

Thaís Alves Fernandes

**ESTUDO DO EFEITO E DO MECANISMO DE AÇÃO DE
CHALCONAS DERIVATIVAS NA SECREÇÃO DE INSULINA:
ILHOTAS PANCREÁTICAS**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós Graduação em
Bioquímica da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica.

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Fátima
Regina Mena Barreto Silva.

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Fernandes, Thaís Alves

Estudo do efeito e do mecanismo de ação de
chalconas derivativas na secreção de insulina:
ilhotas pancreáticas / Thaís Alves Fernandes ;
orientador, Fátima Regina Mena Barreto Silva, 2018.
79 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

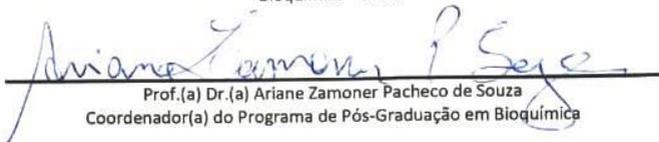
1. Bioquímica. 2. Chalconas. 3. Insulina. 4.
Mecanismo de ação . 5. Cálcio. I. Silva, Fátima
Regina Mena Barreto. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica. III. Título.

"Estudo do efeito e do mecanismo de ação de chalconas derivativas na secreção de insulina: ilhotas pancreáticas"

Por

Thais Alves Fernandes

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (016/2018/PPGBQA) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.


Prof.(a) Dr.(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:


Dr.(a) Fátima Regina Mena Bärreto Silva (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)


Dr.(a) Kátia Padilha Barreto (Universidade Federal de Santa Maria)


Dr.(a) Fabiana Ourique da Silva (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr.(a) Joana Margarida Nivalho Gaspar (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 01 de agosto de 2018.

Dedico este trabalho aos meus queridos pais Marta Regina Alves Pereira e Vitalino Fernandes de Oliveira que sempre me apoiaram e se fizeram presentes com atenção e carinho independente da distância física. E aos meus avós Lucila Brandão, Roberto Alves Pereira e Olga Oliveira que sempre admirei pela força, persistência e generosidade que tinham em vida e que levarei para sempre comigo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Vitalino Fernandes de Oliveira e Marta Regina Alves Pereira, pelo amor incondicional, incentivo e por sempre me apoiarem.

À minha orientadora, Prof(a). Dr(a). Fátima R. M. B. Silva pela oportunidade, incentivo, confiança, apoio, generosidade e por todo aprendizado adquirido durante esses anos.

Ao Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade na avaliação deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais pela amizade e momentos de agradável convivência. Em especial à Renata Gonçalves, à Paola Sulis e à Diana Rey que me ensinaram e auxiliaram nas técnicas desenvolvidas ao longo desses anos, além da amizade e carinho. E a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas e amigos que apoiaram, e estiveram presentes em momentos bons e compartilharam experiências ao longo desta caminhada, em especial à Mônica Wessner, Tânila Simiski e Andreia Narciso.

Ao meu amigo Gabriel Fraga por todo apoio, incentivo e carinho.

Ao Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk pela disponibilidade e compartilhamento do uso de equipamentos.

Ao LAMEB pela disponibilidade e utilização dos equipamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, por ter oportunizado a realização deste trabalho.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Mas é do buscar e não achar que nasce o que eu não conhecia, e que instantaneamente reconheço”. (Clarice Lispector, 1964)

RESUMO

As chalconas apresentam uma variada atividade biológica, devido as diferentes possibilidades de substituintes funcionais ligados aos anéis benzênicos (A e B). Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito e mecanismo de ação da (2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(3',4'- dimetóxi-fenil)-2-propen-1-ona (chalcona P9) na secreção de insulina nas ilhotas pancreáticas. Foram utilizados ratos *Wistar* machos de 49 dias de idade para ensaios em músculo esquelético e de 90 dias de idade para isolamento das ilhotas pancreáticas. Após dissecado, o músculo sóleo foi submetido ao ensaio de captação de glicose na ausência das chalconas (controle) e na presença da chalcona P9 (1 nM; 10 nM e 1 µM; 10 µM) ou da L38 (1 nM, 1 µM). Após o isolamento foram realizados ensaios de influxo de cálcio na ausência da chalcona (controle) e na presença da chalcona P9 (0.1 nM; 1 nM; 10 nM; 100 nM e 1 µM; 10 µM), nos tempos de 30; 60; 600 e 900 segundos. Foi escolhida a concentração de 1 nM e o tempo de 600 segundos de incubação para realização dos ensaios, a fim de investigar o mecanismo de ação da chalcona na secreção de insulina. Foram utilizados inibidores/ativadores de canais iônicos (glibenclamida 20 µM; diazoxide 250 µM; nifedipina 1 µM), quelantes de cálcio (BAPTA-AM 50 µM) e inibidor de proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) (PD98059 50 µM) com o objetivos de estudar as vias de sinalização intracelulares mediadas pela chalcona. Foi também realizado ensaio de captação de glicose nas ilhotas pancreáticas na ausência da chalcona (controle) e na presença da chalcona P9 (1 nM). Além disso, foi realizado um ensaio de secreção de insulina estática induzida nas ilhotas pancreáticas. A chalcona P9 estimulou o influxo de cálcio através do fechamento de canais de potássio dependentes de ATP por uma via semelhante a da glibenclamida, pela abertura de canais de cálcio dependentes da voltagem e com a participação do cálcio dos estoques e da proteína cinase cinase ativada por mitógenos (MEK). Além disso, o efeito da P9 nesta via de sinalização induzida pelo cálcio culminou na secreção de insulina em ilhotas pancreáticas reforçando o papel secretagogo desta chalcona.

Palavras chave: chalconas; secreção de insulina, hiperglicemia, influxo de cálcio, ilhotas pancreáticas.

ABSTRACT

Chalcones are compounds widely found in plants that are important intermediaries and the final product of flavonoid biosynthesis. Such compounds present a variety of biological activities due to different possibilities of functional substitutes connected to benzene rings (A and B) present in the compound. It has been reported that some isolated chalcone classes and synthetic chalcones influenced in carbohydrate metabolism, especially glucose metabolism. This work aimed to study the action mechanism of [(2*E*)-3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-1-(3',4'-dimethoxy-phenyl)-2-propen-1-one] (chalcone P9) in insulin secretion from pancreatic islets. Male 49 day-old *Wistar* rats were used for skeletal muscle test and 90 day-old were used for isolation of pancreatic islets. After removal and cleaning of the soleus muscle, it was subjected to the glucose uptake assay in the absence of chalcones (control) and in the presence of chalcone P9 (1 nM; 10 nM and 1 μM; 10 μM) or L38 (1 nM, 1 μM). After isolation, calcium influx trials without chalcone (control) and with chalcone P9 (0.1 nM; 1 nM; 10 nM; 100 nM and 1 μM; 10 μM) at 30; 60; 600 and 900 seconds were performed. The concentration of 1 nM (P9) and the time of 600 seconds were chosen for the trial in order to verify possible chalcone action mechanisms in insulin secretion. Ionic channel inhibitors/activators (20 μM glibenclamide, 250 μM diazoxide, 1 μM nifedipine), calcium quelantants (BAPTA-AM 50 μM), and mitogen-activated protein kinases inhibitor (MAPK) (PD98059 50 μM) were used with the objective of studying the intracellular signaling pathway mediated by chalcone. Glucose uptake assay was also performed on pancreatic islets in the absence of chalcone (control) and in the presence of chalcone P9 (1 nM). Furthermore, a trial with static insulin secretion induced in the pancreatic islets was done. Chalcone P9 stimulated the calcium influx through the activation of potassium channels dependent on ATP by a pathway similar to glibenclamide, calcium channels dependent on voltage, and with the participation of the calcium from the storages and extracellular mitogen-activated protein kinase kinase (MEK). Also, the effect of P9 in that signaling pathway induced by calcium culminated in insulin secretion in the pancreatic islets, reaffirming the secretagogue effect of that chalcone.

Keywords: chalcones, insulin secretion, hyperglycemia, calcium influx, pancreatic islets.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura fundamental das chalconas (2E)-1,3-difenilprop-2-en-1-ona.....	18
Figura 2 - Rota de biossíntese das chalconas e flavonoides	19
Figura 3 - Esquema geral da condensação de Claisen-Schmidt	20
Figura 4 - Biossíntese e secreção de insulina	26
Figura 5 - Secreção bifásica de insulina estimulada por glicose	27
Figura 6 – Mecanismo geral de secreção de insulina	29
Figura 7 - Sinalização Insulínica	32
Figura 8 - Estrutura química da glibenclamida e da glipizida.....	34
Figura 9 - Procedimento geral para as chalconas com grupamento 3,4-metilenodioxi.....	40
Figura 10 - Estrutura química de chalconas derivativas, (A) (2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(3',4'-dimetoxi-fenil)-2-propen-1-ona e (B) (2E)-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-3-(3,4-dimetoxi-fenil)-2-propen-1-ona); (C) curva concentração-resposta das chalconas derivativas na captação de [U- ¹⁴ C]-2-Deoxi-D-glicose no músculo sóleo.....	48
Figura 11 - Curva de tempo da chalcona (2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(3',4'-dimetoxi-fenil)-2-propen-1-ona) no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas.....	50
Figura 12 - Curva concentração- resposta da chalcona (2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(3',4'-dimetoxi-fenil)-2-propen-1-ona) no influxo de cálcio nos tempos (A) 30 segundos, (B) 60 segundos e (C) 600 segundos.....	51

Figura 13 – Estrutura química da glibenclamida (A) e a influência de um bloqueador de canal de potássio no efeito estimulatório da chalcona derivativa no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas (B)	53
Figura 14 – Estrutura química do diazoxide (A) e a influência de um ativador de canal de potássio no potencial estimulatório da chalcona derivativa no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas (B)	54
Figura 15 - Efeito da chalcona derivativa na captação de [U- ¹⁴ C]-2-Deoxi-D-glicose em ilhotas pancreáticas.....	55
Figura 16 – Estrutura química da nifedipina (A) e a influência de um bloqueador de canal de cálcio na ação estimulatória da chalcona derivativa no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas (B)	56
Figura 17 – Estrutura química do BAPTA-AM (A) e a influência de um quelante de cálcio intracelular no potencial estimulatório da chalcona no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas (B)	57
Figura 18 – Estrutura química do PD98059 (A) e a influência do PD98059 na ação estimulatória da chalcona derivativa no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas (B)	59
Figura 19 – Estrutura química da glipizida (A) e o efeito da chalcona derivativa e da glipizida na secreção de insulina estática em ilhotas pancreáticas (B)	60
Figura 20 - Mecanismo de ação proposto para a chalcona (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)-1-(3',4'-DIMETOXI-FENIL)-2-PROPEN-1-ONA na secreção de insulina.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios laboratoriais para diagnóstico de normoglicemia, pré-diabetes e diabetes melito adotados pela Sociedade Brasileira de Diabetes.....	22
Tabela 2 - Diferentes características da diabetes melito tipo 1 e tipo 2	24
Tabela 3 – Estrutura química do núcleo fundamental e chalconas derivadas do 3,4-metilenodióxi-benzaldeído.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HD - 4-hidroxerricina

AC - Adenilato ciclase

ADP - Adenosina difosfato

Akt - Proteína cinase B

AMPc - Adenosina monofosfato cíclico

ATP - Adenosina trifosfato

AGEs - Produtos finais de glicação avançada

AS160 - Proteína substrato de Akt de 160 kDa

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CCDV - Canais de cálcio dependentes de voltagem

^{14}C -DG - [^{14}C]-2-Deoxi-D-glicose

DAG - Diacilglicerol

DDP-4 - Dipeptidil peptidase IV

GLP-1 - Peptídeo semelhante ao glucagon

GLUTs - Transportadores de glicose

GMPc - Guanina monofosfato cíclico

GSK3 - Proteína glicogênio sintase cinase 3

IP3 - 1,4,5-inositol trifosfato

IRSs - Substrato do receptor de insulina

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada

K_{ATP} - Canal de potássio sensível a ATP

K_{IR} - Canal de potássio retificador interno

KRb - Krebs-Ringer bicarbonato

L38 - (2E)-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-3-(3,4-dimetoxi-fenil)-2-propen-1-ona)

LHTS - Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais

M - Molar

MAPK - Proteína cinase ativada por mitógenos

MEK - Proteína cinase cinase ativada por mitógenos.

mTORC2 - Proteína alvo da rapamicina em mamíferos complexo 2

P9 - (2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(3',4'- dimetóxi-fenil)-2-propen-1-ona

PDKs - Proteínas cinase dependente de 3-fosfoinositídeos

PI3K - Fosfatidil-inositol-3-cinase

PKA - Proteína cinase A

PKB - Proteína cinase B

PKC - Proteína cinase C

PLC - Fosfolipase C

PPAR γ - Receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissoma.

PRS - Partícula de reconhecimento de sinal

PTP 1B - Proteína tirosina fosfatase 1B

RI - Receptor de insulina

SGLTs - Transportadores de glicose dependentes de sódio

SNAREs - Receptores de ligação ao fator solúvel sensível à N-Etilmaleimida

SUR - Receptor de sulfoniluréia

SUR1 - Subunidade receptora de sulfoniluréia

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

VAMP - Proteína de membrana associada à vesícula

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	CHALCONAS	17
1.2	HIPERGLICEMIA	22
1.2.1	<i>Biossíntese de Insulina</i>	25
1.2.3	<i>Secreção de Insulina</i>	26
1.2.4	<i>Sinalização Insulínica</i>	30
1.4	ANTI-HIPERGLICEMIANTES ORAIS	33
1.5	JUSTIFICATIVA	35
2	OBJETIVOS.....	37
2.1	OBJETIVO GERAL	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3	METODOLOGIA	39
3.1	REAGENTES	39
3.1.1	<i>Preparação das chalconas</i>	39
3.2	ANIMAIS	40
3.3	ENSAIOS E MEDIDAS DA CAPTAÇÃO DE GLICOSE NO MÚSCULO SÓLEO	40
3.4	ISOLAMENTO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS	42
3.5	INFLUXO DE CÁLCIO NA ILHOTA PANCREÁTICA ISOLADA	43
3.6	CAPTAÇÃO DE [U- ¹⁴ C]-2-DEOXI-D-GLICOSE EM ILHOTAS PANCREÁTICAS	44
3.7	ENSAIO DE SECREÇÃO DE INSULINA INDUZIDA NA ILHOTA PANCREÁTICA	44
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4	RESULTADOS	47
4.1	APRESENTAÇÃO DO NÚCLEO FUNDAMENTAL E CHALCONAS DERIVATIVAS DA 3,4- METILENODIÓXI-BENZALDEÍDO	47
4.2	ESTUDO DO EFEITO DAS CHALCONAS DERIVATIVAS (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)-1-(3',4'-DIMETOXI-FENIL)-2-PROPEN-	

1-ONA) E (2E)-1-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)-3-(3,4-DIMETOXI-FENIL)-2-PROPEN-1-ONA) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NA CAPTAÇÃO DA GLICOSE NO MÚSCULO SÓLEO	48
4.3 ESTUDO DO EFEITO DA CHALCONA DERIVATIVA (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)-1-(3',4'-DIMETOXI-FENIL)-2-PROPEN-1-ONA) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E DIFERENTES TEMPOS NO INFLUXO DE CÁLCIO EM ILHOTAS PANCREÁTICAS	49
4.4 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)-1-(3',4'-DIMETOXI-FENIL)-2-PROPEN-1-ONA) NO INFLUXO DE CÁLCIO NA ILHOTA PANCREÁTICA: ENVOLVENDO CANAIS DE POTÁSSIO	52
4.5 ESTUDO DO EFEITO DA (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)-1-(3',4'-DIMETOXI-FENIL)-2-PROPEN-1-ONA) NA CAPTAÇÃO DE GLICOSE EM ILHOTAS PANCREÁTICAS	55
4.6 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)-1-(3',4'-DIMETOXI-FENIL)-2-PROPEN-1-ONA) NO INFLUXO DE CÁLCIO NA ILHOTA PANCREÁTICA: ENVOLVENDO CANAIS DE CÁLCIO.....	56
4.7 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)-1-(3',4'-DIMETOXI-FENIL)-2-PROPEN-1-ONA) NO INFLUXO DE CÁLCIO NA ILHOTA PANCREÁTICA: ENVOLVENDO A VIA DA PROTEÍNA CINASE CINASE ATIVADA POR MITÓGENOS	58
4.7 ESTUDO DO EFEITO DA (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)-1-(3',4'-DIMETOXI-FENIL)-2-PROPEN-1-ONA) NA SECREÇÃO DE INSULINA ESTÁTICA EM ILHOTAS PANCREÁTICAS.	59
5 DISCUSSÃO.....	61
6 CONCLUSÕES	65
7 PERSPECTIVAS	67
8 REFERÊNCIAS	69

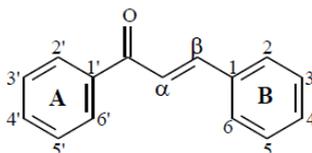
1 INTRODUÇÃO

1.1 CHALCONAS

Chalconas são compostos que estão presentes em uma variedade de plantas, e são importantes intermediários e produtos intermediários na via de síntese dos flavonoides. Em algumas angiospermas as chalconas são responsáveis pela coloração das flores. Esta pigmentação nas flores é de extrema importância para atrair agentes polinizadores como insetos e pássaros. Ademais, as chalconas não se limitam apenas a esta parte da planta sendo encontradas em frutos, caules, raízes e em uma variedade de tecidos vegetais, naturalmente são encontradas em plantas rasteiras e/ou arbóreas (ANTO et al., 1995; RAO; FANG; TZENG, 2004). Em conjunto com os flavonoides, as chalconas exercem outras funções importantes nas plantas, tais como: auxílio na polinização, na dispersão de sementes, reprodução e crescimento (MO; NAGEL; TAYLOR, 1992; TAYLOR; HEPLER, 1997; VOGT et al., 1994). Também atuam na proteção contra patógenos e insetos (DIXON, 2001), além de comunicação em sistemas simbióticos e sinalização molecular (PERRET; STAEHELIN; BROUGHTON, 2000).

