



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Camila Pires Mendes

**ESTUDO DO EFEITO E DO MECANISMO DE AÇÃO
DE HÍBRIDOS SINTÉTICOS
(GLIBENCLAMIDA/PIOGLITAZONA) NA
HOMEOSTASIA DA GLICOSE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

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

Co-orientadora: Dr^a. Marisa Jádna Silva Frederico

Florianópolis, 2015

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

Mendes, Camila Pires

Estudo do efeito e do mecanismo de ação de híbridos sintéticos (glibenclamida/pioglitazona) na homeostasia da glicose / Camila Pires Mendes ; orientadora, Fatima Regina Mena Barreto Silva ; coorientadora, Marisa Jadna Silva Frederico. - Florianópolis, SC, 2015.

129 P.

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

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Diabetes. 3. Hibridização . 4. Glicose. 5. Mecanismo de ação . I. Silva, Fatima Regina Mena Barreto. II. Frederico, Marisa Jadna Silva. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Bioquímica. IV. Título.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por colocar em minha vida todas as pessoas presentes neste agradecimento e por guiar os meus passos.

À professora Dra. Fátima Mena Barreto Silva pela oportunidade, paciência e orientação, desde 2010, quando ainda era aluna de iniciação científica. Agradeço a amizade, apoio e todos seus ensinamentos.

Agradeço de forma especial a minha colega de mestrado e amiga, MSc. Bárbara Graziela Postal, que com certeza tornou mais leve meu trabalho. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvir minhas bobagens. Foi bom poder contar com você, merci!

Às ICs maravilhosas, Ana Luiza Ludwig Moraes e Mayara Brich. Como tive sorte de poder contar com dois braços direitos! Obrigada também pela grande amizade, companhia e risadas. Vocês fizeram com que tudo tivesse um valor maior 22Ks.

À Dra. Marisa Jadna Silva Frederico, pelo incentivo e pelos primeiros passos na área da pesquisa.

A todos e todas que fazem ou fizeram parte do laboratório de Hormônios e Transdução de Sinais enquanto estive presente (Allisson, Ana Luiza, Ana Paula, Bárbara, Cahuê, Danielle, Danusa, Delsi, Fernanda, Franciella, Gabrielle, Geisel, Jéssica, Leila, Luisa, Marisa, Mayara, Renata e Virgínia). Obrigada por todo o aprendizado profissional e pessoal compartilhado.

À minha família: meu pai José Carlos, minha mãe Vera Lúcia, minhas irmãs Karla e Beatriz, meu cunhado Pablo e ainda a Nina, que também faz parte da família. Obrigada por sempre torcerem pela realização dos meus objetivos e pelo carinho durante esta jornada. Amo muito todos vocês!

Ao meu noivo Helton, por todo o amor e carinho, por acreditar em mim, se fazer presente em todos os momentos e me fazer muito feliz.

Aos Professores componentes da banca examinadora, por sua cordialidade e disponibilidade na avaliação deste trabalho.

Ao programa de Pós Graduação em Bioquímica da UFSC (PPGBQA), que possibilitou a implementação deste trabalho.

À CAPES e ao CNPq pelo suporte e apoio financeiro ao longo do curso.

RESUMO

A diabetes melito (DM) é um grupo de doenças crônico-degenerativas caracterizada por distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios resultantes da deficiência na ação e/ou secreção da insulina. A DM vem se tornando um sério e crescente problema de saúde pública nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, em razão do aumento de sua prevalência, morbidade e mortalidade. Neste cenário, a pesquisa de novas moléculas com potencial terapêutico para o tratamento da doença é de extrema importância. A modificação molecular tem por objetivo preparar novas moléculas relacionadas quimicamente, de forma a melhorar a atividade farmacológica e minimizar os efeitos adversos de fármacos. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar o efeito e o mecanismo de ação dos compostos 4-[2-(2-fenil-4-oxo-1,3-tiazolidin-3-il)etil]benzeno-1-sulfonamida (FTEBS) e 4-[2-[2-(3,4-diclorofenil)-4-oxo-1,3-tiazolidin-3-il]etil] benzeno-1-sulfonamida (DTEBS) sintetizados pela hibridização da porção estrutural da glibenclamida à porção funcional da pioglitazona associados a diferentes radicais. Tanto FTEBS, quanto DTEBS reduziram significativamente a glicemia de ratos hiperglicêmicos. Além disso, os dois compostos aumentaram significativamente a insulina sérica, bem como a insulina estática em ilhotas isoladas. Adicionalmente, se observou um aumento no conteúdo de glicogênio no músculo sóleo e fígado após o tratamento com FTEBS. Ainda, FTEBS estimulou a captação de glicose em músculo sóleo através de uma via de sinalização semelhante à da insulina, principalmente, estimulando a translocação e síntese proteica do GLUT4. FTEBS se mostrou eficaz no aumento da sensibilidade à insulina em ratos resistentes, além de melhorar o perfil lipídico através da diminuição de triglicerídeos, VLDL e aumentando HDL plasmáticos por efeito per se do composto, e aumentando HDL-colesterol em ratos resistentes. DTEBS estimulou a captação de cálcio em ilhotas pancreáticas isoladas, atuando como um potencial agente secretagogo de insulina. Os dois compostos preveniram a glicação de proteínas *in vitro*. No entanto, não houve alteração da atividade de enzimas digestivas (dissacaridases) na presença dos compostos (FTEBS e DTEBS).

