [3]
Dentre os mecanismos já reconhecidos pelos quais a hiperglicemia leva ao desenvolvimento das lesões vasculares associadas ao diabetes (via do poliol, via da hexosamina, via dos AGEs e via da proteína quinase C). A via dentro os mecanismos de formação dos AGEs é considerada uma das mais importantes. [3]



*Os alimentos com predominância de carboidratos simples apresentam alto índice glicêmico (IG).

Alguns dos AGEs detectados *in vivo* foram originalmente identificados em alimentos como a CML (carboximetil lisina), um dos produtos finais de reações de glicoxidação e lipoxidação e um importante marcador monitorado em estudos laboratoriais. Foram avaliados os efeitos dos diversos métodos de preparo no conteúdo de AGEs, determinando CML em 250 itens alimentares comumente consumidos pela população norte-americana. A lista com os resultados desta pesquisa foi publicada pelo American Diabetes Association e é parcialmente reproduzida no anexo. A análise desse documento permite verificar a influência de diversos fatores na formação de AGEs em alimentos, mesmo que vários dos itens apresentados façam parte do hábito alimentar específico da população norte-americana e os AGEs tenham sido mensurados por um único tipo, dentre os vários compostos possivelmente presentes nas amostras analisadas. [3][16]

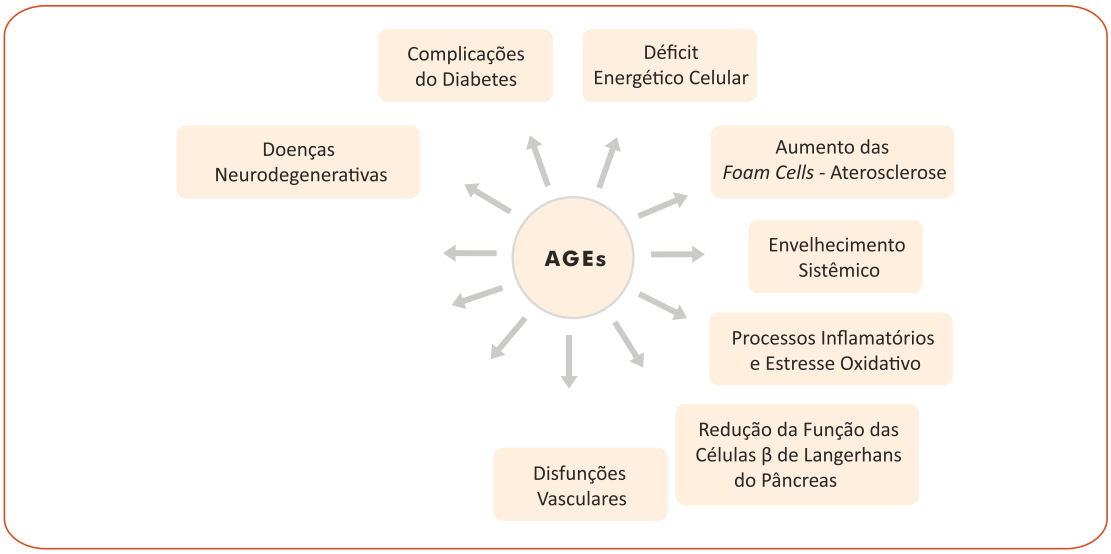
VOCÊ SABE O QUE ESTÁ INGERINDO?

CONTEÚDO DE PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs) EM ALIMENTOS*

ALIMENTO	AGEs (U/g)*	ALIMENTO	AGEs (U/g)*
Alimentos Gordurosos		**Ovos**	
Manteiga	264 873	Clara cozida/10min	442
Margarina (60% de óleo vegetal)	175 192	Clara cozida/12min	573
Maionese	94 000	Gema cozida/12min	12 134
Maionese *light*	22 011	Gema cozida/12min	18 616
Óleo de Oliva	120 000	Ovo frito com margarina	27 494
Carne Bovina		**Cereais e Leguminosas**	
Linguiça (*frankfurter*) grelhada/5min	112 697	Pão italiano com miolo	225
Linguiça (*frankfurter*) cozida/7min	74 850	Pão italiano com casca	366
Roast beef (rosbife)	60 708	Pão baguete	1 075
Hambúrguer (*fast food*)	54 175	Pão baguete tostado	1 675
Almôndega cozida/1h	28 519	Barra de cereais com chocolate	5 068
Carne cozida/1h	22 305	Panqueca caseira	9 722
Carne Suina		Cereal com *flakes*	2 320
Bacon no microondas/3min	90 228	Biscoito de chocolate	16 837
Bife de lombo frito/7min	47 526	Granola	19 997
Frango		Sanduíche de queijo quente	43 327
Peito sem pele cru	7 686	Pizza (massa fina)	68 248
Peito sem pele cozido/1h	11 236	Feijão cozido/1h	2 983
Peito sem pele no microondas/5min	15 245	Macarrão cozido/12min	2 420
		Arroz branco cozido	316

Fonte: Barbosa et al., Rev. Nutr., Campinas, 22(1):113-124, jan./fev., 2009

Inúmeros estudos têm demonstrado que os AGEs atuam como mediadores, não apenas do desenvolvimento de complicações crônicas do diabetes, mas também nas desordens relacionadas ao envelhecimento, à nefropatia, à doença de Alzheimer à insuficiência cardíaca, entre outras.



A remoção dos AGEs formados nos componentes teciduais é realizada pela proteólise extracelular ou pelas células como os macrófagos que endocitam AGEs via receptores e, após a degradação intracelular, liberam na circulação AGE-peptídeos solúveis e de baixo peso molecular para serem excretados com a urina. Entre esses AGE-peptídeos, também denominados segunda geração de AGEs, pode haver intermediários altamente reativos, mas seus efeitos são limitados pela excreção renal. Assim, a eficiência dos sistemas de remoção de AGEs dependente, em última instância, da eficiência da depuração renal. A disfunção renal que ocorre em pacientes portadores de nefropatia, por exemplo, resulta na falha de remoção dos AGEs circulantes e contribui consideravelmente para as altas concentrações de AGEs séricos e teciduais encontradas em pacientes. A ativação crônica dos macrófagos pode sobrecarregar o sistema imunológico e até ocasionar doenças autoimunes. Além disso, essa ativação crônica de macrófagos em indivíduo com alta taxa de gordura, pode aumentar a inflamação dificultando a perda de peso.

3.1.2 AGEs, Estresse Oxidativo e Inflamação

Implicações no envelhecimento, inflamação, neurodegeneração e complicações do diabetes

Os AGEs estão envolvidos em um círculo vicioso de inflamação, geração de ROS, produção amplificada de AGEs e mais inflamação, e assim por diante. [30]

Adicionalmente à ligação com os receptores de AGEs, os RAGE, os AGEs podem estar relacionados ao aumento da geração de ROS por múltiplos mecanismos, tais como o decréscimo da atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase, a diminuição dos estoques de glutationa e a ativação da proteína quinase C.

A relação direta da inflamação e formação de AGEs foi sugerida por estudos nos quais a ativação das cascatas da mieloperoxidase (MPO) demonstraram gerar diretamente CML (carboximetil-lisina)-AGEs. Outra evidência do ciclo vicioso entre estresse oxidativo e produção de AGEs é o fato do malondialdeído (um produto da lipoperoxidação) causar um dano oxidativo secundário às proteínas.

Foi hipotetizado por Ramasamy et al., que, estimulada pelo estresse oxidativo e geração de ROS, estímulo inflamatório, insulto físico, episódios intermitentes ou crônicos de hiperglicemia, a formação de AGEs seria a chave para explicar uma série de ocorrências lesivas. Uma vez formados, os AGEs amplificariam as cascatas de estresse e diminuiriam a remoção/detoxificação dos AGEs. No envelhecimento, por exemplo, a redução da defesa anti-AGEs contribui para o acúmulo de AGEs que promove a up-regulação dos RAGEs e atração das células inflamatórias, como os polimorfonucleares e os linfócitos. Como as células inflamatórias estão envolvidas no processo de homeostasia, uma alteração na sua resposta pode promover uma série de mudanças importantes. [30]

