

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**NOVA TIAZOLIDINONA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA**

MARIA JULIANA DANTAS DE PAULA

Recife- Brasil

2010

MARIA JULIANA DANTAS DE PAULA

**NOVA TIAZOLIDINONA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Farmacologia, Fisiologia e Química Medicinal.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta

CO-ORIENTADORA

Prof^a. Dr^a. Glória Isolina Boente Pinto Duarte

RECIFE

2010

Paula, Maria Juliana Dantas de
Nova Tiazolidinona: síntese, caracterização estrutural e avaliação da atividade antidiabética / Maria Juliana Dantas de Paula. – Recife: O Autor, 2010.

81 folhas: fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB.
Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Diabetes melitus 2. Glândulas endócrinas – Doenças 3. Farmacologia
médica I. Título.

616.462

CDD (22.ed.)

UFPE/ CCB – 2010- 095

**NOVA TIAZOLIDINONA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA**

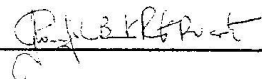
Maria Juliana Dantas de Paula

ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Glória Isolina Boente Pinto Duarte

BANCA EXAMINADORA:



**Prof. Dr^ª. Glória Isolina Boente Pinto Duarte (Departamento de Fisiologia e
Farmacologia – UFPE)**



**Prof^ª. Dr^ª. Paloma Lys de Medeiros (Departamento de Histologia e Embriologia
– UFPE)**

Dedicatória

A minha mãe, Eulália, meu maior exemplo de força e perseverança. Com quem eu aprendi a lutar e a quem eu prometi trabalhar em busca de conhecimentos que melhorem a qualidade de vida dos portadores de Diabetes, como ela.

A meu amado pai, Luiz, que com sua sábia paciência e amor sempre me incentivou a rezar e confiar nos planos de Deus.

A minhas irmãs Gracinha e Andreza, meu cunhado Cleyton, meus primos Alessandra e Júnior, que sempre vibraram comigo e nas horas difíceis me deram força, inclusive nas idas ao laboratório nos finais de semana e feriados.

Aos amigos Márcia, Iane, Rodrigo e Tati, que sempre me acompanharam nesta jornada, tanto me consolando nos momentos difíceis, como me acompanhando em alguns finais de semana no trabalho. Com eles vivi momentos maravilhosos de minha vida.

Agradecimentos

A Deus, por toda força, perseverança e sabedoria que me deu em todos os momentos que supliquei.

Ao Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta por sua orientação e imensurável ajuda no desenvolvimento deste projeto.

A Prof^a. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima, Nena, por toda atenção e orientação desde minha iniciação científica, até os dias de hoje. Ela, que nos momentos mais difíceis, falou, tenha calma. Meu eterno carinho.

A Prof^a. Dra. Suely Lins Galdino, uma excelente orientadora, em quem sempre me espelhei por sua garra e vontade de fazer ciência. Agradeço por toda orientação e por sempre ouvir meus pedidos de socorro. Obrigada por sempre ter acreditado em mim, no meu potencial.

A Prof^a. Dra. Glória Isolina Pinto Duarte, pela oportunidade de desenvolver toda parte biológica deste trabalho em seu laboratório e por todo conhecimento e orientação dispensados.

Aos professores do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular Fabino Elias, Saad Lahlou, Cristina Oliveira pelo incentivo e exemplos de pesquisadores.

Aos professores Pedro Rollin e Teresinha Gonçalves pelo apoio dado em algumas etapas do experimento.

A todos os amigos e companheiros do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, que se fizeram presentes e contribuíram com os momentos alegres e tensos que tanto incentivaram a minha permanência no grupo e o apoio ao desenvolvimento desde a minha iniciação científica até os dias de hoje.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular Fernanda Alves, Manuela, Marcelo, L. Raphael, Raiza, Diego, Juliana Rocha, Olga, Daniela, Claudio, Thaise, Fernanda Alves pelo companheirismo e ajuda durante os experimentos.

Aos colegas da Pós graduação Thiago Lins, Marina Pitta, Fabiana Gomes, Anekécia Lauro, Tiago Bento, Juliana Kelly, Janaína Couto, Diego, Odair Alves, Luciana Veloso, André Aires, Rodrigo Siqueira, Leillyane pela amizade, companheirismo e ajuda nesta caminhada.

Aos funcionários do departamento de Fisiologia e Farmacologia em especial, ao técnico de laboratório Sr. José Antônio Albuquerque, por todo apoio, amizade e excelente trabalho técnico.

À veterinária Claudia Oliveira pelo apoio e fornecimento dos animais.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	Xi
LISTA DE ABREVIATURAS	Xiii
LISTA DE TABELAS	Xv
RESUMO	Xvi
ABSTRACT	Xvii
I – INTRODUÇÃO	18
1.0. Generalidades	18
1.1. Classificação do diabetes	19
1.2. Insulino resistência	23
1.3. Insulinoterapia	26
2.0. Tratamento do diabetes Mellitus tipo 2	29
2.1. PPAR γ : alvo terapêutico no tratamento do diabetes mellitus	31
3.0. Diabetes Experimental	32
4.0. Obtenção de novos fármacos	34
5.0. JUSTIFICATIVA	36
II – OBJETIVOS	37
III - MATERIAL E MÉTODOS	38
1.0. Parte química	38
1.1. Síntese do derivado 5-(1 <i>H</i> -INDOL-3-IL-METILENO)-3-(4-METIL-BENZIL)- TIAZOLIDINA-2,4-DIONA (LPSF/GQ-11)	38
1.1.1. Obtenção da tiazolidina-2,4-diona	39
1.1.2. Obtenção da 3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-1)	40

1.1.3. Obtenção do 2-ciano-3-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-acrilato de etila (LPSF/IP-19)	41
1.1.4. Obtenção da 5-(1 <i>H</i> -indol-3-ilmetileno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina 2,4-diona (LPSF/GQ-11)	42
2.0. Parte Biológica	43
2.1. Animais	43
2.2. Protocolo experimental	43
2.3. Consumo alimentar, hídrico e ganho de peso corporal	45
2.4. Determinação dos parâmetros bioquímicos	45
2.5. Efeito do diabetes sobre os parâmetros anatômicos do coração em ratos tratados com tiazolidinadionas em monoterapia ou associada a insulina	46
3.0. Análise Estatística	46
IV – RESULTADOS	47
1.0. Análise Espectroscópica	47
1.1. Infravermelho	47
1.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio	51
2.0. Efeito do tratamento com estreptozotocina	55
3.0. Efeito do tratamento com tiazolidinadionas em monoterapia ou associada a insulina sobre a ingestão alimentar e hídrica de ratos diabéticos	57
4.0. Efeito do tratamento com tiazolidinadionas em monoterapia ou associada a insulina sobre os níveis plasmáticos de glicose, triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL	60
5.0. Efeito do diabetes sobre os parâmetros anatômicos do coração em ratos tratados com tiazolidinadionas em monoterapia ou associada à insulina.	62
6.0. Efeito do diabetes sobre os parâmetros anatômicos do coração dos ratos diabéticos tratados com tiazolidinadionas em monoterapia ou associada à	64

insulina.

V – DISCUSSÃO	66
VI – CONCLUSÕES	70
VII – PERSPECTIVAS	71
VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática dos fenômenos de glicotoxicidade e de lipotoxicidade	22
Figura 2 - Representação esquemática da cascata de reações anormais resultantes da acumulação de lipídeos nas células β . Fenômeno de Lipotoxicidade conduzindo a destruição celular (Apoptose)	22
Figura 3 – Mecanismo de resistência à insulina	25
Figura 4 - Secreção de insulina e sinalização da célula β pancreática	27
Figura 5 - Compostos bioisósteros tiazolidina-2,4-diona (a) e hidantoína (b)	30
Figura 6 - Tiazolidinas Hipoglicemiantes	31
Figura 7- Rota da síntese do derivado da série 5-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-Tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-11)	38
Figura 8 - Espectro de infravermelho do 2-ciano-3-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)-acrilato de etila (LPSF/IP-19)	49
Figura 9 - Espectro de infravermelho do 5-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-11)	50
Figura 10 – Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do 2-ciano-3-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-acrilato de etila (LPSF/IP-19)	53
Figura 11 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do 5-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-11)	54
Figura 12 - Consumo médio diário de ração (g), ao longo dos 14 dias de tratamento, dos animais dos grupos: controle normoglicêmico (CN), diabético não tratado (D), diabético tratado com LPSF/ GQ-11 (10 mg/Kg), diabético tratado com LPSF/ GQ-11 (10 mg/Kg) em associação com	58

insulina, diabético tratado com rosiglitazona (10mg/Kg), diabético tratado com insulina (I), diabético tratado com LPSF/ GQ-11 (20 mg/Kg). Os valores são expressos como média $\pm$ e.p.m; *** $p < 0.0001$. Teste t Student não pareado.

Figura 13 - Consumo médio diário de água (mL), ao longo dos 14 dias de 59 tratamento, dos animais dos grupos: controle normoglicêmico (CN), diabético não tratado (D), diabético tratado com LPSF/ GQ-11 (10 mg/Kg), diabético tratado com LPSF/ GQ-11 (10 mg/Kg) em associação com insulina, diabético tratado com rosiglitazona (10mg/Kg), diabético tratado com insulina (I), diabético tratado com LPSF/ GQ-11 (20 mg/Kg).

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh = acetilcolina

Acil-CoA = acil co-enzima A

ALX - Aloxana

AGL = Ácidos graxos livres

ATP = Adenosina trifosfato

DM1 = Diabetes tipo 1

DM 2 = Diabetes tipo 2

DG = Diabetes gestacional

g = gramas

GLUT-2 = Glutamina 2

GLUT-4 = Glutamina 4

HbA_{1c} = Hemoglobina glicada

HDL = Lipoproteína de alta densidade

HGP = Glicose hepática

IGF-IR - Receptor do fator de crescimento da insulina

IP-19 = 2-ciano-3-(1*H*-indol-3-il)-acrilato de etila

iNOs = Óxido nítrico síntase

LDL= Lipoprotéina de baixa densidade

LPSF= Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos

mg/dL = Miligrama por decilitro

MTP = Poro de permeabilidade de transição

NO = Óxido nítrico

PPAR_γ = Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama

PPARs = Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma

GQ- 1= 3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona

GQ-11= 5-(1*H*-INDOL-3-IL-METILENO)-3-(4-METIL-BENZIL)-TIAZOLIDINA-2,4-DIONA

R_f = Razão de frente

RI = Resistência à insulina

r.p.m = rotações por minuto

s.c. = via subcutânea

STZ - Estreptozotocina

SUS = Sistema Único de Saúde

TG = Triglicerídeos

U= Unidades de insulina

TNF α = Fator- alfa de necrose tumoral

TZDs- Tiazolidinadionas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequências de absorção no infravermelho do 2-ciano-3-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-acrilato de etila (LPSF/IP-19) (cm ⁻¹)	47
Tabela 2 – Frequências de absorção no infravermelho do 5-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-11) (cm ⁻¹)	48
Tabela 3 - Deslocamento químico (δ) do 2-ciano-3-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-acrilato de etila (LPSF/IP-19)	51
Tabela 4 - Deslocamento químico (δ) dos derivado 5-(1 <i>H</i> -indol-3-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-11)	52
Tabela 5 - Níveis plasmáticos de glicose e triglicerídeos dos grupos controle normoglicêmico, diabético (tratado com veículo) e diabéticos antes e após o tratamento com LPSF/GQ 11 (10 mg e 20 mg/Kg), insulina, LPSF/GQ11 (10 mg/Kg) associada à insulina (LPSF/ GQ- 11 + I) e rosiglitazona (10 mg/Kg).	56
Tabela 6 - Níveis plasmáticos de colesterol total e colestrerol HDL basais dos animais controle e diabéticos e após o tratamento do diabetes com rosiglitazona (10 mg/Kg) LPSF/ GQ- 11 (10 mg e 20 mg/Kg), com LPSF GQ11 (10 mg/Kg) associada à insulina (LPSF/ GQ- 11 + I) e apenas com insulina.	61
Tabela 7- Porcentagem da variação do peso semanal de ratos do controle e diabéticos tratados com veículo, apenas com tiazolidinadiona (LPSF/ GQ- 11, 10 mg e 20 mg/Kg), com tiazolidinadiona (10 mg/Kg) associada à insulina (LPSF/ GQ- 11 + I), apenas com rosiglitazona (10 mg/Kg) e apenas com insulina, respectivamente.	63
Tabela 8 - Comparação entre os parâmetros anatômicos dos animais controle e diabéticos diabéticos tratados com veículo, apenas com tiazolidinadiona (LPSF/ GQ- 11, 10 mg e 20 mg/Kg), com tiazolidinadiona (10 mg/Kg) associada à insulina (LPSF/ GQ- 11 + I), apenas com rosiglitazona (10 mg/Kg) e apenas com insulina, respectivamente.	65

Resumo

O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não secreta insulina suficiente (DM tipo 1) ou quando o organismo não utiliza adequadamente a insulina que produz (DM tipo 2). Nos últimos vinte anos, avanços importantes foram efetuados no controle da hiperglicemia, das dislipidemias e no tratamento da hipertensão arterial. Apesar disso, as doenças cardiovasculares continuam sendo a principal causa da morbidade e mortalidade em pacientes com DM. No DM tipo 2, a terapêutica é baseada em medicamentos que diminuem a resistência à insulina (metformina e tiazolidinadionas TZDs) e naqueles que estimulam a secreção de insulina (sulfoniluréias e glinidas). Um dos mecanismos de ação das TZDs se dá por meio da ativação de receptores nucleares denominados PPAR ("Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama"). Os ativadores da isoforma PPAR γ diminuem os fatores produzidos pelo tecido adiposo, como o TNF α . No presente estudo foi sintetizado uma nova tiazolidinadiona, a 5-(3-indol)-benzilideno-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-11) para avaliação dos efeitos hipoglicemiante e hipolipidêmico. Para tanto, utilizou-se ratos *Wistar* com diabetes induzida por estreptozotocina, em baixa dose (42 mg/Kg). O composto LPSF/GQ-11 foi sintetizado a partir de uma reação de N-alkilação da tiazolidina com haletos de alquila, seguida de Adição de Michael com intermediário de Cope. O composto foi estruturalmente caracterizado por métodos espectrofotométricos, tais como infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênios e espectrometria de massas. O tratamento dos animais com o LPSF/GQ-11 +Insulina, durante 14 dias, revelou um melhor resultado hipoglicêmico. O grupo tratado com LPSF/GQ-11 10mg/Kg, mostrou um melhor resultado (79%) para o controle da glicose plasmática, quando comparado com o fármaco padrão, rosiglitazona. Não foi observado perda de peso corporal nos animais tratados com o LPSF/GQ-11 na dose 10mg/Kg/dia, com ou sem associação com insulina, quando comparados com o grupo controle normoglicêmico. O tratamento com o derivado LPSF/GQ-11 apresentou uma melhora no perfil lipídico, o que pode ser sugestivo de melhoria no risco cardiovascular.

Palavras chave: diabetes mellitus, Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama, tiazolidinadionas.

Paula, M.J.D.

Abstract

The diabetes mellitus is a chronic disease that occurs when the pancreas can't secrete enough insulin (DM type 1) or when the organism can't utilize the produced insulin properly. For the last twenty years, important advances were made in the control of hyperglycemia, dyslipidemias and treatment of hypertension. Nonetheless, cardiovascular diseases remain the leading cause of morbidity and mortality in patients that have DM. In type 2 diabetes, therapy is based on medications that reduce insulin resistance (metformin and TZDs thiazolidinadionas) and on those that stimulate insulin secretion (sulfonylureas and glinides). One of the mechanisms of action of TZDs is through the activation of nuclear receptors called PPAR (peroxisome proliferator-activator receptor). The PPAR γ isoform activators decrease the factors produced by adipose tissue, such as TNF- α . In the present study, it was synthesized a new thiazolidinadione, 5 - (3-indole)-benzylidene-3-(4-methylbenzyl)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF-GQ-11) to assess the hypoglycemic and hypolipidemic effects. In order to achieve this goal, rats with streptozotocin-induced diabetes in low dose (42 mg / kg).were used The compound LPSF/GQ-11 was synthesized from a reaction of N-alkylation of thiazolidine with alkyl halides, followed by Michael addition with Cope intermediates. The compound was structurally characterized by spectrophotometric methods, such as infrared, nuclear magnetic resonance of hydrogen and mass spectrometry. The treatment of animals with LPSF/GQ-11 + I for 14 days showed a better hypoglycemic result. The group treated with LPSF/GQ-11 10mg/Kg, showed a better outcome (79%) for the control of plasma glucose, when compared with the standard drug, rosiglitazone. There was no weight loss in animals treated with LPSF/GQ-11 dose 10mg/kg/day, with or without combination with insulin when compared with the control group. The treatment with LPSF/GQ-11 showed a better activity hypolipidemic which may be suggestive of improvement in cardiovascular risk.

keywords: diabetes mellitus, Peroxisome proliferator-activated receptor; Thiazolidinedione.

I - INTRODUÇÃO

1.0. Generalidades

Diabetes mellitus (DM) é uma doença sistêmica caracterizada pela regulação metabólica anormal de glicose e lipídeos, resultando em hiperglicemia causada pelo declínio acelerado na função de células beta (MAASSEN et al., 2007) e hiperlipidemia (CLAUDINO et al., 2007).