Além disso, FTEBS e DTEBS não alteraram a atividade da LDH. Desta forma, apoiado nos resultados obtidos neste trabalho, é sugerido que os compostos sintéticos FTEBS e DTEBS, aqui estudados, regulem a homeostasia da glicose. Os mecanismos pelo qual FTEBS atua sobre a homeostase glicêmica envolvem a melhora da resistência a insulina através da estimulação da captação de glicose em tecidos periféricos, aumento de secreção de insulina pelas células β pancreática, além de inibição da glicação de proteínas. O mecanismo pelo qual DTEBS atua parece envolver o estímulo da secreção de insulina e inibição da glicação de proteínas. Tanto o FTEBS como o DTEBS têm efeitos semelhantes aos respectivos protótipos, porém em menor dose, o que pode por sua vez melhorar a eficácia terapêutica e diminuir efeitos adversos em longo prazo.

Palavras-chave: diabetes; glicemia; glibenclamida; pioglitazona; análogos, glicogênio; secreção insulina; captação de glicose; resistência a insulina; cálcio

ABSTRACT

The diabetes mellitus (DM) is a group of chronic degenerative diseases characterized by disorders in the metabolism of carbohydrates, proteins and lipids resulting from deficient action and / or secretion of insulin. The DM has become a serious and growing public health problem in developed and developing countries, due to the increase of its prevalence, morbidity and mortality. In this scenario, the search for new molecules with therapeutic potential for the treatment of the disease is of utmost importance. The molecular modification is aimed to prepare new molecules chemically related, to improve the pharmacological activity and minimize the side effects of drugs. Therefore, this study aimed to characterize the effect and mechanism of action of the compounds 4- [2- (4-oxo-2-phenyl-1,3-thiazolidin-3-yl) ethyl] benzene-1-sulfonamide (FTEBS) and 4- {2- [2- (3,4-dichlorophenyl) -4-oxo-1,3-thiazolidin-3-yl] ethyl} benzene-1-sulfonamide (DTEBS) synthesized by the hybridization of the structural portion glibenclamide to functional portion associated with pioglitazone different radicals. Also FTEBS *per se* increased HDL and HDL-colesterol in the plasma of resistant rats. DTEBS stimulated calcium uptake in isolated pancreatic islets, acting as a potential insulin secretagogue agent. The two compounds prevented glycation of proteins *in vitro*. However, in the presence of FTEBS and DTEBS there was no change in the activity of digestive enzymes (disaccharidases). In addition, these compounds did not alter the LDH activity. Therefore, according to the results obtained in this study, it is suggested that synthetic compounds FTEBS and DTEBS, studied here, regulate glucose homeostasis. The mechanisms by which FTEBS acts on glucose homeostasis involving the increase of pancreatic insulin secretion from β -cells improves insulin resistance by stimulating glucose uptake into peripheral tissues, and inhibits protein glycation. The mechanism by which DTEBS acts appear to be involved in the stimulation of insulin secretion and inhibition of protein glycation. Both FTEBS and DTEBS have similar effects to the respective prototypes, but at a lower dose, which in turn can improve

therapeutic efficacy and decrease adverse effects in the long term.

Keywords: diabetes; blood glucose; glibenclamide; pioglitazone; analogs, glycogen; insulin secretion; glucose uptake; insulin resistance; calcium; pancreatic islets; advanced glycation end products (AGEs); disaccharidases.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 DIABETES MELITO.....	25
1.2 COMPLICAÇÕES DA DIABETES.....	27
1.2.1 Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs).....	27
1.2.2 Dislipidemias	29
1.3 HOMEOSTASIA E ABSORÇÃO DE GLICOSE.....	30
1.4 INSULINA - SÍNTESE E SECREÇÃO	34
1.5 CAPTAÇÃO DE GLICOSE EM TECIDOS INSULINODEPENDENTES	38
1.6 RESISTÊNCIA A INSULINA.....	41
1.7 RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADOR PEROXISSOMA	42
1.8 TRATAMENTO DA DIABETES	43
1.9 GLIBENCLAMIDA.....	44
1.10 PIOGLITAZONA.....	46
1.11 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MEDICAMENTOS.....	47
1.12 MODIFICAÇÃO MOLECULAR	48
2. OBJETIVOS	50
2.1 OBJETIVO GERAL	50
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
3. JUSTIFICATIVA	52
4. MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1 MATERIAIS.....	53
4.1.1 Animais.....	53
4.1.2 Síntese e caracterização química dos compostos FTEBS e DTEBS.....	54
4.2 MÉTODOS.....	55
4.2.1 Determinação da curva de tolerância à glicose.....	55
4.2.2 Determinação da insulina sérica e estática	55
4.2.3 Determinação da atividade das dissacaridasas intestinais in vitro	56
4.2.4 Determinação da atividade anti-glicação	56
4.2.5 Conteúdo de glicogênio	57
4.2.6 Captação de [U- ¹⁴ C]-2-desoxi-D-glicose no músculo sóleo de ratos.....	57
4.2.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida e Western blott	58