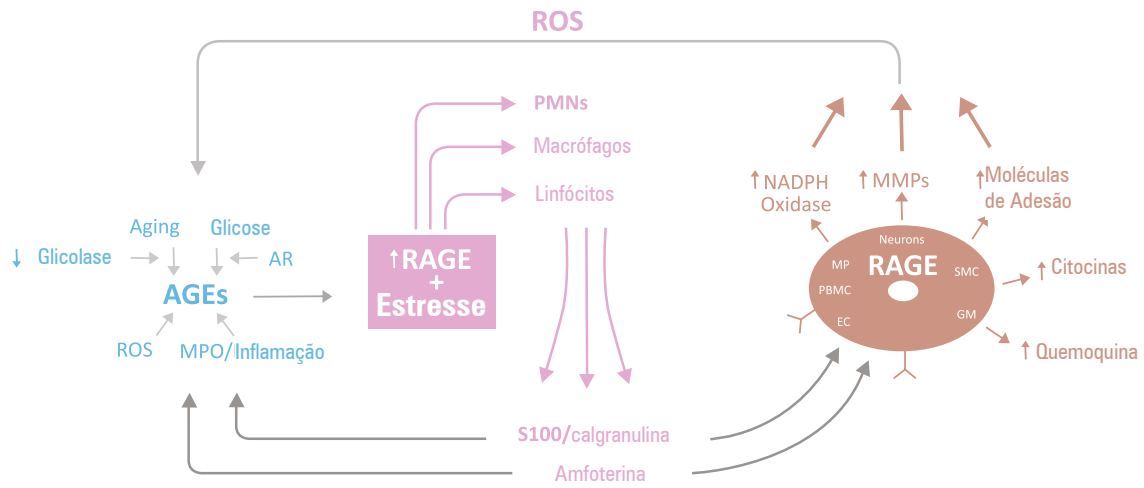


Figura 11: Ligação entre o receptor de AGE (RAGE) e os AGEs: AGE-RAGE e o ciclo vicioso de perturbação celular e insulto tecidual – implicações no envelhecimento, inflamação, neurodegeneração e complicações do diabetes.

O mesmo processo pode ocorrer em pessoas que não têm diabetes, apenas um padrão alimentar incorreto e/ou renitência à insulina.

3.1.3 AGEs e Complicações do Diabetes Mellitus

De acordo com Zimmet et al., a incidência crescente do Diabetes Mellitus tipo 2 constitui-se em uma das principais preocupações à saúde humana. Acredita-se que mudanças importantes no meio ambiente e no comportamento humano justifiquem esse fenômeno e estima-se que no ano 2010 exista cerca de 221 milhões de pessoas diagnosticadas em todo o mundo.

A glicose plasmática exerce função-chave nas complicações do Diabetes Mellitus, pois promove a formação da hemoglobina A1c (HbA1c) que é glicada e dos AGEs circulantes, que por sua vez exercem função central na fisiopatologia das complicações do diabetes.

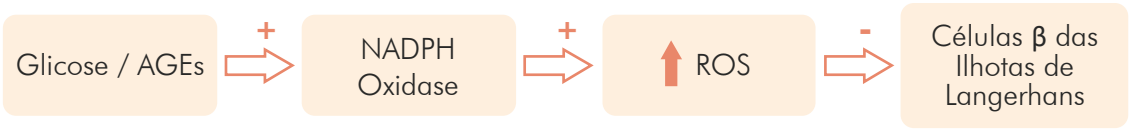
As principais complicações do diabetes relacionadas às altas concentrações de AGEs são a retinopatia, a renopatia, a neuropatia e a insuficiência cardíaca. [36][22][32]

3.1.4 Mecanismos Fisiopatológicos Envolvendo a Glicação no Estado Hiperglicêmico

Aumento do Estresse Oxidativo Via Ativação da NADPH Oxidase

A glicose, assim como os AGEs, podem induzir ao estresse oxidativo tendo este, implicação importante na fisiopatologia do diabetes.

De acordo com os resultados de um estudo recentemente publicado por pesquisadores da Faculdade de Medicina de Shangai, China, que conduziram um estudo *in vitro* expondo um tipo celular a várias concentrações de glicose ou AGEs, a viabilidade celular decresceu significativamente e a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio), via ativação da NADPH oxidase, aumentou de forma bastante pronunciada. Ainda segundo os pesquisadores, o estresse oxidativo pode prejudicar a função das células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas e contribuir para o aparecimento do diabetes. [24]



\+ Ativação, - Prejuízo.

Indução da Resistência ao Óxido Nitrico (NO)

Resultados de um estudo publicado no Journal of Hypertension, em fevereiro de 2010, comprovam que a exposição de células endoteliais aos AGEs promove significativa redução da resposta vasodilatadora à acetilcolina e da expressão dos mediadores "downstream" da GMPc-PKG-1, uma proteína-quinase dependente de GMPc ou Proteína Cinase G (PKG) é "uma proteína quinase serina" / treonina-específica que é ativada por cGMP. Ela fosforila uma série de alvos biologicamente importantes e está implicada na regulação do relaxamento do músculo liso, função das plaquetas, no metabolismo do esperma, na divisão celular e síntese de ácido nucleico. Além disso, foi observado que os AGEs reduzem a produção de NO no endotélio, assim como a expressão da NO sintase endotelial, *in vitro*. [23]

Ativação do PARP e das Cascatas Dependentes da Mitocôndria

Segundo resultados de um estudo publicado no renomado periódico Free Radical Biology Medicine em fevereiro de 2010, a hiperglicemia causa a super-expressão de PARP, a redução intracelular de NAD assim como dos níveis de ATP e aumenta a fragmentação do DNA em tecido hepático de animais portadores do diabetes.

(Cárdenas-Léon M. et al., 2009)

3.1.5 AGEs e Doenças Neurodegenerativas

Experimentos têm demonstrado que na presença da demência vascular ou de Alzheimer, os níveis de Ages aumentam ainda mais.

(Ramasamy et al., 2005)

Múltiplos estudos têm demonstrado que os AGEs são neurotóxicos em cultura de neurônios. Os AGEs e seus precursores (metilglioxal e glioxal) podem aumentar a agregação e a citotoxicidade dos fragmentos carboxi-terminais da proteína beta-amilóide. Essas considerações permitem ressaltar que os AGEs podem ser centrais na exacerbação da demência e no aumento do risco de acidente vascular cerebral.

(Ramasamy et al., 2005)

Um estudo conduzido por Girones et al. sugeriu que o acúmulo de um tipo de AGE, o CML (carboximetil lisina), é maior em pacientes com diabetes e demência de Alzheimer associada quando comparado aos pacientes portadores apenas da doença de Alzheimer. Entretanto, a relação entre o *déficit* cognitivo, o diabetes e a doença de Alzheimer ainda não está clara.

(Ramasamy et al., 2005)

Uma estreita relação é observada entre a demência vascular e de Alzheimer, especialmente na presença de fatores de risco vascular conhecidos. Conectando as informações, pode-se dizer que os AGEs atuam no estresse neuronal e com isso, exacerbam o envelhecimento e o processo ativo de neurodegeneração. [30]

3.1.6 AGEs e Doenças Cardiovasculares

A insuficiência cardíaca é caracterizada por uma desordem cardíaca estrutural e funcional que resulta na inabilidade do coração em exercer suas funções vitais. [19]

Os AGEs contribuem para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca por meio de dois mecanismos:

1) Afetam as propriedades fisiológicas das proteínas na matriz extracelular por promover a formação dos *cross-linkgs*;
2) Causam múltiplas mudanças vasculares e miocárdicas via interação com os receptores dos AGEs (RAGEs).

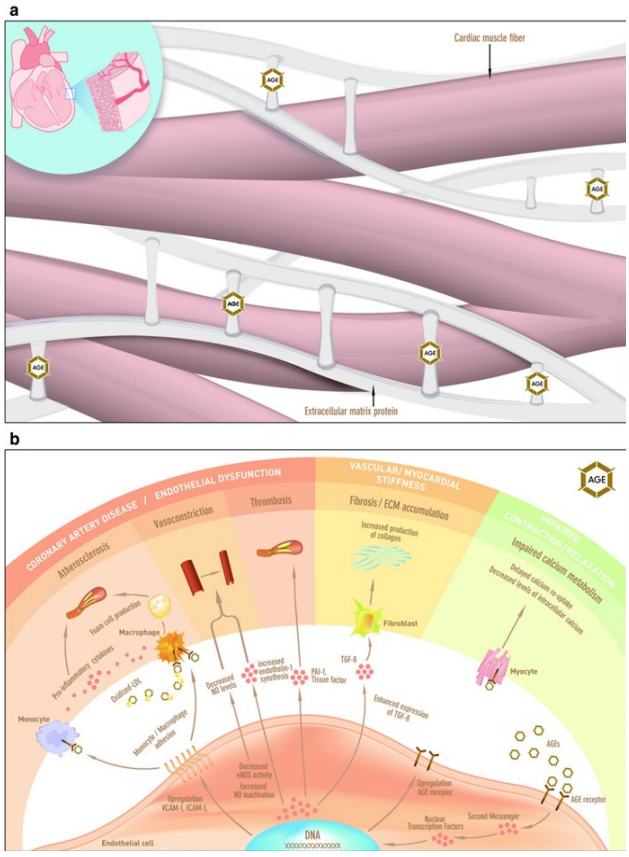
O resultado é a indução da disfunção vascular sistólica e diastólica. Subsequentemente, essas anormalidades resultam no desenvolvimento e na progressão da insuficiência cardíaca. [19]

AGEs e as Disfunções Diastólica e Sistólica

O *cross-linking* das proteínas da matriz extracelular é essencialmente um fenômeno fisiológico, pois fortalece o tecido assegurando a integridade, sem comprometer a flexibilidade. Os AGEs, entretanto, podem ligar-se covalentemente a outros AGEs e formar *cross-links* adicionais entre as proteínas da matriz, colágeno, elastina e laminina. O excesso de *cross-linkgs* causado pelo acúmulo de AGEs destrói a flexibilidade da matriz extracelular. O aumento da rigidez pode promover a disfunção diastólica (Figura A). Outra via possível para promover a disfunção diastólica é a ativação do RAGE que induz à fibrose via upregulação do TGF-β (Figura B).