O DM configura-se hoje como uma epidemia mundial, traduzindo-se em grande desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo. O envelhecimento da população, a urbanização crescente e a adoção de estilos de vida pouco saudável como sedentarismo, dieta inadequada e obesidade são os grandes responsáveis pelo aumento da incidência e prevalência do diabetes em todo o mundo (M. S, 2006). A Organização Mundial de Saúde (2007) relata que 5% das mortes no mundo são causadas por diabetes, 80% dos portadores de DM vivem em países de baixo e média renda, encontrando-se na faixa etária que varia entre 45 a 64 anos. Considerando a análise do impacto econômico causada pelo DM no Brasil, em 2006 o Ministério da Saúde repassou R\$ 370 milhões para a aquisição de medicamentos básicos, para a incorporação da insulina Glargina, o Sistema Único de Saúde (SUS) teve um gasto mensal de R\$ 126.000.000,00 considerando um público-alvo de 70% de todos os pacientes diabéticos tipo 1 (504.000 pessoas), e o gasto de R\$ 250,00 por frasco, segundo média do Banco de Preços em Saúde.

No Brasil, dados de um Estudo Multicêntrico sobre a Prevalência do Diabetes “Censo de Diabetes” realizado sob coordenação do Ministério da Saúde no período de 1986 a 1988, mostraram que o diabetes acomete cerca de 7,6% da população entre 30 e 69 anos de idade. Mais de 50% dos diagnosticados não sabiam ser portadores da doença, enquanto 24% dos reconhecidamente diabéticos não faziam qualquer tipo de tratamento (M. S, 2001).

Cerca de 18 milhões de pessoas morrem a cada ano de doenças cardiovasculares, nas quais diabetes e hipertensão são os principais fatores. Hoje, mais de 1,1 bilhões de adultos do mundo estão acima do peso, e 312

milhões destes são obesos. O aumento da prevalência do DM2 está intimamente conectado com o surgimento da obesidade. Cerca de 90% do DM2 é atribuída ao excesso de peso. Aproximadamente 197 milhões de pessoas têm intolerância à glicose, mais comumente por causa da obesidade e a associação com a síndrome metabólica. As estimativas apontam que em 2025 esse número aumente para 420 milhões (HOSSAIN et al., 2007).

1.1. Classificação do diabetes

O diabetes mellitus pode ser classificado, atualmente, em: i) Diabetes tipo 1 (DM 1); ii) -Diabetes tipo 2; iii) Outros tipos específicos; iv) Diabetes gestacional.

- Diabetes mellitus 1

O DM é uma desordem metabólica de múltipla etiologia caracterizada por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, como resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina ou de ambos (ALBERTI et al., 1998). Também conhecida como diabetes “juvenil”, esta desordem é caracterizada por uma deficiência na produção endógena de insulina, mediada por um processo auto-imune (tipo A), onde ocorre a destruição das células produtoras de insulina (células β -pancreáticas//), resultando em uma dependência de insulina exógena injetáveis ou por causa desconhecida (forma idiopática ou tipo B).

Na forma auto-imune que é a mais comum, ocorre um processo de insulite e a presença de auto-anticorpos (anti-descarboxilase do ácido glutâmico, anti-ilhotas e anti-insulina), enquanto a forma idiopática caracteriza-se pela ausência de insulite e de auto-anticorpos. Neste tipo de diabetes há ausência de insulina possibilitando um diagnóstico rápido quando comparado com a diabetes tipo 2 (GROSS et al., 2002). Portanto, no desenvolvimento do (DM1) estão envolvidos fatores genéticos, ambientais e infecções virais. Esta doença afeta, no geral, indivíduos mais jovens (SHIMADA et al., 2007), sendo a

adolescência um período de grandes mudanças fisiológicas e psicológicas. O controle glicêmico nesta fase da vida exige bastante esforço e raramente é alcançado. Esta dificuldade se dá por fatores como: mudanças hormonais da puberdade, problemas psicossociais, problemas de comportamento, a não-adesão ao regime de tratamento entre outros (KAKLEAS et al., 2009).

Em comparação com a população não diabética, em geral os pacientes DM1 têm um risco aumentado de desenvolver doenças auto-imunes órgão-específicas, como anemia perniciosa e atrofia gástrica, doenças que raramente acometem indivíduos não diabéticos (TZELLOSA et al., 2008).

Entre as complicações do DM1 tem-se a retinopatia diabética, neuropatia periférica e nefropatia o que reduz drasticamente a qualidade de vida dos seus portadores. A nefropatia é uma das principais complicações do diabetes aumentando o risco de mortalidade por doenças cardiovasculares.

A maior parte dos fatores de risco cardiovasculares tais como hipertensão, hiperglicemia e dislipidemia, são altamente prevalentes em pacientes com doença renal terminal (JUNGERS et al., 1997). Além disso, fatores não tradicionais como, estresse oxidativo, inflamação e hiperhomocisteinemia também podem contribuir para uma maior morbimortalidade.

- Diabetes tipo 2

O DM 2 é uma doença progressiva e multifatorial que caracteriza-se pelo declínio da função células β , causado por dois tipos de anormalidades fisiopatológicas: a resistência à insulina (RI) e disfunção na secreção da insulina. Isto ocorre por influência de fatores genéticos e ambientais como que contribuem para desordens no metabolismo de carboidratos e lipídios, glicotoxicidade e lipotoxicidade, respectivamente (GUILLAUSSAU et al., 1997; DE VRIESE et al., 2000). E geralmente é associada com o aumento da ingestão calórica e sedentarismo.

Fatores genéticos determinam a susceptibilidade para desenvolver esta doença, que muitas vezes, está acompanhada de outras co-morbidades tais como hipertensão e dislipidemia. Juntos, eles constituem a síndrome metabólica (MAASSEN et al., 2007). São aspectos fundamentais na patogênese do DM 2 a diminuição da capacidade da insulina desempenhar as suas funções fisiológicas normais, a RI e a incapacidade da células- β pancreáticas secretar insulina de forma adequada (PHIELIX et al., 2008). O DM 2 causa complicações crônicas a nível microvascular (retinopatias, nefropatias) e macrovascular (doenças coronárias, doenças vasculares periféricas), além de neuropatias, afetando nervos motores, sensoriais e autonômicos (SIMA; SOGIMOTO, 1999).

A glicotoxicidade (Figura 1) é causada por uma hiperglicemia crônica que exerce efeito deletério sobre a função de insulino-secreção das células β que pode ocorrer tanto pela redução da expressão de transportadores de glicose (GLUT-2) nas células β quanto pelo aumento do conteúdo de glicogênio nessas células.

A RI também pode ser acentuada pela redução da expressão do transportador de glicose GLUT-4, assim como pela redução da atividade de glicoquinases, enzimas chaves envolvidas no metabolismo da glicose (KAHN 2001; GIRARD ., 2005).

Os ácidos graxos livres (AGL) desempenham um papel importante no desenvolvimento do DM2. Em indivíduos obesos, o acúmulo de triglicerídeos (TG) nas ilhotas de Langerhans, somado ao aumento de AGL e TG no plasma leva a um estado de lipotoxicidade e à perda de secreção de insulina em resposta ao aumento da glicose (Figura 1) O acúmulo de TG nas células β pancreáticas resulta na produção de radicais citotóxicos, como ceramida e óxido nítrico (NO), cujos efeitos tóxicos desencadeiam a apoptose celular (Figura 2).

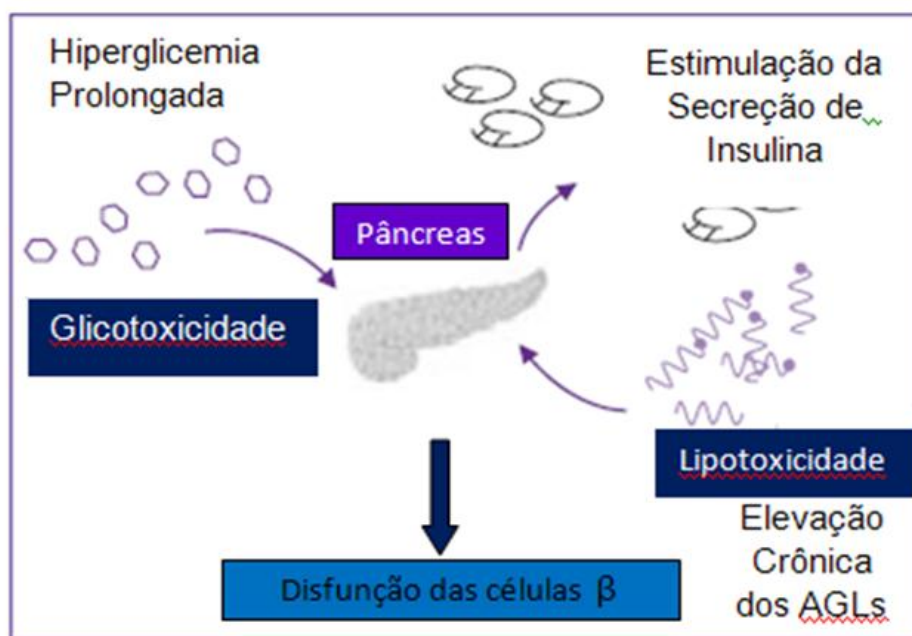


Figura 1: Representação esquemática dos fenômenos de glicotoxicidade e de lipotoxicidade conduzindo a falência progressiva da função das células β-pancreáticas. Adaptado de GIRARD, 2005.

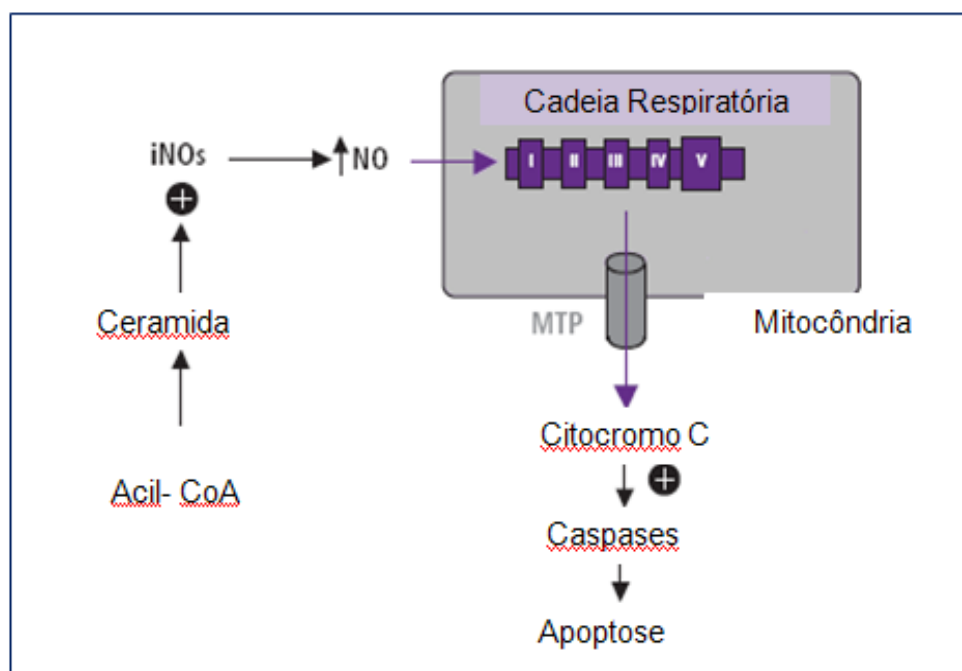


Figura 2: Representação esquemática da cascata de reações anormais resultantes da acumulação de lipídeos nas células β. Fenômeno de Lipotoxicidade conduzindo a destruição celular (Apoptose). iNOs: forma induzível da monooxigenase síntase; NO: óxido; MTP: poro de permeabilidade de transição (Girard J., 2005).

- Outros tipos específicos de diabetes e Diabetes gestacional

Ocorrem devido a defeitos genéticos da função da célula beta (β), defeitos genéticos na ação da insulina, doença do pâncreas exócrino, endocrinopatias, infecções, formas incomuns de diabetes imuno-mediado, etc. O diabetes gestacional (DG) é definido como uma intolerância à glicose que começa ou é diagnosticada durante a gravidez (A.C.O.G., 2001). No diabetes gestacional ocorre tolerância diminuída aos carboidratos, podendo esta tolerância persistir, ou não, após o parto.

Outros critérios para definir o diabetes foram propostos pela Associação Americana de Diabetes (ADA) e levam em consideração estudos epidemiológicos que permitem relacionar os níveis de glicemia e o risco de desenvolvimento de complicações vasculares classificadas em microvasculares (retinopatia, neuropatia e nefropatia) e macrovasculares (isquemia cardíaca, doenças cerebrovascular e vascular periférica) (PETTIT et al., 1990 ; JARRETT; KEEN, 1976 ; GUILLAUSSAU et al., 1998; RAHMAN et al., 2007).

1.2. Insulino resistência

A insulina é um hormônio anabólico secretado pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas, em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após uma refeição (SESTI, 2006). Este hormônio age através de uma subfamília do receptor tirosina quinase, cujos membros mais importantes são o receptor para insulina e o receptor do fator de crescimento da insulina I (IGF-IR) (ULLRICH et al., 1986). A hiperinsulinemia pode ativar a IGF-I promovendo crescimento e divisão celular das células do músculo liso vascular, exercendo um potencial aterogênico importante (UTRIAINEN et al., 1998).

A insulina regula a síntese de lipídeos, proteínas e a transcrição gênica (NAKANO et al., 2002), além de regular a homeostase de glicose, reduzindo produção de glicose hepática (através de uma diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a taxa de captação de glicose, principalmente no músculo esquelético e tecido adiposo. No estado basal a insulina é secretada em ritmo reduzido e constante para regular a lipólise e produção hepática de glicose entre as refeições e durante a noite (MCAULAY. et al ., 2003).

A RI é classicamente definida como um estado de redução da capacidade de resposta dos tecidos alvo aos níveis normais de insulina circulante (SESTI, 2006), desempenhando um papel muito relevante no desenvolvimento do DM 2. Ela também é característica de uma série de outros transtornos de saúde, incluindo obesidade, intolerância à glicose, dislipidemia e hipertensão, o que resulta no desenvolvimento da chamada síndrome metabólica.

O papel das células β pancreáticas é muito importante na homeostasia da glicose. Como foi supramencionado o DM 1 e DM 2 tem diferentes etiologias, mas em ambos os tipos, a redução severa na função das células beta, leva a degenerações metabólicas e complicações secundárias (BUTLER et al., 2003). O músculo esquelético e o fígado são os mais afetados pela RI. O DM 2 é caracterizado por um aumento basal da produção da glicose hepática (HGP) e pela redução da habilidade da supressão da HGP pela insulina (insulino resistência hepática), contribuindo assim para uma hiperglicemia (PHIELIX et al., 2008., GUILHERME et al., 2008).

Em indivíduos insulino resistentes, mas que não apresentam diabetes, o controle da glicemia pode ser mantido por aumentos compensatórios na secreção de insulina pelas células β pancreáticas. Assim, um segundo caminho para a progressão da RI e à DM 2 é a falha na produção dos níveis de insulina pelas células β que mantenham os níveis normais de glicose no sangue (KAHN, 2003).

O tecido adiposo é o principal local de armazenamento do excesso de energia derivada de alimentos, na forma de TG. Em caso de necessidade calórica, esses TG podem ser rapidamente hidrolisados por lipases (um processo conhecido como lipólise) e os ácidos graxos resultantes são transportados para outros tecidos para serem oxidados na mitocôndria como fonte de energia (Figura 3).

No estado normal (Figura 3a), os adipócitos armazenam eficientemente os TG, que podem ser metabolizados, em caso de necessidade energética, na via mitocondrial gerando ATP. Na hiperfagia e excesso de ingestão calórica (Figura 3b), há uma sobrecarga metabólica, consequentemente uma maior entrada de TG,

ocasionando atrofia das células adiposas. Em indivíduos não diabéticos, com sobrepeso, o armazenamento dos TG e a β -oxidação nos músculos são mantidos. Desta forma, o desenvolvimento da RI é evitado. Em caso de uma sobrecarga ainda maior (Figura 3c), ocorre a liberação de proteínas pró-inflamatórias como MCP-1, liberação de TNF- α pelos macrófagos resultando em um estado inflamatório crônico, reduzindo a deposição de TG e aumentando a lipólise. Isso acarreta o acúmulo de lipídeos no músculo (Figura 3d), desregulando assim as funções mitocondriais, tais como a fosforilação oxidativa e a entrada de glicose no músculo, desencadeando desta forma a RI.

O tecido adiposo secreta um grande número de hormônios peptídicos e citocinas (conhecido como adipocinas), bem como moléculas não peptídicas biologicamente ativas. Estas moléculas afetam o metabolismo energético em outros tecidos como o fígado e músculo, bem como comportamentos relacionados à alimentação através dos efeitos sobre as vias neuroendócrinas (GUILHERME et al., 2008).

A importância do tecido adiposo no controle do metabolismo da gordura corporal é observada quando ocorre a falta de tecido adiposo, o que conduz a elevadas concentrações circulantes de TG e ácidos graxos, levando à RI em ratos e humanos (GUILHERME et al., 2008). A presença de tecido adiposo é também necessária para a secreção normal de adipocinas como leptina e adiponectina, que aumentam a sensibilidade à insulina.

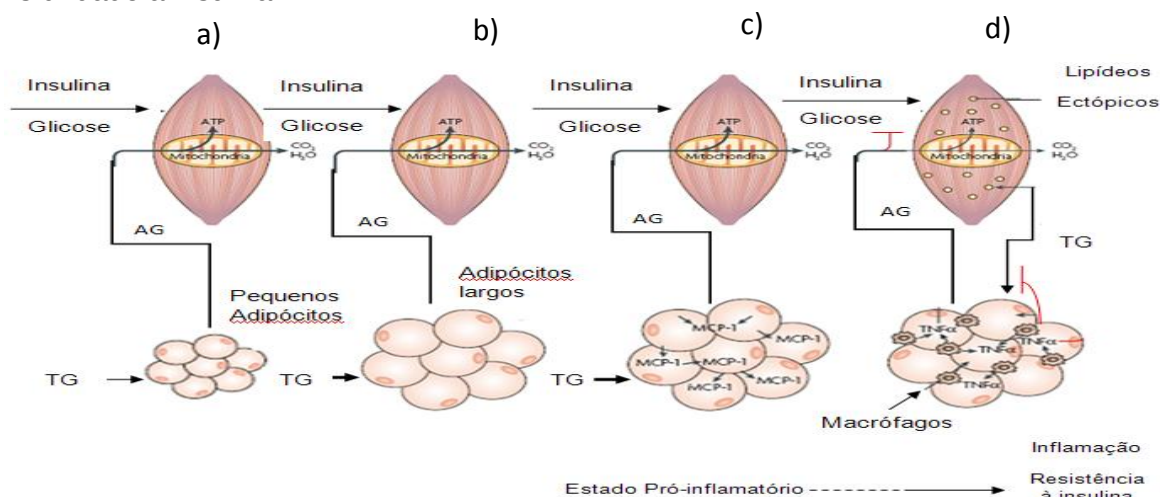


Figura 3 – Mecanismo de resistência à insulina, adaptado de GUILHERME et al., 2008.