4.2.8 PCR em Tempo real	58
4.2.9 Resistência à insulina	59
4.2.10 Teste de tolerância à insulina	59
4.2.11 Perfil lipídico sérico	60
4.2.12 Curva de tolerância oral a triglicerídeos	60
4.2.13 Isolamento das ilhotas pancreáticas.....	61
4.2.14 Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas	61
4.2.15 Dosagem sérica de lactato desidrogenase ..	62
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	62

5. RESULTADOS.....63

5.1 CAPÍTULO 1 - ESTUDO DO EFEITO INSULINOMIMÉTICO DO FTEBS EM MÚSCULO SÓLEO

5.1.1 Efeito do FTEBS na curva de tolerância à glicose e na secreção de insulina	63
5.1.2 Efeito do FTEBS no conteúdo do glicogênio hepático e muscular	65
5.1.3 Estudo do mecanismo de ação do FTEBS no tecido muscular	66
5.1.4 Estudo do mecanismo de ação do FTEBS na ação estimulatória na captação de ^{14}C -glicose no músculo sóleo	67
5.1.5 Mecanismo do FTEBS na translocação e fusão do GLUT4 na membrana plasmática no músculo sóleo	68
5.1.6 Influência da transcrição gênica e da síntese de proteínas no efeito estimulatório do FTEBS na captação de glicose no músculo sóleo	69
5.1.7 Mecanismo de ação do FTEBS na captação de glicose e ativação do GLUT4 no músculo sóleo	71
5.1.8 Efeito do FTEBS na expressão do RNAm e no conteúdo total de GLUT4 no músculo sóleo.....	72
5.1.9 Efeito do FTEBS na resistência periférica à insulina	73
5.1.10 Efeito do FTEBS no teste de tolerância à emulsão lipídica	75
5.1.11 Perfil lipídico de ratos resistentes à insulina tratados com FTEBS	76
5.1.12 Efeito do FTEBS na formação de AGES	77
5.1.13 Efeito do FTEBS na atividade de dissacaridases intestinais.....	78

5.1.14 Toxicidade do FTEBS na atividade de LDH sérica	79
5.2 CAPÍTULO 2 - ESTUDO DO EFEITO SECRETAGOGO DO DTEBS EM ILHOTAS PANCREÁTICAS	80
5.2.1 Efeito do DTEBS na curva de tolerância à glicose e na secreção de insulina in vivo e in vitro	80
5.2.2 Efeito do DTEBS no conteúdo de glicogênio hepático e muscular	82
5.2.3 Curva de tempo e de dose-resposta do DTEBS no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas	83
5.2.4 Envolvimento de canais de K^+ _{ATP} no efeito estimulatório do DTEBS no influxo de $^{45}Ca^{2+}$ em ilhotas pancreáticas	84
5.2.5 Envolvimento dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem no efeito estimulatório do DTEBS no influxo $^{45}Ca^{2+}$	85
5.2.6 Envolvimento do cálcio dos estoques do RE no efeito estimulatório do DTEBS no influxo de $^{45}Ca^{2+}$	86
5.2.7 Envolvimento da PKA e PKC no efeito estimulatório do DTEBS no influxo $^{45}Ca^{2+}$	87
5.2.8 Efeito do DTEBS na formação de AGES	88
5.2.9 Efeito do DTEBS na atividade de dissacaridases intestinais	89
5.2.10 Toxicidade do DTEBS sobre atividade de LDH sérica	90
6. DISCUSSÃO	92
7. CONCLUSÃO	107
8. REFERÊNCIAS	109

LISTA DE ABREVIATURAS

^{14}C -DG	[U- ^{14}C]-2-deoxi-D-glicose
AC	Adenilato Ciclase
ADA	Associação Americana de Diabetes
ADP	Adenosina difosfato
AGE	Produto final de glicação avançada
AGL	Ácidos graxos livres
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
AS160	Proteína substrato da Akt de 160 kDa
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAG	Diacilglicerol
DM	Diabetes melito
DPP-IV	Dipeptidilpeptidase IV
DTEBS	4- {2- [2- (3,4-diclorofenil) -4-oxo-1,3-tiazolidin-3-il] etil} benzeno-1-sulfonamida
E.P.M	Erro padrão da média
eEF2K	Cinase eucariótica do fator 2 do alongamento
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ERK	Cinase reguladora de sinal extracelular
FTEBS	4- [2- (2-fenil-4-oxo-1,3-tiazolidin-3-il) etil] benzeno-1-sulfonamida
GIP	Polipeptídeoinsulíntrópico dependente de glicose
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
GLUT	Transportador de glicose

GSK-3	Glicogênio Sintasecinase 3
H-89	N-[2-(p-bromocianamilamino)etil]-5 isoquinolinesulfonamida
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL-C	Colesterol da lipoproteína de alta densidade
HEPES	Ácido etanosufônico 2-[4-(2- hidroxietil)piperazina-1-yl]
IDF	Federação Internacional de Diabetes
IL-6	Interleucina 6
IP3	Inositol1,4,5-trifosfato
IRS	Substrato receptor de insulina
K ⁺ _{ATP}	Canal de potássio dependente de ATP
KRb-HEPES	Tampão Krebs Ringer-bicarbonato adicionado de HEPES
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MEK	Proteína tirosina/treonina cinase
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
PBS	Tampão fosfato salina
PDK	Proteína cinase dependente de 3- fosfoinosítídeos
PI3K	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol4,5-bisfosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PKA	Proteína cinase A