A ativação do RAGE pelos AGEs promove ainda:

- Redução da concentração do cálcio nos miócitos;
- Aterosclerose, trombose e vasoconstrição;
- Influência negativa sobre o metabolismo do LDL aumentando o risco de aterosclerose e subsequente infarto do miocárdio. O LDL modificado pelos AGEs é mais suscetível à captação pelos macrófagos por meio dos receptores dos AGEs, formando as *foam cells*.
- Disfunção vascular por reduzir a biodisponibilidade do vasodilatador óxido nítrico (NO) e aumentar a produção de endotelina-1, um potente vasoconstritor. [19]



4 Glycoxil®: Um Peptidomimético Anti-AGEs

Muitos produtos antiglicantes têm sido introduzidos no mercado nos últimos anos. Eles geralmente atuam como competidores nucleofílicos e limitam a iniciação da glicação por opor-se ao primeiro passo da condensação entre os grupamentos carbonilas dos açúcares e as aminas nucleofílicas dos aminoácidos. No entanto, a estratégia mais interessante consiste na interrupção das etapas iniciais dos processos de rearranjos antes que os *cross-linkgs* irreversíveis ocorram, mecanismo exercido pelo Glycoxil®.
Glycoxil® é uma substância natural e patenteada, descoberta na Rússia, considerada atualmente como um dos mais importantes nutracêuticos no combate à glicação.
Glycoxil® pertence a família dos aminoácidos. Esse dipeptídeo revela-se fundamental para todo o organismo com efeito, anticarbonilação proteica, anticarbonilação fosfolipídica, *anti-cross-linking* e antiglicosilação.

O envelhecimento da pele é o sinal mais visível da degradação proteica, manifestando-se por rugas, perda de elasticidade e menor capacidade de cicatrização. Contudo, a pele reflete alterações que afetam todo o organismo e dizem respeito aos músculos, aos vasos sanguíneos, aos olhos, ao cérebro e a muitos outros órgãos. Quando as proteínas se tornam glicadas e deixam de ser funcionais, o corpo torna-se alvo das doenças degenerativas e envelhece prematuramente.

Estudos demonstram que carcinina é o antioxidante mais eficaz contra o radical hidroxil e o mais potente inibidor conhecido do processo de glicação que carameliza as proteínas. Os estudos mostram igualmente que, aos 70 anos de idade, a taxa de carnosina nos músculos diminui mais de 63%, o que poderia explicar perda da massa muscular com a idade chamada sarcopenia. A redução da presença de carnosina no organismo, associada a um *estresse* oxidativo crescente e a hábitos alimentares que previlegiam os açúcares, torna-se desejável ou mesmo indispensável a suplementação com nutracêuticos.

5 Glicoxyl®: Um Peptidomimético Desglicante

Nos estudos dos inibidores pós-produto de Amadori e tem sido proposto que estes não recuperam a estrutura original da proteína no entanto, impedem a formação dos *cross-linkgs* irreversíveis, assim como dos produtos da glicoxidação. De forma alternativa, é possível interromper a formação da glicosilamina, um produto intermediário entre a Base de Schiff e o Produto de Amadori (figura 13) e reverter a glicação. Esse processo é denominado transglicação. Glycoxil® apresenta atividade transglicante. [9]

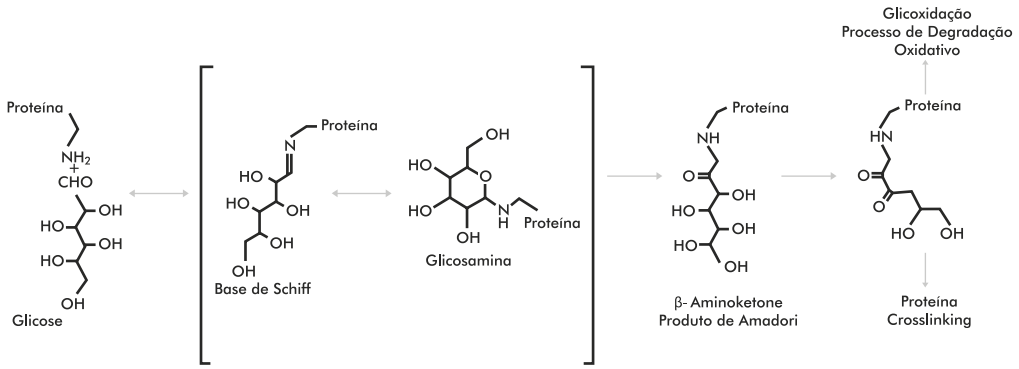


Figura 13: Etapas sucessivas na formação dos *cross-linkgs* de proteínas derivados da glicação.

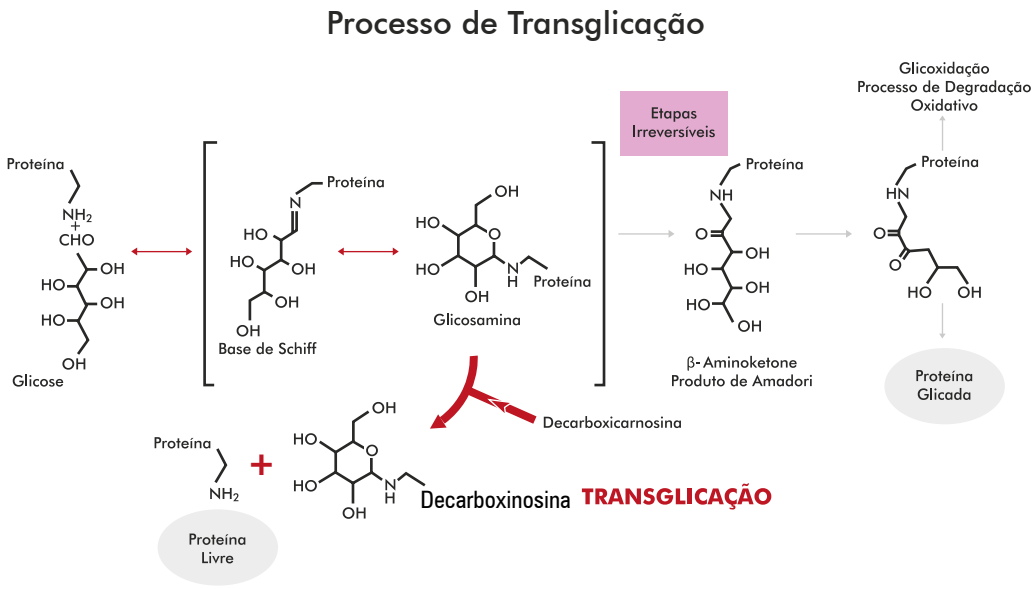
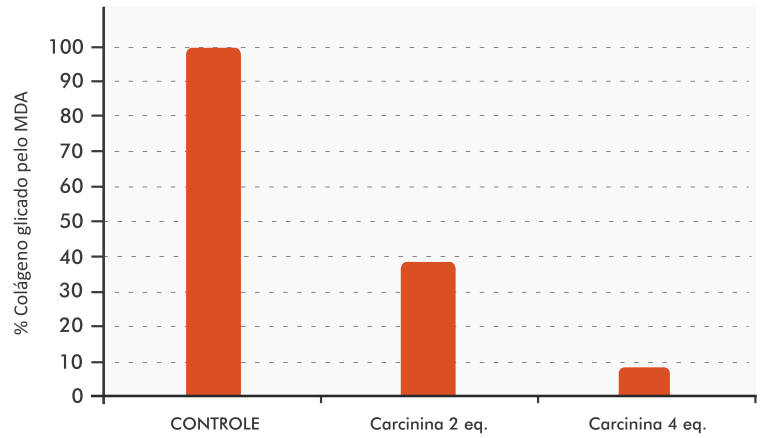


Figura 14: Processo de transglicação exercido pelo **Glycoxil®**.