1.3. Insulinoterapia

Em termos estruturais, a insulina é uma proteína formada por duas cadeias de aminoácidos (a.a.), A e B, que contêm 21 e 30 a.a., respectivamente, interligadas por duas pontes de dissulfeto. A massa molecular (MM) é de aproximadamente 6 KDa. A composição em a.a. é variável para diferentes animais, mas em cada cadeia 10 resíduos são comuns. Na cadeia A existe uma ponte de dissulfeto intra-cadeia (A6-A11). Alguns aa. da molécula não são essenciais à atividade biológica da insulina, como os resíduos em B30 ou A21. O octapeptídeo terminal da cadeia B (B23-B30) é importante na ação hipoglicêmica, visto que a separação deste segmento conduz à perda de 85% da atividade biológica (CHIEN, 1996).

Com já foi exposto anteriormente, este hormônio anabólico tem importante papel na regulação da homeostase da glicose, e na sua ausência ocorre o desenvolvimento de uma hiperglicemia, o que induz uma série de patologias em diferentes tecidos, entre eles as células vasculares e neuronais.

A atividade dos nervos parassimpáticos, bem como a estimulação com a glicose, tem um papel importante na secreção de insulina pelas células β pancreáticas. A ativação do receptor muscarínico por ação da acetilcolina (ACh) promove a exocitose dos grânulos de insulina e a ACh também despolariza as células β . O influxo de Ca^{2+} promovido pela abertura de canais voltagem dependentes induzida por glicose e ACh resulta no aumento do $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico nestas células (NAKANO et al., 2002). O receptor de insulina é uma tirosina cinase, que sofre autofosforilação e catalisa a fosforilação de proteínas celulares, tais como membros das famílias IRS (substratos do receptor de insulina), Shc (molécula adaptadora e substrato do receptor de insulina) e Cbl (protooncogene que exerce função de substrato do receptor de insulina).

Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila esses vários substratos protéicos em tirosina. Junto com a fosforilação da tirosina, essas proteínas interagem com moléculas sinalizadoras através de seus domínios SH2, resultando em diversas vias de sinalização, que modulam a regulação do tráfego vesicular, síntese de proteínas, ativação e inativação de enzimas e

expressão gênica (Figura 4). As células β pancreáticas possuem receptores de insulina e há evidências da ação autócrina desse hormônio na função dessas células, incluindo a transcrição da glicocinase e genes responsáveis pela expressão de insulina (LAKEY et al., 1990).

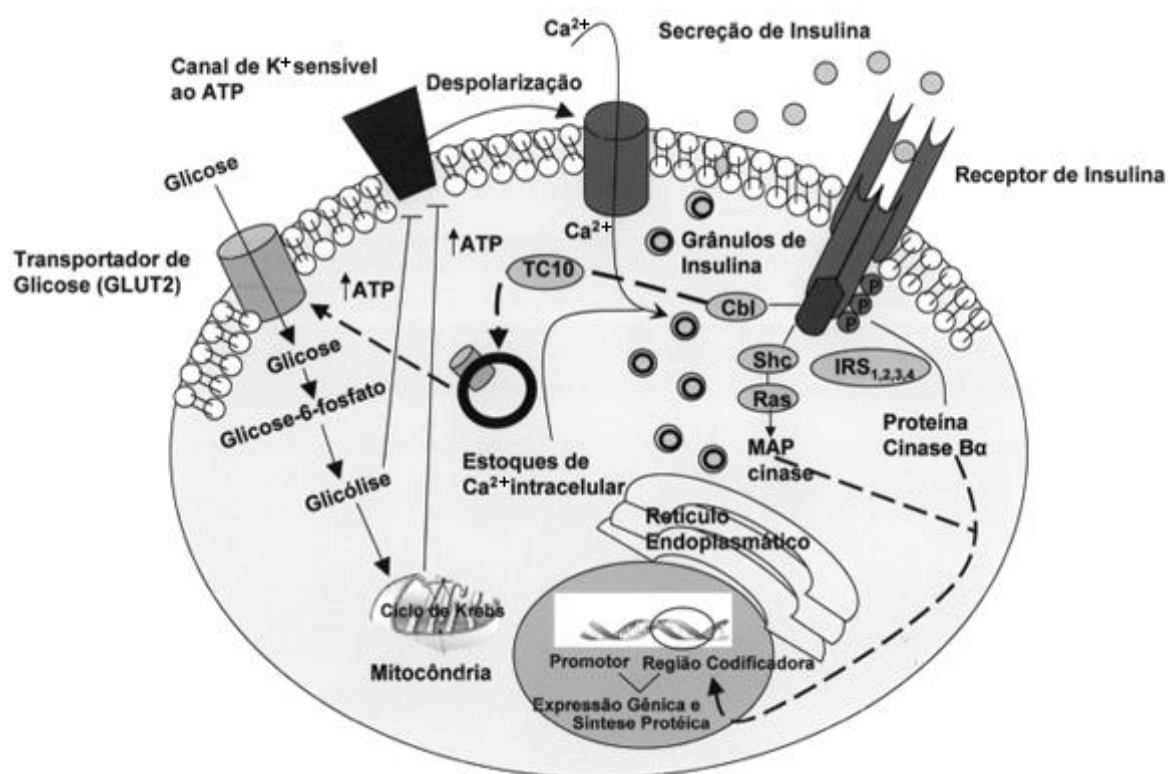


Figura 4 - Secreção de insulina e sinalização da célula β pancreática (CARDOSO et al., 2007).

O tratamento com insulina exógena tem como objetivo obter níveis plasmáticos idênticos aos da secreção fisiológica em indivíduos não diabéticos (SILVA et al., 2003). A terapêutica normal consiste na administração parenteral de insulina, em especial pela via subcutânea (s.c.), sendo curto seu tempo de ação, 4 - 8 horas, o que exige 2 a 4 injeções diárias para um controle apropriado da doença. Após a injeção ocorre um aumento na concentração de insulina plasmática que apresenta picos após 1-2 h e retorna às concentrações basais dentro de 6-8 h (TREHAN et al, 1998).

Os efeitos metabólicos da insulina variam consideravelmente intra e inter-individualmente. Um fator muito importante para a taxa de absorção da insulina injetada é o fluxo de sangue local no tecido subcutâneo, o que facilita sua ação. Além disso, fatores como realização de atividade física, associação com outros fármacos e controle metabólico podem modificar a sensibilidade à insulina.

Em pacientes diabéticos mal controlados, em que coexistem sobrepeso ou obesidade, sem recente perda de peso e sem cetoacidose, predomina fisiopatologicamente a RI sobre a insulinopenia. No entanto, com persistência de altos valores da hemoglobina glicada (HbA_{1c}) deve-se insulinizar o paciente para reduzir o risco de complicações micro e macrovasculares (IZQUIERDO E et al., 2008).

De acordo com a Associação Brasileira de Diabetes em 2009, o valor de HbA_{1c} mantido abaixo de 7%, o que corresponde a uma glicemia em torno de 156 mg/dL, promove proteção contra o surgimento e a progressão das complicações microvasculares do diabetes (GIACCARI et al., 2009). Dados da Associação Americana de Endocrinologistas Clínicos (AACE) e do Colégio Americano de Endocrinologia (ACE) recomendam um percentual de HbA_{1c} de 6,5%. Segundo a ACE e a AACE, pacientes com um nível de HbA_{1c} de 8,5% raramente alcançam os níveis glicêmicos aceitáveis utilizando hipoglicemiantes orais em monoterapia, nestes casos são recomendados a insulino terapia como combinação terapêutica, pois com a evolução natural do DM 2, a capacidade secretora de insulina pelo pâncreas se esgota de forma progressiva dificultando o controle glicêmico. O início da terapia insulínica leva ao aumento dos riscos de episódios de hipoglicemia, e ainda se produz um aumento de peso corporal, o que habitualmente já é excessivo no DM2 (BRETZEL et al., 2006).

2.0. Tratamento do diabetes Mellitus tipo 2

As complicações em longo prazo associadas com o DM2 têm elevado custo econômico - os pacientes diabéticos consomem mais do dobro dos cuidados de saúde do que os não diabéticos, devido principalmente ao alto custo associado com o tratamento destas complicações (SKYLER; ODDO, 2002).

Para o tratamento do DM2, dois conjuntos de medidas podem ser tomados : modificações no estilo de vida tais como regularidade da ingestão alimentar através de dietas hipocalóricas, realização de atividades físicas que diminuem as concentrações de glicose, reduzem os fatores de risco coexistentes de doenças cardiovasculares e aumentam eficácia dos esquemas terapêuticos (INZUCCHI, 2002). E, medidas medicamentosas, sendo utilizados os agentes antidiabéticos orais os quais são indicadas quando o paciente diabético não responde ou deixa de responder adequadamente às medidas não medicamentosas.

Os fármacos de escolha para o tratamento oral do DM2 são a metformina, as sulfoniluréias, a glibenclamida e a glicazida. Nas últimas décadas, os compostos heterocíclicos que apresentam o anel tiazolidínico têm sido alvos de extensos estudos químico e biológico. Dentre estes, destacam-se as tiazolidina-2,4-dionas (a), grupo de compostos bioisósteros da hidantoína (b) estruturalmente diversos (Figura 5). A importância dessas tiazolidinadionas (TZDS) se dá pela viabilidade de sua síntese, podendo ser preparados em poucas etapas sintéticas, com produtos acessíveis, metodologia eficaz e economicamente viável obtendo-se produtos com bons rendimentos. capazes de influenciar a regulação de diferentes cascatas moleculares, com implicações importantes no tratamento do câncer, doenças metabólicas, inflamatórias e neurodegenerativas (RAKOWITZ et. al., 2006), hipoglicemiantes, anti-tumoral atuam em cânceres de cólon e mama (MORETTI et al., 2001; PANIGRAHY et al., 2002), anti-oxidante (JEONG et al., 2004) esquistossomicidas entre outras.

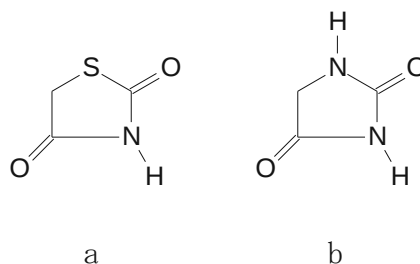


Figura 5 - Compostos bioisósteros tiazolidina-2,4-diona (a) e hidantoína (b).

A síntese de compostos contendo o anel 4-tiazolidinona é bastante descrita na literatura (ANDRES et al., 2000; DANDIA et al., 2006). Devido à busca por um método geral, simples, eficiente e de baixo custo para a obtenção destes compostos, vários trabalhos têm sido desenvolvidos (MOURÃO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2008; KAVITHA. et al., 2006; TENÓRIO et al., 2005). Em geral, as 4-tiazolidinonas podem ser produzidas, com bons rendimentos, através de reações de ciclização envolvendo ácido α -haloacético ou ácido α mercaptoacético, como descrito em revisões desenvolvidas por Brown (1961), Olivereira (2008) e Singh e colaboradores (1981).

As TZDs ou glitazonas são agentes hipoglicemiantes orais (figura 6), que atuam aumentando, especialmente, a sensibilidade do tecido adiposo à insulina (PETERS, 2001; SALTIEL et al 1996). Vários estudos mostram o efeito do tratamento das TZDs sobre o metabolismo de lipídeos, diferenciação celular e alguns riscos cardiovasculares (COLLIONS et al., 2001; LAW et al 1996; MOURÃO et al., 2005).

Atualmente os medicamentos da classe das TZDs que são usadas para tratar o diabetes são: Avandia[®] (rosiglitazona), Actos (pioglitazona), Avandary[®] (rosiglitazona e glimepiride), Avandamet[®] (rosiglitazona e metformina), e Duetact[®] (pioglitazona e glimepiride). Estes fármacos atuam aumentando a sensibilidade das células à ação da insulina, podendo também, reduzir a produção de glicose pelo fígado. Podem ser usadas em monoterapia, mas freqüentemente são associadas às sulfoniluréias, a metformina ou a insulina para maior benefício. Ao contrário das sulfoniluréias, não estimulam a secreção

de insulina. Vários estudos sugerem que as TZDs são bem toleradas e, quando usadas em monoterapia, é improvável que causem hipoglicemia. No Brasil, estudos específicos sobre a utilização destes fármacos antidiabéticos, bem como sobre os fatores relacionados a este uso, são raros ou mesmo inexistentes, embora o conhecimento destas questões seja imprescindível para o emprego terapêutico adequado desta classe.

Foi demonstrado que um dos alvos moleculares dos derivados tiazolidínicos são os Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR γ) (LEHMANN et al., 1995). Atuando sobre estes receptores, as TZDs estimulam a diferenciação dos adipócitos e aumentam a insulino-sensibilidade dos tecidos (MOURÃO et al., 2005; LEITE et al., 2006).

2.1. PPAR γ : alvo terapêutico no tratamento do diabetes mellitus

Os receptores nucleares PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma) são responsáveis pelo balanceamento energético e hormonal atuando principalmente no metabolismo de lípidios e glicose. Apresentam atividades antiinflamatórias, imunomoduladora e anti-aterosclerótica. Esses receptores estão associados a várias doenças como DM2, arteriosclerose e obesidade (WILLSON et al., 2001). O papel fisiológico dos receptores PPAR γ revela-se após sua ligação à ligantes específicos. Os receptores PPAR γ são especificamente ligados as tiazolidinas (Figura 6) e apresentam atividade anti-diabética

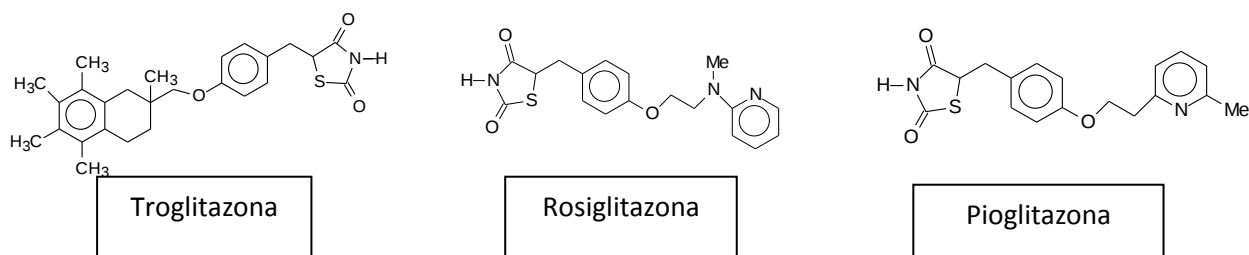


Figura 6 - Tiazolidinas Hipoglicemiantes

Outros ligantes do PPAR γ incluem as prostaglandinas naturais J2 (15dPGJ2), os ácidos graxos poliinsaturados (HOUSEKNECHT et al., 2002), e

antiinflamatórios não esteroidais (NSAIDs), como ibuprofeno e a indometacina (LEHMANN et al., 1997).

Os ligantes específicos de PPAR γ têm uma alta afinidade para o domínio ligante de PPAR γ , podendo causar mudanças em sua conformação. Como resultado, o receptor é convertido para o modo ativado que promove o recrutamento de co-ativadores, tais como o receptor co-ativador de esteroides 1 (SRC-1) e p300/CBP (NOLTE et al., 1998; UPPENBERG et al., 1998), e estimula especificamente a transcrição de genes associados com o balanço energético.

Foi mostrado que o PPAR γ reprime a expressão de mediadores pró-inflamatórios no nível transcricional por indução inibitória da óxido nítrico síntase (iNOS) e ativação da sinalização da proteína-1 (AP-1) (RICOTE et al., 1998; DELERIVE et al., 2001).

Há também evidências de que PPAR γ atuam em várias circunstâncias fisiopatológicas com o câncer, a arteriosclerose, inflamação e a diabetes. (DUEZ et al., 2001).

3.0. Diabetes Experimental

O pâncreas é constituído pelas ilhotas de Langerhans compostas por células α produtoras de glucagon, células β produtoras de insulina, células δ produtoras de somatostatina e células PP produtoras de polipeptídeo pancreático. As ilhotas pancreáticas podem sofrer alterações funcionais e morfológicas decorrentes de vários fatores. Fármacos como a aloxana e a estreptozotocina são capazes de produzir radicais livres que destroem as células β do pâncreas resultando em um quadro de hiperglicemia (LEKHOLM , 1993; TESCH., ALLEN, 2007).

Estas drogas cicitotóxicas são bastante utilizadas para indução de diabetes experimental em animais tais como, ratos, coelhos e camundongos. Estas substâncias, apesar de causarem um elevado índice de mortalidade relativa, são de fácil execução e permitem a utilização de um grande número

de animais. A sensibilidade da STZ varia segundo a espécie animal, sexo, idade e estado nutricional (BAILEY *et al*, 1990).