PKB/Akt	Proteína cinase B
PKC	Proteína cinase C
PLC	Fosfolipase C
PPAR- γ	Receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissomo
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
Raf	Proteína serina/treonina cinase
RAGE	Receptor específico de AGE
Ras	Proteína GTPase
RE	Retículo Endoplasmático
RI	Receptor de insulina
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SERCA	Bomba Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático
SGLT-1	Proteína co-transportadora de Na^+ /glicose1
SLC5A	Família dos transportadores de glicose dependentes de sódio
SNARE	Receptor de ligação ao fator solúvel sensível à Netilmaleimida
SUR	Receptor de sulfoniureia
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VDCC-L	Canal de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L
VDDC-T	Canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem tipo T
VLDL	Lipoproteína de densidade intermediária
VLDL-c	Colesterol da lipoproteína de densidade Intermediária

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação dos Produtos Finais de Glicação (AGEs)	28
Figura 2 - Ação das dissacaridases intestinais sobre dissacarídeos	31
Figura 3 - Transporte de glicose nos enterócitos	33
Figura 4 - Etapas da síntese da insulina.....	34
Figura 5 - Mecanismo de secreção de insulina pelas células β -pancreáticas	36
Figura 6 - Fases de liberação da insulina	38
Figura 7 - Sinalização periférica da insulina	40
Figura 8 - Estrutura química da glibenclamida	45
Figura 9 - Estrutura química da pioglitazona	46
Figura 10 - Síntese dos análogos FTEBS e DTEBS54	
Figura 11 - Efeito agudo do FTEBS na curva de tolerância a glicose.....	64
Figura 12 - Efeito do FTEBS na secreção de insulina65	
Figura 13 - Efeito de FTEBS no conteúdo de glicogênio hepático e muscular	66
Figura 14 - Curva dose-resposta do FTEBS na captação de ^{14}C -glicose no músculo	66
Figura 15 - Envolvimento do receptor de insulina na ação estimulatória do FTEBS na captação de glicose no músculo sóleo	67
Figura 16 - Efeito de inibidores da translocação e da fusão do GLUT4 na membrana plasmática na ação estimulatória do FTEBS na captação de glicose no músculo sóleo ..	68
Figura 17 - Relação do efeito de FTEBS na cascata da MAPK e a síntese protéica	70
Figura 18 - Envolvimento da p38 MAPK no efeito estimulatório do FTEBS na captação de glicose.....	71
Figura 19 - Efeito do FTEBS na síntese de RNAm do GLUT472	
Figura 20 - Efeito do FTEBS no conteúdo protéico total de GLUT4	73
Figura 21 - Efeito de FTEBS na resistência periférica à insulina	74
Figura 22 - Efeito do FTEBS na captação de ^{14}C -glicose no músculo sóleo.....	74

Figura 23 - Efeito do FTEBS no teste de tolerância oral a triglicerídeo.....	75
Figura 24 - Efeito do FTEBS nos lipídeos plasmáticos em animais resistentes ou não à insulina.....	76
Figura 25 - Efeito do FTEBS na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.....	77
Figura 26 - Efeito do FTEBS na atividade de dissacaridases intestinais.....	78
Figura 27 - Atividade da lactato desidrogenase na presença ou não de FTEBS em período agudo e após 5 dias de tratamento	79
Figura 28 - Efeito agudo do DTEBS na curva de tolerância à glicose	80
Figura 29 - Efeito de DTEBS na secreção de insulina <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	81
Figura 30 - Efeito do DTEBS no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.....	82
Figura 31 - Efeito do DTEBS na captação de ¹⁴ C-glicose no músculo sóleo	83
Figura 32 - Curva de tempo e de dose-resposta do DTEBS no influxo de ⁴⁵ Ca ²⁺ em ilhotas pancreáticas.....	84
Figura 33 - Efeito do DTEBS no influxo de ⁴⁵ Ca ²⁺ em canais de potássio em ilhotas pancreáticas.....	85
Figura 34 - Influência dos canais de cálcio dependentes da voltagem no efeito estimulatório do DTEBS no influxo de ⁴⁵ Ca ²⁺ em ilhotas pancreáticas	85
Figura 35 - Influência do cálcio dos estoques no efeito estimulatório do DTEBS no influxo de ⁴⁵ Ca ²⁺ em ilhotas pancreáticas.....	87
Figura 36 - Influência das cinases (PKA e PKC) no efeito estimulatório do DTEBS no influxo de ⁴⁵ Ca ²⁺ em ilhotas pancreáticas.....	87
Figura 37 - Efeito do DTEBS na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.....	88
Figura 38 - Efeito de DTEBS na atividade de dissacaridases intestinais.....	89
Figura 39 - Atividade da lactato desidrogenase na presença ou não do DTEBS em período agudo de tratamento ...	90

Figura 40 - Mecanismo de ação do FTEBS na captação de glicose no músculo esquelético	107
Figura 41 - Mecanismo de ação do DTEBS no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas.....	108

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Melito

A diabetes melito (DM) se define como um grupo de doenças crônico-degenerativas tendo como principal característica a hiperglicemia crônica que leva a distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (ADA, 2014; SBD 2013). Essa desordem metabólica é desencadeada pela deficiência na ação e/ou secreção da insulina. Sendo este hormônio essencial para que a glicose periférica seja captada por tecidos insulino-dependentes como o tecido muscular e o adiposo (GOMES, 2009; SBD 2013).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Associação Americana de Diabetes (ADA) o DM pode ser dividido em quatro classes clínicas distintas: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e o DM gestacional.