As chalconas são quimicamente classificadas como cetonas aromáticas α,β -insaturadas. Elas são formadas por dois anéis benzênicos unidos por três carbonos, onde estão presentes um grupo carbonila e uma porção olefínica como representado na figura 1. As diversas atividades biológicas conferidas ao grupo das chalconas são possíveis, devido a ligação dupla que se encontra em conjugação com a carbonila, de tal forma que a retirada deste agrupamento torna a molécula inativa (SINGH; ANAND; KUMAR, 2014).

Figura 1 - Estrutura fundamental das chalconas (2E)-1,3-difenilprop-2-en-1-ona



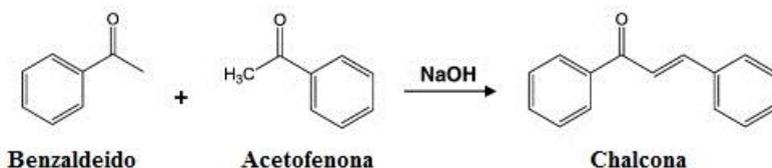
Representação plana da estrutura química do núcleo fundamental das chalconas. Fonte: Adaptado de Simões et al. (Org.), 2004.

A nomenclatura química da estrutura fundamental das chalconas definida pela IUPAC é (2E)-1,3-difenilprop-2-en-1-ona e na representação plana dessa classe de compostos, o anel A é numerado com números ordinários seguidos de uma linha (') e o anel B somente com números ordinários, se diferindo de outras classes de compostos como os flavonoides (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004). Esse esqueleto C6-C3-C6 por ser considerado simples e principalmente por apresentar uma variada atividade biológica, desperta a atenção de pesquisadores para o fato de se tratar de um composto com grande potencial farmacológico. Além disso, as atividades das chalconas se diferem de acordo com os substituintes ligados aos anéis aromáticos (ÁVILA et al., 2008; BATOVSKA et al., 2009). Devido a essa característica e as incontáveis possibilidades de substituições nos anéis aromáticos, somada a relativa facilidade de manipulação química, esses compostos são utilizados para vários estudos, pois apresentam atividade farmacológica muito ampla.

As chalconas são sintetizadas pela convergência de duas vias biossintéticas distintas (figura 2): a do ácido chiquímico - o que irá originar a fenilalanina precursora do ácido cinâmico - e a do acetato via ácido malônico. Sendo assim, a rota biossintética das chalconas, metabólitos secundários das plantas, se dá a partir de três moléculas de malonil-CoA e uma molécula de cinamoil-CoA, em que o cinamoil-CoA é responsável pela formação do anel B, além da ponte com três carbonos e o malonil-CoA pelo anel A das chalconas e pela flavona (SIMÕES et al., 2004).

condensação de um derivado de acetofenona com um benzaldeído usando metanol ou etanol e hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio como solvente polar e uma base como catalisador (SINGH; ANAND; KUMAR, 2014; VOGEL, 1989; YADAV et al., 2011). Desta forma uma ampla variedade de compostos podem ser obtidos pois, são encontrados inúmeras acetofenonas e benzaldeídos comerciais para serem combinadas. Esta variedade estrutural proporciona as diversas atividades biológicas das chalconas (DUCKI et al., 1998).

Figura 3 - Esquema geral da condensação de Claisen-Schmidt



Representação geral da reação de condensação de Claisen-Schmidt utilizando o NaOH como catalisador da reação. Fonte: Adaptado de Yadav, 2011.

Está descrito na literatura uma multiplicidade dessas atividades tais como: antioxidante, antifúngica, antiprotozoária, antibacteriana, anti-inflamatória, antitumoral, antiagregante plaquetário, (SINGH; ANAND; KUMAR, 2014). Outra atividade apresentada pelas chalconas encontrada na literatura é sobre o efeito no metabolismo de carboidratos, principalmente o da glicose. Chen et al., (2002) demonstraram que chalconas presentes nas raízes da *Broussonetia papyrifera* (Amoreira-de-papel), isoladas, atuaram como inibidoras da atividade da proteína tirosina fosfatase 1B (PTP 1B). Estas enzimas atuam defosforilando, e por consequência, inativando o receptor de insulina. Também foi elucidado que o poder de atividade desta chalcona envolvida no metabolismo dos carboidratos, está diretamente relacionado com a quantidade de substituintes polares.

Estudos demonstram que as chalconas contribuem para a homeostase da glicose. Diferentes classes de chalconas se mostraram capazes de diminuir a glicose sérica, sendo pela diminuição da absorção intestinal de glicose, pelo aumento da captação de glicose pelo tecido

muscular e adiposo via ativação da translocação do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT4), pela síntese de glicogênio e/ou aumento da secreção de insulina, tanto em procedimentos *in vivo* quanto *in vitro* (KAMEI et al., 2003). Sendo assim é possível notar que as chalconas podem atuar em diversos tecidos/órgãos como exemplo podemos citar ações no intestino por meio das dissacaridasas e através da regulação do transportador de glicose dependente de sódio (SGLT1), do GLUT2 e GLUT5 - e nos rins por meio da regulação do SGLT2, além da atuação nos tecidos muscular, adiposo e hepático citados anteriormente, colaborando desta forma para o controle da glicemia. (ALBERTON et al., 2008; DAMAZIO et al., 2009, 2010; JAMAL; ANSARI; RIZVI, 2009; SATYANARAYANA et al., 2004; SEO et al., 2005).

O extrato etanol de *Angelica keisei* uma erva japonesa - comum na medicina popular do Japão - apresentou duas chalconas principais, a 4-hidroxerricina (4-HD) e a xantoangelol que demonstraram atividade semelhante à insulina atuando através de uma via independente da ativação do receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissoma (PPAP γ)(ENOKI et al., 2007). A 4-HD também atuou na prevenção da progressão da diabetes geneticamente induzida em camundongos (ENOKI et al., 2007). Outro estudo demonstrou que as chalconas 4-HD e a xantoangelol obtidas da *Angelica keiskei Koidzumi* quando administradas por via oral tiveram efeito anti-hiperglicêmico em teste de tolerância oral à glicose em camundongos, mostrando-se capazes de aumentar a captação de glicose, por meio do aumento da translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática de células musculares L6 (KAWABATA et al., 2011).

Trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais (LHTS) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) demonstraram que chalconas derivativas com um grupo nitro como substituinte (um grupo receptor de elétrons), em determinadas posições do anel fundamental da chalcona, possuem atividade anti-hiperglicêmica quando testados *in vivo*, assim como, chalconas com grupo 3,4-metilenodioxí em um dos anéis (DAMAZIO et al., 2009). Em outro trabalho, Damazio et al., (2010) demonstrou que a chalcona 2(E)-1-(40-nitrofenil)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona administrada *in vivo* foi capaz de melhorar significativamente a curva de tolerância à glicose e induzir a secreção de insulina, indicando esta chalcona como uma potencial secretagogo de insulina. Além disso, foi demonstrado que ambos os tipos de grupos:

doador de elétrons como metoxi e receptor de elétrons como o nitro dão essa atividade às chalconas, de acordo com a posição delas no anel “A” mostrando a significância do efeito conformacional.

1.2 HIPERGLICEMIA

A manutenção da concentração de glicose sanguínea (<100mg//dl) é primordial para a sobrevivência e funcionamento adequado do organismo (BRUTSAERT, 2017a). A Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) (2017) adotou parâmetros de glicemia e hemoglobina glicada para detectar normalidade ou alterações no metabolismo de carboidratos, com graus de hiperglicemia que podem indicar um pré-diabetes ou risco aumentado para o desenvolvimento da diabetes e a diabetes melito já estabelecidas como demonstrado na tabela a baixo.

Tabela 1 - Critérios laboratoriais para diagnóstico de normoglicemia, pré-diabetes e diabetes melito adotados pela Sociedade Brasileira de Diabetes.

	Glicose em jejum (mg/dL)	Glicose 2 horas após sobrecarga com 75 g de glicose (mg/dL)	Glicose ao acaso	HbA1c (%)	Observações
Normoglicemia	< 100	< 140	–	< 5,7	OMS emprega valor de corte de 110 mg/dL para normalidade da glicose em jejum. ²
Pré-diabetes ou risco aumentado para DM	≥ 100 e < 126*	≥ 140 e < 200#	–	≥ 5,7 e < 6,5	Positividade de qualquer dos parâmetros confirma diagnóstico de pré-diabetes.
Diabetes estabelecido	≥ 126	≥ 200	≥ 200 com sintomas inequívocos de hiperglicemia	≥ 6,5	Positividade de qualquer dos parâmetros confirma diagnóstico de DM. Método de HbA1c deve ser o padronizado. Na ausência de sintomas de hiperglicemia, é necessário confirmar o diagnóstico pela repetição de testes.

OMS: Organização Mundial da Saúde; HbA1c: hemoglobina glicada; DM: diabetes mellitus.

* Categoria também conhecida como glicemia de jejum alterada.

Categoria também conhecida como intolerância oral à glicose.

Fonte: SBD, 2017.

Para a homeostasia da glicose a ação da insulina, um hormônio anabólico, é de extrema importância principalmente no estado pós-

alimentado, pois ela é o principal hormônio responsável pela manutenção da glicemia (SALTIEL; KAHN, 2001). Após uma refeição, ocorre uma elevação da concentração de glicose sanguínea. Este aumento da glicemia é compensado primeiramente pela liberação rápida de insulina (primeira fase) e após, pela liberação lenta de insulina com um efeito prolongado (segunda fase). Desta forma a glicose sanguínea retorna a glicemia normal (<100 mg/dl) em cerca de 2 horas (BRUTSAERT, 2017b; CASTIELLO; HEILEMAN; TABRIZIAN, 2016). A hiperglicemia se caracteriza pelos parâmetros glicêmicos acima de 100 mg/dl. Isso se dá por deficiência no mecanismo de controle da homeostasia da glicose. Desta forma a hiperglicemia pode estar relacionada à diminuição da captação de glicose pelos tecidos periféricos e/ou ao aumento da produção hepática de glicose ou pela produção baixa ou ausente de insulina.

Em indivíduos que apresentam uma resistência periférica à insulina, mas que apresentam as células β -pancreáticas funcionando, as demandas na produção de insulina aumentam e compensa a resistência, desta forma, a glicemia é mantida (DONATH; HALBAN, 2004). Vários mecanismos estão associados à hiperglicemia como proteínas e fatores inflamatórios podem interferir na via de sinalização da insulina inibindo a síntese ou secreção da mesma. Esta inibição pode acontecer a partir de uma fosforilação que inativa uma proteína essencial para a sequência de sinalização insulínica. O excesso de lipídeos no organismo também está associado à ativação de vias de resistência à insulina, além de saturar os estoques de lipídeos no tecido adiposo e se acumular em tecidos como fígado e músculo (MUOIO; NEWGARD, 2008).

A hiperglicemia crônica caracteriza a diabetes melito, que é uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o organismo não responde efetivamente a insulina produzida pelo pâncreas, neste caso estamos falando da resistência a insulina. Em 2014, 8,5% da população mundial com 18 anos ou mais tinham diabetes e em 2015, 1,6 milhões de mortes foram causadas diretamente pela diabetes (WHO, 2018). Esta doença é dividida principalmente em dois grandes grupos, a diabetes melito tipo 1 que é caracterizada por uma insuficiência do pâncreas em produzir insulina e está associada a processos autoimune que não estão bem definidos, como infecções virais e processos alérgicos. Esses processos autoimunes levam a uma degradação das células β pancreáticas fazendo com que esse indivíduo se torne dependente de insulina exógena (SBD, 2017; YAMADA, A.T.T; LAVRAS, C.; DEMUNER, 2011).

Já a diabetes melito tipo 2 esta relacionada a múltiplas desordens metabólicas como a resistência à insulina nas células adiposas e musculares, que quando ultrapassa a capacidade adaptativa das células beta, culmina em um declínio da produção e secreção de insulina. Além da produção hepática de glicose desregulada e uma intolerância à glicose que levam ao quadro de diabetes melito tipo 2. Na tabela 2 são descritas algumas características dos dois principais tipos desta patologia (SBD, 2017; ADA, 2016).

Tabela 2 - Diferentes características da diabetes melito tipo 1 e tipo 2

Característica	Tipo 1	Tipo 2
Idade de início	Mais comumente < 30 anos	Mais comumente > 30 anos
Obesidade associada	Não	Muito comum
Propensão à cetoacidose requerendo tratamento com insulina para controle	Sim	Não
Concentrações plasmáticas de insulina endógena	Extremamente baixas ou indetectáveis	Variáveis; podem ser baixas, normais ou elevadas, dependendo do grau de resistência à insulina e do distúrbio de secreção de insulina
Concordância entre gêmeos	≤ 50%	> 90%
Associado a tipos específicos de antígenos HLA-D	Sim	Não
Presença de anticorpos contra células das ilhotas ao diagnóstico	Sim	Não
Patologia das ilhotas	Insulite, perda seletiva da maioria das células β	Ilhotas pequenas, com aspecto normal; deposição de amiloide (amilina) é comum
Tendência ao desenvolvimento de complicações do diabetes (retinopatia, nefropatia, neuropatia, doença vascular aterosclerótica)	Sim	Sim
Hiperglicemia responde a drogas orais anti-hiperglicemiantes	Não	Sim, inicialmente em vários pacientes



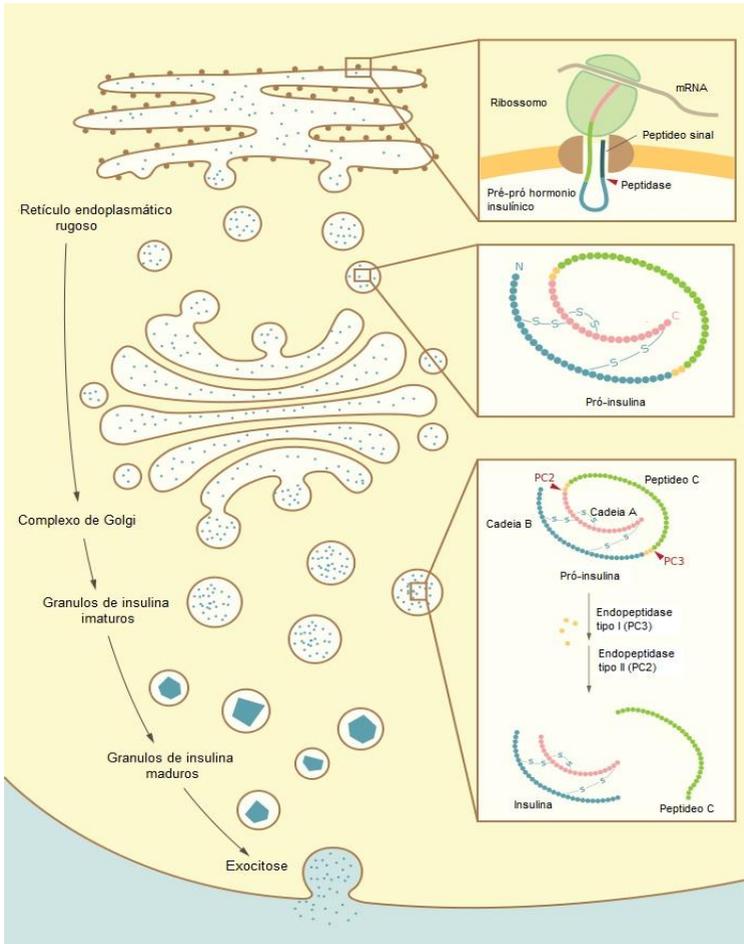
Fonte: BRUTSAERT, 2017a.