A aloxana é uma droga de ação rápida, seletiva de células beta pancreáticas e de baixo custo. Esta droga ou seus metabólitos interagem com íons presentes no pâncreas, como o zinco, provocando uma destruição das células beta das ilhotas de Langerhans (MAEDA; FERNANDEZ, 1995). Entretanto, outras observações dão suporte a teoria da formação de radicais de oxigênio que desempenham uma função significativa na ação diabetogênica desta substância (DONNINI *et al.*, 1996, MALAISSE, 1982;). Já a STZ causa a degranulação das células produtoras de insulina e, conseqüentemente, promove o aparecimento do diabetes.

A STZ é um análogo da N-acetilglucosamina (GlcNAc), que é facilmente transportada pelas células β do pâncreas pelo transportador de glicose GLUT-2, causando a toxicidade destas células e resultando em deficiência de insulina. Desta forma, a STZ inibe seletivamente a atividade da O-GlcNAcase, que é responsável pela remoção da O-GlcNAc da proteína. Isso causa glicosilação das proteínas intracelulares resultando em apoptose das células β do pâncreas (TESCH, ALLEN, 2007).

Alguns estudos mostram que em ratos da linhagem Wistar, a dose de 35 mg/Kg de STZ produz DM 2 com glicemia entre 180-250 mg/dL (STRIFFLER *et al.*, 2004; UGOCHUKWU *et al.*, 2004), a dose de 65 mg/kg produz DM 1 com glicemia acima de 350 mg/dL, caracterizando uma diabetes severa (MIHM *et al.*, 2001; UGOCHUKWU *et al.*, 2004). Segundo Caluwaerts *et al.* (2003), o nível normal de glicose para ratos é abaixo de 100 mg/dL, entre 100 - 300 mg/dL a hiperglicemia seria moderada, e acima de 300 mg/dL a hiperglicemia seria severa.

As alterações fisiológicas manifestadas neste quadro são hiperglicemia, glicosúria, polidipsia, polifagia e poliúria. A hiperglicemia plasmática aumenta a absorção de glicose pelos néfrons dos rins levando a um

aumento da excreção de glicose na urina (glicosúria), gerando um aumento da pressão osmótica e maior retenção de água na urina (poliúria); conseqüentemente a ingestão de água é aumentada (polidipsia). O aumento do consumo de ração (polifagia) pode ser associado com o fato da ausência de insulina comprometer o transporte de glicose para as células, sendo assim as células ficam sem energia, portanto o animal aumenta a ingestão de ração para suprir a falta de energia celular e mesmo assim ocorre a perda de peso (WONG et al.,1993)

4.0. Obtenção de novos fármacos

A Química Medicinal, segundo definição da IUPAC, é uma disciplina baseada na química, envolvendo aspectos das ciências biológicas, médica e farmacêutica, cuja missão é o planejamento, descoberta, invenção, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos (protótipos), o estudo do metabolismo, interpretação do mecanismo de ação a nível molecular e a construção das relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica. Um projeto de Química Medicinal compreende as etapas de descoberta, otimização e desenvolvimento do protótipo (WERMUTH, 2003)

Dentre os métodos de obtenção de novos fármacos, a modificação ou variação molecular, utilizando conceitos de bioisosterismo e isoisterismo são os mais utilizados (BARREIRO et al, 2001). Este último é aplicado na escolha de átomos ou moléculas orgânicas ou inorgânicas que possuem o mesmo número e/ou o mesmo arranjo de elétrons (BURGUER, 1991). Já com a aplicação de bioisosterismo pode-se analisar a influência da modificação de um átomo ou de um grupo de átomos por seu bioisótero sobre a atividade biológica que o fármaco original apresenta, podendo ser de ação idêntica ou mesmo antagônica

Na década de 80, os avanços da biologia molecular contribuíram para a compreensão dos aspectos bioquímicos associados a várias fisiopatologias, favorecendo o fortalecimento da abordagem de planejamento de fármacos baseado no mecanismo de ação pretendido (LIMA, 2007). Para isso foram imprescindíveis avanços na utilização de técnicas como espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (PELLECCHIA et al 2002), métodos computacionais para análise do complexo receptor-ligante e os conceitos de pontos e grupamentos farmacofóricos (LIMA, 2007). Desde então, vários grupos de pesquisa foram criados, reconhecendo a importância desta estratégia de planejamento molecular de ligantes. Entre esses, temos o Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (GPIT) do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) da Universidade Federal de Pernambuco, que desde 1980, trabalha com a síntese, planejamento e avaliação das propriedades farmacológicas de derivados tiazolidínicos empregando-se métodos fundamentados em diferentes estratégias da Química Medicinal, como de bioisosterismo e isoisterismo, tendo-se obtido resultados animadores no desenvolvimento de derivados tiazolidínicos bioativos potenciais candidatos a fármacos antidiabéticos (MOURÃO, 2005), antimicrobianas (ALBUQUERQUE et al., 1999) e antiinflamatórias (UCHOA, 2004; SANTOS et al, 2005; COUTO, 2006).

Dessa forma, o trabalho aqui desenvolvido, inserido numa linha de pesquisa que visa o planejamento racional e a síntese de novos protótipos bioativos, se propôs a sintetizar e avaliar a atividade hipoglicemiante de um novo derivado tiazolidínico a fim de reduzir ou eliminar os efeitos tóxicos, diminuindo o tempo de reação e menor formação de subprodutos e maximizando os efeitos benéficos dos fármacos aqui planejados.

5.0. Justificativa

As TZDs são potentes sensibilizadores de insulina que melhoraram o controle glicêmico e exercem efeitos benéficos sobre os fatores de risco cardiovasculares (SAUER et. al., 2006). No entanto, dados da literatura relatam que o tratamento com a rosiglitazona, uma tiazolidina em uso na clínica médica, foi associada com aumento de risco de enfarte no miocárdio e morte por doenças cardiovasculares (STAFYLAS et al., 2009).

Dessa forma, este trabalho foi desenvolvido inserido numa linha de pesquisa que visa o planejamento racional e a síntese de novos protótipos bioativos, e se propõe a contribuir para o desenvolvimento e melhoramento de agentes farmacodinâmicos com atividade hipoglicêmica e hipolipidêmica, na tentativa de torná-los mais eficazes, específicos e menos tóxicos, buscando um tratamento mais satisfatório para o diabetes.

II - OBJETIVOS

a. Objetivo geral

Encontrar uma nova alternativa terapêutica mais eficaz que as atuais drogas hipoglicemiantes e desta forma contribuir com a pesquisa de novos agentes, mais específicos e menos tóxicos, melhorando as desordens metabólicas do diabetes mellitus.

b. Objetivos específicos

- Preparar, por síntese orgânica, o novo derivado 5-benzilideno-3-benzil-tiazolidínico
- Caracterizar estruturalmente o composto sintetizado por métodos espectrofotométricos, tais como infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênios e espectrometria de massas;
- Avaliar a atividade antidiabética do composto sintetizado.

III - MATERIAL E MÉTODOS**1.0. Parte Química**

1.1. Síntese do derivado 5-(1*H*-INDOL-3-IL-METILENO)-3-(4-METIL-BENZIL)-TIAZOLIDINA-2,4-DIONA (LPSF/GQ-11)

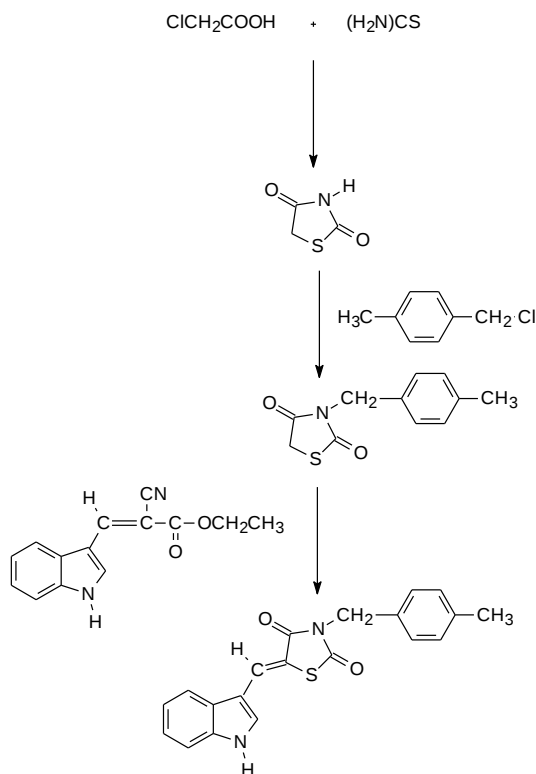
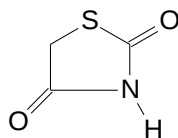


Figura 7. Rota da síntese do derivado da série 5-(1*H*-indol-3-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-Tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-11)

O derivado 5-(1*H*-indol-3-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-Tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-11) foi obtidos através de síntese em várias etapas. Inicialmente, obtém-se a tiazolidina-2,4-diona por reação da tiouréia com o ácido cloroacético. Numa segunda etapa a tiazolidina-2,4-diona reagiu com o cloreto de 4-metil-benzila, para formação da 3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona. Paralelamente, obtém-se os compostos 3-aril-2-ciano-acrilatos de etila através da reação de condensação de indol-3-carboxaldeído com cianacetato de etila, em presença de piperidina.

Finalmente, a 3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona sofre uma reação de adição pelo éster cianocinâmico, conduzindo ao produto final desejado.

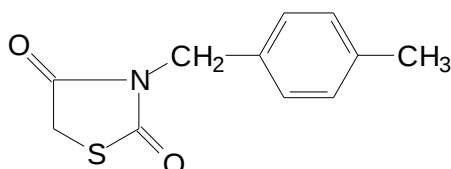
1.1.1. Obtenção da tiazolidina-2,4-diona



Em um balão adicionou-se a tiouréia (5 g - 0,0658 mols) o ácido cloroacético (6,335 g - 0,0673 mols) previamente dissolvido em água. Aqueceu-se a mistura por 18 horas. Em seguida, deixou-se o produto obtido em repouso por 24 horas na geladeira. Formaram-se cristais brancos, cuja purificação foi feita por recristalizações sucessivas em água destilada.

A tiazolidina-2,4-diona, de fórmula molecular $C_3H_3NO_2S$ (MM = 117), após purificação, apresenta-se na forma de cristais brancos. Este composto foi obtido com rendimento de 84 %, apresentando ponto de fusão 121-122°C [ponto de fusão na literatura 122°C (KOCHKANYAN; ISRAELYAN; ZARITOUSKII, 1978)] e $R_f = 0,51$, em sistema de eluição $CHCl_3/CH_3OH$ 96:4.

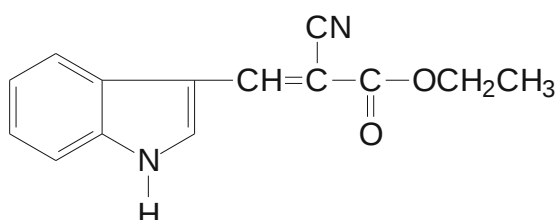
1.1.2. Obtenção da 3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-1)



A tiazolidina-2,4-diona (5,5712 g - 0,0476 mols), dissolvida em 10 mL de etanol absoluto, adiciona-se hidróxido de potássio (1,9 g - 0,0476 mols) dissolvido por sua vez em 10 mL de etanol absoluto, deixando-se reagir à temperatura ambiente, por 10 minutos. Ao sal de potássio da tiazolidina-2,4-diona formado adiciona-se 7 mL do cloreto de 4-metil-benzila, deixando-se reagir por 4 horas a uma temperatura de 70 °C. A mistura reacional adiciona-se gelo picado; o precipitado formado é filtrado e purificado através de cromatografia sob pressão em sílica gel 60 através de um gradiente de eluição CHCl_3 e $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 92:08 (SHIVAIIKA et al., 1983).

<i>Fórmula Molecular</i>	<i>Massa</i>	<i>P.F. (°C)</i>	<i>Rdt.</i>	<i>Rf</i>	<i>Sistema de eluição</i>
	<i>Molecular</i>		<i>(%)</i>		
$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{NS}$	189	70-72	56	0,78	Hex/Ac 7:3

1.1.3. Obtenção do 2-ciano-3-(1H-indol-3-il)-acrilato de etila (LPSF/IP-19)

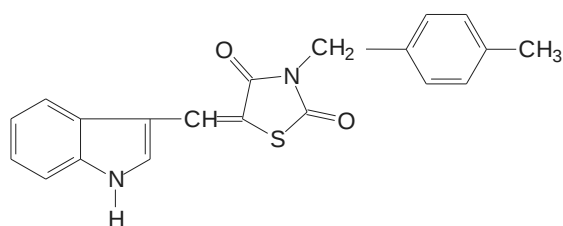


Paula, M.J.D.

Em um balão de fundo redondo colocam-se o 3-carboxi-indol (3 g - 0,02069 mols) e o cianacetato de etila (2,3379 g - 0,02069 mols), em presença de piperidina como catalisador e benzeno como solvente. A mistura reacional é aquecida a uma temperatura de 110 °C, durante 4 horas. O produto é mantido na geladeira por 12 horas. O éster foi purificado através de recristalizações sucessivas em etanol (COPE et al., 1941; PITTA et al., 2007, SANTOS et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2005; BRANDAO et al., 2004; YADAV et al., 2004; HAMZA et al., 2002; YADAV et al., 1998; SINGH et al., 1998; ERTEL et al., 1977; MATSUOKA et al., 1990; RODIONOV et al., 1950; VAN et al., 1945).

<i>Fórmula</i>	<i>Massa</i>	<i>P.F. (°C)</i>	<i>Rdt.</i>	<i>Rf</i>	<i>Sistema de eluição</i>
<i>Molecular</i>	<i>Molecular</i>		<i>(%)</i>		
C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₂	240	162-165	84	0,71	Benz/AcOEt 6:4

1.1.4. Obtenção da 5-(1*H*-indol-3-ilmetileno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-11)



A mistura reacional da 3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-1) (0,3 g - 0,00136 mols) e do éster 2-ciano-3-(1*H*-indol-3-il)-acrilato de etila (LPSF/IP-19) (0,32 g - 0,00136 mols) dissolvido em etanol seco, em presença de piperidina como catalisador, é aquecida a refluxo durante 4 horas. Após resfriamento em banho de gelo ocorre a cristalização da 5-(1*H*-indol-3-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-11) (PEREIRA, 2007).

<i>Fórmula Molecular</i>	<i>Massa</i>	<i>P.F. (°C)</i>	<i>Rdt.</i>	<i>Rf</i>	<i>Sistema de eluição</i>
	<i>Molecular</i>		<i>(%)</i>		
C ₂₀ H ₁₆ N ₂ O ₂ S	348	229-231	99,02	0,48	Benz/AcOEt 95:5

2.0. Parte Biológica

2.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 250g a 300g, procedentes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos a temperatura de $21 \pm 2^\circ \text{C}$, ciclo claro-escuro de 12 horas, umidade de 65%. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais recebendo ração labina (Purina[®]) e água *ad libitum*.

Todos os protocolos foram submetidos e aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco (processo n° 23076.006464/2009-98).

2.2. Protocolo experimental

- Indução do Diabetes e grupos experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos: **i)** diabético - recebendo uma dose única de 42 mg/Kg de estreptozotocina (STZ, Sigma, St. Louis, MO, USA), via intra-peritoneal, dissolvida em tampão citrato (0,01M pH 4,5), denominado grupo diabético (n = 36); **ii)** grupo controle (n= 6) – normoglicêmico, tratado apenas com o veículo (tampão citrato).

Os níveis de glicose foram estimados com o uso de um glicosímetro (Lifescan[®], Johnson & Johnson Company, EUA) sete dias após a administração de STZ. Foram considerados diabéticos os ratos que apresentaram glicemia de jejum acima de 200 mg/dL. Este grupo de animais foi subdividido em seis novos grupos, que receberam tratamentos diferenciados para a avaliação da atividade antidiabética das moléculas candidatas à agonistas de PPAR γ :

- Grupo 1 – hiperglicêmico tratado apenas com veículo (Diabético não tratado - D);

- Grupo 2 - hiperglicêmico tratados com rosiglitazona (10mg/Kg, RG), diariamente durante 14 dias ;
- Grupo 3 - hiperglicêmico tratado com LPSF/GQ-11 (10mg/Kg, v.o.) diariamente durante 14 dias ;
- Grupo 4 - hiperglicêmico tratado com LPSF/GQ-11 (20mg/Kg, v.o.) diariamente durante 14 dias ;
- Grupo 5 - hiperglicêmico tratado com insulina associada com LPSF/QG-11 (10mg/Kg, v.o.) diariamente durante 14 dias ;
- Grupo 6 - hiperglicêmico tratado com insulina (I) durante 14 dias.

Os procedimentos experimentais foram realizados sempre pela manhã (entre 8 e 9 horas). Animais com glicemia abaixo de 200 mg/dL e acima de 350 mg/dL foram descartados do protocolo. Amostras de sangue foram coletadas através do plexo retro-orbital, com auxílio de tubos capilares, sob anestesia (Tiopental, 30 mg/Kg) para dosagens bioquímicas e submissão aos vários tratamentos, segundo o grupo de animais. Após o tratamento de 14 dias, os animais foram postos novamente em jejum de 10 horas, anestesiados e foi coletado novas amostras de sangue para a realização dos testes bioquímicos. Em seguida, os animais foram sacrificados sob anestesia e os órgãos como rins e coração retirados.

O grupo tratado com insulina humana NPH (Neutral Protamine Harguerdon; Biohulin NU-100, 100 U/mL, Biobrás, Montes Claros, MG, Brazil), recebeu a insulina duas vezes ao dia por via sub-cutânea .

Os animais dos grupos tratados com o derivado tiazolidínico LPSF/GQ-11 (10mg/Kg) associado a insulina e o grupo tratado com insulina em monoterapia, receberam doses de insulina de acordo com os níveis de glicose plasmática apresentado (em acordo com Matafome et al., 2009) :

- Glicemia entre 200 e 299 mg/dL, 4 U;
- Glicemia acima de 300 mg/dL - 6 U.