A diabetes melito do tipo 1 é caracterizada por ser insulino-dependente, já que os indivíduos que pertencem a essa classificação necessitam de doses diárias deste hormônio. Esta ausência de insulina no organismo se deve a destruição das células betas pancreáticas, mediada na sua maioria por auto-anticorpos. Porém também há relatos de casos de diabetes tipo 1 idiopáticos. A taxa de destruição das células beta varia, sendo em geral mais acelerada entre as crianças. A forma lentamente progressiva ocorre em adultos (ADA, 2014; IDF, 2014)

A diabetes melito do tipo 2 corresponde cerca de 90% dos casos da doença. Ocorre devido à resistência periférica da insulina em tecidos insulino-dependentes, essenciais para o metabolismo de carboidratos. Quando a resistência insulínica ultrapassa a capacidade adaptativa das células beta se desenvolve a intolerância à glicose até culminar em DM tipo 2. O quadro pode se desenvolver em qualquer idade, porém geralmente é diagnosticado após os 40 anos, sendo que os pacientes na maioria apresentam sobrepeso ou obesidade (IDF, 2014; ADA, 2014).

Outros tipos de diabetes melito específicos podem ser causados por defeitos genéticos das células beta pancreáticas,

defeitos genéticos da ação da insulina em tecidos periféricos, doenças do pâncreas exócrino, infecções associadas à destruição das células beta, endocrinopatias, ou ainda por indução por fármacos ou agentes químicos (ADA, 2014).

A DM gestacional se desenvolve quando há intolerância a glicose diagnosticada pela primeira vez durante a gravidez. A placenta é responsável pela diminuição da ação da insulina, compensada pelo aumento de secreção deste hormônio pelo pâncreas em uma gestação saudável. Quando o bebê é exposto à hiperglicemia intrauterina, que ocorre na DM gestacional há risco de macrossomia fetal (crescimento excessivo do feto) podendo acarretar em partos traumáticos, hipoglicemia neonatal e até obesidade e diabetes na vida adulta.

A DM é considerada atualmente como uma epidemia mundial, se tornando um grande desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo. O aumento do número de indivíduos diabéticos está ligado diretamente ao crescimento e ao envelhecimento populacional, a maior urbanização, a crescente prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como da maior sobrevivência de pacientes com DM (SBD, 2013; IDF, 2014).

Dados da Federação Internacional de Diabetes indicam que 8,3% da população adulta no mundo vive com diabetes. Em números absolutos, existiam 387 milhões de pessoas afetadas pela doença, em 2014. Estimativas apontam que até 2035 a diabetes atingirá 592 milhões de pessoas, o que representa um aumento de 55% (IDF, 2014).

No Brasil a situação também é preocupante, em 2014 o número de pessoas portadoras da diabetes chegou a 11,6 milhões, sendo que o país é classificado atualmente em quarto lugar no ranking mundial da doença, perdendo apenas para países como Estados Unidos, Índia e China. Para 2035 a estimativa é que o Brasil alcance 19,2 milhões de diabéticos (IDF, 2014).

O aumento da incidência progressiva da diabetes melito se deve principalmente ao estilo de vida e ao sedentarismo aliado a obesidade tendo relação direta e positiva com a doença. Os avanços tecnológicos proporcionam à população a praticidade e o comodismo, o que acarreta em aumento de ingestão de alimentos com alta carga energética. O acúmulo destes

alimentos no dia a dia altera o sistema homeostático do organismo que requer um equilíbrio entre oferta e demanda energética. Este desequilíbrio é percebido como uma perda da capacidade do organismo de utilizar e/ou liberar glicose dos estoques, provocando um quadro de hiperglicemia persistente que pode levar ao diagnóstico de diabetes (HERMAN; KAHN, 2006).

1.2 Complicações da Diabetes

1.2.1 Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs)

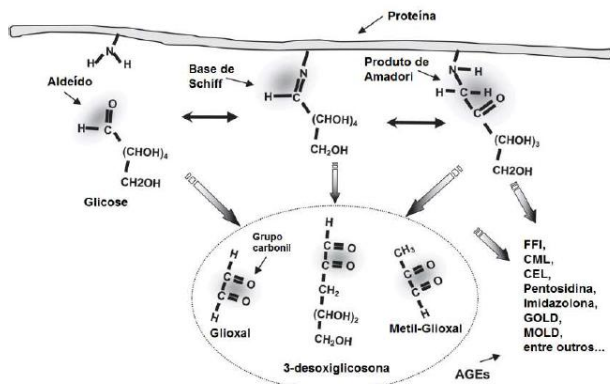
A diabetes melito quando não tratada pode levar a complicações em longo prazo comprometendo a qualidade e sobrevida dos portadores da doença. O mecanismo pelos quais a diabetes leva as complicações ainda é razão de muito estudo, envolvendo diretamente efeitos tóxicos sobre a alta concentração de glicose na circulação, assim como a pressão arterial elevada e concentrações lipídicas fora dos padrões (PEPPA; VLASSARA, 2005).