1.2.1 Biossíntese de Insulina

A insulina é um hormônio produzido pelas células β das ilhotas de Langerhans, no pâncreas. Este hormônio é um polipeptídeo de 51 aminoácidos, dispostos em duas cadeias denominadas A e B. A insulina é produzida na forma de pré- pró- hormônio, inicialmente com 110 aminoácidos, contendo um peptídeo sinal que ao ser reconhecido por uma partícula de reconhecimento de sinal (PRS) é transportado até o interior do retículo endoplasmático. As peptidases presentes no retículo endoplasmático clivam o peptídeo sinal, dando origem a pró-insulina que passa por um processo de maturação da estrutura tridimensional da insulina. Nesta maturação o pró-hormônio passa por um enovelamento que dá origem a três pontes dissulfeto sendo, duas unindo as cadeias A e B que estão separadas pelo peptídeo C e uma entre aminoácidos da cadeia A (FU; GILBERT; LIU, 2013; STEINER; OYER, 1967). O processo final de maturação do hormônio ocorre no complexo de Golgi, dentro de vesículas imaturas onde as proteases agem retirando o peptídeo C entre as cadeias A e B. Forma-se então a insulina que contém duas pontes dissulfeto ligando a cadeia A na cadeia B, como representado na figura 4 (FU; GILBERT; LIU, 2013; STEINER, 2008; STEINER; CHAN; RUBENSTEIN, 2011; STEINER; OYER, 1967).

Ainda no processo de maturação da insulina, nas vesículas do complexo de Golgi, ela se liga ao zinco. Cada Zn^{+2} é capaz de se ligar a 6 moléculas de insulina formando um hexâmero (CHIMIENI; FAVIER; SEVE, 2005; DUNN, 2005). Os grânulos de insulina são armazenados em vesículas compondo o pool de insulina intracelular que ficam a espera de um sinal para iniciar o processo de exocitose (HENQUIN, 2000; HENQUIN et al., 2003).

Figura 4 - Biossíntese e secreção de insulina



Representação da biossíntese e secreção de insulina em células beta pancreáticas. Fonte: Adaptado de: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Insulin_biosynthesis.svg. Acesso em: 22/06/2018

1.2.3 Secreção de Insulina

O principal estímulo para a secreção de insulina é o aumento da glicemia no período pós-prandial (BRUTSAERT, 2017a). Entretanto

outros fatores também podem regular essa secreção como os hormônios gastrintestinais, pancreáticos, inervação das ilhotas pancreáticas pelo sistema nervoso autônomo (BEARDSALL et al., 2006; HENQUIN, 2000; HENQUIN et al., 2003). A secreção de insulina pelas células β em resposta a uma sensibilização por glicose ocorre em duas fases distintas (figura 5). Há a fase inicial ou desencadeadora, de liberação rápida e transitória que tem duração de quatro a dez minutos e a segunda fase ou amplificadora com duração estendida. Na fase desencadeadora, os grânulos de insulina do estoque de liberação rápida que estão acoplados ou próximos à membrana plasmática são liberados. Os principais efeitos desta etapa são direcionar a glicose proveniente da dieta para uso imediato e inibir a produção hepática de glicose (gliconeogênese e glicogenólise) (DEL PRATO; TIENGO, 2001). Já na segunda fase de liberação de insulina os sinais para tal secreção são amplificadas, os grânulos de insulina do estoque que estavam dispersos no citoplasma são ativados e deslocados para a membrana plasmática para serem liberados, além disso, a biossíntese da insulina é ativada por esses sinais. Esta fase visa manter os níveis basais da glicemia (BEARDSALL et al., 2006; RORSMAN; BRAUN, 2013).

Figura 5 - Secreção bifásica de insulina estimulada por glicose

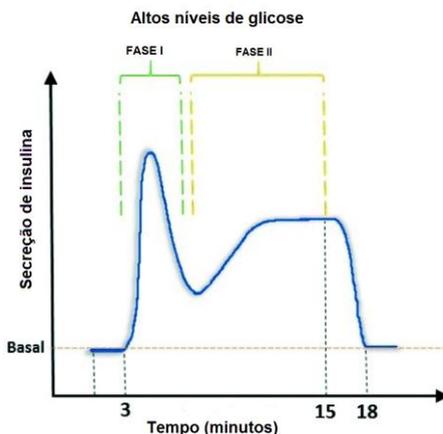


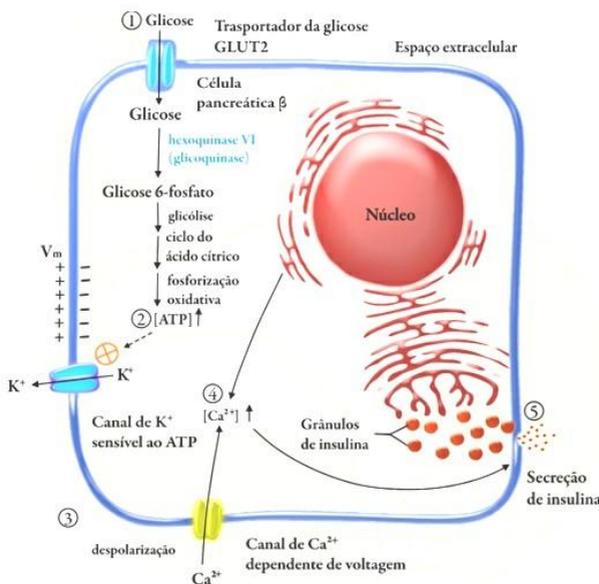
Gráfico representativo das fases I e II na secreção de insulina versus tempo (minutos), após o estímulo das células β -pancreáticas por altos níveis de glicose. Fonte: Adaptado de: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/LC/C5LC01046B>. Acesso em: 25/06/2018

No entanto, para que ocorra esta secreção de insulina, a glicose precisa ser transportada para o interior da célula β . Isto ocorre por difusão facilitada via GLUTs, presentes na membrana plasmática, que em ratos são do tipo 2 (GLUT2) e em humanos são do tipo 1 (GLUT1). A glicose no interior do pâncreas começa a ser metabolizada, sofrendo uma ação da enzima glicocinase (hexocinase IV) que diferente da hexocinase I, possui uma baixa afinidade pelo produto desta reação que é a glicose-6-fosfato (MATSCHINSKY, 1996; RORSMAN; BRAUN, 2013). A glicose-6-fosfato segue até a degradação total e há um aumento na formação de ATP pelas mitocôndrias, via cadeia respiratória. A relação ATP/ADP aumenta no interior das células β e isso faz com que ocorra o fechamento de canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}). Na célula β não estimulada, os canais K_{ATP} estão abertos e o movimento de saída dos íons K^+ através do canal mantém o potencial de membrana negativo (-70 mV). O fechamento destes canais, modifica a diferença de potencial eletroquímico entre o meio intra e extracelular, o que leva à despolarização da membrana plasmática. Em decorrência da despolarização da membrana, os canais de cálcio dependentes de voltagem se abrem e ocorre, por consequência, o aumento do influxo de cálcio (FREDERICO et al., 2017; GRIBBLE; REIMANN, 2003; KOMATSU et al., 2013; RORSMAN, 1997).

O cálcio é um íon de extrema importância para a secreção de insulina pois é responsável por ativar a translocação e acoplamento das vesículas de insulina para/na membrana plasmática presentes no citoplasma das células β pancreáticas, para que ocorra a exocitose (FREDERICO et al., 2017; NICHOLS; REMEDI, 2012; YANG et al., 2014). Além disso, os íons Ca^{2+} são importantes sinalizadores intracelulares, pois participam de relevantes processos celulares e fisiológicos, como diferenciação, proliferação, apoptose, ativação de sistemas enzimáticos, secreção, fertilização, formação de padrão embrionário, aprendizado e memória, contração muscular, transporte de açúcares e aminoácidos (BROSTROM; BROSTROM, 1990; ZHOU; XUE; YANG, 2013). Como exemplos de ação do cálcio na transdução de sinais, muitas proteínas possuem sítio de ligação específico para o íon e são ativadas a partir da ligação do mesmo. Outro exemplo é a ligação do cálcio, a receptores que são sensibilizados e ativam proteínas alvos, frente a alterações de concentração intracelular de cálcio (KRAUSS, 2014).

Ao abrir os canais de cálcio dependentes de voltagem ocorre um aumento na concentração de cálcio intracelular, vindo de meio extracelular e dos estoques citoplasmático (retículo endoplasmático e mitocôndria), dessa forma este íon ativa o transporte das vesículas de insulina do citoplasma para a membrana com a qual elas se fundem e este hormônio é secretado (GRIBBLE; REIMANN, 2003; KOMATSU et al., 2013; NICHOLS; REMEDI, 2012; YANG et al., 2014) (figura 6).

Figura 6 – Mecanismo geral de secreção de insulina



Representação da célula beta pancreática após o aumento da glicose sanguínea. 1) A glicose entra na célula beta via transportador de glicose (GLUT 2) e é oxidada passando pelo processo de respiração celular, ao final deste processo é formada uma grande quantidade de adenosina trifosfato (ATP). 2) O aumento do ATP intracelular resulta no bloqueio dos canais de potássio dependentes de ATP, que gera despolarização da membrana plasmática. 3) Devido a despolarização celular os canais de cálcio dependentes de voltagem se abrem, aumentando a concentração do cálcio intracelular. 4) O aumento da concentração de cálcio devido a liberação dos estoques intracelulares e a entrada do cálcio extracelular, ativa o transporte de vesículas de insulina para a membrana plasmática. 5) Estas vesículas se fundem a membrana plasmática liberando o

hormônio na corrente sanguínea. Fonte: Adaptado de: <http://www.numeb.furg.br/images/stories/diabetes/insulina/fig7leg.jpg>
Acessado em : 26/06/2018

Além da glicose, que desempenha um papel fundamental na secreção da insulina, outras enzimas participam do processo secretório. A fosfolipase C (PLC) e a adenilato ciclase (AC) são exemplos de enzimas associadas à membrana que auxiliam neste processo. A ligação de hormônios como a acetilcolina, o glucagon, as incretinas, a somatostatina e adrenalina (MENDES, 2015) a receptores associados à proteína G podem ativar tais enzimas desencadeando ações subsequentes para que ocorra a secreção de insulina. As proteínas Gq e Gs são responsáveis pela interação com enzimas efetoras (MOURAD; NENQUIN; HENQUIN, 2012; SHIBASAKI et al., 2014; WAUSON; LORENTE-RODRÍGUEZ; COBB, 2013). A ativação da PLC faz com que ela quebre os fosfolípídeos de membrana por hidrólise, gerando diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-inositol trifosfato (IP3). Por sua vez, o DAG ativa a proteína cinase C (PKC) que é imprescindível para secreção da insulina e também é dependente de Ca^{2+} . Já o IP3 aumenta o cálcio iônico intracelular através do efluxo do retículo endoplasmático, contribuindo com a exocitose das vesículas de insulina (WAUSON; LORENTE-RODRÍGUEZ; COBB, 2013). A AC ativa aumentando a concentração de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) no interior da célula, que por sua vez ativa a proteína cinase A (PKA) dispara vias que auxiliam o recrutamento de vesículas de insulina no processo secretório (BALK-MØLLER; EHRENREICH KUHRE, 2014; DIAKOGIANNAKI; GRIBBLE; REIMANN, 2012).

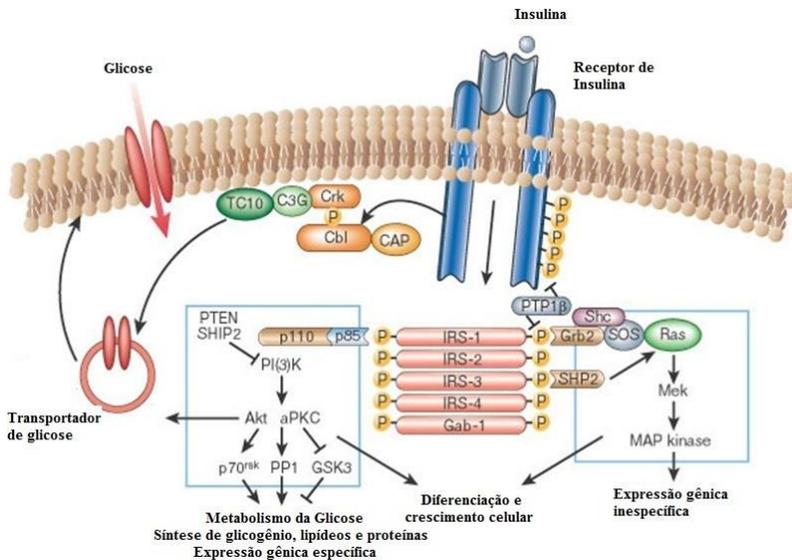
1.2.4 Sinalização Insulínica

Ao ser secretada na corrente sanguínea a insulina promove ações em vários tecidos alvos como o muscular esquelético, hepático, adiposo - envolvidos com a homeostasia da glicose. Para agir em tais alvos a insulina se liga a um receptor de insulina (IR) presente nos mesmos. O IR é uma glicoproteína transmembranar heterotetramérica, que possui duas subunidades α extracelulares e duas subunidades β intracelulares. Este receptor é membro da família de receptores tirosina cinase, quando a insulina interage com o sítio alostérico da subunidade α , ativa a tirosina cinase na subunidade β desencadeando a autofosforilação do receptor em resíduos de tirosina específicos (HOFFMAN; ELMENDORF, 2011; KLIP, 2009). Mudanças conformacionais

também ocorrem, aumentando a atividade tirosina cinase do receptor de insulina. Ao ser ativado o RI interage com proteínas substrato de receptor de insulina (IRS) que são fosforiladas e assim regulam o início da fase de sinalização insulínica. O IRS possui quatro isoformas (IRS1-4), sendo que a isoforma 1 é a principal envolvida na regulação do sinal insulínico no músculo. O IRS2 parece estar mais envolvido com as células β e ambos desempenham esta função no metabolismo da glicose no fígado. Quando fosforilado, o IRS origina sítios de reconhecimento para outras proteínas serem ativadas como as subunidades p85 (regulatória) e p110 (catalítica) da fosfatidil-inositol-3-cinase (PI3K). Quando ativada a PI3K age como segundo mensageiro e ativa outras vias de sinalização, envolvendo a ativação de proteínas cinase dependente de 3-fosfoinosítídeos (PDK), sendo as isoformas PDK-1 e PDK-2 ativadas por proteína alvo da rapamicina em mamíferos, complexo 2 (mTORC2). Após serem ativadas essas proteínas fosforilam a proteína cinase B (PKB). A PKB também chamada de Akt está envolvida em pontos importantes de vias metabólicas reguladas pela insulina. Uma das ações que a Akt promove é a fosforilação da proteína glicogênio sintase cinase 3 (GSK3). Esta proteína está diretamente envolvida na via de síntese de glicogênio hepático e muscular (CHANG; CHIANG; SALTIEL, 2004; HOFFMAN; ELMENDORF, 2011; KLIP, 2009; WATSON; PESSIN, 2007). A ativação do eixo PI3K/Akt é de grande importância na captação de glicose pelos tecidos periféricos como o muscular e o adiposo, pois a Akt ativada auxilia no processo de translocação de GLUT4 do citosol para a membrana plasmática. O GLUT4 é essencial para captação de glicose nestes tecidos considerados dependentes de insulina (COHEN, 2006; SALTIEL; KAHN, 2001). Para tal, a Akt fosforila a proteína substrato de Akt de 160 kDa (AS160), imprescindível para translocação das vesículas de GLUT4. Além da AS160, outras proteínas participam do processo de translocação e fusão do GLUT4 na membrana plasmática. Essas são responsáveis por direcionar as vesículas que se encontram na região perinuclear para a membrana. Participam desta ação os receptores de ligação ao fator solúvel sensível à N-etilmaleimida (SNAREs), os filamentos de actina, os microtúbulos em resposta a sinalização gerada pela insulina (HOFFMAN; ELMENDORF, 2011; KLIP, 2009). Estudos sugerem que além da translocação induzida pela via da PI3K, ocorre um aumento da atividade intrínseca do GLUT4, por vias complementares a esta da PI3K, como a da proteína serina/treonina cinase ativada por mitógenos (MAPK). Esta via provavelmente amplifica o estado fosforilado do GLUT4 na membrana plasmática. Essas evidências

ajudam a explicar a discrepância entre a captação da glicose e a translocação de GLUT4 para a membrana em tecidos dependentes de insulina (CAZAROLLI et al., 2013b; FURTADO; POON; KLIP, 2003). Além do metabolismo da glicose, a insulina participa do crescimento e diferenciação celular, pois a sinalização desencadeada por ela ativa vias como a da p38MAPK, vias nucleares como MAPK e proteína cinase cinase ativada por mitógenos (MEK) que implica na regulação de várias atividades celulares (GONZÁLEZ-TERÁN et al., 2013; JUNG et al., 2011; RISCO; CUENDA, 2012) (figura 7).