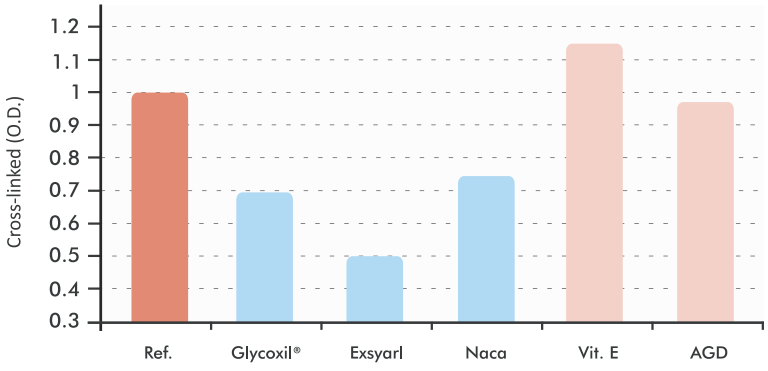
A transglicação resulta na transferência de uma molécula aceptora, o Glycoxil®, à molécula intermediária glicosilamina, revertendo essa etapa na reação de Maillard e, consequentemente, a glicação (Figura 14). [9]

6 Glycoxil®: Um Peptidomimético Antiglicante/Glicoxidante

O grupamento amina do anel imidazólico de Glycoxil® participa do efeito antiglicoxidação devido à sua particular reatividade com os produtos de oxidação dos açúcares Exsymol.



Glycoxil® promove redução significativa e dose-dependente do *cross-linking* do colágeno.

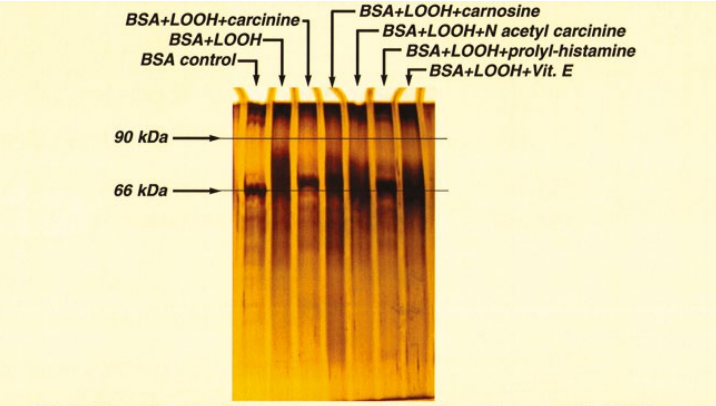


Glycoxil® promove redução significativa e superior à vitamina E e à aminoguanidina do *cross-linking*.
Fonte: Exsymol.

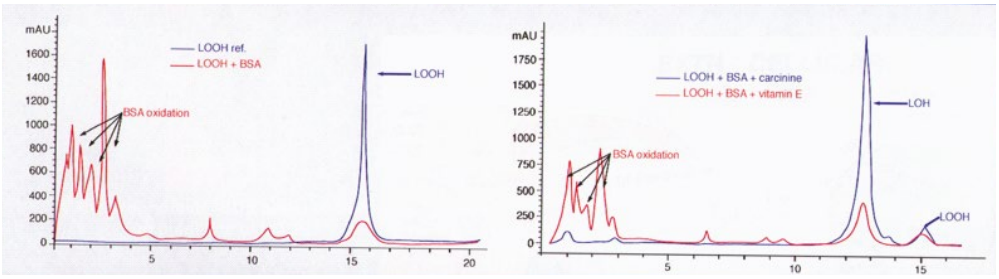
7 Glycoxil®: Um Peptidomimético Multifuncional

Glycoxil® apresenta atividade antiperoxidação lipídica, além de atuar como um varredor de radicais livres. Glycoxil® inibe a ativação das hidroperoxidases lipídicas, prevenindo e reduzindo o acúmulo de produtos oxidados a partir da peroxidação lipídica (LPO) das membranas biológicas como mostram os testes abaixo:

Correlação entre a Redução de Lipídeo Peróxido e Proteção da Proteína

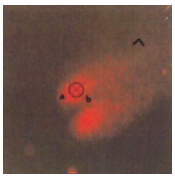


Glycoxil®, como a carnosina e a vitamina E, previne a degradação proteica por reduzir os peróxidos lipídicos (Eletroforese da BSA, albumina sérica bovina, na presença do LOOH, um peróxido lipídico). Exsymol



Evidência da redução das hidroperoxidases lipídicas promovidas pelo **Glycoxil®** (método realizado por HPLC). Fonte: Exsymol

Teste: Proteção do DNA



Método Cometa

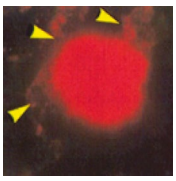
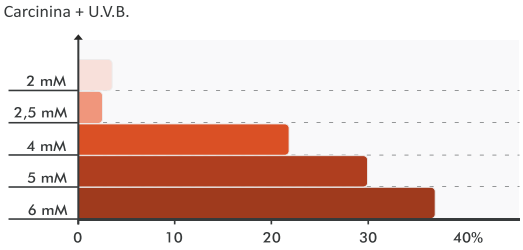


Imagem de um núcleo de queratinócito irradiado no "Método Cometa".

Imagem de um queratinócito irradiado no "Método Cometa". As setas mostram a migração do DNA danificado.

	Células Controle	Células Irradiadas	Células Irradiadas + Carcinina 2,5mM	Células Irradiadas + Carcinina 5mM
d1/d2	1,028	1,719	1,019	1,106
+/-DS	0,59	0,59	0,23	0,38



Glycoxil® protege contra o dano oxidativo ao DNA, prevenindo a fragmentação do mesmo frente à radiação UVB ("Método Cometa" e morte celular por ELISA). "Glycoxil"

8 Estudos de Eficácia

8.1 Glycoxil® promove melhora clínica e histológica em ratos com diabetes

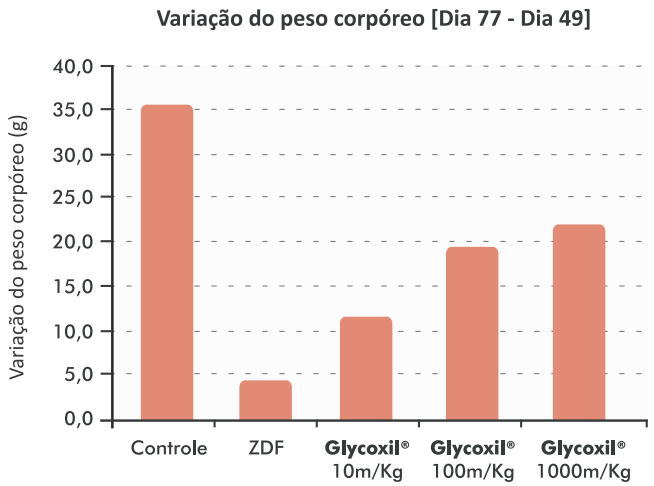
Animais com diabetes induzidos pela ZDF receberam a administração oral de Glycoxil®.

O desenho experimental consistiu em:

- 46 ratos machos com diabetes induzidos pela ZDF e 4 machos controle (magros);
- Administração oral de Glycoxil® nas doses de 10, 100 e 1000 mg/Kg, por 3 meses;
- Avaliação de resultados clínicos e histológicos (pele).

Resultados

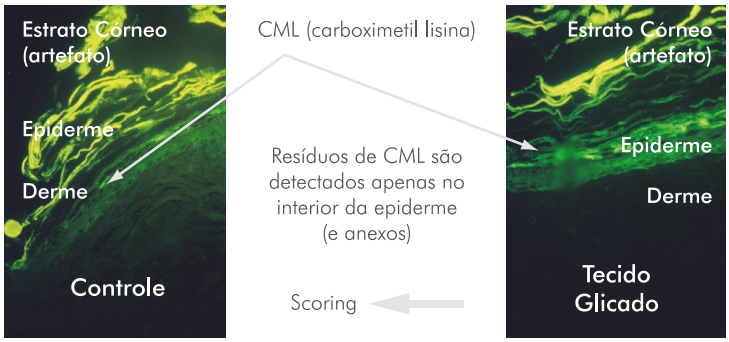
• Clínicos: o tratamento com Glycoxil® 1000mg/Kg promoveu melhora do *status* físico geral e menor variação do peso corpóreo nos animais portadores do diabetes.



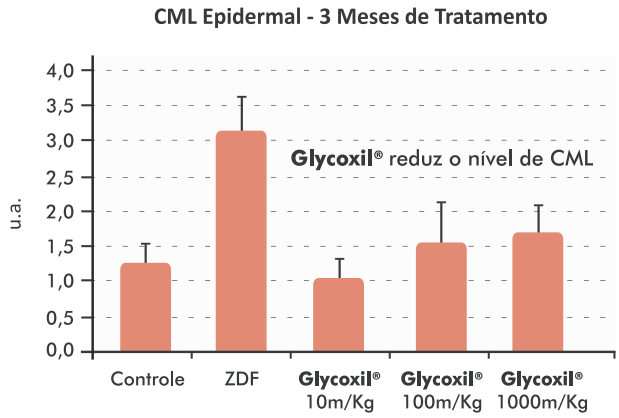
Glycoxil® promove menor variação do peso corpóreo. Fonte: Exsymol

• Histológicos: os animais portadores do diabetes apresentaram aumento dos níveis de glicação cutânea, além de outros prejuízos na pele quando comparados aos ratos magros (controle);

• A administração de Glycoxil® reduziu os níveis de CML na epiderme e de caspase-3 em fibroblastos, apresentando desempenho de um *antiaging*.