Dentre as principais complicações da DM está a retinopatia, caracterizada por alterações vasculares com lesões na retina e consequente perda na qualidade visual (WAN et al., 2012); nefropatia, que provoca alterações nos vasos renais culminando em proteinúria, podendo levar até a perda de função dos rins (EBOH; CHOWDHURY, 2015); neuropatia, que afeta pelo menos metade da população diabética atual, englobando alterações cardiovasculares, respiratórias, digestivas e genitourinárias (WITZEL et al., 2015); macroangiopatia, que incide em comprometimento das artérias dos membros inferiores, comum em pacientes DM tipo 2 (BOWLING; RASHID; BOULTON, 2015).

A hiperglicemia crônica é a característica mais prevalente em todas as formas da DM. Entre as hipóteses que explicam como a hiperglicemia crônica conduz aos danos celulares e teciduais observados nessa doença, a da formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) é considerada uma das mais importantes (GOH; COOPER, 2008).

A reação de formação de AGEs pode ser separada em três fases: Durante a primeira fase ocorre a glicação não enzimática, em que o grupamento carbonila do açúcar redutor se condensa com o grupo amino livre da proteína, formando a base de Schiff que, após sofrer rearranjo, origina os produtos de Amadori, estruturalmente mais estáveis. A hemoglobina glicada e a frutossamina são conhecidos exemplos de produtos de Amadori. Na fase intermediária, os produtos de Amadori são transformados em uma série de compostos dicarbonílicos como glioxal, metilglioxal e glicaldeído através de oxidações e desidratações. A última fase compreende a reação da dicarbonila novamente com os grupos amina primárias acessíveis, formando os compostos irreversíveis chamados AGEs (CALCUTT et al., 2009; BASTA et al., 2004). A inibição de qualquer uma destas três fases pode reduzir a formação dos AGEs e beneficiar o tratamento e as complicações da diabetes. A formação dos AGEs é considerada altamente deletéria ao organismo, em virtude de favorecerem a formação de espécies reativas de oxigênio, além de modificar a capacidade funcional de proteínas e enzimas em vários tecidos, entre estes, renal, endotelial, cardíaco, cerebral e epitelial (VLASSARA; STRIKER, 2013).

Figura 1 - Formação dos Produtos Finais de Glicação (AGEs). Durante a primeira fase o grupamento carbonila do açúcar redutor se condensa com o grupo amino livre da proteína, formando a base de Schiff que, após sofrer rearranjo, origina os produtos de Amadori que são transformados durante a fase intermediária em uma série de compostos dicarbonílicos como glioxal, metilglioxal e glicaldeído através de oxidações e desidratações. A última fase compreende a reação da dicarbonila novamente com os grupos amina primárias acessíveis, formando os compostos irreversíveis chamados AGEs.



Fonte: Adaptado de BASTA, et al. (2004).

1.2.2 Dislipidemias

A maioria dos pacientes com DM2 apresentam elevação das taxas de lipídios e de lipoproteínas na corrente sanguínea, a chamada dislipidemia, que é uma das causas principais para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Geralmente a dislipidemia está presente no momento do diagnóstico da hiperglicemia em pacientes com DM2. Essa desordem ocorre em consequência de modificações no metabolismo lipídico que promove alteração das concentrações de lipoproteínas na circulação (SCHEFFEL et al., 2004; SCHAAN, HARZHEIM e GUS, 2004 e WAJCHENBERG et al., 2007).

Lipoproteínas são estruturas macromoleculares que auxiliam o metabolismo lipídico no transporte e solubilização de lipídeos na circulação. Existem cinco tipos de lipoproteínas que diferem em tamanho, forma, densidade e composição. São classificadas em lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), e quilomícra (DEVLIN; MICHELACCI, 2011; LEHNINGER, 2014).

Etiologicamente a dislipidemia é classificada como dislipidemia primária, de origem genética, causada pela desordem da síntese e degradação de lipídios; e dislipidemia

secundária, causada por outras doenças como DM ou uso de medicamento (SANTOS, 2001; PEREIRA, 2011). Na DM2 a dislipidemia é causada devido à resistência a insulina e a obesidade, podendo ser provocada pelo aumento na produção de glicose, hipertrigliceridemia e VLDL, associando a redução na HDL e elevação na LDL. Isto pode ser provocado pelo excesso de ácidos graxos circulantes derivados do tecido adiposo em indivíduos diabéticos (SANTOS, 2001; PEREIRA, 2011).

Os indivíduos com diabetes mellitus e hipertensão arterial podem apresentar maior prevalência de dislipidemias, aumentando a incidência da relação da diabetes a doenças cardiovasculares (SOUZA et al., 2003). Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2013), pacientes com DM2 estão sujeitos de duas a quatro vezes mais risco para doenças cardiovasculares (DCV) quando comparados a pacientes não diabéticos.

Desta forma, o tratamento deste desequilíbrio metabólico compreende controle da dieta, exercícios físicos, bem como o uso de fármacos redutores de lipídeos (XIE et al., 2007).