Figura 7 - Sinalização Insulínica



O receptor de insulina é uma tirosina cinase que sofre auto-fosforilação e catalisa a fosforilação de proteínas celulares, como membros da família IRS, Shc e Cbl. Após a fosforilação da tirosina, estas proteínas interagem com moléculas sinalizadoras através dos domínios SH2, resultando em uma série diversa de vias de sinalização, incluindo a ativação das proteínas cinases PI (3) K e PtdIns (3,4,5) P3 a jusante, Ras e a cascata de cinase MAP e Cbl / CAP e a ativação de TC10. Essas vias atuam para coordenar a regulação do tráfego de vesículas, síntese de proteínas, ativação e inativação enzimática e expressão gênica, o que

resulta na regulação do metabolismo de glicose, lipídios e proteínas. Fonte: Adaptado de Saltiel; Kahn, 2001.

A insulina desempenha um papel fundamental na homeostasia da glicose, atuando em vários níveis, desde a diminuição hepática da produção/liberação de glicose (gliconeogênese/glicogênólise) até o aumento da captação de glicose por tecidos dependentes de insulina como o muscular e o adiposo. Além das ações envolvidas com a glicose, a insulina, por ser um hormônio anabólico, promove a síntese proteica, a lipogênese no fígado e inibe a degradação de proteína e dos lipídeos do tecido adiposo (THORENS; MUECKLER, 2010).

1.4 ANTI-HIPERGLICEMIANTE ORAIS

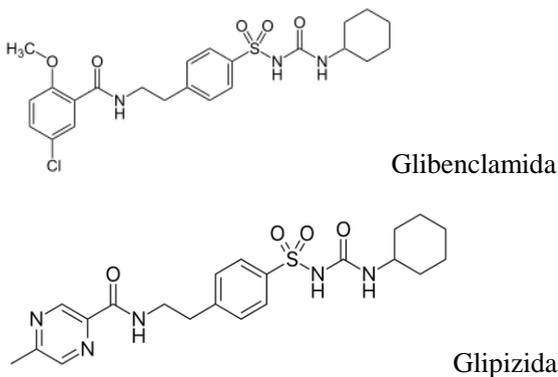
A hiperglicemia crônica é um dos principais problemas para as pessoas que são acometidas com a diabetes melito, podendo gerar produtos finais de glicação avançada (BOWLING; RASHID; BOULTON, 2015; WADA; YAGIHASHI, 2005). A diabetes é dividida principalmente em dois tipos, a diabetes tipo 1 que é caracterizada pela destruição das células β -pancreáticas sendo o portador dependente de terapia insulínica, e a diabetes tipo 2 que representa a maior parte dos pacientes com diabetes do mundo, é caracterizada por resistência à insulina, hiperglicemia e síndrome metabólica (BRUTSAERT, 2017a). Terapias não medicamentosas são prescritas para diabéticos tipo 2, como a terapia nutricional e a prática de exercício físico. Porém quando não é possível obter um controle da glicemia com esses cuidados é necessária uma intervenção medicamentosa com os hipoglicemiantes orais. Esses fármacos estão distribuídos em mais de cinco classes distintas como as sulfoniluréias, biguanidas, tiazolidinedionas, inibidores da dipeptidil peptidase IV (DDP-4), inibidores da α -glucosidase, dentre outras classes de fármacos que vem sendo desenvolvidas (BRUTSAERT, 2017b).

As sulfoniluréias são fármacos que atuam aumentando a secreção de insulina pelas células β -pancreáticas. O mecanismo de ação desses fármacos já se encontra bem relatado na literatura. Eles agem nas células β bloqueando canais de potássio dependentes e adenosina trifosfato causando uma despolarização da membrana celular e conseqüentemente abrindo canais de cálcio dependentes de voltagem que por sua vez aumenta o influxo de cálcio e leva a secreção de insulina pelas células β -pancreáticas (BRUTSAERT, 2017b;

HENQUIN, 2004). Este bloqueio dos canais K_{ATP} se dá pela ligação das sulfoniluréias ao receptor de sulfoniluréia (SUR) presente na membrana plasmática das células β . O SUR é composto por quatro subunidades receptoras de sulfoniluréia 1 (SUR1) que possuem uma alta afinidade pelas sulfoniluréias e são requeridas para ativação e regulação do receptor. E outras quatro subunidades $K_{IR6.2}$ que apresentam baixa afinidade pelas sulfoniluréias. (HENQUIN, 2004; ROSAK, 2002).

Duas classes de sulfoniluréias são bem definidas, as de primeira geração representadas pela clorpropamida, tolbutamida e têm ação lenta e de longa duração. E as de segunda geração representadas pela glibenclamida, glipizida (figura 8) e glicazida que possuem ação mais rápida e maior potência do que as de primeira geração. Tanto as sulfoniluréias de primeira, quanto as de segunda geração, apresentam efeitos colaterais como o ganho de peso e a hipoglicemia, o último mais relacionado às de primeira geração (KOSKI, 2006; OIKNINE; MOORADIAN, 2003). Além desses efeitos adversos, observa-se que as sulfoniluréias usadas por longos períodos podem exaurir a função das células β (FREDERICO et al., 2017; MERCK, 2014).

Figura 8 - Estrutura química da glibenclamida e da glipizida



Representação plana da estrutura química da molécula de glibenclamida e da molécula de glipizida. Fonte: Adaptado de Abdelmoneim et al., 2012.

As biguanidas são representadas principalmente pela metformina. São fármacos que atuam independente de insulina, diminuem a produção hepática de glicose, reduzem a gliconeogênese e

aumentam a absorção de glicose em tecidos periféricos. Além disso, aumentam a sensibilidade das células β à glicose, diminuem a absorção intestinal de lipídios e reduzem as concentrações do inibidor de plasminogênio 1 promovendo um efeito antitrombótico. Os efeitos colaterais mais evidentes desses fármacos são os transtornos gastrointestinais como, náuseas e vômitos, mas que são transitórios (BRUTSAERT, 2017b; CHAN et al., 2007)

As tiazolidinedionas também conhecidas como glitazonas são fármacos que atuam no fígado, músculos e tecido adiposo diminuindo a resistência à insulina nesses tecidos. No tecido adiposo as tiazolidinedionas exercem ação agonista se ligando a um receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissoma (PPAR γ) que regulam a transcrição de genes envolvidos no metabolismo da glicose e lipídios. São exemplos de tiazolidinedionas as pioglitazona e rosiglitazona (BRUTSAERT, 2017b; FOWLER, 2007; KARAK et al., 2013; LUCONI; CANTINI; SERIO, 2010).

Os inibidores de α -glicosidases, como a acarbose, reduzem as concentrações de glicose após a alimentação, atuando como inibidores competitivos das α -glicosidases, que são enzimas presentes na orla ciliada do intestino, que hidrolisam o carboidrato proveniente da dieta (BRUTSAERT, 2017b). Essa classe de fármacos é menos eficiente quanto à diminuição da glicemia, porém podem ser usados associados com outros fármacos e com a insulina. Os efeitos adversos podem levar a interrupção do tratamento, pois estão relacionados a transtornos gastrointestinais como dispepsia, flatulência e diarreia (BRUTSAERT, 2017b; CHENG; FANTUS, 2005; KOSKI, 2006).

Os inibidores de dipeptidil peptidase-4 agem dificultando a degradação do peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) por inibição da enzima DPP-4. São exemplos de inibidores de DPP-4 a sitagliptina e a saxagliptina (BRUTSAERT, 2017b; CAPUANO et al., 2013).

1.5 JUSTIFICATIVA

Muitos trabalhos tem relatado o efeito antidiabético de diferentes classes de chalconas naturais e sintéticas (CAZAROLLI et al., 2013a; HU et al., 2014; MAHAPATRA; ASATI; BHARTI, 2015). Entre estes efeitos descritos para as chalconas em relação à homeostasia da glicose, destacam-se a atividade de dissacaridasas intestinais, efeito

insulinomimético em tecidos alvos da insulina, efeito antioxidante no pâncreas e na secreção de insulina, nos mais variados modelos in vivo e in vitro (HU et al., 2012, 2014; OHTA et al., 2015). No entanto, os mecanismos celulares e moleculares que medeiam a ação de chalconas na secreção de insulina ainda são desconhecidos. Apoiado em trabalhos do Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais que descreveram o efeito agudo de chalconas derivativas, com grupamentos eletrodoadores e eletroceptores, na tolerância a glicose, o presente trabalho foi proposto. Para tanto, foram selecionadas algumas chalconas com efeitos significativos na regulação da glicemia in vivo, para o estudo do mecanismo de ação que culminam na secreção de insulina, in vitro.

Devido as varias reações adversas que os anti hiperglicêmicos orais apresentam a curto ou longo prazo que podem fazer com que o tratamento se torne inviável, seja por descontinuação do uso do medicamento por parte do paciente ou por problemas fisiológicos causados como o caso das sulfoniluréias. É de extrema importância que se descubra/desenvolva outros fármacos com atividade anti-hiperglicêmica que apresente menos efeitos colaterais do que os que já estão disponíveis no mercado. Desta forma este trabalho visou estudar as chalconas como uma alternativa para o tratamento da diabetes melito tipo 2.

Este estudo está apoiado no efeito de chalconas, com grupamentos funcionais metoxi, na redução da glicemia na curva de tolerância à glicose. A hipótese do mecanismo de ação das chalconas aqui estudadas seria que elas atuem na a secreção de insulina pelo mecanismo de ação semelhante ao estimulado pela alta glicose (inibição de canais K_{ATP} e ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV)).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o mecanismo de ação da chalcona (2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(3',4'- dimetóxi-fenil)-2-propen-1-ona (P9) na secreção de insulina em ilhotas pancreáticas

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar as chalconas com ação anti-hiperglicêmica para o estudo do mecanismo de ação na secreção de insulina em ilhotas pancreáticas.
- Estudar o efeito das chalcona P9 e da chalcona (2E)-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-3-(3,4-dimetoxi- fenil)-2-propen-1-ona (L38) na captação de glicose no músculo sóleo.
- Investigar a curva de tempo da chalcona P9 no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas.
- Estudar a curva de concentração-resposta da chalcona P9 no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas.
- Averiguar o mecanismo de ação da chalcona P9 no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas.
- Investigar o efeito da chalcona P9 na captação de glicose em ilhotas pancreáticas.
- Estudar o efeito da chalcona P9 na secreção de insulina estática.

3 METODOLOGIA

3.1 REAGENTES

Glibenclaminda, diazoxide, nifedipina, BAPTA-AM, PD98059, glipizida, albumina bovina sérica e colagenase tipo V foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company[®] (St. Louis, MO, EUA). Glicose, e outros solventes foram adquiridos da Diprolab[®] (Florianópolis, SC, Brasil). Solventes para os procedimentos analíticos, etanol e metanol foram adquiridos da Merck[®] (Darmstadt, Alemanha). Todos os produtos químicos utilizados eram de grau analítico. O ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) para a determinação quantitativa de insulina de rato (número de catálogo EZRMI-13K) foi adquirido da Millipore (St. Charles, MO, EUA). [U-¹⁴C]-2-Deoxi-D-glicose (¹⁴C-DG), atividade específica 9.25 GBq/mmol, [⁴⁵Ca]CaCl₂ (sp. act. 321 KBq/mg Ca²⁺) e Optiphase Hisafe líquido de cintilação biodegradável foi adquirido da Perkin-Elmer Life e da Analytical Sciences (Boston, MA, EUA).

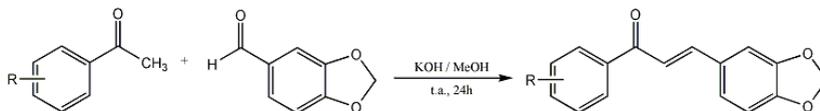
3.1.1 Preparação das chalconas

A preparação das chalconas foi de responsabilidade do Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes, do grupo de Síntese Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (DAMAZIO et al., 2009, 2010).

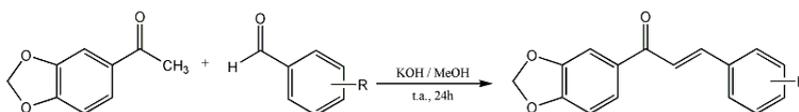
Os reagentes usados para a preparação das chalconas foram obtidos comercialmente (Merck[®], Sigma-Aldrich[®]). Todas as chalconas foram preparadas por adicionar em um balão de 100 mL, o benzaldeído (1,5 g; 10 mmol), a acetofenona (10 mmol) e metanol (30 mL). Os reagentes foram dissolvidos por agitação magnética e em seguida foi adicionado KOH 50% v/v (10 mL). A reação foi mantida em agitação magnética, à temperatura ambiente, por 24 h. Após este período, água destilada foi adicionada à reação, sendo a mesma acidificada com ácido clorídrico 10%, o que provocou a precipitação dos compostos. Esta foi filtrada em funil de Büchner; a pureza foi verificada por cromatografia de camada delgada e, quando necessário, as chalconas foram recristalizadas em hexano e diclorometano ou purificadas por coluna cromatográfica (figura 9

Figura 9). As estruturas foram identificadas por ponto de fusão, infravermelho, análise elementar, e ressonância magnética de ^1H e ^{13}C .

Figura 9 - Procedimento geral para as chalconas com grupamento 3,4-metilenodioxil



Chalcona P9: R = 3',4'-OCH₃



Chalcona L38: R = 3,4-OCH₃

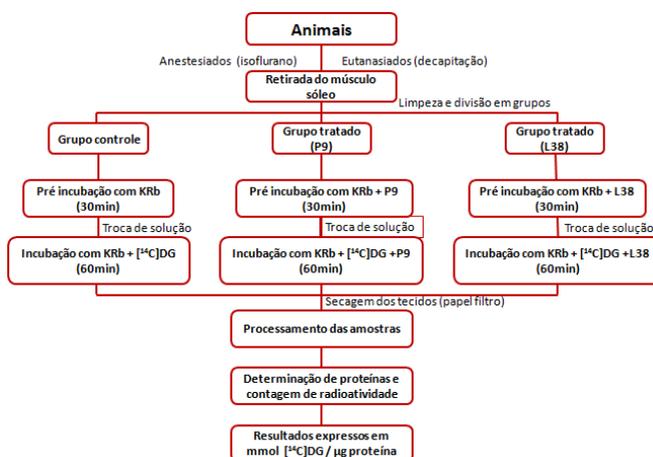
Representação da reação de condensação de Clain-Schmitd para formação das chalconas (2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(3',4'-dimetoxifenil)-2-propen-1-ona (P9) e (2E)-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)-2-propen-1-ona (L38). Fonte: Damazio, 2008

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* machos de 49-50 dias que foram utilizados para ensaios em músculo esquelético e 60-90 dias de idade que foram utilizados nos ensaios aplicados em ilhotas pancreáticas. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e alimentados com ração comercial e água *ad libitum* em sala climatizada onde foram submetidos a um ciclo normal de claro/escuro (luzes acesas das 6 h às 18 h). Todos os animais foram monitorados e mantidos em concordância com as recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Foi utilizado o Protocolo nº 2119280317 aprovado pela CEUA/UFSC em 07.07.2017.