Animais portadores do diabetes apresentaram maiores níveis de CML. A terapia oral com **Glycoxil®** promove redução dos níveis de AGEs (CML) no tecido epidérmico dos animais. Fonte: Exsymol



Glycoxil® promove redução dos níveis de AGEs (CML) no tecido epidérmico dos animais. Fonte: Exsymol

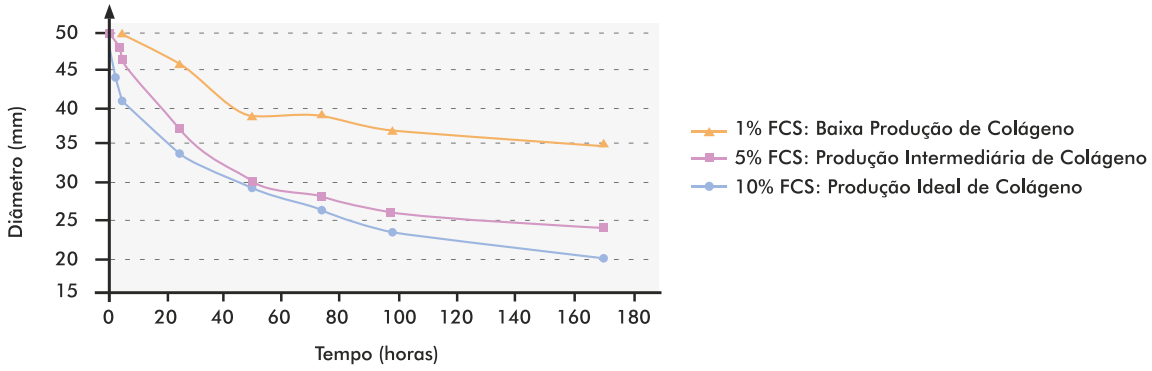
8.2 Glycoxil® promove melhora da propriedade tensora dos fibroblastos, ativando-os metabolicamente

Para avaliar o papel do Glycoxil® na ativação metabólica dos fibroblastos, os pesquisadores utilizaram o modelo de equivalente dérmico, um sistema 3D *in vitro* também conhecido como *free-floating lattice*. Os *lattices* foram preparados com fibroblastos primários dérmicos humanos (HDF), cultivados em condições ótimas ou em meio com privação de soro bovino (FCS).

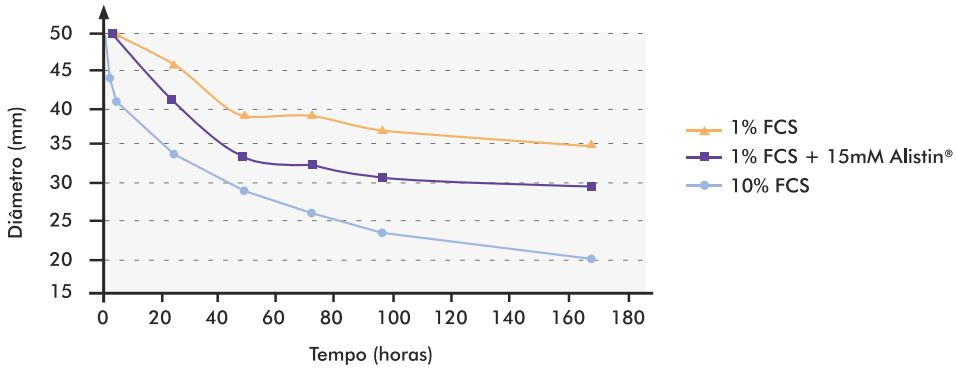
Nesse experimento, a habilidade de contração é associada à ativação metabólica dos fibroblastos.

Resultados:

A privação do soro bovino promove uma contração menos eficiente e mais retardada **(gráfico 1)**. Já quando Glycoxil® é adicionado ao meio pobre em nutrientes (FCS a 1%), a contração é aumentada **(gráfico 2)**.

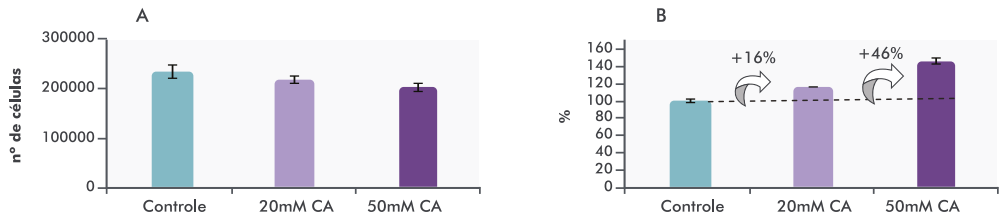


Influência da depleção de soro na capacidade dos fibroblastos na capacidade de contração. **(gráfico 1) Fonte: Exsymol**



Efeitos benéficos do **Glycoxil®** nas propriedades de contração dos fibroblastos em derme equivalente metabolicamente deprimida. **(gráfico 2). Fonte: Exsymol**

Para investigar os efeitos do Glycoxil® no metabolismo celular, HDF foram cultivados durante 24h em meio contendo FCS e Glycoxil® em diferentes concentrações, sendo realizada e a contagem celular foi realizada. O método MTT (atividade mitocondrial refletida enzimaticamente) também foi feita. De acordo com os resultados, apesar da adição de Glycoxil® não aumentar a contagem celular, a transformação metabólica foi dose-dependente **(gráfico 3)**.



Efeito benéfico do **Glycoxil®** sobre a atividade metabólica celular.
A) número de célula; B) % de metabolização indicativo de atividade mitocondrial**(gráfico 3). Fonte: Exsymol**

Conclusão:

A atividade metabólica dos fibroblastos modula fortemente a interação célula-matriz evidenciada pelo monitoramento das propriedades tensoras.

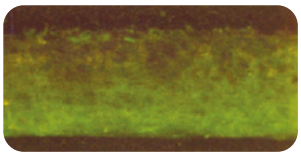
8.3 Glycoxil® é um Potente Protetor do DNA: Apresenta Atividade Fotoprotetora

O principal interesse pela carcinina no que se refere à fotoproteção é oriundo da habilidade deste composto em inibir a toxicidade dos hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e seus produtos tóxicos formados em nível das membranas celulares após a exposição à radiação UV. De acordo com evidências recentes, a proteção do DNA pela carcinina tem sido demonstrada por meio de várias técnicas que utilizam uma linhagem celular de queratinócitos (NCTC2544) para avaliações.

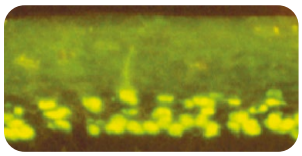
8.3.1 Estudo Imuno-histoquímico: Avaliação da Formação de Dímeros de Pirimidina

Os dímeros de pirimidina podem ser detectados no DNA de queratinócitos irradiados com UV. Estes são resultados da alteração do material genético da célula, indicando dano ao DNA. Na figura abaixo, podemos observar como o tratamento com Glycoxil® reduz as alterações celulares após a irradiação UVB.

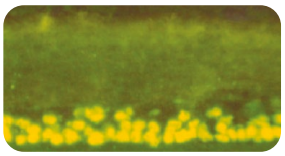
Epiderme Irradiada e Não Tratada



Epiderme humana reconstruída (EHR) padrão - não tratada

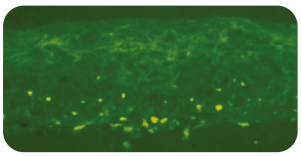


EHR 1h30 depois da irradiação com muitas alterações nas camadas das células basais e supra-basais

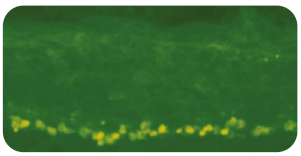


EHR 6h depois da irradiação com alto número de células com dTT-DNA rompido.