A nova tiazolidinadiona foi diluída em uma suspensão base composta por. Carboximetilcelulose (CMC 1000 a 2000), Sorbitol 70% e Dióxido de Silício

coloidal (Aerosil). Esta mesma suspensão foi administrada no grupo controle normoglicêmico e no grupo diabético.

2.3. Consumo alimentar, hídrico e ganho de peso corporal

Os animais foram alojados em gaiolas individuais e alimentados com água e ração *ad libitum* , sendo uma quantidade em cerca de 100g/dia da ração purina e 700mL/dia de água. O consumo de ração e água foi anotado diariamente, entre 9 e 10 horas da manhã, sendo calculado sobre as sobras verificadas no dia seguinte.

O ganho ou perda de peso dos ratos tratados com insulina, TZDs e RG e/ou veículo foi acompanhado semanalmente durante todo período experimental.

2.4. Determinação dos parâmetros bioquímicos

Foram coletadas amostras de sangue de todos os animais antes da administração das TZDs (T= 0), com o objetivo de determinar os níveis de glicose, triglicerídeos, colesterol total, colesterol LDL e colesterol HDL plasmáticos, e após o término do tratamento (décimo quarto dia). As amostras foram centrifugadas a 4000 r.p.m. durante 15 minutos. O colesterol plasmático foi determinado pelo método enzimático-Trinder, um ensaio enzimático de determinação espectrofotométrica que utiliza as enzimas colesterol-esterase, colesterol oxidase e peroxidase, comercializado pela Labtest[®].

Os triglicerídios plasmáticos também foram medidos pelo método enzimático -Trinder através das reações catalisadas pela lipase, gliceroquinase, glicerol fosfato oxidase e peroxidase, comercializados igualmente pela Labtest[®].

O colesterol LDL e colesterol HDL foram mensurados quantitativamente pelo método de precipitação utilizando os reagentes comercializados pela Labtest[®].

A leitura de todas as amostras foi realizada em espectrofotômetro com filtros de acordo com indicação do kit.

2.5. Efeito do diabetes sobre os parâmetros anatômicos do coração em ratos tratados com tiazolidinadionas em monoterapia ou associada a insulina

Ao final dos experimentos, os corações foram excisados. Os átrios foram ablados e os ventrículos pesados para avaliação do peso úmido, logo depois foram secos em estufa a 70°C durante 48 horas, e repesados para avaliação do peso seco. A relação peso do coração seco/peso corporal foi determinada e usada como índice de atrofia/ hipertrofia cardíaca (KNUFMAN et al, 1987; LAHLOU et al, 1998) e comparada entre os grupos.

3.0. Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como variações médias $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.). Na análise dos dados foram utilizados o teste t de Student para dados não-pareados. Para análise de bloco foi utilizada a análise de variância (ANOVA) a uma via ou duas vias. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Para auxiliar na análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA).

IV – RESULTADOS

1.0. Análise Espectroscópica

1.1. Infravermelho

Através da espectroscopia no infravermelho (Figuras 8 e 9), verificaram-se as bandas de absorção características dos grupos funcionais presentes nos ésteres de Cope. Observou-se as frequências de absorção referentes à deformação axial do grupamento $C\equiv N$, variando entre 2211 a 2221 cm^{-1} , e as vibrações de deformação da $C=O$ em uma banda de absorção compreendida entre 1694 a 1720 cm^{-1} . A vibração da ligação dupla $C=C$ foi observada em uma frequência de 1567 a 1598 cm^{-1} . O espectro IV do derivado 2-ciano-3-(1*H*-indol-3-il-metileno)-acrilato de etila (LPSF/IP-19) apresenta uma frequência de absorção do NH em 3325 cm^{-1} (Tabela 1).

Tabela 1 – Frequências de absorção no infravermelho do 2-ciano-3-(1*H*-indol-3-il)-acrilato de etila (LPSF/IP-19) (cm^{-1})

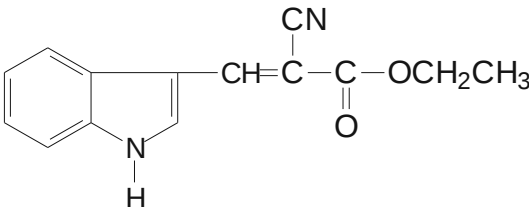
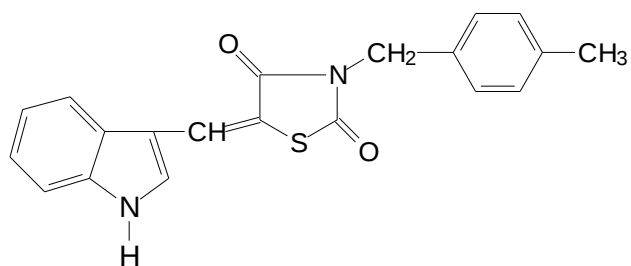
				
NH	CH	CN	C=O	
3325	1567	2211	1694	1262
Pastilhas de KBr - Espectrofotômetro FTIR Bruker, modelo IFS66				

Tabela 2 – Frequências de absorção no infravermelho do 5-(1*H*-indol-3-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-11) (cm^{-1})



NH

-CH=

C=O ₍₂₎C=O ₍₄₎

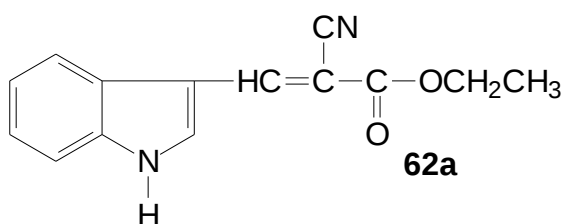
3406

1595

1727

1664

Pastilhas de KBr - Espectrofotômetro FTIR Bruker, modelo IFS66



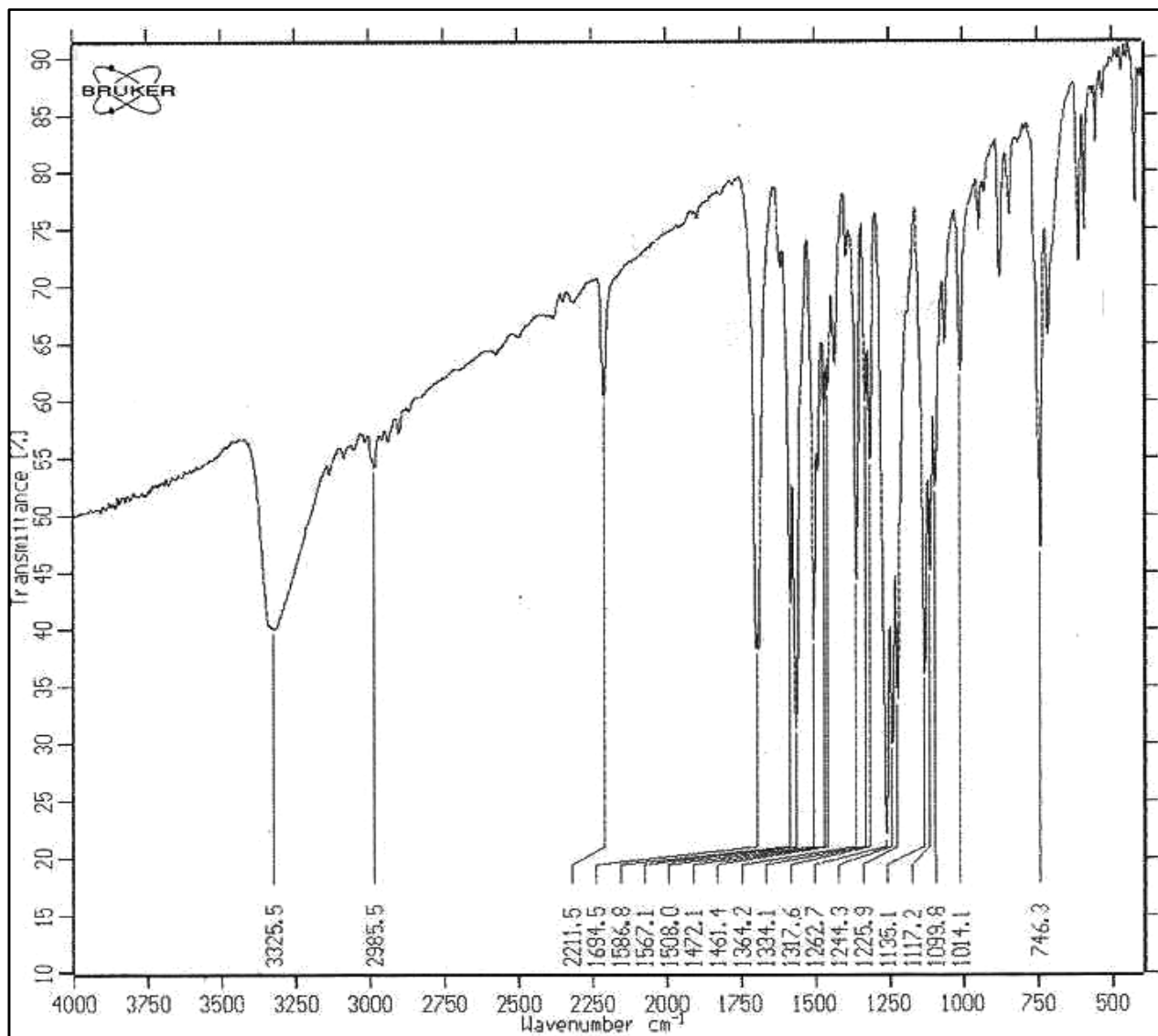
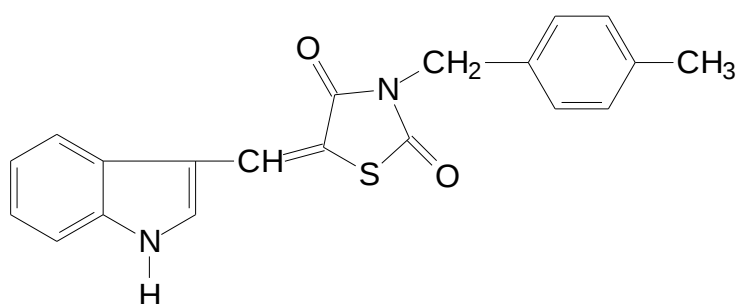


Figura 8 - Espectro de infravermelho do 2-ciano-3-(1H-indol-3-il-metileno)-acrilato de etila (LPSF/IP-19)



Paula, M.J.D.

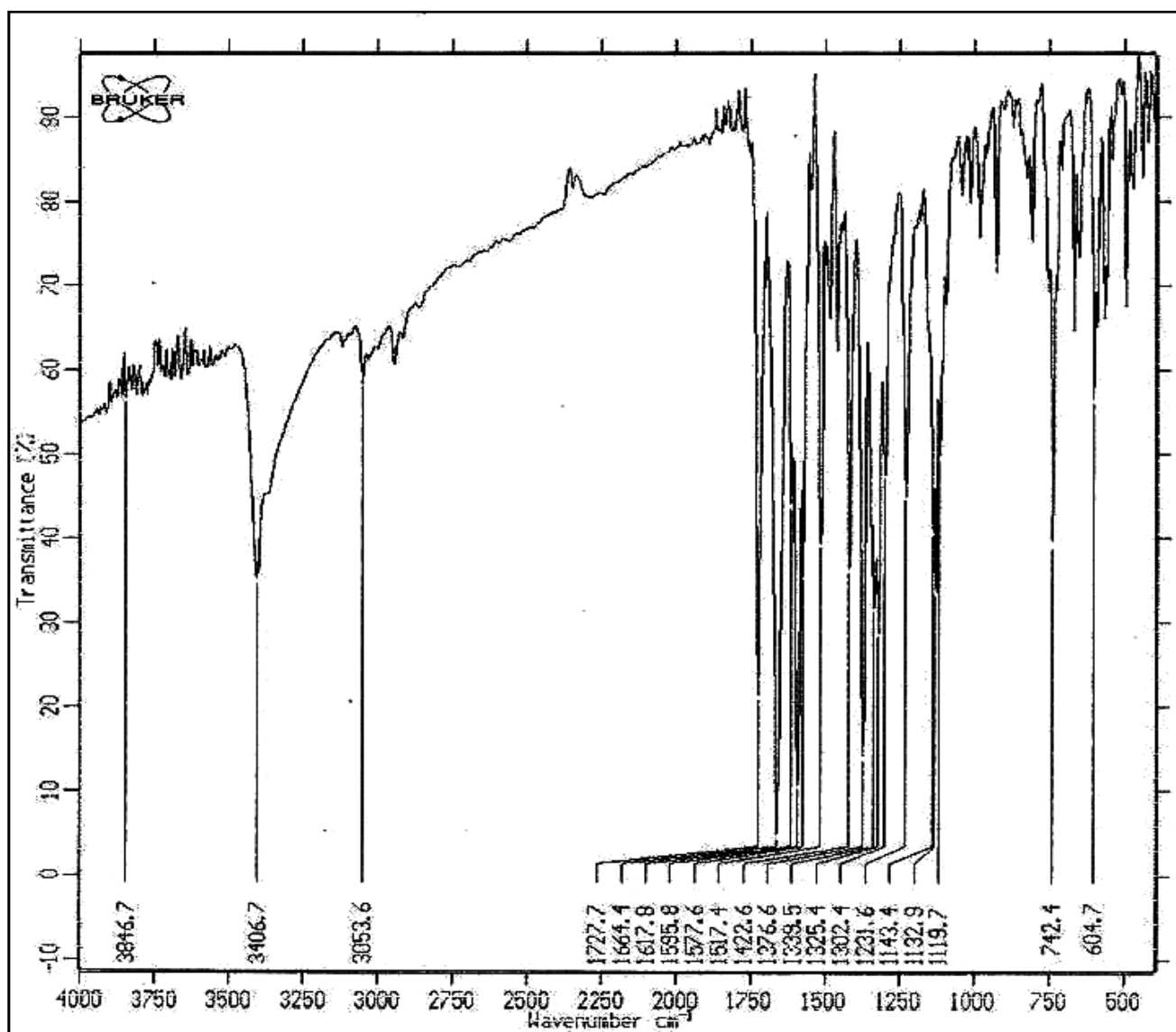
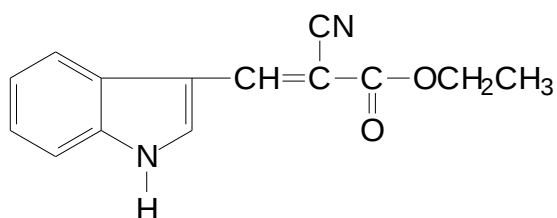


Figura 9 - Espectro de infravermelho do 5-(1H-indol-3-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-11)

1.1.2. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

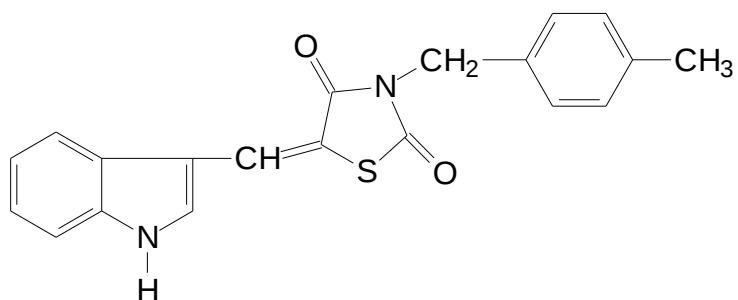
A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) permitiu confirmar as estruturas dos compostos sintetizados. Foram verificados os picos característicos dos hidrogênios presentes nos grupos CH=, CH₂, CH₃, NH e no anel aromático. Nas tabelas 3 e 4 encontram-se expressos, em ppm, os deslocamentos químicos observados para estes compostos. As figuras 10 e 11 ilustram os espectros dos derivados sintetizados.