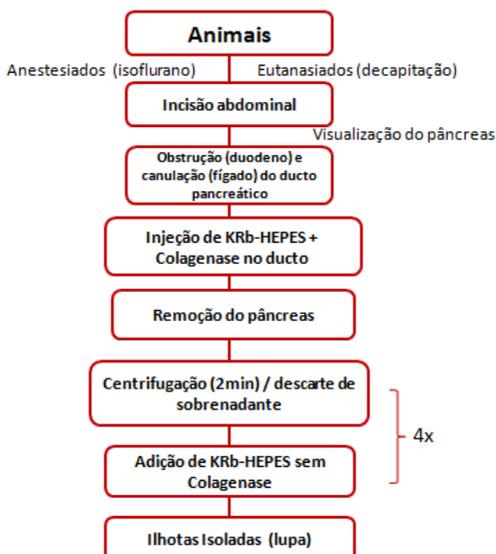
3.3 ENSAIOS E MEDIDAS DA CAPTAÇÃO DE GLICOSE NO MÚSCULO SÓLEO

Ratos *Wistar* machos (49-50 dias) foram anestesiados com isoflurano e decapitados, o músculo sóleo foi removido e imediatamente colocado em placa de Petri, em gelo, contendo o tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRb) com uma composição de NaCl (122 mM), KCl (3 mM), MgSO₄ (1,2 mM), CaCl₂ (1,3 mM), KH₂PO₄ (0,4 mM), e NaHCO₃ (25 mM) em atmosfera de O₂/CO₂ (95%: 5%, v/v) até o pH 7,4; contendo 3 mM de glicose. Após dissecação e limpeza do tecido conjuntivo os músculos direito e esquerdo foram divididos em quatro fatias (corte transversal às fibras musculares), alternadamente incubados nos grupos controles e tratados com a chalcona P9 e L38 em diferentes concentrações. Para a captação de [U-¹⁴C]-2-deoxi-D-glicose os músculos foram pré-incubados durante 30 minutos em tampão KRb (controle) 300 µL em um agitador metabólico a 37°C em atmosfera de carbogênio (O₂: CO₂, 95:5, v/v) e posteriormente incubados por 1 hora em novo tampão KRb contendo 0,1 µCi/mL de [U-¹⁴C]-2-deoxi-D-glicose acrescido do composto nas concentrações determinadas. Os músculos, então foram removidos, secados em papel filtro e transferidos para tubos com 500 µL de NaOH e fervidos por 15 minutos. Alíquotas de 5 µL de cada amostra foram utilizadas para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry et al., 1951. Alíquotas de 50 µL de cada amostra foram utilizadas para contagem da radioatividade em líquido de cintilação OptiPhase Hisafe3 (WallacOy, Turku, Finlândia) em espectrômetro de cintilação (LKB rack beta modelo LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman, Boston, USA). Como observado no fluxograma abaixo:



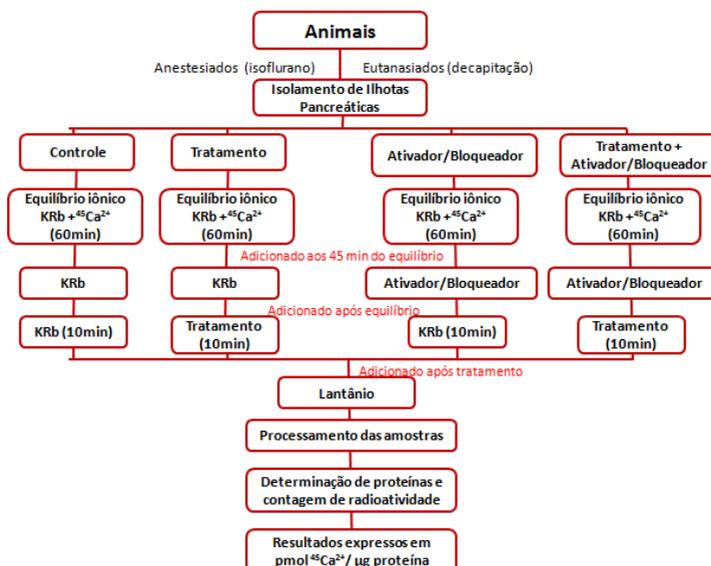
3.4 ISOLAMENTO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS

Ratos *Wistar* machos (60-90 dias) euglicêmicos foram anestesiados com isoflurano e decapitados. O pâncreas dos ratos foi visualizado por meio de uma incisão abdominal central. O ducto pancreático foi obstruído na altura do duodeno e canulado próximo ao fígado. O tampão Krebs Ringer (contendo 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,3 mM CaCl₂, 0,4 mM KH₂PO₄, e 25 mM NaHCO₃, carbogenado com O₂/CO₂ (95%:5%, v/v) até atingir o pH 7,4) adicionado de HEPES (8 mM), glicose 3 mM (KRb-HEPES) e colagenase (10 mg) foi injetado no ducto pancreático até o pâncreas ficar totalmente distendido. O pâncreas foi removido e mantido numa placa de Petri com KRb-HEPES. Posteriormente o tecido foi transferido para tubo cônico (110 x 115 104 mm), centrifugado (centrifuga Excelsa Baby (modelo 206), FANEM, São Paulo, SP, Brasil), por 2 min. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 10 mL de KRb-HEPES sem colagenase. Este processo foi repetido por quatro vezes, sendo o último realizado por decantação. Alíquotas (100 µL) em média 500 µg de proteína de ilhotas isoladas foram transferidas para microtubos contendo 300 µL de KRb-HEPES sem colagenase. Após nova centrifugação o tampão foi removido e foi iniciado o ensaio com as ilhotas. Como observado no fluxograma abaixo:



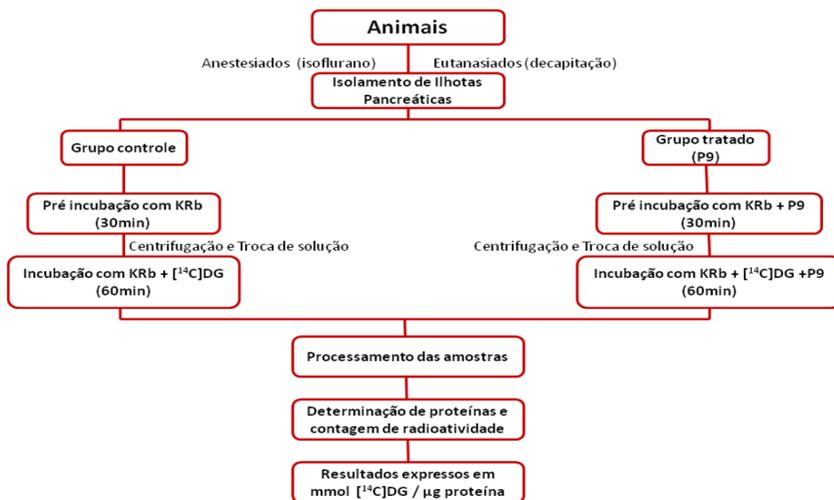
3.5 INFLUXO DE CÁLCIO NA ILHOTA PANCREÁTICA ISOLADA

As ilhotas pancreáticas isoladas foram pré-incubadas em tampão KRb-HEPES contendo 5 mM de glicose, 0,1 $\mu\text{Ci} / \text{mL}$ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ por 60 minutos em incubadora com agitação metabólica a 37 °C, pH 7,4 em atmosfera de dióxido de carbono com O_2 : CO_2 (95: 5, v / v) nos grupos controles ou tratados com a chalcona P9. Em alguns experimentos foram adicionados, um ativador/bloqueador de canais iônicos ou ativadores/inibidores de proteínas específicas, aos 45 minutos de incubação, correspondendo a 15 minutos antes do tratamento. Estes foram mantidos durante todo o período de incubação (Frederico et al., 2012). Foram utilizados os seguintes compostos: glibenclamida 20 nM; diazoxide 250 μM ; nifedipina 1 μM (Frederico et al., 2012); BAPTA-AM 50 μM (Altenhofen et al., 2017) e PD98059 50 μM (CASTRO et al., 2014). As ilhotas foram tratadas durante 10 minutos e a incubação foi finalizada com uma solução de cloreto de lantânio (10 mM) a 2 °C para impedir o fluxo de Ca^{2+} (BATRA; SJÖGREN, 1983). Alíquotas de 50 μL foram retiradas de cada amostra para medição da radioatividade em líquido de cintilação através de um espectrômetro de cintilação líquida rack (modelo LS 6500; Contador de Cintilação Multifinalidade - Beckman Coulter) e, 10 μl foi usada para a quantificação de proteína de acordo com Lowry et al., 1951. Como observado no fluxograma abaixo:



3.6 CAPTAÇÃO DE [U-¹⁴C]-2-DEOXI-D-GLICOSE EM ILHOTAS PANCREÁTICAS

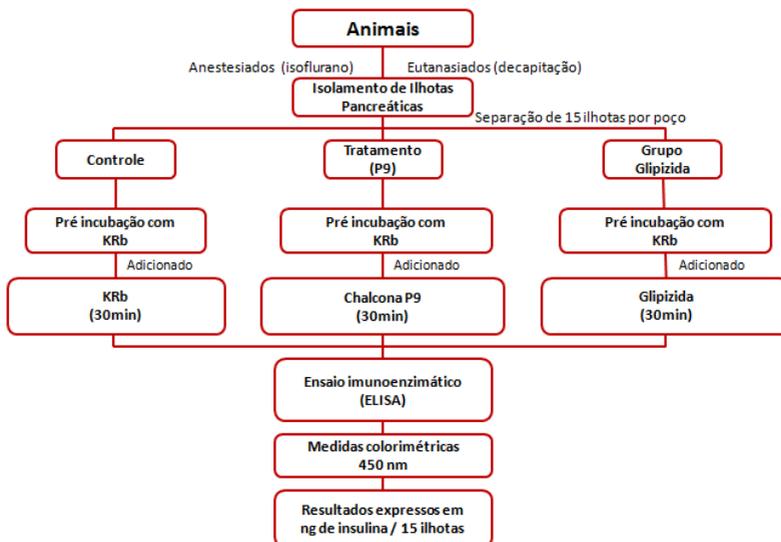
As ilhotas pancreáticas isoladas foram pré-incubadas durante 30 minutos em tampão KRb-HEPES contendo 3 mM de glicose em um agitador metabólico a 37°C em atmosfera de carbogênio (O₂: CO₂, 95:5, v/v) e posteriormente foram incubados por 60 minutos em novo tampão KRb contendo 0,1 μCi/mL de [U-¹⁴C]-2-deoxi-D-glicose no grupo controle ou no grupo tratado contendo o composto (P9) nas concentrações determinadas. Alíquotas de 10 μL de cada amostra foram utilizadas para fazer dosagem de proteínas pelo método de Lowry et al. (1951). Alíquotas de 50 μL cada amostra foram utilizadas para contagem da radioatividade em líquido de cintilação Opti Phase Hisafe 3 (Wallac Oy, Turku, Finlândia) em espectrômetro de cintilação (LKB rack beta modelo LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman, Boston, USA). Como observado no fluxograma abaixo:



3.7 ENSAIO DE SECREÇÃO DE INSULINA INDUZIDA NA ILHOTA PANCREÁTICA

As ilhotas pancreáticas isolados foram pré-incubadas em tampão Krebs-Ringer-bicarbonato (KRb) -HEPES em um incubador metabólico tipo Dubnoff a 37 °C, pH 7,4 em atmosfera de dióxido de carbono com O₂: CO₂ (95: 5, v / v), contendo glicose 3 mM. A chalcona

derivativa P9 1 nM ou glipizida 2,7 μ M foi incubada durante 30 minutos. A quantificação de insulina estática no meio de incubação, ausência/presença do composto, foi detectada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante e expressas como ng de insulina / 15 ilhotas por poço de incubação. A faixa de valores detectados por este ensaio foi de 0,2-10 ng / mL. Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio para insulina foram de 3,22 e 6,95, respectivamente, uma de sensibilidade de 0,2 ng / mL. Todos os níveis de insulina foram estimados por meio de medidas colorimétricas a 450 nm com um leitor de placa ELISA (Organon Teknica, Roseland, NJ, EUA) através de interpolação a partir de uma curva padrão. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados foram expressos em ng de insulina / 15 ilhotas / poço (CAZAROLLI et al., 2009). Como observado no fluxograma:



3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

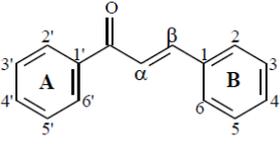
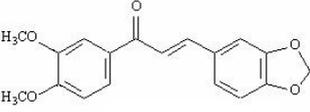
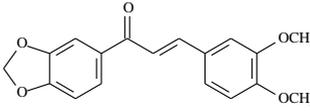
Os dados foram expressos como média \pm S.E.M. Uma análise de variância (ANOVA), seguido de pós-teste *Bonferroni* ou o teste *t* de *Student* foi utilizado para determinar a significância das diferenças entre os grupos. Diferenças foram consideradas significativas para $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 APRESENTAÇÃO DO NÚCLEO FUNDAMENTAL E CHALCONAS DERIVATIVAS DA 3,4-METILENODIÓXI-BENZALDEÍDO

Estes compostos apresentados na Tabela 1 foram sintetizados no departamento de química da UFSC para a elaboração deste projeto. A Tabela 1 apresenta o nome e a estrutura química do núcleo fundamental das chalconas o (2E)-1,3-difenilprop-2-en-1-ona que é composto por dois anéis benzênicos denominados anel A e anel B. Além disso, apresenta a estrutura química das duas chalconas derivativas que foram utilizadas neste trabalho.

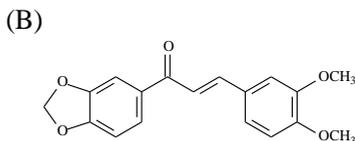
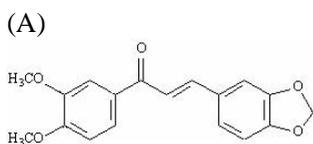
Tabela 3 – Estrutura química do núcleo fundamental e chalconas derivadas do 3,4-metilenodióxi-benzaldeído

<p>Núcleo Fundamental</p> <p>(2E)-1,3-difenilprop-2-en-1-ona</p>		<p>(ALBERTON, 2007; ALBERTON et al., 2008; DAMAZIO et al., 2009)</p>
<p>P9</p> <p>(2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(3',4'-dimetóxi-fenil)-2-propen-1-ona</p>		<p>(ALBERTON et al., 2008; DAMAZIO, 2008)</p>
<p>L38</p> <p>(2E)-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-3-(3,4-dimetoxi-fenil)-2-propen-1-ona</p>		<p>(DAMAZIO, 2008)</p>

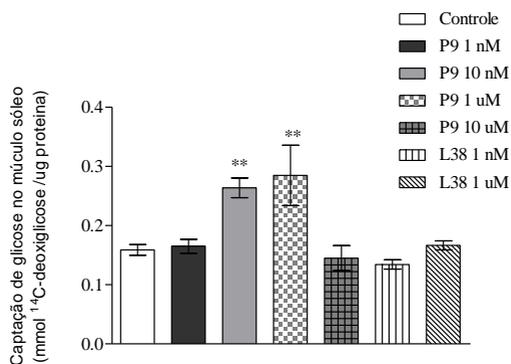
4.2 ESTUDO DO EFEITO DAS CHALCONAS DERIVATIVAS (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)-1-(3',4'-DIMETOXI-FENIL)-2-PROPEN-1-ONA) E (2E)-1-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)-3-(3,4-DIMETOXI-FENIL)-2-PROPEN-1-ONA) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NA CAPTAÇÃO DA GLICOSE NO MÚSCULO SÓLEO

A figura 10 mostra a estrutura química das chalconas derivativas (A; B) e a captação de glicose no músculo sóleo na presença de duas chalconas derivativas em diferentes concentrações, in vitro (C). Como podemos observar a (2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(3',4'-dimetoxi-fenil)-2-propen-1-ona), chalcona P9 na concentração 10 nM e 1 μ M estimulou significativamente a captação de glicose em torno de 70% e 80% quando comparado ao grupo controle. No entanto, a (2E)-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-3-(3,4-dimetoxi-fenil)-2-propen-1-ona), chalcona L38 nesta concentração e tempos estudados não alterou a captação de glicose quando comparada ao grupo controle.

Figura 10 - Estrutura química de chalconas derivativas, (A) (2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(3',4'-dimetoxi-fenil)-2-propen-1-ona) e (B) (2E)-1-(1,3-benzodioxol-5-il)-3-(3,4-dimetoxi-fenil)-2-propen-1-ona); (C) curva concentração-resposta das chalconas derivativas na captação de [U-¹⁴C]-2-Deoxi-D-glicose no músculo sóleo



(C)

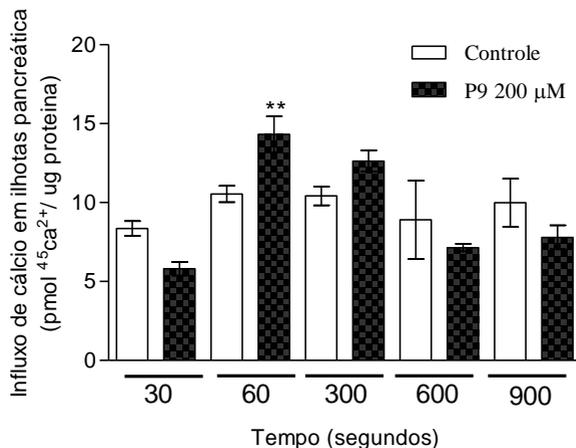


(A) Estrutura química da chalcona P9. (B) Estrutura química da chalcona L38. (C) Ensaio de captação de ¹⁴C-deoxiglicose. Pré incubação (PI) = 30 minutos, incubação (I) = 60 minutos. Os valores são expressos como a média ± E.P.M.; n=6. Significativo para $**p \leq 0,01$ em relação ao grupo controle. (C) Fonte: Elaborado pela autora.

4.3 ESTUDO DO EFEITO DA CHALCONA DERIVATIVA (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)-1-(3',4'-DIMETOXI-FENIL)-2-PROPEN-1-ONA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E DIFERENTES TEMPOS NO INFLUXO DE CÁLCIO EM ILHOTAS PANCREÁTICAS

A figura 11 mostra a curva de tempo da chalcona P9 no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas. Após a incubação da chalcona P9 nos períodos de 30, 60, 300, 600 e 900 segundos foi observado o efeito estimulatório dessa chalcona no tempo de 60 segundos em 36% relação ao respectivo controle, e em relação ao tempo 30 segundos.