Epiderme Irradiada e Tratada com Carcinina



EHR + Carcinina
1h30 depois da irradiação

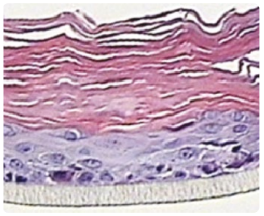


EHR + Carcinina
6h depois da irradiação

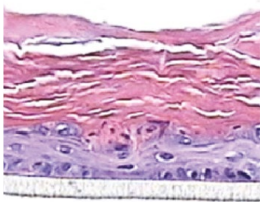
Avaliação imuno-histoquímica das alterações do DNA (dímeros de pirimidina) em epiderme humana reconstituída (HRE) irradiada pela UVB (300 mJ/cm^2) e, em seguida, evidências da genoproteção exercida pelo **Glycoxil®** aplicado na HRE antes da irradiação. Fonte: Exsymol

8.3.2 Estudo Histológico: Monitoramento da Formação de Células Apoptóticas

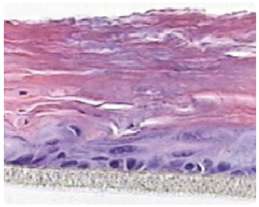
A formação de células apoptóticas no interior da camada epidérmica basal, denominadas "sunburn cells" (SBCs) é outra evidência de danos provocados pela radiação solar no genoma dos queratinócitos. Na figura abaixo, podemos observar que a HRE tratada com Glycoxil® mostrou um número limitado de SBCs.



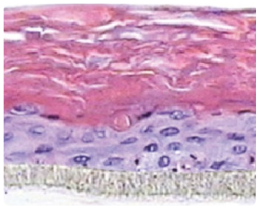
HRE não tratada,
6 horas após irradiação.



HRE tratada com **Glycoxil®**,
6 horas após irradiação.



HRE não tratada,
24 horas após irradiação.

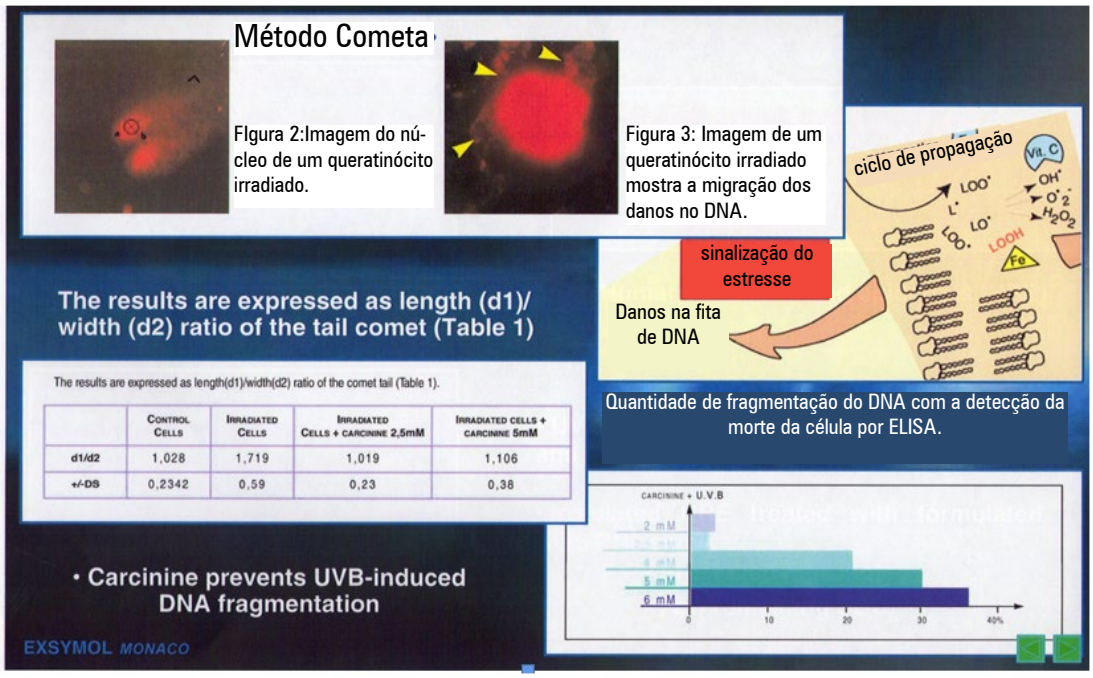


HRE tratada com **Glycoxil®**,
24 horas após irradiação.

Estudo histológico da HRE irradiada pela UVB (300mJ/cm^2) tratada ou tratada pelo **Glycoxil®**. Exsymol

8.3.3 Estudo *In Vitro*

Um experimento *in vitro* foi conduzido por pesquisadores da Exsymol que tiveram com objetivo avaliar o papel do Glycoxil® na proteção do DNA frente às agressões provocadas pela radiação ultravioleta do tipo B (UVB).



Glycoxil® protege contra o dano oxidativo ao DNA prevenindo a fragmentação do mesmo frente à radiação UVB ("Método Cometa" e morte celular, por ELISA). Fonte: Exsymol

Mecanismo de Ação

Glycoxil® protege a célula contra espécies reativas de oxigênio extremamente deletérias, como é o caso do radical hidroxila, além de suprimir o oxigênio singleto.

Glycoxil® inibe a ativação das hidroperoxidases lipídicas prevenindo e reduzindo o acúmulo de produtos oxidados a partir da peroxidação lipídica (LPO) nas membranas biológicas. Dessa maneira, Glycoxil® reduz a concentração de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, marcador de peroxidação lipídica).

Glycoxil® é um antioxidante fisiológico por ligar-se aos metais de transição e aos hidroperóxidos.

Além das atividades antiglicante e desglicante Glycoxil® apresenta atividade antiperoxidação lipídica, além de atuar como um varredor de radicais livres:

• Varredor de radicais livres (radical hidroxila (OH.) e ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$).
Biochem. J., vol. 304, (1994), PP. 509-516.

• Inibidor da peroxidação lipídica.
Biochem. J., vol. 304, (1994), PP. 509-516.

• Efeito peroxidase-like (LOOH).
Letters in Peptide Science, vol. 5, nº 2/3 (1998), PP. 163-169.

• Efeito anti-tóxico para aldeídos (MDA e 4-HNE).
Int. J. Cosmetic Science, vol. 22, (2000), pp. 361-370.

• Quelante de íons metálicos (Fe^{2+}).
Chimica Oggi, vol. 17, nº 1/2 (1999), PP. 44-48.

• Sequestrador de ROS ($^1O_2$).
Bioquemistry (Moscow), vol. 63, nº 5 (1998), pp. 523-528.

Benefícios do Glycoxil®:

- Combate a formação de AGEs;
- Reduz a concentração de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, marcador de peroxidação lipídica) e é um antioxidante fisiológico por ligar-se aos metais de transição e aos hidroperóxidos;
- Inibe duas das mais deletérias ROS (espécies reativas de oxigênio): o radical hidroxila e o oxigênio singleto;
- Protege o DNA por inibir o dano oxidativo;
- Reverte o *déficit* energético celular revitalizando e melhorando as divisões celulares;
- Reverte o envelhecimento sistêmico;
- Essencial para manter a integridade do tecido muscular e nervoso;
- Reduz o *déficit* cognitivo;
- Previne e reverte as complicações do diabetes (devido à presença de AGEs);
- Melhora o processo de cicatrização: [2][33][10][13][1]

10 Avaliação Oral da Toxidade do Glycoxil® em Ratos

10.1 Introdução

A Empresa monegasca Exsymol investigou a toxicidade da substância de ensaio *Carcinine Dihydrochloride* em ratos após uma administração oral repetida durante 28 dias consecutivos.

Este estudo foi realizado em observância à Orientação Regulamentar (OCDE Guideline N° 407 adaptada em 27 de julho de 1995) e às boas práticas e princípios laboratoriais.

10.2 Os Testes

O primeiro teste-estudo a realização de uma administração diária repetida de 3 doses da substância carcinina e do veículo, por via oral a vários grupos de ratos da espécie Sprague Dowley (40 machos e 40 fêmeas) durante um período de 28 dias.

Critérios Avaliados:

- Durante este período, os animais foram examinados diariamente, a fim de registrar qualquer sinal de toxicidade e mortalidade. Ganho de peso e o consumo de alimentos foram determinados ao longo deste período;
- Os exames oftalmológicos foram realizados antes do início do tratamento e no final do estudo;
- Análise de sangue (hematologia, química clínica, coagulação...) e urinária foram feitos no final do estudo.
- No final do período de teste, os animais sobreviventes foram autopsiados. Um exame macroscópico e microscópico foi conduzido em todos os órgãos.

10.3.2 Peso Corpóreo

Em comparação aos grupos-controle, a administração da substância de ensaio *Carcinine Dihydrochloride* causa uma significativa redução (aproximadamente 14%) na perda de peso dos machos tratados com a administração da dose de 4000mg/Kg. No grupo de ratos fêmeas não foram observados os mesmos relatos.
Nenhuma modificação foi observado nos grupos tratados com as dosagens de 100 a 2000mg/Kg.

10.3.3 Consumo de Alimentos

A análise estatística do consumo alimentar indica uma diminuição dose-dependente do consumo. A primeira semana de tratamento para machos e fêmeas tratados com doses de 2000mg/Kg (-10%) e 4000mg/Kg (-60%).
Nenhuma modificação foi encontrado para os grupos tratados com 1000 a 2000mg/Kg.