Tabela 3 - Deslocamento químico (δ) do 2-ciano-3-(1H-indol-3-il)-acrilato de etila (LPSF/IP-19)



-CH=	-CH ₂	CH ₃	NH	Hidrogênios
(s)	(q)	(t)	(s)	Aromáticos
	J = 7,2 Hz	J = 7,2 Hz		
8,57	4,28	1,31	12,60	7,99 – 7,26 (5H, m)

Tabela 4- Deslocamento químico (δ) do derivado 5-(1H-indol-3-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-11)



-CH=	CH ₂	NH	OCH ₃	CH ₃	Hidrogênios Benzílicos	Hidrogênios Benzilidênicos
(s)	(s)	(s)	(s)	(s)		
7,82	4,79	9,09	-	2,27	7,92 (2H, d) J = 7,79 Hz 7,51 (2H, d) J = 7,79 Hz	7,29 – 7,14 (5H, m)

Solvente – DMSO-d₆ - Espectrofotômetro Varian modelo Unity plus-300 MHz

Solvente – DMSO-d₆ - Espectrofotômetro Varian modelo Unity plus-300 MHz

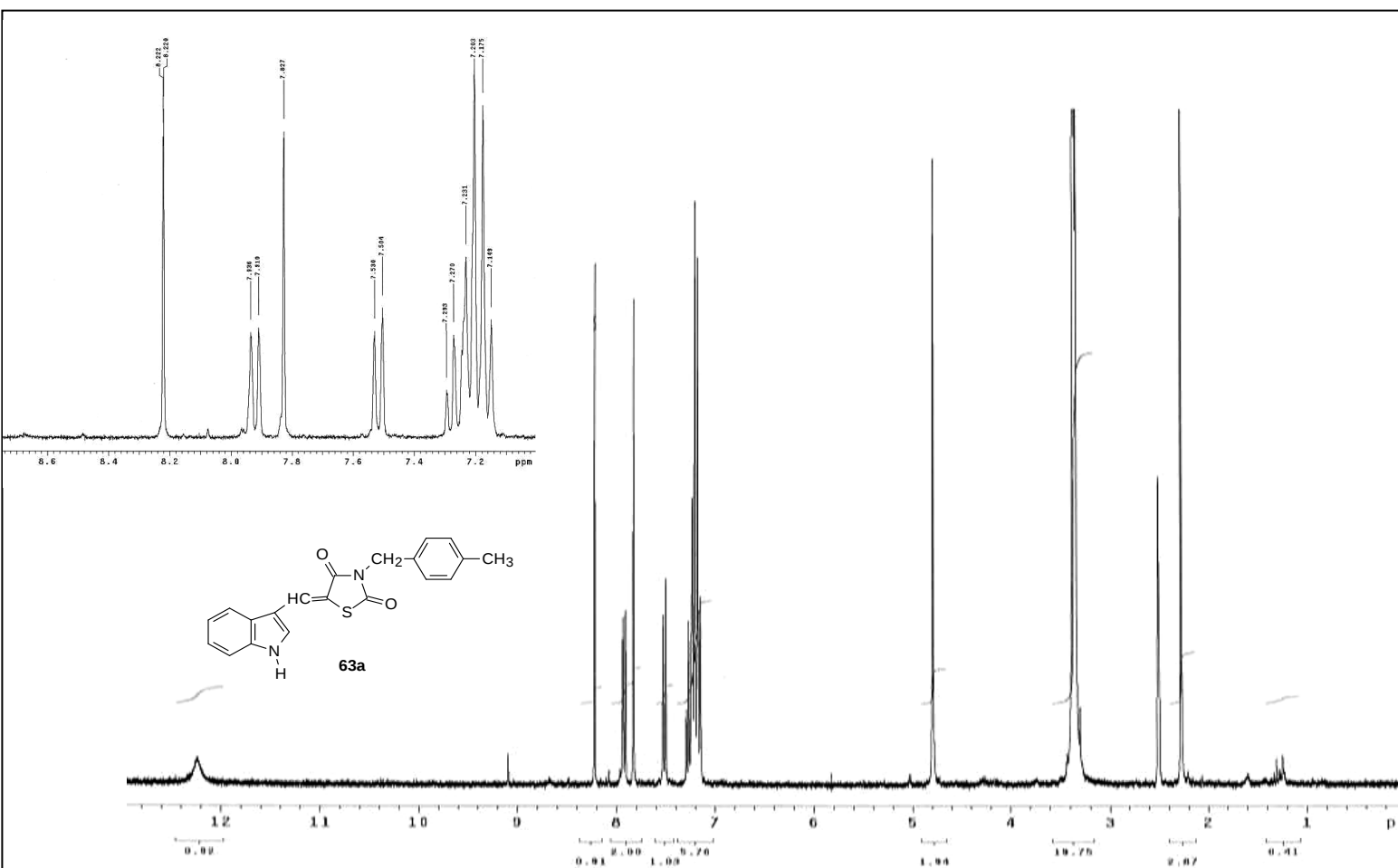


Figura 11- Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do 5-(1H-indol-3-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-11).

2.0. Efeito do tratamento com estreptozotocina

Os níveis de glicose observados nos animais tratados com STZ (42 mg/Kg, i.p.) foram significativamente elevados ($p < 0,001$) após 7 dias do tratamento quando comparado aos animais controle ($327,9 \pm 12,3$ vs $95,3 \pm 1,8$ mg/dL, respectivamente), configurando um quadro de hiperglicemia. 18,75% dos animais que foram tratados com STZ apresentaram níveis glicêmicos < 200 mg/dL, sendo descartados do protocolo.

A tabela 5 mostra os resultados das dosagens dos níveis plasmáticos de glicose e triglicerídeos antes e após o tratamento dos animais diabéticos com as TZDs associadas ou não a insulina.

O grupo diabético não tratado (D) apresentou níveis de triglicerídeos plasmáticos significativamente ($p < 0,0001$) elevados quando comparado aos demais grupos.

Foi verificado ainda, que o consumo de ração dos animais que receberam STZ foi significativamente elevados ($p < 0,001$), sendo de $48,04 \pm 0,8$ g para o grupo diabético vs $37,4 \pm 1,2$ g para o controle (Figura 12). Da mesma forma, a ingestão hídrica diária foi 4,3 vezes maior no grupo diabético ($209,0 \pm 6,1$ mL) quando comparado ao controle ($48,21 \pm 2,0$ mL). Esses resultados confirmam o quadro de polifagia e polidipsia, que são característicos do diabetes. (Figuras 12 e 13).

Tabela 5- Níveis plasmáticos de glicose e triglicerídeos dos grupos controle normoglicêmico, diabético (tratado com veículo) e diabéticos antes e após o tratamento com LPSF/GQ 11 (10 mg e 20 mg/Kg), insulina, LPSF/GQ11 (10 mg/Kg) associada à insulina (LPSF/ GQ- 11 + I) e rosiglitazona (10 mg/Kg).

Grupos	Glicose (mg/dL)		Triglicerídeos (mg/dL)	
	Antes	Pós	Antes	Pós
Controle normoglicêmico	95,3 ± 1,8	_____	76,6 ± 8,5	_____
Diabético	327,9 ± 12,3**	_____	764,5 ± 71,8 **	_____
LPSFGQ11 (10 mg/Kg)	226,7 ± 19,1	219,6 ± 31,6	89,5 ± 32,2	121,0 ± 19,6
LPSFGQ11 (20 mg/Kg)	257,5 ± 15,1	299,2 ± 46,1	119,5 ± 54,6	163,9 ± 52,0
Insulina	317,5 ± 14,1	50,1 ± 5,9 ^{††}	203,9 ± 12,4	191 ± 26,1
LPSFGQ11 (10 mg/Kg) + I	271,8 ± 21,8	59,9 ± 5,0 ^{††}	94,1 ± 21,4	98,0 ± 11,3
Rosiglitazona	291, 3 ± 10,6	413,9 ± 67,1 ^{††}	148,4 ± 13,9	167,5 ± 9,1

Os valores são expressos como média ± e.p.m; (Teste t de Student não pareado).** p < 0,0001 (diabético vs. controle) ; ^{††} p < 0,0001 (antes vs. pós tratamento)

3.0. Efeito do tratamento com tiazolidinadionas em monoterapia ou associada a insulina sobre a ingestão alimentar e hídrica de ratos diabéticos .

Conforme pode ser observado na Figura 14, nos grupos tratados apenas com GQ-11 (10mg/Kg), GQ-11 (10mg/Kg) associado a insulina e no grupo tratado apenas com Insulina, houve uma redução significativa ($p < 0,001$) no consumo de ração, retornando aos valores do grupo controle. Entretanto, não foi observado mudanças no consumo de ração dos animais tratados com rosiglitazona nem nos animais que receberam uma dose aumentada (20 mg) de LPSF/ GQ 11.

Em todos os grupos de diabéticos que receberam tratamento com TZDs ou com insulina, houve uma redução no consumo de água, porém esses níveis ainda permaneceram significativamente ($p < 0,001$) elevados quando comparados ao controle (Figura 15). Assim, o grupo tratado com insulina permaneceu com um consumo 3,5 vezes maior que o grupo controle e 20% menor quando comparada ao grupo diabético.

O grupo tratado com rosiglitazona consumiu 2,7 vezes mais água em relação ao grupo controle. Resultado muito semelhante foi observado no grupo tratado com LPSF GQ-11 (10mg/Kg), onde permaneceu 2,8 vezes maior em relação ao grupo controle. Comparando-se o grupo tratado com GQ-11 (10mg/Kg) com o grupo tratado com rosiglitazona e ao grupo tratado somente com insulina, não houve redução significativa na quantidade de água ingerida entre esses grupos ($p < 0,001$).

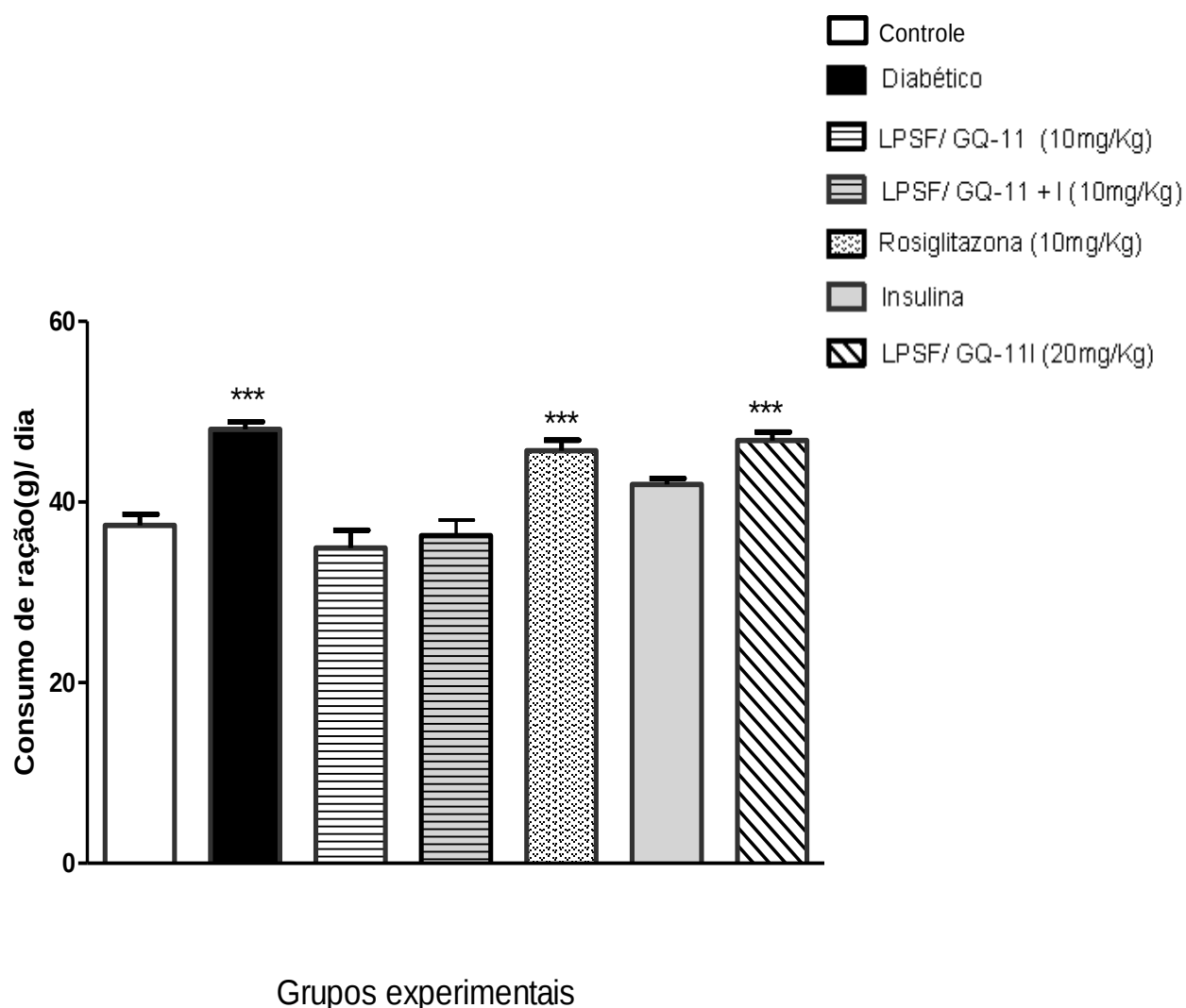


Figura 12 - Consumo diário de ração (g), ao longo dos 14 dias de tratamento, dos animais dos grupos: controle normoglicêmico (CN), diabético não tratado (D), diabético tratado com LPSF GQ-11 (10 mg/Kg), diabético tratado com LPSF GQ-11 (10mg/Kg) em associação com insulina , diabético tratado com rosiglitazona (10 mg/Kg), diabético tratado com insulina (I), diabético tratado com LPSF GQ-11 (20 mg/Kg). Os valores são expressos como média $\pm$ e.p.m; *** $p < 0.0001$). (Teste t de Student não pareado).

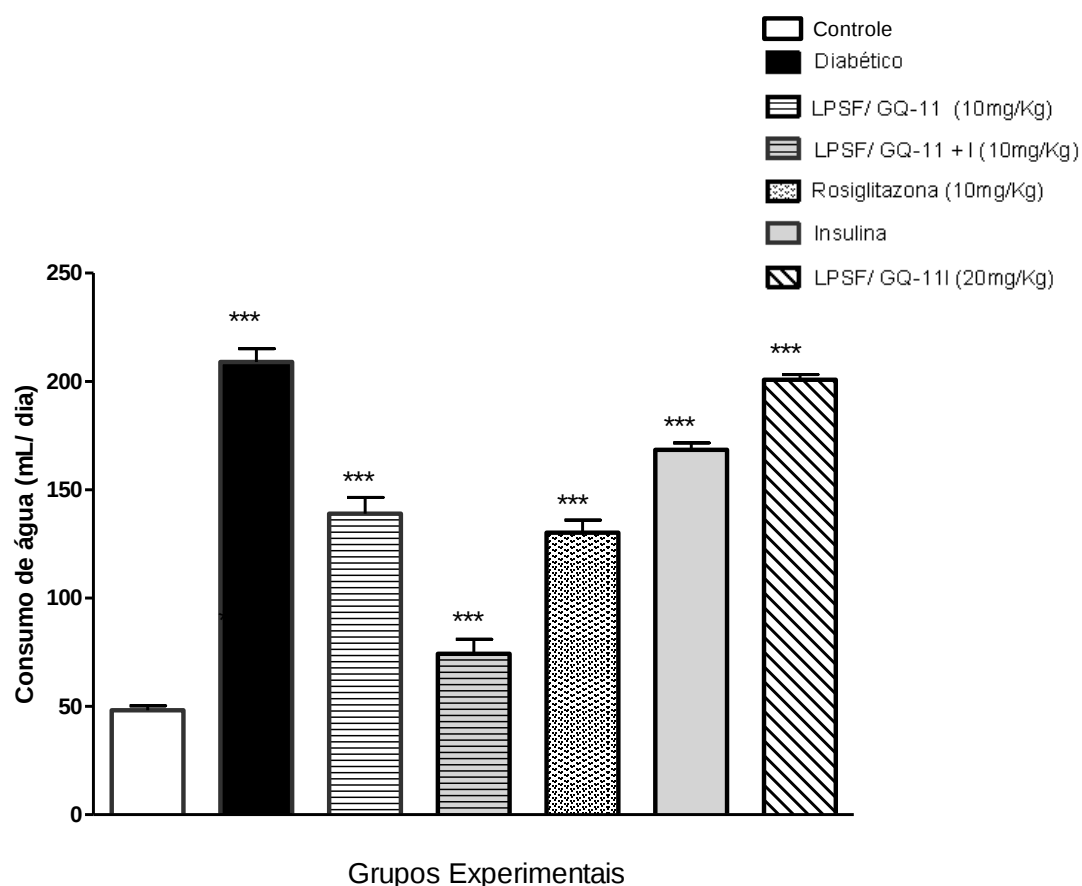


Figura 13 - Consumo diário de água (mL), ao longo dos 14 dias de tratamento, dos animais dos grupos: controle normoglicêmico (CN), diabético não tratado (D), diabético tratado com LPSF GQ-11 (10 mg/Kg), diabético tratado com LPSF GQ-11 (10mg/Kg) em associação com insulina , diabético tratado com rosiglitazona (10 mg/Kg), diabético tratado com insulina (I), diabético tratado com LPSF GQ-11 (20 mg/Kg). Os valores são expressos como média $\pm$ e.p.m; *** $p < 0.0001$). (Teste t de Student não pareado).

4.0. Efeito do tratamento com tiazolidinadionas em monoterapia ou associada a insulina sobre os níveis plasmáticos de glicose, triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL

Na tabela 5, pode ser observado que o tratamento com LPSFGQ11 na dose de 10 ou de 20 mg/Kg não modificou os níveis de glicose nem de triglicerídeos, entretanto quando a LPSF GQ11 foi associada a insulina houve uma redução (79%) significativa ($p < 0,005$) dos níveis de glicose, mas o nível de triglicerídeos permaneceu inalterado.

Na tabela 5, ainda observa-se que os níveis glicêmicos do grupo tratado com GQ11 (10mg/Kg) + I foram significativamente reduzidos ($p < 0,0001$) quando comparado aos níveis antes do tratamento, o mesmo se observou quando comparamos os níveis glicêmicos do grupo tratado com insulina (tabela 5). Os animais tratados com LPSF/GQ-11 na dose 10mg/Kg apresentaram uma redução nos níveis glicêmicos quando comparado ao grupo diabético não tratado sendo estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Após o tratamento dos animais diabéticos com o LPSF/ GQ-11 + I, observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis plasmáticos de triglicerídeos quando comparados ao grupo diabético não tratado. O mesmo se observou quando comparado o grupo tratado com LPSF/ GQ-11 10mg/Kg e o grupo tratado com insulina ($p < 0,05$). Porém, quando comparado ao grupo normoglicêmico, não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

Os animais diabéticos tratados com LPSF/ GQ-11 + I por 14 dias apresentaram um aumento significativo ($p < 0,01$) nos níveis plasmáticos de colesterol total, quando comparados aos seus níveis basais (tabela 6). Porém, quando comparados ao grupo normoglicêmico, mostrou uma redução significativa ($p < 0,05$), o mesmo se observou com o grupo tratado com LPSF/ GQ-11 na dose 20mg/Kg ($p < 0,05$), o qual reduziu significativamente estes valores quando comparados ao grupo normoglicêmico.

Os animais diabéticos tratados com LPSF/ GQ-11 + I apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis plasmáticos de colesterol HDL, quando comparados aos seus níveis basais (tabela 6).

Observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis plasmáticos do colesterol HDL do grupo tratado com LPSF/ GQ-11 10mg/Kg quando comparado ao grupo diabético não tratado, e um aumento significativo ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo tratado com GQ-11 20mg/Kg (tabela 6).