Figura 11 - Curva de tempo da chalcona (2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(3',4'-dimetoxi-fenil)-2-propen-1-ona no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas.



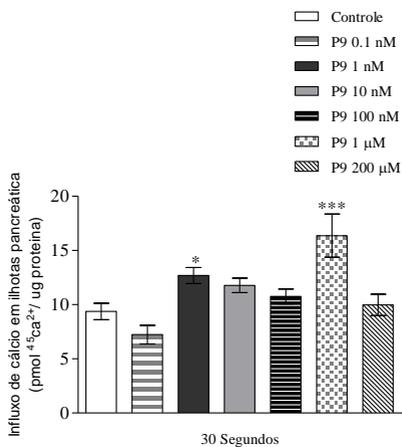
Curva de tempo da chalcona P9 no influxo de cálcio. Equilíbrio iônico (EI) = 60 minutos, I= 30; 60; 300; 600; 900 segundos. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M.; n=6. Significativo para $**p \leq 0,01$ em relação ao grupo controle do respectivo tempo. Fonte: Elaborado pela autora.

A partir desses resultados foram estudadas diferentes concentrações da P9 em 30, 60 e 600 segundos. Na figura 12 (A, B e C) foi observado a curva de concentração-resposta da chalcona P9 no ensaio de influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas nos tempos de 30 segundos (A) em que a chalcona estimulou a captação de cálcio na concentração de 1 nM em 35% e na concentração de 1 μM em 74%, em relação ao controle. Em 60 segundos (B) a chalcona na concentração de 10 nM estimulou o influxo de cálcio aumentando em torno de 60% em relação ao controle e, em 600 segundos (C) a chalcona estimulou nas concentrações de 1 nM em 43%. Já na concentração de 10 μM a P9 apresentou um efeito inibitório do influxo de cálcio em 38% em relação ao controle. Com base nesses resultados adotamos para o presente trabalho a concentração da P9 de 1 nM com um tempo de incubação de

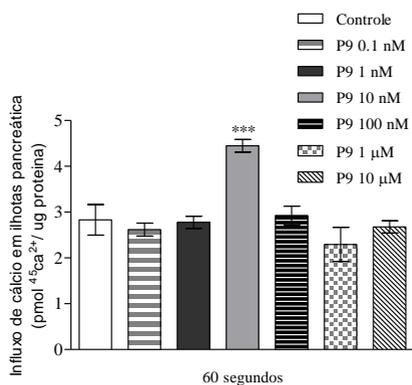
600 segundos (10 minutos) para estudar o mecanismo de ação deste composto no influxo de cálcio.

Figura 12 - Curva concentração- resposta da chalcona (2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(3',4'-dimetoxi-fenil)-2-propen-1-ona no influxo de cálcio nos tempos (A) 30 segundos, (B) 60 segundos e (C) 600 segundos

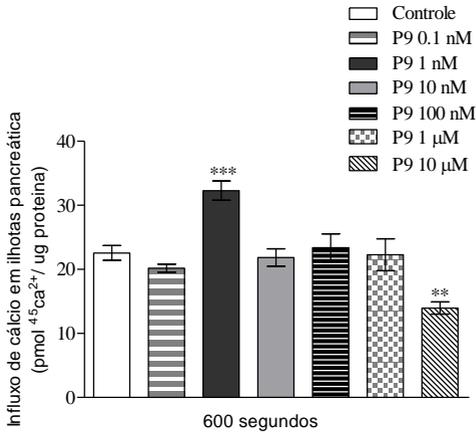
(A)



(B)



(C)

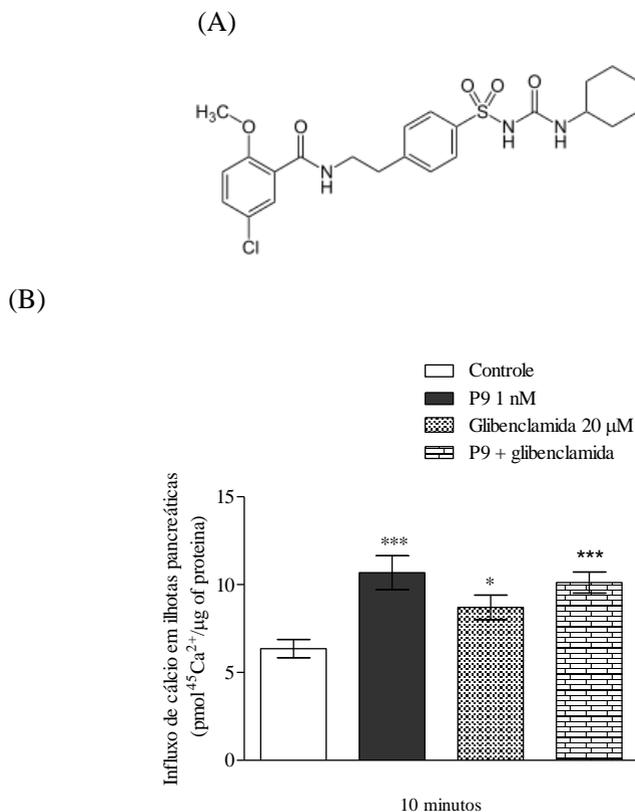


(A) – Curva concentração-resposta da P9 em ensaio de influxo do cálcio. EI= 60 minutos e I= 30 segundos. (B) I= 60 segundos. (C) I= 600 segundos. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M.; n=6. Significativo para* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle. Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)-1-(3',4'-DIMETOXI-FENIL)-2-PROPEN-1-ONA) NO INFLUXO DE CÁLCIO NA ILHOTA PANCREÁTICA: ENVOLVENDO CANAIS DE POTÁSSIO

A glibenclamida, uma sulfonilureia de segunda geração atua inibindo canais de potássio sensíveis a ATP, se ligando a subunidade reguladora sulfonilureia 1 inibitória do canal de potássio em células β pancreáticas. Isso induz uma despolarização da membrana celular e leva conseqüentemente a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem. A figura 13 mostra (A) a estrutura de glibenclamida e (B) a influência da glibenclamida no potencial estimulatório da P9 no influxo do cálcio. Foi demonstrado que a glibenclamida aumentou a captação de cálcio, como esperado para as sulfonilureias, comparado ao grupo controle e quando utilizada em combinação com a P9 a glibenclamida não inibiu o efeito no influxo de cálcio na ilhota pancreática.

Figura 13 – Estrutura química da glibenclamida (A) e a influência de um bloqueador de canal de potássio no efeito estimulatório da chalcona derivativa no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas (B)



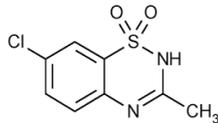
(A) Estrutura química da glibenclamida. (B) EI= 60 minutos, a glibenclamida foi adicionada aos 45 minutos do equilíbrio iônico. I= 10 minutos. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n=6. Significativo para * $p \leq 0,05$ e *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle. Fonte: Elaborado pela autora.

Para entender melhor a relação dos canais de potássio no mecanismo de ação da P9 foi realizado um ensaio com o diazoxide que é um fármaco que abre canais de potássio gerando um gradiente elétrico

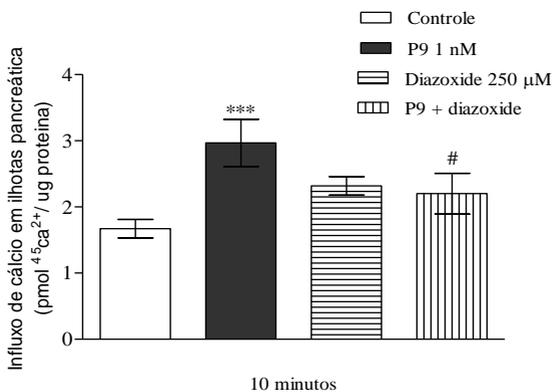
negativo dentro da célula que se traduz em uma hiperpolarização da membrana celular e fecha canais de cálcio dependentes de voltagem diminuindo o influxo de cálcio. Na figura 14 foi possível verificar a influência do diazoxide no potencial estimulatório da P9 no influxo de cálcio. Foi constatado que o diazoxide não alterou o influxo de cálcio comparado ao grupo controle, porém ao ser utilizado em combinação com a P9 diminuiu o efeito estimulatório da chalcona em 25% no influxo de cálcio na ilhota pancreática. Isso corrobora com a glibenclamida reforçando que o efeito da P9 parece ser principalmente fechando canal de potássio, porém outros fatores estão envolvidos, pois não foi totalmente bloqueado.

Figura 14 – Estrutura química do diazoxide (A) e a influência de um ativador de canal de potássio no potencial estimulatório da chalcona derivativa no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas (B)

(A)



(B)



(A)

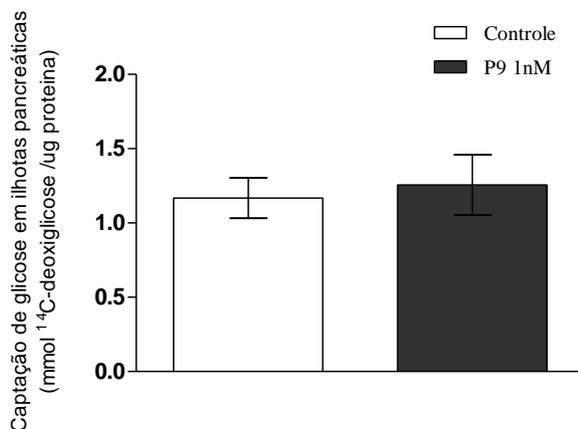
Estrutura química do diazoxide. (B) EI= 60 minutos, o diazoxide foi adicionado aos 45 minutos de equilíbrio iônico. I= 10 minutos. Os

valores são expressos como média \pm E.P.M.; n=6. Significativo para*** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle e # $p \leq 0,05$ em relação ao P9. Fonte: Elaborado pela autora.

4.5 ESTUDO DO EFEITO DA (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)-1-(3',4'-DIMETOXI-FENIL)-2-PROPEN-1-ONA) NA CAPTAÇÃO DE GLICOSE EM ILHOTAS PANCREÁTICAS

Em ilhotas pancreáticas a concentração da chalcona P9 utilizada para o ensaio de captação de ^{14}C -DG foi a mesma utilizada para os ensaios de influxo de cálcio de 1 nM. Porém na captação de glicose não foi possível observar o efeito estimulatório da P9 como representado na figura 15.

Figura 15 - Efeito da chalcona derivativa na captação de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -2-Deoxi-D-glicose em ilhotas pancreáticas



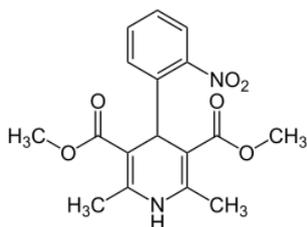
Efeito da P9 na captação de ^{14}C -deoxiglicose. PI= 30 minutos, I= 60 minutos. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n=6. Fonte: Elaborado pela autora.

4.6 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)-1-(3',4'-DIMETOXI-FENIL)-2-PROPEN-1-ONA) NO INFLUXO DE CÁLCIO NA ILHOTA PANCREÁTICA: ENVOLVENDO CANAIS DE CÁLCIO

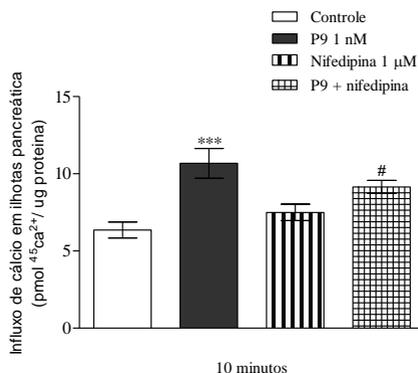
Para caracterizar o mecanismo de ação da chalcona P9 foram utilizados um bloqueador de canais de cálcio dependente de voltagem tipo L, a nifedipina e um quelante de cálcio intracelular, o BAPTA-AM. A figura 16 apresenta a influência da nifedipina no potencial estimulatório da P9 no influxo de cálcio. Neste ensaio foi possível constatar que a nifedipina não apresentou diferença significativa no influxo de cálcio com relação ao grupo controle e ao ser utilizado em combinação com a P9 inibiu o efeito estimulatório da chalcona em 15%.

Figura 16 – Estrutura química da nifedipina (A) e a influência de um bloqueador de canal de cálcio na ação estimulatória da chalcona derivativa no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas (B)

(A)



(B)

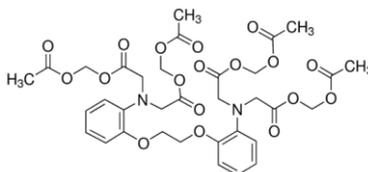


(A) Estrutura química da nifedipina. (B) EI= 60 minutos, a nifedipina foi adicionada aos 45 minutos de equilíbrio iônico. I= 10 minutos. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n=6 Significativo para *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle, # $p \leq 0,05$ em relação ao P9. Fonte: Elaborado pela autora.

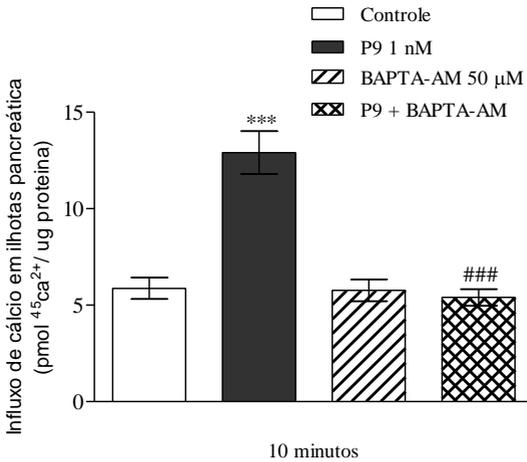
Na figura 17 foi apresentado a influência do BAPTA-AM no efeito estimulatório da P9 no influxo de cálcio. Podemos verificar que o BAPTA-AM não alterou o influxo de cálcio comparado ao grupo controle. Porém, ao ser utilizado em combinação com a P9 bloqueou totalmente o efeito estimulatório da chalcona no influxo de cálcio.

Figura 17 – Estrutura química do BAPTA-AM (A) e a influência de um quelante de cálcio intracelular no potencial estimulatório da chalcona no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas (B)

(A)



(B)



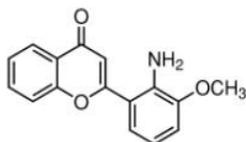
(A) Estrutura química do BAPTA-AM. (B) EI= 60 minutos, o BAPTA-AM foi adicionado aos 45 minutos de equilíbrio iônico. I= 10 minutos. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n=6. Significativo para *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle e ### $p \leq 0,001$ em relação ao P9. Fonte: Elaborado pela autora.

4.7 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)-1-(3',4'-DIMETOXI-FENIL)-2-PROPEN-1-ONA) NO INFLUXO DE CÁLCIO NA ILHOTA PANCREÁTICA: ENVOLVENDO A VIA DA PROTEÍNA CINASE CINASE ATIVADA POR MITÓGENOS

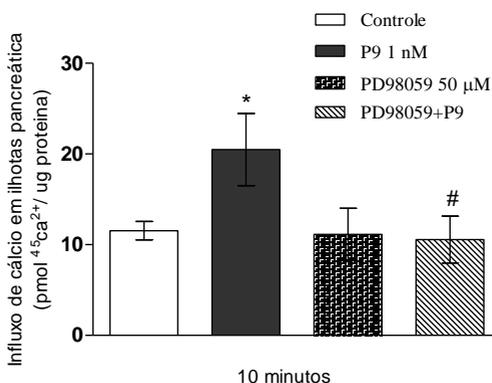
Com o objetivo de verificar o efeito da inibição da via MEK/ERK foi utilizado o PD98059 que é um inibidor da MEK. Na figura 18 foi demonstrada a ação do PD98059 no efeito estimulatório da P9, em que o PD98059 isolado não apresentou diferença no influxo do cálcio em relação ao grupo controle, além disso, quando associado com a P9, anulou completamente a ação da P9.

Figura 18 – Estrutura química do PD98059 (A) e a influência do PD98059 na ação estimulatória da chalcona derivativa no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas (B)

(A)



(B)



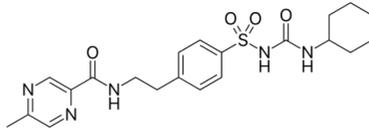
(A) Estrutura química do PD98059. (B) EI= 60 minutos, o PD98059 foi adicionado aos 45 minutos de equilíbrio iônico. I= 10 minutos. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n=6; * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle e # $p \leq 0,05$ em relação ao P9. Fonte: Elaborado pela autora.

4.7 ESTUDO DO EFEITO DA (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)-1-(3',4'-DIMETOXI-FENIL)-2-PROPEN-1-ONA) NA SECREÇÃO DE INSULINA ESTÁTICA EM ILHOTAS PANCREÁTICAS.