1.3 Homeostasia e absorção de glicose

A glicose é a principal fonte de energia do organismo, porém quando em excesso, pode trazer complicações à saúde. Os níveis de glicose sérica são controlados por diversos órgãos que regulam a entrada e remoção do sangue, como intestino, pâncreas, fígado, músculo esquelético, tecido adiposo e rins. Essa regulação se deve principalmente a hormônios como incretinas, insulina e glucagon (BERTRAND; VALET; CASTAN-LAURELL, 2015).

Um dos principais componentes da dieta, os carboidratos, por serem uma fonte significativa de glicose, desempenham um papel importante no equilíbrio energético. Quando ingeridos, os carboidratos estão na forma de polissacarídeos e dissacarídeos que necessitam ser hidrolisados (quebrados) em moléculas mais simples para serem absorvidos. A amilase salivar, uma destas enzimas, é responsável pela quebra destes polissacarídeos já durante a mastigação (LETURQUE et al., 2012; DROZDOWSKI & THOMSON, 2006). No intestino a enzima responsável por esta

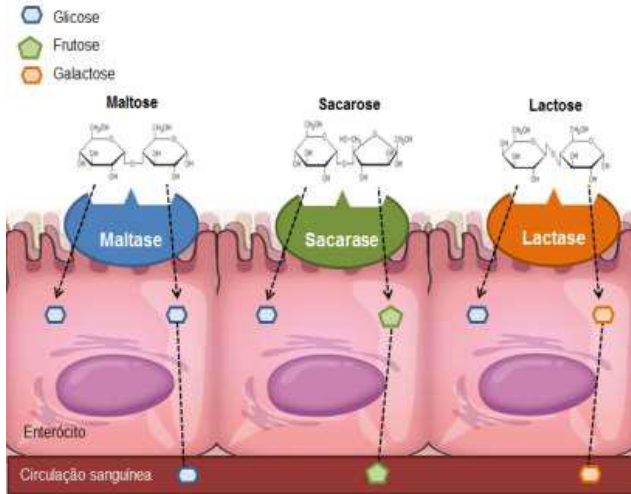
quebra é a amilase pancreática. Para que ocorra a redução dos dissacarídeos em monossacarídeos no intestino, é necessária a ação de enzimas dissacaridasas (maltase, sacarase e lactase) para serem transportados por transportadores específicos do lúmen intestinal para a circulação sanguínea (DROZDOWSKI & THOMSON, 2006).

As dissacaridasas, também conhecidas como glicosidasas, estão presentes na membrana dos enterócitos, células que formam o epitélio intestinal (LETURQUE et al., 2012). As glicosidasas são divididas em duas classes, as α e β glicosidasas. As α -glicosidasas atuam hidrolisando a ligação α -glicosídica dos dissacarídeos conectados por ligações do tipo α . A maltase e a sacarase estão incluídas nesta classe de enzimas e são as mais estudadas como alvo terapêutico da diabetes, pois hidrolisam respectivamente a maltose, liberando duas unidades de glicose para serem absorvidas e sacarose, liberando frutose e glicose (KRASIKOV; KARELOV; FIRSOV, 2001). As β -glicosidasas atuam hidrolisando sacarídeos com ligação β -glicosídica. Dentro desta classe de enzimas se destaca a galactosidase ou lactase. A lactase hidrolisa a ligação β da lactose, liberando unidades de glicose e galactose (KRASIKOV; KARELOV; FIRSOV, 2001).

A acarbose, um medicamento disponível no mercado atua como um adjuvante no tratamento da diabetes. Sua ação se restringe as α -glicosidasas inibindo as enzimas maltase e sacarase, assim faz com que os dissacarídeos não sofram hidrólise, reduzindo a quantidade de moléculas de glicose disponível para a absorção (GOMIS, 2008). Esta terapia se torna vantajosa devido ao fato da acarbose não inibir as β -glicosidasas, não produzindo assim uma intolerância a lactose durante o tratamento (GOMIS, 2008).

Figura 2 - Ação das dissacaridasas intestinais sobre dissacarídeos. A absorção de dissacarídeos no intestino ocorre pela ação das dissacaridasas. A hidrólise da maltose pela enzima maltase libera duas moléculas de glicose disponíveis para absorção. A sacarase age sobre a sacarose liberando uma molécula de glicose e frutose. A lactose sofre ação da lactase liberando uma unidade de glicose e uma

de galactose. Nesta forma de monossacarídeos estes carboidratos são absorvidos pelos enterócitos através de transportadores específicos.



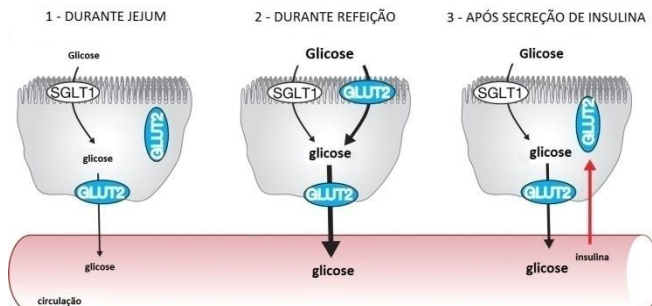
Fonte: Altenhofen, 2014

A glicose não pode adentrar as células epiteliais por difusão entre os poros, visto que o peso molecular é de 180, e o máximo para partículas permeáveis as células epiteliais é em torno de 100 (SILVA et al., 2013; LETURQUE, BROT-LAROCHE, LE GALL, 2012). Existem dois mecanismos de transporte de glicose através da membrana celular: transporte facilitado, mediado por co-transporte de íon sódio (SGLTs) e por transportadores de membrana específicos (GLUTs) (SILVA et al., 2013; LETURQUE, BROT-LAROCHE, LE GALL, 2012; LETURQUE; BROT-LAROCHE; LE GALL, 2009).