Tabela 6- Níveis plasmáticos de colesterol total e colesterol HDL basais dos animais controle e diabéticos e após o tratamento do diabetes com rosiglitazona (10 mg/Kg) LPSF/ GQ- 11 (10 mg e 20 mg/Kg), com LPSF GQ11 (10 mg/Kg) associada à insulina (LPSF/ GQ- 11 + I) e apenas com insulina.

Grupos	Colesterol total (mg/dL)		Colesterol HDL (mg/dL)	
	Antes	Pós	Antes	Pós
Controle normoglicêmico	76,3 ± 4,3	_____	54,9 ± 2,5	_____
Diabético	94 ± 11,4*	_____	24,5 ± 2,4 *	_____
LPSFGQ11 (10 mg/Kg)	61,0 ± 0,2	74,0 ± 5,6 [†]	43,0 ± 0,0	56,4 ± 3,2
LPSFGQ11 (20 mg/Kg)	51,2 ± 2,5	61,9 ± 15,7	31,3 ± 2,1	36,4 ± 2,2
Insulina	89,1 ± 21,0	67,4 ± 5,9 ^{††}	65,2 ± 15,5	45,3 ± 4,6
LPSFGQ11 (10 mg/Kg)+ I	30,4 ± 4,4	59,1 ± 4,0 [†]	36,8 ± 3,0	50 ± 1,8
Rosiglitazona	52,9 ± 8,5	56,5 ± 3,3	46,2 ± 5,5	47,8 ± 3,0

Os valores são expressos como média ± e.p.m; (Teste t de Student não pareado).** $p < 0,0001$ (diabético vs. controle) ; ^{††} $p < 0,0001$ (antes vs. pós tratamento)

Diante dos nossos resultados, não foi possível constatar a atividade hipoglicemiante do composto avaliado. Já na atividade hipolipidêmica foi possível observar aumento significativo nos níveis plasmáticos de HDL sendo 18,8% no grupo tratado com GQ-11 10mg/Kg e 12,33% no grupo tratado com GQ-11 20mg/Kg (tabela 6).

A hiperglicemia induzida por STZ tendeu a reduzir quando os animais foram tratados com LPSF/GQ-11- (10 e 20 mg/kg, v.o.), mas não atingiu valores significativos, entretanto os níveis de triglicérides foram

significativamente ($p < 0,05$) reduzidos, enquanto os níveis de colesterol HDL foram aumentados ($p < 0,01$) (Tabela 6).

5.0. Efeito do diabetes sobre o peso corporal em ratos tratados com tiazolidinadionas em monoterapia ou associada à insulina.

A variação da massa corporal dos ratos, em porcentagem, ao longo do período experimental, está apresentada na Figura 16. O grupo controle normoglicêmico incrementou sua massa corporal em 2,5%, já o grupo diabético perdeu 4,6% de peso corporal. No grupo tratado com insulina houve a perda de 3,7% de massa corporal durante os 14 dias de avaliação, já a combinação dos tratamentos com GQ-11 10mg/Kg + I impediu a perda e incrementou 8,33% da massa corporal.

Não houve diferença significativa entre pesos dos animais do grupo controle e os demais animais diabéticos tratados com TZDs e/ ou insulina durante os 14 dias, o mesmo se observou quando comparados o grupo diabético não tratado com os demais grupos ($p < 0,05$).

Porém todos os animais apresentaram diferença significativa entre seu peso inicial e final (tabela 3), com exceção dos animais do grupo GQ-11 10mg/Kg ($p > 0,05$) e do grupo tratado com insulina ($p > 0,05$).

Tabela 7- Variação do peso semanal de ratos do controle e diabéticos tratados com veículo, apenas com tiazolidinadiona (LPSF/ GQ- 11, 10 mg e 20 mg/Kg), com tiazolidinadiona (10 mg/Kg) associada à insulina (LPSF/ GQ- 11 + I), apenas com rosiglitazona (10 mg/Kg) e apenas com insulina, respectivamente.

em gramas dos animais diabéticos antes e depois do tratamento com as drogas

Grupos	Peso inicial	Peso final	Ganho em %
Normoglicêmico	278,7± 6,9	301,8±7,8***	2,5%
Diabético	321,4± 6,5	261,1± 9,9**	-4,6%
GQ-11 10mg/Kg	320,6± 8,6	338,6± 16,5	3%
GQ-11 20mg/Kg	329,9± 15,0	290,0± 6,2	-2,47%
GQ-11 10mg/Kg + I	257,2± 13,7	308,9±13,0***	8,33%
Rosiglitazona	302,6±16,2	280,3±16,8*	-2,25%
Insulina	321,7± 23,6	302,7± 15,6	-3,7%

Os valores são expressos como média ± e.p.m; n= 6; (Teste t de Student não pareado).

*Representa diferença estatística significativa em relação ao grupo CN (*p<0.05; **p<0.01;

***p< 0.0001).

6.0. Efeito do diabetes sobre os parâmetros anatômicos do coração dos ratos diabéticos tratados com tiazolidinadionas em monoterapia ou associada à insulina.

Quando comparamos os pesos do ventrículo úmido do grupo normoglicêmico com os demais grupos, diabéticos não tratados e diabéticos tratados, não observou-se diferença significativa ($p > 0.05$, teste t de Student não pareado).

Porém, quando comparamos os grupos diabéticos tratados com diabético não tratados, observou-se diferença significativa entre os grupos diabético e diabético tratado com insulina ($p < 0.05$, teste t de Student não pareado).

A relação peso do ventrículo úmido/ peso corporal e a relação do peso do coração seco/ peso corporal, não foi modificada ($p > 0.05$, teste t de Student não pareado) nos animais diabéticos quando comparados ao grupo normoglicêmico, com exceção do grupo tratado com rosiglitazona onde se observou um aumento significativo da relação ventrículo úmido/ peso corporal com relação ao grupo controle e com relação ao grupo diabético (na tabela 4).

Comparando-se a relação peso do ventrículo úmido/ peso corporal entre os grupos grupos diabéticos tratados com diabético não tratados, não se observou diferença significativa ($p > 0.05$, teste t de Student não pareado), com exceção do grupo tratado com rosiglitazona versus LPSF/GQ-11 20 mg/Kg, onde se observou-se um aumento significativo ($p < 0,01$) nestes valores.

Tabela 8- Comparação entre os parâmetros anatômicos dos animais controle e diabéticos tratados com veículo, apenas com tiazolidinadiona (LPSF/ GQ- 11, 10 mg e 20 mg/Kg), com tiazolidinadiona (10 mg/Kg) associada à insulina (LPSF/ GQ- 11 + I), apenas com rosiglitazona (10 mg/Kg) e apenas com insulina, respectivamente.

Grupos	Peso corporal final (g)	Peso do ventrículo úmido (mg)	Peso vent. Úmido (mg)/ peso corporal (g)	Peso do ventrículo seco (mg)	Peso vent. seco (mg)/ peso corporal (g)
Normoglicêmico	345,8 ± 0,2	864,9±21,6	2,5± 0,06	207,8± 3,3	0,60± 0,0
Diabético	281,4± 5,9	829,7± 41,4	2,7± 0,1	200,9± 27,1	0,7 ± 0,1
GQ-11 10mg/Kg	332,3±18,9	943,9± 54,8	2,8 ± 0,06	210,3± 9,9	0,6 ± 0,02
GQ-11 10mg/Kg +I	309.9 ± 11.3	852.8 ± 23.7	2,6± 0,1	190,0± 4,6	0,6 ± 0,03
Insulina	322 ± 20,3	1007± 43,3	2,7 ± 0,17	206,1 ± 13,6	0,6 ± 0,01
Rosiglitazona	270,9 ± 12,6	905,6± 51,4	3,3± 0,1	178,7± 2,7	0,6 ± 0,05
GQ-11 20mg/Kg	315,2 ± 9,8	874,6± 38,7	3,18 ± 0,2	200,8± 7,8	0,6 ± 0,02

V - DISCUSSÃO

A hiperglicemia é uma causa comum relacionada a doenças cardíacas, entre as quais a doença arterial coronariana. Vários estudos clínicos mostram que o controle da glicemia está associado à redução das complicações cardiovasculares que levam ao óbito no DM 1 (NATHAN et al., 2005). Níveis circulantes elevados de triglicerídeos e ácidos graxos não esterificados estão correlacionados a resistência insulínica que pode ter impacto na produção de lipoproteínas envolvidas na aterosclerose (MERTENS et al., 2002). Agonistas de PPAR-gama, tais como as TZDs, podem reduzir o nível de triglicerídeos e ácidos graxos não esterificados reduzindo o risco vascular, o que justifica o uso desta classe terapêutica no DM2. O efeito antidiabético das TZDs, está bem estabelecido. Embora, os tecidos alvos e o mecanismo da atividade farmacológica dessas drogas não sejam completamente compreendidos. As TZDs possuem alta afinidade pelos receptores PPAR γ (SPIEGELMAN, 1998), exercendo sua ação principal sobre a glicemia e secundariamente sobre o perfil lipídico.

As duas TZDs mais utilizadas clinicamente são a pioglitazona e a rosiglitazona, que parecem ter benefícios importantes no controle da glicemia em portadores do DM 2, redução da pressão arterial e redução do quadro inflamatório. Mas, alguns efeitos colaterais como hepatotoxicidade, aumento do colesterol LDL e edema, necessitam de esclarecimentos. Paradoxalmente, vários autores têm questionado a segurança cardiovascular e renal do uso da rosiglitazona. Alguns autores tem relacionado o uso de rosiglitazona no DM 2 ao declínio da função renal (FELDMAN et al., 2010) e ao infarto do miocárdio (NISSEN et al., 2007), o que justifica uma investigação mais acurada dos possíveis efeitos colaterais dessas drogas, bem como a busca de alternativas para o tratamento do diabetes.

No presente estudo nós testamos uma molécula candidata a fármaco hipoglicemiante denominada LPSF/GQ11. Essa molécula foi obtida a partir a partir de uma reação de N-alkilação da tiazolidina com haletos de alquila, seguida de Adição de Michael com intermediário de Cope. A

metodologia aplicada já se encontra instalada no laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do Departamento de Antibióticos, onde vários trabalhos já foram realizados (PITTA et al., 2007, SANTOS et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2005; BRANDAO et al., 2004).

A mesma foi testada no modelo animal com diabetes induzida por STZ em uma dose considerada baixa (42 mg/Kg), o que poderia simular um modelo de DM2, embora classicamente a STZ seja utilizada para induzir o DM1. Na dose que utilizamos os níveis glicêmicos foram superiores a 200 mg/dL, entretanto a resposta animal não foi homogênea e alguns animais apresentaram níveis glicêmicos acima de 350 mg/dL, o que caracteriza uma diabetes severa e portanto não responsiva as TZDs, o que justificou a retirada desses animais do protocolo experimental. Seria importante mensurar os níveis de insulina circulantes, para confirmar com exatidão se estaríamos trabalhando com DM 1 ou DM2.

A mensuração do consumo hídrico e alimentar permitiu confirmar o estado diabético, caracterizado por polifagia, polidipsia além de poliúria (dados não mostrados). Resultados que corroboram com os de outros autores (CALUWAERTS et al., 2003).

Os efeitos do LPSF/GQ 11 foram avaliados sobre os níveis de glicose, triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL, em monoterapia ou associado a insulina, e comparado ao padrão rosiglitazona. Desta forma foi possível observar que a modificação no núcleo tiazolidínico teoricamente deveria ter uma atividade melhor, entretanto nossos resultados não mostraram a atividade hipoglicemiante esperada neste modelo animal. É possível que o modelo de diabetes induzido por STZ, mesmo em dose considerada baixa, não se adeque ao “sring” de tiazolidinadionas. Em nossa equipe, foi utilizado anteriormente um modelo de diabetes experimental induzido por alloxana (uma droga citotóxica), onde se reproduz um modelo que apresenta níveis de toxicidade pancreática elevada com destruição das ilhotas de Langerhans, reduzindo drasticamente a insulina endógena, o que se assemelha a um quadro de DM 1. Provavelmente, um modelo que combine baixa dose de STZ (35 mg/Kg) com

dieta hiperlipídica, ou ainda indução do diabetes com STZ no período neonatal venha a ser um modelo mais promissor. Por outro lado a realização do docking, um estudo onde mostra o nível de interação do fármaco ao sítio ativo, seria bastante esclarecedor e facilitaria a comparação entre a molécula aqui utilizada e às anteriormente sintetizadas por nosso laboratório (MOURÃO, 2005; PITTA et al., 2007) .

Os animais dos grupos tratados com o derivado tiazolidínico LPSF/GQ-11 (10mg/Kg) associado com insulina e o grupo que recebeu apenas insulina, receberam doses de insulina de acordo com os níveis de glicose plasmática apresentado: Glicemia acima de 200 até 299 mg/dL, 4 U; Glicemia acima de 300 mg/dL, 6 U (MATAFOME et al., 2009).

Nossos estudos demonstraram que o tratamento dos ratos diabéticos com LPSF/GQ-11 (10mg/Kg) + I ou apenas com LPSF/GQ-11 (10mg/Kg) impediu a perda e incrementou a massa corporal durante os 14 dias de tratamento. Esses dados estão em concordância com outros estudos onde é associado à insulina ao tratamento com fármacos hipoglicemiantes (BUSE, 2000). O rápido ganho de peso observado em animais e humanos tratados com glitazonas parece ser em parte consequência da retenção de fluidos, e a formação de edema (ZHANG et al., 2005).

Entretanto, em nosso trabalho não identificado a presença de edema no coração. A relação peso úmido (mg)/peso corporal (g) não foi diferente entre os grupos diabéticos tratados, com exceção do grupo tratado com rosiglitazona, onde esta relação se mostrou aumentada quando comparada ao grupo normoglicêmico.

Os animais diabéticos tratados com insulina apresentaram perda de massa corporal durante os 14 dias de avaliação dados que estão de acordo com trabalhos da literatura como o de John Buse em 2000.

A combinação terapêutica de agentes orais com insulina é comum, e visa assegurar um excelente controle glicêmico (BUSE, 2000). É possível que esta nova TZD combinada com insulina reduza a porcentagem de hemoglobina glicada. E para isso seria necessária a dosagem no plasma.

SOHDA e colaboradores (1982) constataram que as várias tiazolidinadionas apresentavam propriedades hipoglicemiantes e hipolipidêmica. Neste contexto, os resultados aqui encontrados, através da avaliação dos novos derivados tiazolidínicos ratificam esta afirmativa, sugerindo uma interessante atividade hipolipidêmica.

No modelo utilizado, o novo derivado tiazolidínico, GQ-11 10mg/Kg, associado com insulina tem sido efetivo em normalizar os níveis plasmáticos de triglicerídeos e aumentou os níveis plasmáticos de colesterol HDL, o que pode ser um indicativo de melhoria do risco vascular nesses animais, entretanto investigações mais profundas necessitam ser realizadas.

Ainda é importante acrescentar no protocolo experimental rotineiro para a avaliação de novas tiazolidinadionas, exames histológicos de fígado, pâncreas, provas enzimáticas como TGO, TGP, ALT e provas funcionais.

Isto poderia atestar a segurança de novas moléculas, que através das diferentes estratégias, fundamentadas na Química Medicinal, permitiria obter novos derivados tiazolidínicos candidatos a fármacos antidiabéticos mais específicos e menos tóxicos.

VI. CONCLUSÕES

A rota sintética utilizada mostrou-se adequada para a preparação do derivado, o que ficou comprovado através dos métodos espectrofotométricos, apresentando bons rendimentos.

Observou-se uma melhora nos quadros de polifagia e polidipsia nos animais tratados com LPSF/GQ-11(10mg/Kg) em monoterapia e associado com insulina e no grupo tratado apenas com insulina.

Entretanto, testes realizados com o modelo de diabetes experimental induzidos por STZ, não mostraram atividade hipoglicemiante, embora tenha sido observado que o tratamento com o LPSF/GQ-11 aumentou os níveis de colesterol HDL, o que pode ser sugestivo de uma possível melhoria no risco vascular.

Assim, mais estudos com outros modelos experimentais, como os de resistência à insulina, podem ser importantes para se definir o papel deste candidato à fármaco na terapia do diabetes.

VII. PERSPECTIVAS

Os resultados promissores em relação à atividade hipolipidêmica do composto testado incitam novas investigações com aprofundamentos dos ensaios farmacológicos, utilizando outros modelos experimentais. Somado a isso, é importante acrescentar no protocolo experimental rotineiro para a avaliação de novas tiazolidinadionas, exames histológicos de fígado, pâncreas, provas enzimáticas como TGO, TGP, ALT e provas funcionais com o objetivo de melhor assegurar essas novas moléculas, associado com a identificação e otimização desta e de novas séries de compostos através das diferentes estratégias fundamentadas na Química Medicinal, obtendo-se novos derivados tiazolidínicos candidatos a fármacos antidiabéticos mais específicos e menos tóxicos.

VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.E. BUTLER, J. JANSON, S. BONNER-WEIR, R. RITZEL, R.A. RIZZA, P.C. Butler, Beta cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes, *Diabetes* 52 (2003) 102–110

ALBERTI, K.G., ZIMMET, P.Z., Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation 13, *Diabet. Med*; v. 15, p. 539–553, 1998.

ALBUQUERQUE, J.F.C.; ROCHA FILHO, J.A.; BRANDÃO, S.S.F.; LIMA, M.C.A.ANDRES, C. J.; BRONSON, J. J.; D'ANDREA, S. V.; DESHPANDE, M. S.; FALK, P. J.; GRANT-YOUNG, K. A.; HARTE, W. E.; HO, H. T.; MISCO, P. F.; ROBERTSON, J. G.; STOCK, D.; SUN, Y.; WALSH, A. W.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000,10, 715

ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; SILVA, T. G.; PITTA, M. G. R.; SILVA, A. C. A.; SILVA, P. G.; MALAGUENO, E.; SANTANA, J. V.; WANDERLEY, A. G.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; BARBE, J.; PITTA, I. R. Synthesis and schistosomicidal activity of new substituted thioxo-imidazolidine compounds. *Pharmazie* (2005)

BAILEY CJ, FLATT PR. Model for texting now hypoglicaemia drugs. En: Bailey CJ, Flatt PR, eds. New antidiabetic drugs. London: Smith Gordon. 1990; 65-82.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; Química Medicinal: as bases moleculares da ação de fármacos, ARTMED: Porto Alegre, 2001.