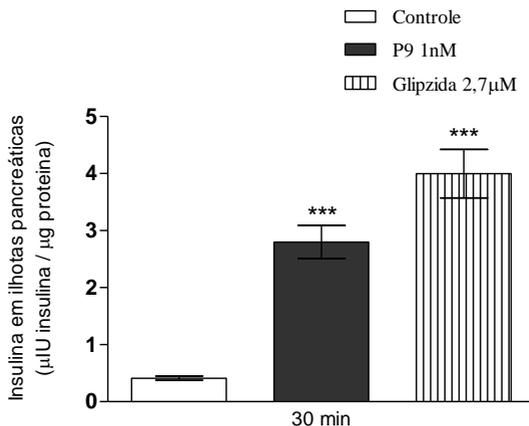
A P9 assim como a glipizida aumentaram a secreção de insulina estática nas ilhotas pancreáticas após serem incubadas por 30 minutos. A figura 19 mostra o efeito estimulatório da chalcona P9 comparada ao controle em torno de 200% enquanto o aumento na presença de glipizida, um composto referência utilizado como secretagogo de insulina, foi em torno de 330%.

Figura 19 – Estrutura química da glipizida (A) e o efeito da chalcona derivativa e da glipizida na secreção de insulina estática em ilhotas pancreáticas (B)

(A)



(B)



(A) Estrutura química da glipizida. (B) EI= 60 minutos, I= 30 minutos. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n=6; Significativo para *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle. Fonte: Elaborado pela autora.

5 DISCUSSÃO

As chalconas, metabólitos secundários das plantas, possuem diferentes atividades biológicas já descritas (CAZAROLLI et al., 2013a). Entre estas, a atividade antioxidante, anti-inflamatória, atividades pró-apoptótica e/ou antiproliferativa e, entre as doenças crônicas autoimunes se destaca a diabetes (BATOVSKA; TODOROVA, 2010). As chalconas derivativas mostradas na tabela 1 representam uma classe de estruturas contendo o grupo benzodioxol e o grupo dimetoxifenil no anel A e B, respectivamente, sendo os substituintes de cada molécula um o espelho do outro. Estas estruturas previamente relatadas com o efeito na melhoria da tolerância à glicose e/ou no estímulo na secreção de insulina (ALBERTON et al., 2008; DAMAZIO et al., 2009, 2010) foram então selecionadas para este estudo do mecanismo de ação contidos nesta dissertação. Uma das justificativas desta escolha foi em relação ao grupo funcional metoxifenil por apresentarem melhor atividade anti-hiperglicêmica em relação a outros grupos funcionais inseridos nas chalconas (ALBERTON et al., 2008).

Ainda que o efeito de diferentes chalconas esteja amplamente relatado na literatura como o efeito antidiabético (insulinomimético) anti-hiperglicêmico (secretagogo de insulina), o mecanismo de ação em nível celular e molecular é pouco conhecido. Uns dos efeitos fisiologicamente mais importantes da insulina para a manutenção da glicemia é através do aumento de transportadores de glicose (GLUT4) na membrana plasmática nos tecidos chamados dependentes de insulina (SILVA et al., 2013). Dentre estas duas chalconas estudadas, a P9 e a L38, a P9 estimulou significativamente a captação de glicose em um tecido dependente de insulina, o músculo esquelético. Foi relatado na literatura o efeito de chalconas derivativas como a 4-hidroxiclericina e a xantangelol no estímulo da captação de glicose em linhagens de adipócitos (3T3-L1) e na musculatura esquelética por meio da ação da 2',4'-diidroxí-6'-metoxi-3',5'-dimetilchalcona, respectivamente (CHOI et al., 2016; OHTA et al., 2015). Ainda, outros trabalhos descreveram que chalconas derivativas (2E)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(4'-nitrofenil)-2-propeno-1-ona e a ((2E)-1-4'-nitrofenil)-3-(2-naftil)-2-propeno-1-ona não apresentaram efeito na captação de glicose no músculo esquelético de ratos (DAMAZIO et al., 2009, 2010).

Damazio, 2008 descreveu que a chalcona P9 estimula a secreção de insulina sérica durante a curva de tolerância à glicose. No presente trabalho foi estudado o mecanismo de ação na secreção de insulina da P9 in vitro em ilhotas isoladas. O efeito estimulatório da chalcona P9 no influxo de cálcio em diferentes concentrações caracterizam a ação de rápida resposta deste composto na mobilização de cálcio extracelular como um agente essencial para a secreção de insulina nas células beta. Além disso, este efeito da P9 no acúmulo intracelular de cálcio, que é mandatório para a secreção de insulina, ocorreu entre 30 e 600 segundos, o que culmina com o período de secreção de insulina de primeira fase (CASTIELLO; HEILEMAN; TABRIZIAN, 2016).

É bem conhecido que a alta molaridade de glicose inicia a ativação dos canais de potássio dependentes de ATP através do fechamento destes canais e inibição da saída de potássio. Posteriormente, este acúmulo de cargas positiva ativa a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem caracterizando uma ação inicial para a secreção de insulina pelo mais bem conhecido nutriente da nossa dieta, a glicose (FREDERICO et al., 2017). Como observado na figura 13 a chalcona P9 estimulou o influxo de cálcio em torno de 78%. Já a glibenclamida, uma sulfonilureia de segunda geração bem conhecida como secretagogo de insulina, aumentou o influxo de cálcio em torno de 15 %. Uma vez que se observou que a coincubação da chalcona com a glibenclamida não reduziu o efeito estimulatório no influxo de cálcio e a coincubação da P9 com o diazoxide inibiu o efeito estimulatório da P9 em 25% (Figura 14), sugere-se que esta chalcona esteja agindo no mesmo sítio no canal de potássio o qual a glibenclamida se liga. Esta hipótese foi corroborada pelos resultados que mostram que a P9 não altera a captação basal de glicose na ilhota sugerindo que não haja majoritariamente um comprometimento das subunidades K_{ir} no mecanismo de ação da chalcona (YANG; BERGGREN, 2006). Estudos têm demonstrado que moléculas semi-sintéticas como o triterpeno fern-9(11)-ene-2 α ,3 β -diol derivativo estimula o influxo de cálcio através de um mecanismo envolvendo os canais de potássio dependentes da voltagem em ilhotas pancreáticas isoladas (DA LUZ et al., 2016). Ainda, uma sulfonamida derivativa (4-metoxifenil) induziu a secreção de insulina in vivo e o efeito estimulatório deste composto no influxo de cálcio foi totalmente bloqueado na presença do diazoxide, um composto que atua na abertura de canais de potássio (FREDERICO et al., 2013). Estes dados reforçam

a ação de compostos como os triterpenos que também são metabólitos secundários de plantas como secretagogos de insulina (CASTRO et al., 2015b). Ainda, compostos derivativos que foram desenhados apoiados na estrutura das sulfoniltioureias também tem forte ação na secreção de insulina (MASCARELLO et al., 2014). Entretanto, para as chalconas, o mecanismo de ação para a secreção de insulina ainda é pouco conhecido.

Na investigação sobre a participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem foi detectado que estes canais têm ampla participação no mecanismo de ativação das células beta na ilhota pancreática para a secreção de insulina uma vez que na presença de nifedipina a ação do composto no influxo de cálcio foi inibida. Além disso, foi observado que o cálcio dos estoques intracelulares tem papel relevante no efeito da P9 para que o composto exiba ação máxima no influxo de cálcio. Isto foi observado quando a presença do BAPTA-AM, um quelante de cálcio interno, o efeito da chalcona foi bloqueada. Alguns relatos da literatura mostram que compostos exógenos como rutina e triterpenos induzem a secreção de insulina inicialmente por aumentar significativamente e abruptamente o influxo de cálcio por ativar os canais dependentes da alta voltagem (CASTRO et al., 2015b; DA LUZ et al., 2016; DEMARCHI KAPPEL et al., 2013). Além disso, outra via de sinalização envolvida na secreção de insulina, a via da MEK foi investigada pelo uso do bloqueador desta MAPK na ilhota. O envolvimento da MEK no mecanismo de ação da chalcona derivativa P9 foi caracterizado uma vez que este bloqueador anulou o efeito da chalcona no influxo de cálcio. A literatura relata alguns trabalhos que envolvem a alteração da atividade da transcrição gênica através do estudo de compostos exógenos como o ácido ursólico ou sintéticos como o (2E)-N¹-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazide (BZD) (no músculo esquelético) através da ativação da via da MEK para a regulação da glicemia (CASTRO et al., 2015a; SILVA FREDERICO et al., 2016). Mais recentemente foi demonstrado o importante papel da MEK como um dos mediadores na via de sinalização da osteocalcina não carboxilada no efeito insulínico em células β -pancreáticas (GAO et al., 2016). No entanto, o envolvimento da MEK em células beta pancreáticas para a secreção de insulina ainda é pouco entendido e merecem estudos adicionais.

A fim de identificar o efeito direto desta chalcona derivativa na secreção de insulina, esta foi incubada durante 30 min, *in vitro*, em

ilhas isoladas. Deste perfil de secreção de insulina *in vitro* na presença da P9 podemos sugerir que o mecanismo de ação da chalcona mediada por canais de potássio e consequente acúmulo de cálcio citosólico são um estímulo imediato que culmina com a secreção de insulina já na primeira fase de liberação deste hormônio. Ainda que em molaridades diferentes, o fármaco de referência secretagogo de insulina (glipzida), estimulou significativamente a secreção de insulina nestas condições experimentais, como esperado. Estes resultados referentes à ação secretagoga de insulina por esta chalcona estão de acordo com o efeito na redução da glicemia na curva de tolerância a glicose conforme relatado por Alberton et al., 2008. No presente trabalho foi demonstrado que a secreção de insulina pela célula beta pancreática é devido à ação da chalcona P9 na ativação de canais de potássio dependentes de ATP, de canais de cálcio dependentes da voltagem e com a participação do cálcio dos estoques intracelulares.

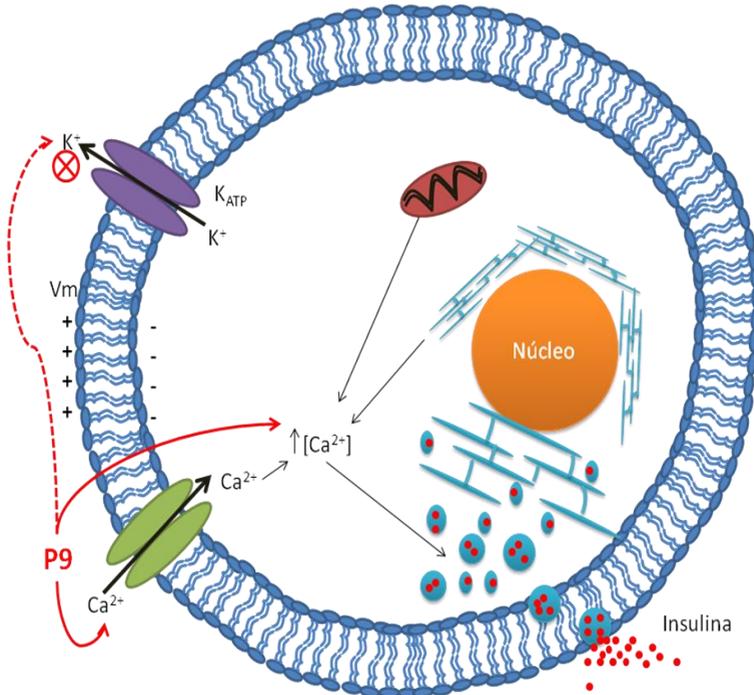
Nas últimas décadas, as chalconas são relatadas como anti-hiperglicemiantes por atuarem em diferentes órgãos envolvidos no controle glicêmico (ALBERTON et al., 2008; DAMAZIO et al., 2010; HU et al., 2012, 2014). O efeito na proteção contra o dano celular em linhagens de células beta e o estímulo na secreção de insulina foi descrito para a chalcona 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-3',5'-dimetilchalcona (HU et al., 2012). A presença de grupos metoxi em chalconas, como as utilizadas também no presente trabalho, parece contribuir com o efeito secretagogo de insulina. Além disso, também foi relatado que chalcona 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-3',5'-dimetilchalcona protege as células betas da glicotoxicidade por aumentar a secreção e síntese do peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) e por inibir a produção de óxido nítrico (HU et al., 2014).

6 CONCLUSÕES

- A chalcona P9 estimulou a secreção de insulina estática.
- A chalcona P9 estimulou a captação de glicose no músculo esquelético.
- A chalcona P9 aumentou o influxo de cálcio na ilhota pancreática em um período condizente com a primeira fase de secreção de insulina.
- A chalcona P9 estimulou o influxo de cálcio nas concentrações 1 nM, 10 nM e 1 μ M em diferentes tempos.
- A chalcona P9 estimula o influxo de cálcio através da ativação do fechamento de canais de potássio dependentes de ATP, de canais de cálcio dependentes da voltagem e com a participação do cálcio dos estoques intracelulares e da proteína MEK.
- A chalcona P9 exibiu efeito secretagogo de insulina estática em ilhotas pancreáticas em 30 min. A ação estimulatória da P9 na secreção de insulina foi em torno de 200% em relação ao controle, em uma concentração em torno de 3.000 vezes menor que o fármaco de referência, glipzida.

De acordo com os resultados obtidos podemos sugerir que a chalcona P9 exibe um potencial efeito secretagogo de insulina, mostrando que esta chalcona apresenta efeitos importantes que estão de acordo com os necessário para um potencial fármaco para a terapia da diabetes melito.

Figura 20 - Mecanismo de ação proposto para a chalcona (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)-1-(3',4'-DIMETOXI-FENIL)-2-PROPEN-1-ONA na secreção de insulina



Mecanismo de ação proposto para a chalcona P9 na secreção de insulina, segundo os protocolos experimentais testados no presente trabalho. Fonte: elaborado pela autora.

7 PERSPECTIVAS

- Estudar o envolvimento e a via de sinalização MEK na exocitose das vesículas de insulina na célula beta.
- Estudar as proteínas envolvidas na exocitose coordenada de vesículas de insulina (SNARE, VAMP, Munc).

8 REFERÊNCIAS

(ORG) OLIVEIRA, J. E. P. .; JUNIOR, R. M. M. .; VENCIO, S. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018**. São Paulo: [s.n.].

Disponível em: <www.editoraclannad.com.br>. Acesso em: 10 set. 2018.

ABDELMONEIM, A. S. et al. Variations in tissue selectivity amongst insulin secretagogues: a systematic review. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 14, n. 2, p. 130–138, fev. 2012.

ALBERTON, E. H. **INFLUÊNCIA DE CHALCONAS ANÁLOGAS, XANTONAS E MONOSSACARÍDEOS NA GLICEMIA EM MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

ALBERTON, E. H. et al. Influence of chalcone analogues on serum glucose levels in hyperglycemic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, n. 3, p. 355–362, 2008.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). **Type 2 Diabetes**.

Disponível em: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/type-2/?loc=util-header_type2>. Acesso em: 20 set. 2018.

ANTO, R. J. et al. Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds. **Cancer Letters**, v. 97, n. 1, p. 33–37, 20 out. 1995.

ÁVILA, H. P. et al. Structure–activity relationship of antibacterial chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 22, p. 9790–9794, 15 nov. 2008.

BALK-MØLLER, E.; EHRENREICH KUHRE, E. Incretin secretion: direct mechanisms (revision number 7). In: **Diapedia**. [s.l.] Diapedia.org, 2014.

BATOVSKA, D. et al. Examination of growth inhibitory properties of synthetic chalcones for which antibacterial activity was predicted. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 2211–2218, 1 maio 2009.

BATOVSKA, D. I.; TODOROVA, I. T. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. **Current Clinical Pharmacology**, v. 5, p. 1–29, 2010.

BATRA, S.; SJÖGREN, C. Effect of estrogen treatment of calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. **Life Sciences**, v. 32, n. 4, p. 315–319, 24 jan. 1983.

BEARDSALL, K. et al. Applied physiology of glucose control. **Current Paediatrics**, v. 16, n. 6, p. 434–438, 1 nov. 2006.

BOWLING, F. L.; RASHID, S. T.; BOULTON, A. J. M. Preventing and treating foot complications associated with diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, n. 10, p. 606–616, 18 out. 2015.

BROSTROM, C. O.; BROSTROM, M. A. Calcium-Dependent Regulation of Protein Synthesis in Intact Mammalian Cells. **Annual Review of Physiology**, v. 52, n. 1, p. 577–590, 28 out. 1990.

BRUTSAERT, E. F. **Diabetes Mellitus (DM) - Endocrine and Metabolic Disorders - Merck Manuals Professional Edition**. Disponível em: <<https://www.merckmanuals.com/professional/endocrine-and-metabolic-disorders/diabetes-mellitus-and-disorders-of-carbohydrate-metabolism/diabetes-mellitus-dm>>. Acesso em: 26 jun. 2018a.