10.3.3.1 Observação Clínica

O principal sintoma observado revelado durante este estudo foi caracterizada em doses mais elevadas de 4000mg/Kg: a presença de inflamações no abdômen e fezes moles que parecia ser mais forte para os machos do que para fêmeas. Esses sintomas parecem ser menos importantes após uma semana de tratamento.
Nenhum sinal de toxicidade foi gravada para a dosagem de 1000 a 2000mg/Kg aos grupos tratados.

10.3.4 Exames Oftalmológicos

Nenhuma modificação das estruturas dos olhos em relação ao tratamento foi observada após o tratamento.

10.3.5 Análises Hematológicas

A análise estatística dos parâmetros de coagulação indicavam uma ligeira diminuição do tempo cephaline ativado e um ligeiro aumento do tempo de protrombina para os machos e fêmeas tratados com doses de 4000mg/Kg. As outras alterações dos parâmetros hematológicos foram significativos um aumento do número de leucócitos para machos tratados com as doses mais elevadas de 4000mg/Kg.
Este aumento foi relacionado ao tratamento com a solução-teste de carcinina.
Algumas outras estatísticas foram observadas aumentos significativos: para a formula leucocitária.
Machos tratados com as doses de 4000mg/Kg, ocorreu um aumento significativo no número de neutrófilos, linfócitos e monócitos. Para as fêmeas administrados as doses de 2000mg/Kg, ocorreu um aumento no número de linfócitos e monócitos. Essas diferenças foram consideradas em relação ao tratamento.
Nenhuma modificação significativa foi observada nos parâmetros hematológicos no grupo tratado com as doses de 1000mg/Kg.

10.3.5.1 Química Clínica

Ratos Fêmeas
Foi relatado um aumento significativo nos níveis de triglicérides (+153%) na administração das dosagens de 4000mg/Kg. Ocorreu uma multiplicação do nível de AST (43%) e da ALP (56%). Com esta mesma dose verificou-se um aumento do nível de ALT nas doses de 2000mg/Kg (+39%) e 4000mg/Kg (+19,5%). Estas alterações estão relacionadas ao tratamento com a substância *Carcinine Dihydrochloride*.

Ratos Machos
A análise estatística revelou um aumento significativo no nível de ALT para animais tratados com doses de 2000mg/Kg (86%) e 4000mg/Kg (+90%). Outras modificações estatísticas foram relatadas, como o aumento do nível de glicose nas doses de 4000mg/Kg (+29%), uma diminuição do nível de proteínas totais (-17%) e do nível de albumina (-16%). Estas alterações se dão mediante ao uso da substância de ensaio.

10.3.6 Peso dos Orgãos

- Coração (-26%) do peso absoluto para animais tratados com doses de 4000mg/Kg;
- Baço (-18%) com doses de 2000mg/Kg e (-37%) com doses de 4000mg/Kg;
- Timus (-54%) para animais tratados com dose de 4000mg/Kg.

O tratamento com *Carcinine Dihydrochloride* resulta em uma diminuição significativa do peso de orgãos como o coração, baço e timus. Algumas outras diferenças significativas, que não são atribuídas ao tratamento foram observadas. Isto envolveu os pesos relativos dos rins direito e esquerdo, o testículo renal esquerdo e direito com administração de doses a mais elevadas de 4000mg/Kg.

Resultados que não estavam atribuídos ao tratamento foram observados com os pesos relativos dos rins direito e esquerdo, o testículo renal esquerdo e direito, administrados com doses de 4000mg/Kg.

Ratos Fêmeas

A análise estatística indicou um aumento significativo para o peso absoluto e relativo:

- Fígado com administração de doses de 2000mg/Kg (+16%) e doses de 4000mg/Kg (+18%);
- Rins nas doses de 2000mg/Kg (+13%) e 4000mg/Kg (+16%);
- Glândulas renais nas doses de 4000mg/Kg;
- Fígado (+16%) com administração de doses de 2000mg/Kg.

Estes aumentos significativos dos pesos dos órgãos podem ser atribuídos ao tratamento com a substância teste. Acredita-se que possa ser uma resposta fisiológica adaptável dos órgãos ao nível de dose elevado de tratamento.

Em comparação com o grupo controle, notou-se uma diminuição significativa (-27%) para o absoluto e o relativo peso do timo para os demais tratados com as doses de 4000mg/Kg. Esta diferença significativa pode igualmente ser atribuída ao tratamento com a substância teste.

Foi observado um aumento significativo (+21%) do peso adequado do ovário das fêmeas tratadas com doses de 2000mg/Kg, mas não foi considerada esta relação com o tratamento. Esta diferença significativa não era dose-dependente da dose.

Nenhuma modificação significativa do peso do órgão foi observada para os grupos do macho e da fêmea tratados com doses de 1000mg/Kg.

10.3.7 Histologia

Todas as modificações microscópicas observadas ao termo são aquelas registradas geralmente como mudanças espontâneas para o rato. Estas não foram consideradas de nenhuma importância toxicológica.

Em circunstâncias experimentais, nenhuma lesão histológica relevante foi relacionada ao tratamento de *Carcinine Dihydrochloride* administrado com doses de 4000mg/Kg no período de um mês.

11 Mutagenicidade

Segundo o teste de AMES, Glycoxil® não apresenta mutagenicidade.

12 Conclusão

Nas condições deste estudo a administração oral diária do *Carcinine Dihydrochloride* durante dias consecutivos em ratos Sprague Dawley, macho e fêmea, com doses de 1000mg/Kg não mostrou qualquer sinal evidente de toxicidade. Esta dose representa cerca de 1000 vezes a dose estimada proposta em humanos.

Para as doses de 2000mg/Kg algumas alterações foram observadas, como uma redução no consumo de alimento para macho e fêmea, em um aumento do nível da aminotransferase da alanina para machos e fêmeas, e em um aumento do peso do fígado para fêmeas e do peso do baço para os machos.

Na administração com doses de 2000mg/Kg, foram observados alterações na redução de consumo de alimento em ratos machos e fêmeas. Ocorreram aumento de peso do fígado das fêmeas e do baço dos ratos machos comparados ao grupo controle com administração de doses de 4000mg/Kg foram observados:

- Uma redução no ganho de peso para o sexo masculino e uma redução do consumo de alimentos para os machos e as fêmeas;
- Uma modificação da função digestiva caracterizada por uma inflamação no abdômen e presença de fezes moles (este efeito foi observado mais forte nos machos do que em fêmeas);
- Uma modificação dos parâmetros de coagulação para machos e fêmeas (uma ligeira diminuição do tempo de tromboplastina parcial ativado e um ligeiro aumento do tempo de protrombinal e uma diminuição da quantidade de plaquetas), aumento no número de leucócitos apenas para o sexo masculino;

- Aumento da diurese para o macho e a fêmea;
- Aumento do tamanho do ceco para alguns machos e fêmeas;
- Algumas alterações de peso de órgãos (diminuição do peso do coração, baço e timo dos machos, aumento do peso do fígado, rins, glândulas supra-renais e uma diminuição do peso do timo para fêmeas), sem alterações fisiológicas.

Mediante os resultados observados nos testes com *Carcinine Dihydrochloride* foi avaliado como seguro e sem efeitos adversos as dosagens de 1000mg/Kg.

Nas doses de 2000mg/Kg foi considerado como efeito adverso leve. A tolerância máxima com efeitos adversos permitidos como seguro é para as dosagens de 4000mg/Kg.

13 Especificações Farmacotécnicas

DENOMINAÇÃO QUÍMICA	*Decarboxy Carnosine HCL.*
APARÊNCIA	Pó branco.
FORMULAÇÃO	Hidrossolúvel. Incorporar abaixo de T: 50°C
DOSAGEM	Associado a outros ativos: 50 a 300 mg/dia. Isolado: 300 a 600 mg/dia.
INDICAÇÃO	Sem restrição de horário.
ARMAZENAMENTO	Bem fechado ao abrigo de luz e umidade.

Referências Bibliográficas

[1] Babizhayev MA, Kasus-Jacobi A. **State of the art clinical efficacy and safety evaluation of N-acetylcarnosine dipeptide ophthalmic prodrug. Principles for the delivery, self-bioactivation, molecular targets and interaction with a highly evolved histidyl-hydrazide structure in the treatment and therapeutic management of a group of sight-threatening eye diseases**. Curr Clin Pharmacol. 2009 Jan;4(1):4-37.

[2] Babizhayev MA, Lozovskaya EL, Makareyeva EN, Lul'kin YA, Sapezhinskii II. **Photoprotector and antioxidant properties of histamine-containing peptidomimetics in the photooxidation of glycyltryptophan**. Biochemistry (Mosc). 1998 May;63(5):523-8.