BRANDAO, S. S. F.; ANDRADE, A. M. C.; PEREIRA, D. T. M.; BARBOSA FILHO, J. M.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; BARBE, J. A novel

way of synthesis of 1,3,5-trisubstituted-2-thioxoimidazolidinones. Heterocyclic Communications (2004)

BERENGUER B. N., MORENO P., ESBRIT P., DAPIÁ S., CAEIRO J., CANCELAS J., MORA J., PEÑACARRILLO V., Effect of GLP-1 Treatment on Bone Turnover in Normal, Type 2 Diabetic, and Insulin-Resistant States
Received: 14 August 2008 / Accepted: 14 January 2009_ Springer
Science+Business Media, LLC 2009.

BRETZEL R, UNN T. Equivalence of basal insulin glargine vs prandial insulin lispro for glucose control in type 2 diabetes patients on oral agents-results of the APOLLO study. Diabetes. 2006; 55(Suppl 1). Abstract A326-OR.

BROWN, F. C.; Chem. Rev. 1961, 61, 463.

CARDOSO, E. C., FRANÇA, L. P., CHINEN, E., MORAIS A. F.S., FERREIRA, A. T., FRANÇA, J. P., Avaliação Morfológica e dos Mecanismos de Mobilização de Ca^{2+} pela Glicose e Acetilcolina em Células Pancreáticas Humanas. Arq Bras Endocrinol Metab 2007;51/3.

CHIEN, Y. W. Human insulin: Basic sciences to therapeutic uses. Drug Dev. Ind. Pharm., New York, v. 22, p. 753- 789, 1996.

CLAUDINO M, CEOLIN DS, ALBERTI S, CESTARI TM, SPADELLA CT, BULLEN I.R.F.R., GARLET GP. ASSIS GF. Alloxan-Induced Diabetes Triggers the Development of Periodontal Disease in Rats. 1320. doi:10.1371/journal.

COLLIONS A.R., MEEHAN W.P., KINTSCHER U., JACKSON, S.; S. WAKINO; COSYNS B., DROOGMANS S., WEYTJENS C., LAHOUTTE T., CAMP G. V., SCHOORS D., FRANKEN P. R., Effect of streptozotocin-induced diabetes on left ventricular function in adult rats: an in vivo Pinhole Gated SPECT study . *BioMed Central Ltd. Cardiovascular Diabetology* p. 6:30, 2007

COUTO, J.A. Novos Compostos 5-(4-metil-sulfonil-benzilideno)-imidazolidínicos e tiazolidínicos: Síntese, Elucidação Estrutural e Atividade Antiinflamatória. 2006. (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife. Brasil.

CRANE L., ANASTASSIADOU M., HAGE S. E., STIGLIANI J. L., BAZIARD-MOUYSSET G., PAYARD M., LEGER J. M., BIZOT-ESPIARD J-G., KTORZA A. , CAIGNARD D-H., RENARD P., Design and synthesis of novel imidazoline derivatives with potent antihyperglycemic activity in a rat model of type 2 diabetes *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, V. 14,p. 7419-7433, 2006.

DANDIA, A.; SINGH, R.; KHATURIA, S.; MÉRIENNE, C.; MORGANTC, G.; LOUPYD, A.; *Bioorg. Med. Chem.*, V. 14,p. 2409, 2006

DONNINI, D., ZAMBITO, A.M., PERRELA, G., AMBESI-IMPIOMBATO, F.S., CURCIO, F: Glucose may induce cell death through a free radical-mediated mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, V.15, p. 412-417, 1996.

FELDMAN L, SHANI M, EFRATI S, BEBERASHVILI I, BAEVSKY T, WEISSGARTEN J, VINKER S. Association between rosiglitazone use and decline in renal function in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Nephrol.* 2010 Feb 4.

GIACCARI, G., SORICE, G., MUSCOGIURI, G. Glucose toxicity: The leading actor in the pathogenesis and clinical history of type 2 diabetes e mechanisms and potentials for treatment . *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* V. 19, p. 365 e 377 ,2009.

GIRARD J., Glitazones et fonction pancréatique *Ann. Endocrinol.*, Ann. Endocrinol., 2005 ; 66, 2, Cahier 2: 1S18

GREG H TESCH and TERRI J ALLEN Methods in Renal Research Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy .*Nephrology*. V. 12, p.; 61–266, 2007.

GUILHERME A., VIRBASIS J. V., PURI V., CZECH M. P., Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes Nature reviews *Molecular cell biology* v. 9, 2008.

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/multimedia/adolescente/textos_comp/tc_06.html acesse em 27/01/2009 12h58 min World Health Organization 2009

<http://www.aace.com/meetings/consensus/dcc/pdf/dccwhitepaper.pdf> Acesso em 07/10/09 às 17h29 min

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem> acesso em 21/02/10 às 16h23 min

<http://www.diabetes.org.br/exames/535-hemoglobina-glicada-e-frutosamina> acesso em 07/10/09 às 16h45 min

HAMZA, N.; GIATH, ABDALL; IBRAHIM, M. N. Reaction of 3 indolylmethylenecyanoacetic acid ethylester with 2-phenyl-5-oxazolone and 3-methyl-1-phenyl-pyrazolin-5-one via Michael addition. *Asian Journal of Chemistry* (2002)

HUANG, Q. L., JIN, Y., ZHANG, L. N., CHEUNG, P. C. K., & KENNEDY, J. F. Structure, molecular size and antitumor activities of polysaccharides from *Poria cocos* mycelia produced in fermenter. *Carbohydrate Polymers*, V. 70, p.324–333, 2007.

INZUCCHI, S.E. Tratamento Anti-hiperglicêmico Oral do Diabetes Tipo 2. *Jama Brasil*. V. 6, p.; 894-904, 2002.

IZQUIERDO E. S., MALPARTIDA K. G., MIJARES. Y A. H., Tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 con insulina. *Endocrinol Nutr*; v. 55(Supl 2), p. 53-7, 2008.

JOHN BUSE. Combining Insulin and Oral Agents .*Am J Med.*; v. 108(6A), p. 23S–32S, 2000.

JUNGERS, P., MASSY, Z. A., NGUYEN, K. T., FUMERON, C., LABRUNIE, M., LACOUR, B., SCAMPS-LATSCHA, B., & MAN, N. K. Incidence and risk factors of atherosclerotic cardiovascular accidents in predialysis chronic renal failure patients: A prospective study. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, v.12, p. 2597–2602, 1997.

KAHN S. E. The relative contributions of insulin resistance and β -cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia*; v. 46, p. 3–19 , 2003.

KAHN. S. E. The importance of β cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*; v. 86 , p. 4047-58, 2001.

KAKLEAS K., KANDYLA B., KARAYIANNI C., KARAVANAKI K., Psychosocial problems in adolescents with type 1 diabetes mellitus *Diabetes & Metabolism* Received 19 July 2008; received in revised form 11 May 2009; accepted 11 May 2009.

KAVITHA, C. V.; BASAPPA; NANJUNDA, S. S.; MANTELINGU, K.; DORESWAMY, S.; SRIDHAR, M. A.; PRASAD, J. S.; RANGAPPA, K. S.; *Bioorg. Med. Chem.*; v.14, p. 2290, 2006.

LAKEY JRT, KENNEDY RT. Insulin-stimulated insulin secretion in single pancreatic beta cells. *J Biol Chem* ; v. 274(10), p. 6360-5, 1999.

LAURENT ST, DEDONG D R.; - WU, SERRANO-WU Q. G., M. H.; *Tetrahedron Lett*; v. 45, p. 1907, 2004.

LAW R.E., MEEHAN W.P., GRAF K. ; WUTHRIC, D.A., COATS W., *J. Clin. LEHMANN J.M., MOORE L.B., SMITH-OLIVER T.A., WILKISON W.O., WILSON T.M., KLIEWER S.A., J. Biol. Chem*; v. 270 , p.12953–12956,1995.

LEITE, L. F. C. C.; VIDAL, S. ; VIEIRA, E. S.; HERNANDES, M. Z. ; GALDINO, SUELY LINS ; LIMA, MARIA DO CARMO ALVES DE ; MOURÃO, R. H. V. ; BARBE, JACQUES ; PITTA, IVAN DA ROCHA . Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling Studies of Thiazolidinediones with Potential Hypoglycemic and Hypolipidemic Activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, França, v. 42, p. 1263-1271, 2007.

LEKHOLM U. The use of osseointegrated implants in growing jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants*; v.8, p. 243-4, 1993.

LUDWIG S, DHARMALINGAM S, ERICKSON-NESMITH S, REN S, ZHU F, MA G Impact of simvastatin on homeostatic and fibrinolytic regulators in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* ; v.70, p.110–118, 2005.

LUU-DUC, C. Synthesis and antimicrobial activity of substituted imidazolidinediones and thioxoimidazolidinones. *Il Farmaco*, v. 54, p. 77-82, nov. 1999.

MAASSEN J. A., ROMIJN J. A., HEINE R. J. Fatty acid-induced mitochondrial uncoupling in adipocytes as a key protective factor against insulin resistance and beta cell dysfunction: a new concept in the pathogenesis of obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*; v. 50, p. 2036–2041, 2007.

MAEDA, C.Y., FERNANDEZ, T.G.. Streptozotocin diabetes modifies arterial pressure and baroreflex insensitivity in rats. *J. Med. Bio*; .v. 28(4), p. 497-

501,1995.

MALAISSSE, W.J.: Alloxan toxicity to the pancreatic β -cell. *Biochem. Pharmacol*; v.31,p. 3527-3534, 1982.

MARTENS FM, VISSEREN FL, LEMAY J, DE KONINGE J, RABELINK TJ. Metabolic and additional vascular effects of thiazolidinediones. *Drugs*. 62:1463–1480,2002.

MATAFOME, P., NUNES, E., LOURO, T., AMARAL, C., CRISÓSTOMO, J., RODRIGUES, L., A MOEDAS., MONTEIRO, P., CIPRIANO, A., SEIÇA, R. A role for atorvastatin and insulin combination in protecting from liver injury in a model of type 2 diabetes with hyperlipidemia. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*; v. 379, p. 241 251, 2009.

MCAULAY V, FRIER BM Insulin analogues and other developments in insulin therapy for diabetes. *Expert Opin Pharmacother* . v.4, p. 1141-1156, 2003.

MCNEILL JH, YUEN, VG, DAI, S, ORVIG C. Increased potency of vanadium using organic ligands. *Molecular and Cellular Biochemistry*; v. 153, p. 175-180, 1995. *Medicinal Chemistry Letters*; v. 14, p. 567–574, 2006.

MING M., GUANHUA L., ZHANHAI Y., GUANG C., XUAN Z., Effect of the Lycium barbarum polysaccharides administration on blood lipid metabolism and oxidative stress of mice fed high-fat diet in vivo *Elsevier Ltd. Food Chemistry* ; v.113 , p.872–877 , 2009.

MOURÃO, R. H. V.; SILVA, T. G. ; SOARES, A. L. M. ; VIEIRA, E. S. ; SANTOS, J. N. ; LIMA, M. C. A ; LIMA, V. L. M. ; GALDINO, S. L.; BARBE, Jacques ; PITTA, I. R. . Synthesis and biological activity of novel acridinylidene and benzylydene thiazolidinediones. *European Journal of Medicinal Chemistry, França*; v. 40, n. 11, p. 1129-1133, 2005.

Paula, M.J.D.

NAKANO K, SUGA S, TAKEO T, OGAWA Y, SUDA T, KANNO T, et al. Intracellular Ca^{2+} modulation of ATP-sensitive K^{+} channel activity in acetylcholine-induced activation of rat pancreatic β -cells. *Endocrinology*; v. 143(2), p. 569-76, 2002.

NATHAN DM, CLEARY PA, BACKLUND JY, GENUTH SM, LACHIN JM, ORCHARD TJ, RASKI NP, ZINMAN B. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 353: 2643–2653, 2005.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 41, n. 2, abr./jun., 2005

NISSEN SE, WOLSKI K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 356 (24):2457–2471, 2007.

NOH G; et al., *Arterioscl, Throm. Vasc. Biol*. V.21, p. 365–371, 2001.

OLIVEIRA S. M., SILVA J.B.P., HERNANDES M.Z., LIMA M.C.A., GALDINO S.L., PITTA I.R., Estrutura, Reatividade e Propriedades Biológicas de Hidantoínas *Quim. Nova*; v.31, No. 3,p. 614-622, 2008.

PELLECCHIA, M.; SEM, D. S.; WUTHRICH, K.; *Nat. Rev. Drug Discovery* ; v.1, p. 211, 2002.

PETERS A.L., *Am. J. Manag. Care*; v. 7, p. 587–595, 2001.

PHIELIX E., MENSINK M. Type 2 Diabetes Mellitus and Skeletal Muscle Metabolic Function *Physiology & Behavior*, v. 94, p.252–258, 2008.

PITTA, I. R.; GALDINO, S. L.; LIMA, M. C. A. Preparation of 2,4-thiazolidinedione derivatives having hypoglycemic activity. *Braz. Pedido PI* (2007).

RAKOWITZ, D.; MACCARI, R.; OTTANÀ, R.; VIGORITA, M.G. In vitro aldose reductase inhibitor activity of 5-benzyl-2,4-thiazolidinediones. *Bioorganic & SALTIEL A.R., OLEFSKY J.M., Diabetes*; v.45, p. 1661–1669, 1996.

SANTOS, L.C.; UCHOA, F.T.; CANAS, A.R.P.A.; SOUSA, I.A.; MOURA, R.O.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; BARBE, J. Synthesis and anti-inflammatory activity of new thiazolidine-2,4-diones, 4-thioxothiazolidinones and 2- thioxoimidazolidinones . *Heterocyclic Communications*, v. 11(2), p. 121-128, 2005.

SESTI G., Pathophysiology of insulin resistance *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* Vol. 20, No. 4, pp. 665-679,2006.

SHIMABUKURO M, ZHOU YT, LEVI M, UNGER RH. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* ; v. 95, p. 2498-502, 1998.

SHIMADA A., KANAZAWA Y., MOTOHASHI Y., YAMADA S., MARUYAMA T., IKEGAMI H., AWATA T., KAWASAKI E., KOBAYASHI T., NAKANISHI K., KAWABATA Y., SUSUMU K., UGA M., TANAKA S. Evidence for association between vitamin D receptor BsmI polymorphism and type 1 diabetes in *Japanese Journal of Autoimmunity*; v. 30 , p. 207e211, 2008.

SILVA, C., RIBEIRO, A., FERREIRA, D., VEIGA, F., *Revista Administração oral de peptídios e proteínas: III. Aplicação à insulina Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*; v. 39, n. 1, 2003

SINGH, S. P.; Parmar, S. S.; Raman, K.; *Chem. Rev.* 1981, 81, 175.

SKYLER JS, ODDO C. Diabetes trends in the USA. *Diabetes Metab Res Ver*; v. 18 Suppl 3, p. S21-26, 2002.

SOHDA T, MIZUNO K. Studies on antidiabetic agents. II. Synthesis of 5[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)-benzyl]thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878) and its derivatives. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*; v. 30(10), p.3580-600,1982.

STAFYLAS P. C., SARAFIDIS P. A., LASARIDIS A. N., The controversial effects of thiazolidinediones on cardiovascular morbidity and mortality *International Journal of Cardiology*; v. 131, p.298–304, 2009.

TENÓRIO, R. P.; CARVALHO, C. S.; PESSANHA, C. S.; LIMA, J. G.; DE FARIA, A.R.; ALVES, A. J.; MELO, E. J. T.; GÓES, A. J. S.; *Bioorg. Med. Chem. Lett*; v.15 p. 2575, 2005.

TESCH, G. H., ALLEN T. J., Methods in Renal Research Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy *nephrology*; v. 12, p.261–266, 2007.

TREHAN, A.; ALI, A. Recent approaches in insulin delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, New York; v. 24, p. 589-597, 1998.

TZELLOSA T. G., TAHMATZIDISA D. K., LALLASA A., APOSTOLIDOUA K., GOULISB D. G., Pernicious anemia in patient with Type 1 diabetes mellitus and alopecia areata universalis. *Journal of Diabetes and Its Complications* ; v. 23 p. 434–437, 2009.

UCHÔA, F.D.T. Síntese e avaliação da atividade antiinflamatória de 5-benzilideno-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-dionas. 2004. (Mestrado em 102 Biotecnologia de Produtos Bioativos) Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife. Brasil.

WERMUTH, C. G.; The Practice of Medicinal Chemistry, 2nd ed., *Academic*
WONG K. K., TZENG ES. Appearance of different diabetic symptoms after streptozocin administration: a comparison study. *Biochem Mol Biol Int*; v. 30, p.1035-41,1993.

XIMENES, E.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; CHANTEGREL, J.; PERRISSIN, M.; ZHANG R., REISIN E. Obesity-Hypertension: The Effecton Cardiovascular and Renal Systems. *American Journal of Hypertension, Ltd Published by Elsevier Science, Inc. AJH* ; v. 13, p. 1308–1314, 2000.

YADAV, ANUPAMA; YADAVA, V. S. Nucleosides of novel heterocyclic bases. *Himalayan Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (1998)

YADAV, JHILLU S.; REDDY, BASI V. SUBBA; BASAK, ASHOK K.; VISALI, BODDAPATI; NARSAIAH, AKKIRALA VENKAT; NAGAIAH, KOMMU. Phosphane-catalyzed Knoevenagel condensation: A facile synthesis of a-cyanoacrylates and a-cyanoacrylonitriles. *European Journal of Organic Chemistry* (2004)