BRUTSAERT, E. F. **Drug Treatment of Diabetes Mellitus - Endocrine and Metabolic Disorders - Merck Manuals Professional Edition**. Disponível em: <<https://www.merckmanuals.com/professional/endocrine-and-metabolic-disorders/diabetes-mellitus-and-disorders-of-carbohydrate-metabolism/drug-treatment-of-diabetes-mellitus>>. Acesso em: 26 jun. 2018b.

CALVINO, V. et al. Ultrasound accelerated Claisen–Schmidt condensation: A green route to chalcones. **Applied Surface Science**, v. 252, n. 17, p. 6071–6074, 30 jun. 2006.

CAPUANO, A. et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes therapy--focus on alogliptin. **Drug design, development and therapy**, v. 7, p. 989–1001, 2013.

CASTIELLO, F. R.; HEILEMAN, K.; TABRIZIAN, M. Microfluidic perfusion systems for secretion fingerprint analysis of pancreatic islets: applications, challenges and opportunities. **Lab on a Chip**, v. 16, n. 3, p. 409–431, 26 jan. 2016.

CASTRO, A. J. G. et al. The mechanism of action of ursolic acid as insulin secretagogue and insulinomimetic is mediated by cross-talk between calcium and kinases to regulate glucose balance. **Biochimica et Biophysica**

Acta (BBA) - General Subjects, v. 1850, n. 1, p. 51–61, 1 jan. 2015a.

CASTRO, A. J. G. et al. Acute effect of 3β -hidroxihop-22(29)ene on insulin secretion is mediated by GLP-1, potassium and calcium channels for the glucose homeostasis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 150, p. 112–122, 1 jun. 2015b.

CAZAROLLI, L. H. et al. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C-(2''-O- α -l-rhamnopyranosyl)- β -l-fucopyranoside on 14C-glucose uptake. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, n. 2–3, p. 407–412, 15 maio 2009.

CAZAROLLI, L. H. et al. Natural and Synthetic Chalcones: Tools for the Study of Targets of Action—Insulin Secretagogue or Insulin Mimetic? **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 39, p. 47–89, 1 jan. 2013a.

CAZAROLLI, L. H. et al. Insulin signaling: A potential signaling pathway for the stimulatory effect of kaempferitrin on glucose uptake in skeletal muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 712, n. 1–3, p. 1–7, 15 jul. 2013b.

CHAN, J. C. N. et al. Role of metformin in the initiation of pharmacotherapy for type 2 diabetes: an Asian-Pacific perspective. **Diabetes research and clinical practice**, v. 75, n. 3, p. 255–66, 1 mar. 2007.

CHANG, L.; CHIANG, S.-H.; SALTIEL, A. R. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 10, n. 7–12, p. 65–71, 2004.

CHEN, R. M. et al. Natural PTP1B Inhibitors from *broussonetia papyrifera*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 23, p. 3387–3390, 2 dez. 2002.

CHENG, A. Y. Y.; FANTUS, I. G. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 172, n. 2, p. 213–26, 18 jan. 2005.

CHIMIANTI, F.; FAVIER, A.; SEVE, M. ZnT-8, A Pancreatic Beta-Cell-Specific Zinc Transporter. **BioMetals**, v. 18, n. 4, p. 313–317, ago. 2005.

CHOI, J. W. et al. DMC (2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone) improves glucose tolerance as a potent AMPK activator.

Metabolism, v. 65, n. 4, p. 533–542, 1 abr. 2016.

COHEN, P. The twentieth century struggle to decipher insulin signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 11, p. 867–873, 1 nov. 2006.

DA LUZ, G. et al. Triterpene derivative: A potential signaling pathway for the fern-9(11)-ene-2 α ,3 β -diol on insulin secretion in pancreatic islet. **Life Sciences**, v. 154, p. 58–65, 1 jun. 2016.

DAMAZIO, R. G. **ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DE CHALCONAS NA GLICEMIA DE RATOS** Dissertação. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

DAMAZIO, R. G. et al. Nitrochalcones: Potential in vivo insulin secretagogues. **Biochimie**, v. 91, n. 11–12, p. 1493–1498, 2009.

DAMAZIO, R. G. et al. Antihyperglycemic activity of naphthylchalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1332–1337, 2010.

DEL PRATO, S.; TIENGO, A. The importance of first-phase insulin secretion: implications for the therapy of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 17, n. 3, p. 164–174, maio 2001.

DEMARCHI KAPPEL, V. et al. Rutin potentiates calcium uptake via voltage-dependent calcium channel associated with stimulation of glucose uptake in skeletal muscle. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 532, p. 55–60, 2013.

DIAKOGIANNAKI, E.; GRIBBLE, F. M.; REIMANN, F. Nutrient detection by incretin hormone secreting cells. **Physiology & behavior**, v. 106, n. 3, p. 387–93, 6 jun. 2012.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 843–847, 14 jun. 2001.

DONATH, M. Y.; HALBAN, P. A. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. **Diabetologia**, v. 47, n. 3, p. 581–589, 1 mar. 2004.

DUCKI, S. et al. Potent antimetabolic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, n.

9, p. 1051–1056, 5 maio 1998.

DUNN, M. F. Zinc–Ligand Interactions Modulate Assembly and Stability of the Insulin Hexamer – A Review. **BioMetals**, v. 18, n. 4, p. 295–303, ago. 2005.

ENOKI, T. et al. Antidiabetic Activities of Chalcones Isolated from a Japanese Herb, *Angelica keiskei*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6013–6017, jul. 2007.

FWLER, M. J. Diabetes Treatment, Part 2: Oral Agents for Glycemic Management. **Clinical Diabetes**, v. 25, n. 4, p. 131–134, 1 out. 2007.

FREDERICO, M. J. S. et al. Antidiabetic effects of sulfonamide derivatives based on structural fragment of sulfonylureas. **Current Trends in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 11–25, 2013.

FREDERICO, M. J. S. et al. Mechanism of Action of Novel Glibenclamide Derivatives on Potassium and Calcium Channels for Insulin Secretion. 2017.

FU, Z.; GILBERT, E. R.; LIU, D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. **Current diabetes reviews**, v. 9, n. 1, p. 25–53, 1 jan. 2013.

GAO, J. et al. The PLC/PKC/Ras/MEK/Kv channel pathway is involved in uncarboxylated osteocalcin-regulated insulin secretion in rats. **Peptides**, v. 86, p. 72–79, 2016.

GOMES CASTRO, A. J. et al. Betulinic acid and 1,25(OH)₂vitamin D₃ share intracellular signal transduction in glucose homeostasis in soleus muscle. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 48, n. 1, p. 18–27, 2014.

GONZÁLEZ-TERÁN, B. et al. Eukaryotic elongation factor 2 controls TNF- α translation in LPS-induced hepatitis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 1, p. 164–178, 2 jan. 2013.

GRIBBLE, F. M.; REIMANN, F. Differential selectivity of insulin secretagogues: Mechanisms, clinical implications, and drug interactions. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 17, n. 2, p. 11–15, 1 mar. 2003.

HENQUIN, J.-C. Pathways in beta-cell stimulus-secretion coupling as

targets for therapeutic insulin secretagogues. **Diabetes**, v. 53 Suppl 3, n. suppl 3, p. S48-58, 1 dez. 2004.

HENQUIN, J. C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. **Diabetes**, v. 49, n. 11, p. 1751–60, 1 nov. 2000.

HENQUIN, J. C. et al. Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 33, n. 9, p. 742–750, set. 2003.

HOFFMAN, N. J.; ELMENDORF, J. S. Signaling, cytoskeletal and membrane mechanisms regulating GLUT4 exocytosis. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 22, n. 3, p. 110–6, 1 mar. 2011.

HU, Y.-C. et al. In Vitro Investigation of 2',4'-Dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone for Glycemic Control. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 42, p. 10683–10688, 24 out. 2012.

HU, Y.-C. et al. 2',4'-Dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone Protects the Impaired Insulin Secretion Induced by Glucotoxicity in Pancreatic β -Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 7, p. 1602–1608, 19 fev. 2014.

JAMAL, H.; ANSARI, W. H.; RIZVI, S. J. Chalcones: Differential effects on glycogen contents of liver, brain and spinal cord in rats. **Biology and Medicine**, v. 1, n. 2, p. 107–115, 2009.

JUNG, G. A. et al. Methylation of eukaryotic elongation factor 2 induced by basic fibroblast growth factor via mitogen-activated protein kinase. **Experimental & molecular medicine**, v. 43, n. 10, p. 550–60, 31 out. 2011.

KAMEI, R. et al. 2'-benzyloxychalcone derivatives stimulate glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. **Life Sciences**, v. 73, n. 16, p. 2091–2099, 5 set. 2003.

KARAK, M. et al. Targeting Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma for Generation of Antidiabetic Drug. **Current Diabetes Reviews**, v. 9, n. 4, p. 275–285, 1 jun. 2013.

KAWABATA, K. et al. Prenylated chalcones 4-hydroxyderricin and xanthoangelol stimulate glucose uptake in skeletal muscle cells by inducing GLUT4 translocation. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 3,

p. 467–475, mar. 2011.

KLIP, A. The many ways to regulate glucose transporter 4 This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 14th International Biochemistry of Exercise Conference – Muscles as Molecular and Metabolic Machines, and has undergone the Journal's usual peer review process. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 34, n. 3, p. 481–487, jun. 2009.

KOMATSU, M. et al. Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. **Journal of diabetes investigation**, v. 4, n. 6, p. 511–6, 27 nov. 2013.

KOSKI, R. R. Practical Review of Oral Antihyperglycemic Agents for Type 2 Diabetes Mellitus. **The Diabetes Educator**, v. 32, n. 6, p. 869–876, 7 nov. 2006.

KRAUSS, G. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation. In: **Signal Transduction**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014. v. 5p. 844.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.

LUCONI, M.; CANTINI, G.; SERIO, M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): Is the genomic activity the only answer? **Steroids**, v. 75, n. 8–9, p. 585–594, 1 ago. 2010.

MAHAPATRA, D. K.; ASATI, V.; BHARTI, S. K. Chalcones and their therapeutic targets for the management of diabetes: Structural and pharmacological perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 839–865, 6 mar. 2015.

MASCARELLO, A. et al. Novel sulfonyl(thio)urea derivatives act efficiently both as insulin secretagogues and as insulinomimetic compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 491–501, 30 out. 2014.

MATSCHINSKY, F. M. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. **Diabetes**, v. 45, n. 2, p. 223–41, 1 fev. 1996.

MENDES, C. P. **ESTUDO DO EFEITO E DO MECANISMO DE AÇÃO DE HÍBRIDOS SINTÉTICOS**

(GLIBENCLAMIDA/PIOGLITAZONA) NA HOMEOSTASIA DA GLICOSE. [s.l.] Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2015.

MICHELLE FURTADO, L.; POON, V.; KLIP, A. GLUT4 activation: thoughts on possible mechanisms. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 178, n. 4, p. 287–296, ago. 2003.

MO, Y.; NAGEL, C.; TAYLOR, L. P. Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 15, p. 7213–7, 1 ago. 1992.

MOURAD, N. I.; NENQUIN, M.; HENQUIN, J.-C. cAMP-Mediated and Metabolic Amplification of Insulin Secretion Are Distinct Pathways Sharing Independence of β -Cell Microfilaments. **Endocrinology**, v. 153, n. 10, p. 4644–4654, 1 out. 2012.

MUOIO, D. M.; NEWGARD, C. B. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 193–205, 1 mar. 2008.

NICHOLS, C. G.; REMEDI, M. S. The diabetic β -cell: hyperstimulated vs. hyperexcited. **Diabetes, obesity & metabolism**, v. 14 Suppl 3, n. 0 3, p. 129–35, out. 2012.

OHTA, M. et al. Two chalcones, 4-hydroxyderricin and xanthoangelol, stimulate GLUT4-dependent glucose uptake through the LKB1/AMP-activated protein kinase signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. **Nutrition Research**, v. 35, n. 7, p. 618–625, 1 jul. 2015.

OIKNINE, R.; MOORADIAN, A. D. Drug therapy of diabetes in the elderly. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, n. 5–6, p. 231–239, 1 jul. 2003.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**, v. 64, n. 1, p. 180–201, 2000.

RAO, Y. K.; FANG, S.-H.; TZENG, Y.-M. Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 2679–2686, 15 maio 2004.

RISCO, A.; CUENDA, A. New Insights into the p38 γ and p38 δ MAPK Pathways. **Journal of signal transduction**, v. 2012, p. 520289, 2012.

RORSMAN, P. The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. **Diabetologia**, v. 40, n. 5, p. 487–495, 24 abr. 1997.

RORSMAN, P.; BRAUN, M. Regulation of Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets. **Annual Review of Physiology**, v. 75, n. 1, p. 155–179, 10 fev. 2013.

ROSAK, C. The pathophysiologic basis of efficacy and clinical experience with the new oral antidiabetic agents. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 16, n. 1, p. 123–132, 1 jan. 2002.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799–806, 13 dez. 2001.

SATYANARAYANA, M. et al. Synthesis and antihyperglycemic activity of chalcone based aryloxypropanolamines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 883–889, 1 mar. 2004.

SEO, W. D. et al. Sulfonamide chalcone as a new class of α -glucosidase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 24, p. 5514–5516, 15 dez. 2005.

SHIBASAKI, T. et al. Cooperation between cAMP signalling and sulfonylurea in insulin secretion. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 16, n. S1, p. 118–125, set. 2014.

SILVA, F. R. M. B. et al. Glucose Uptake: Knowledge from In Vivo, In Situ and In Vitro Studies and Health Implications. In: **Glucose Uptake: Regulation, Signaling Pathways and Health Implications**. [s.l.] Nova Biomedical, 2013. p. 45–76.

SILVA FREDERICO, M. J. et al. Incretinomimetic and Insulinomimetic Effect of (2*E*)-*N'*-(1'-Naphthyl)-3,4,5-Trimethoxybenzohydrazide for Glycemic Homeostasis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 117, n. 5, p. 1199–1209, maio 2016.

SINGH, P.; ANAND, A.; KUMAR, V. Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 758–777, 6 out. 2014.

- STEINER, D. F. The Biosynthesis of Insulin. In: **Pancreatic Beta Cell in Health and Disease**. Tokyo: Springer Japan, 2008. p. 31–49.
- STEINER, D. F.; CHAN, S. J.; RUBENSTEIN, A. H. Biosynthesis of Insulin. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011. p. 49–78.
- STEINER, D. F.; OYER, P. E. The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 57, n. 2, p. 473–80, fev. 1967.
- TAYLOR, L. P.; HEPLER, P. K. POLLEN GERMINATION AND TUBE GROWTH. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol**, v. 48, p. 461–91, 1997.
- THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st Century. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 298, n. 2, p. E141–E145, fev. 2010.
- VOGEL, A. I. **Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry**. 5 ed ed. [s.l: s.n.].
- VOGT, T. et al. Pollination- or Wound-Induced Kaempferol Accumulation in Petunia Stigmas Enhances Seed Production. **The Plant cell**, v. 6, n. 1, p. 11–23, 1 jan. 1994.
- WADA, R.; YAGIHASHI, S. Role of Advanced Glycation End Products and Their Receptors in Development of Diabetic Neuropathy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043, n. 1, p. 598–604, jun. 2005.
- WATSON, R. T.; PESSIN, J. E. GLUT4 translocation: The last 200 nanometers. **Cellular Signalling**, v. 19, n. 11, p. 2209–2217, 1 nov. 2007.
- WAUSON, E. M.; LORENTE-RODRÍGUEZ, A.; COBB, M. H. Minireview: Nutrient sensing by G protein-coupled receptors. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 27, n. 8, p. 1188–97, ago. 2013.
- WHO. WHO | Diabetes programme. **WHO**, 2018.
- YADAV, V. R. et al. The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 295–309, 1 mar. 2011.

YAMADA, A.T.T; LAVRAS, C.; DEMUNER, M. S. (ORGS). **Manual de orientação clínica: diabetes mellitus**. São Paulo: [s.n.]. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/destaques/linhas-de-cuidado-sessp/diabetes-melitus/manual-de-orientacao-clinica-do-diabetes-mellitus/lc_diabetes_manual_atualizado_2011.pdf>. Acesso em: 10 set. 2018.

YANG, S.-N. et al. Ionic mechanisms in pancreatic β cell signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 21, p. 4149–4177, 23 nov. 2014.

YANG, S.-N.; BERGGREN, P.-O. The Role of Voltage-Gated Calcium Channels in Pancreatic β -Cell Physiology and Pathophysiology. **Endocrine Reviews**, v. 27, n. 6, p. 621–676, 1 out. 2006.

ZHOU, Y.; XUE, S.; YANG, J. J. Calciomics: integrative studies of Ca^{2+} -binding proteins and their interactomes in biological systems. **Metallomics : integrated biometal science**, v. 5, n. 1, p. 29–42, jan. 2013.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. **Flavonóides**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. Cap. 23. p. 577-614.