[3] Barbosa, J. H; Oliveira, S. L; Seara, L. T. **Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes**. Rev. Nutr., Campinas, 22(1):113-124, jan./fev., 2009.

[4] Beckman, K. B., and Ames, B. N., T**he Free Radical Theory of Aging Matures**, **Physiological Reviews** 78 (2): 547-581, 1998).

[5] Boldyrev, A. A.; Stvolinsky, S. L.; Fedorova, T. N.; Suslina Z. A. **Rejuvenation Research**. -Not available-, ahead of print. doi:10.1089/rej.2009.0923.

[6] Boldyrev, A.A., and S.E. Severin. **The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance**. Adv. Enzyme. Regul. 30: 175-194, 1990.

[7] Blake, M. J.; Udelsman, R., Feulner, G. J., Norton, D. D., and Holbrook, N. J. Stress-Induceced HSP70 Expression in Adrenal Cortex **A glucocorticoide Sentive, AGE-Dependent Response**, Proceedings of the National Academy of Siences 87: 846-850, 1991.

[8] Cárdenas-León M, Díaz-Díaz E, Argüelles-Medina R, Sánchez-Canales P, Díaz-Sánchez V, Larrea F. **[Glycation and protein crosslinking in the diabetes and ageing pathogenesis]** Rev Invest Clin. 2009 Nov-Dec;61(6):505-20.

[9] Carletto C, Nicolaÿ JF, Courbebaisse Y. **Oxidative stress and cutaneous ageing: the 'toxic second messengers' concept and an interesting family of products, 'pseudodipeptides'**. Int J Cosmet Sci. 2000 Oct;22(5):361-70.

[10] Chen Z, Sakurai E, Hu W, Jin C, Kiso Y, Kato M, Watanabe T, Wei E, Yanai K. **Pharmacological effects of carcinine on histaminergic neurons in the brain. Br J Pharmacol.** 2004 Nov;143(5):573-80. Epub 2004 Oct 4.

[11] Derave W; Ozdemir M. S; Harris R. C; Pottier A; Reyngoudt H; Koppo K; Wise J. A; Achten E. **J Appl Physiol**; 103(5): 1736-43, 2007 Nov.

[12] Elizabete Wenzel de Menezes y Franco Lajolo. **INDICE GLICÊMICO: CRITÉRIO DE SELEÇÃO DE ALIMENTOS**. Seminario "Índice glicémico en salud y alimentación humana". INCIENSA: Costa Rica, 12 de setiembre 2002.

[13] Exsymol, Mônaco.

[14] Gariballa, S. E.; Sinclair, A. L. **Carnosise: Physiological properties and therapeutic potential**. Age and Aging, 2000,29:207-21.

[15] Ge QM, Dong Y, Su Q. **Effects of glucose and advanced glycation end products on oxidative stress in MIN6 cells**. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2010 Feb 9;56 Suppl:OL1231-8.

[16] Goldberg T, Cai W, Peppa M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, et al.,. **Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods**. J Am Diet Assoc. 2004; 104(8):1287-91.

[17] Guiotto A, Ruzza P, Babizhayev MA, Calderan A. **Malondialdehyde scavenging and aldose-derived Schiff bases' transglycation properties of synthetic histidyl-hydrazide carnosine analogs**. Bioorg Med Chem. 2007 Sep 15;15(18):6158-63. Epub 2007 Jun. 20.

[18] Gulewitsch, W. and Amiradzibi, S. (1990) **Deutsch. Chem**. Ges. 33, 1902-1903.

[19] Hartog JW, Voors AA, Bakker SJ, Smit AJ, van Veldhuisen DJ. **Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications**. Eur J Heart Fail. 2007 Dec;9(12):1146-55.

[20] Hunt JV, Bottoms MA, Mitchinson MJ. **Oxidative alterations in the experimental glycation model of diabetes mellitus are due to protein-glucose adduct oxidation. Some fundamental differences in proposed mechanisms of glucose oxidation and oxidant production.** Biochem J. 1993 Apr 15;291 (Pt 2):529-35.

[21] Jackson, M. C.; Lenney, J. F. **The distribution of carnosine and related dipeptides in rat and human tissues**, Inflamm Res 1996,45 (3): 132-5.

[22] Leslie RD, Cohen RM. **Biologic Variability in Plasma Glucose, Hemoglobin A1c, and Advanced Glycation End Products Associated with Diabetes Complications**. J Diabetes Sci Technol. 2009 Jul 1;3(4):635-643.

[23] Lohwasser C, Neureiter D, Weigle B, Kirchner T, Schuppan D. **The receptor for advanced glycation end products is highly expressed in the skin and upregulated by advanced glycation end products and tumor necrosis factor-alpha**. J Invest Dermatol. 2006 Feb;126(2):291-9.

[24] Manna P, Das J, Ghosh J, Sil PC. **Contribution of type 1 diabetes to rat liver dysfunction and cellular damage via activation of NOS, PARP, IkappaBalpha/ NF-kappaB, MAPKs and mitochondria dependent pathways: Prophylactic role of arjunolic acid**. Free Radic Biol Med. 2010 Feb 24. [Epub ahead of print].

[25] Mark A. Babizhayev, *§ Marie-Christine Seguin, Jean Gueynej, Rima P. Evstigneeva, ** Elena A. Ageyevat and Galina A. Zheltukhinai. **L-Carnosine (-alanyl-L-histidine) and carcinine f-alanylhistamine) act as natural antioxidants with hydroxyl-radical-scavenging and lipid-peroxidase activities**. *Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Russia, Exsymol S.A.M., Monaco, Principaute de Monaco, and ** M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Russia. Biochem. J. (1994) 304, 509-516.

[26] Meade SJ, Miller AG, Gerrard JA. **The role of dicarbonyl compounds in non-enzimatic crosslinking: a structure-activity study**. Bioorg Med Chem. 2003; 11(6):853-62.

[27] Pegova A, Abe H, Boldyrev A. **Hydrolysis of carnosine and related compounds by mammalian carnosinases**. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2000 Dec;127(4):443-6.

[28] Peppa M, Uribarri J, Vlassara H. **Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works**. Clin Diabetes. 2003; 21(4):186-7.

[29] Quinn PJ, Bildyrev AA, Formazuyk VE. **Carnosine: its properties, function and potential therapeutic applications**. Mol Aspects Med 1990; 13: 379-84.

[30] Ramasamy R, Vannucci SJ, Yan SS, Herold K, Yan SF, Schmidt AM. **Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation**. Glycobiology. 2005 Jul;15(7):16R-28R. Epub 2005 Mar 10.

[31] Sedifa, Mônaco.

[32] Soro-Paavonen A, Zhang WZ, Venardos K, Coughlan MT, Harris E, Tong DC, Brasacchio D, Paavonen K, Chin-Dusting J, Cooper ME, Kaye D, Thomas MC, Forbes JM. **Advanced glycation end-products induce vascular dysfunction via resistance to nitric oxide and suppression of endothelial nitric oxide synthase**. J Hypertens. 2010 Feb 24.

[33] Steinberg C, Notterman DA. **Hemodynamic effects of carcinine in the anesthetized, instrumented, open-chest rat.** Crit Care Med. 1996 Dec;24(12):2042-5.

[34] Szwergold BS. **Carnosine and anserine act as effective transglycating agents in decomposition of aldose-derived Schiff bases**. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Oct 14;336(1):36-41.

[35] Tanaka, R.A. **Avaliação do efeito radioprotetor da carnosina (β-alanil 1-histidina) na reparação tecidual em ratos**. Dissertação de Mestrado. Unicamp 2002.

[36] Zimmet P, Alberti KGMM, Shaw J. **Global and societal implications of the diabetes epidemic**. Nature. 2001; 414(13):782-7.

[37] Dozio E, Vianello E, Briganti S, Lamont J, shmitz G, Corsi Romanelli MM. Expression of the Receptor for Advanced Glycation End Products in Epicardial Fat: Link with Tissue Thickness and Local Insulin Resistance in Coronary Artery Disease. J diabete res. 2016;2016:2327341. Doi: 10.1155/2016/2321341.Epub 2015 dec 14

[38] Ottum MS, Mistry AM, advanced glycation end-products: modifiable environmental factors profoundly mediate insulin resitance. J Clin Biochem Nutr, 2015 Jul:57 (1): 1-12. Doi: 10.3164/jcbn.15-3. Epub 2015 Jul 1

AQIA
QUÍMICA INOVATIVA

BIOTEC
Inovação é o nosso melhor ativo

EXSYMOL
MONACO

BIOTEC DERMOCOSMÉTICOS LTDA.
Rua Comendador Eduardo Saccab, 215 - Sala 408
CEP 04601-070 - Brooklin Paulista - São Paulo - SP
Tel: 55 (11) 3047 2447 / Fax: 55 (11) 3047 2467

0800 770 6160
www.biotecdermo.com.br