A família dos transportadores de glicose dependentes de sódio é chamada de SLC5A (LETURQUE, BROT-LAROCHE, LE GALL, 2012). Dentre estes membros, seis deles são denominados SGLT tendo, três deles (SGLT1, SGLT2 e SGLT3), funções de transportadores bem estabelecidas. A absorção clássica no intestino é mediada pelo co-transporte de sódio e glicose através do SGLT1 (SILVA et al., 2013; POSTAL et al., 2014). A proteína SGLT1 possui dois locais de fixação em sua estrutura voltada para o lúmen, uma para o sódio e outra para

glicose. Além disso, a concentração dos íons sódio é muito mais alta no lúmen do que no interior da célula intestinal, o que auxilia na energia para o transporte (proveniente do gradiente de concentração do sódio). O gradiente de concentração do íon sódio é mantido pela $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$. O SGLT1 é um transportador com alta afinidade pela glicose, porém baixa capacidade, devido ao baixo V_{max} para a glicose que o SGLT1 apresenta, ele é rapidamente saturável (KELLETT et al., 2005; ARAÚJO; MARTEL, 2009). Durante o estado alimentado parte da glicose é internalizada por SGLT1, no entanto 75% da glicose é absorvida através de carreadores solúveis pertencentes à família dos transportadores de glicose, GLUTs (ARAÚJO; MARTEL, 2009). No enterócito, a absorção facilitada de glicose é mediada por GLUT2. O GLUT2 apresenta baixa afinidade, porém, alta capacidade de transporte de glicose e, além desta, transporta também a frutose, galactose e manose. Quando há baixa concentração de glicose no lúmen o GLUT2 se encontra suprimido, desempenhando apenas seu papel na membrana basolateral transportando glicose do enterócito para a corrente sanguínea. Nesta situação somente está atuante na membrana apical o transportador SGLT1 (SILVA, et al., 2013). No entanto, durante uma refeição, quando há maior concentração de glicose no lúmen, o GLUT2 é recrutado para a membrana apical através de sinalização intracelular, permitindo maior absorção de glicose para o enterócito. Em período pós-prandial, a insulina secretada é responsável por controlar a homeostasia da glicose, suprimindo o GLUT2 novamente (LETURQUE; BROT-LAROCHE; LE GALL, 2009).

Figura 3 - Transporte de glicose nos enterócitos. Translocação regulada de GLUT2 em membranas dos enterócitos durante diferentes condições fisiológicas. Se a concentração de glicose é baixa no lúmen, a absorção é assegurada por transportador de glicose dependente de sódio 1 (SGLT1), e a liberação de glicose na circulação é assegurada por GLUT2. Um conjunto de vesículas intracelulares de GLUT2 se translocam para a membrana apical durante alta concentração de glicose no lúmen. A insulina, quando secretada provoca a internalização de GLUT2 e reduz a absorção de glicose para o enterócito. Controlando assim a hiperglicemia pós-prandial.



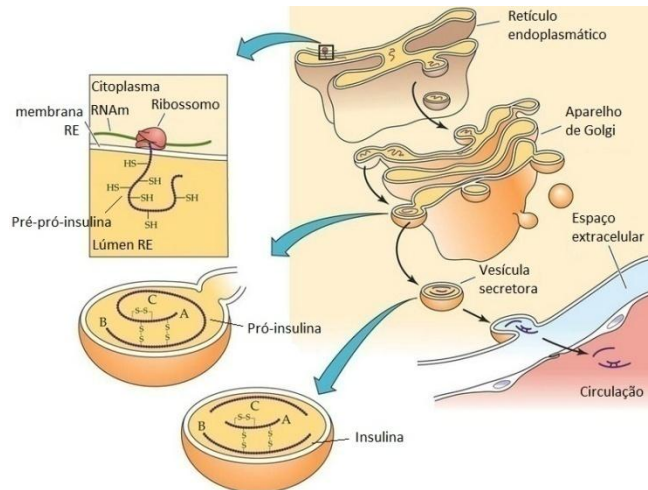
Fonte: Adaptado de Leturque et al., 2009.

1.4 Insulina - Síntese e secreção

A insulina é um hormônio polipeptídico sintetizado e armazenado nas células β de ilhotas de Langerhans do pâncreas. É composta por 51 aminoácidos dispostos em duas cadeias polipeptídicas, A e B, unidas através de ligações dissulfeto (FU; GILBERT; LIU, 2013).

Inicialmente a insulina é sintetizada a partir de um precursor de 110 aminoácidos, a pré-pró-insulina, no retículo endoplasmático das células β que após a ação de uma peptidase é clivada a pró-insulina. A pró-insulina fica armazenada em grânulos no complexo de Golgi até que chegue o sinal para a secreção. Através da ação de peptidases específicas ocorre clivagem da pró-insulina promovendo o processo de maturação tridimensional da insulina, que envolve o enovelamento da proteína e formação de três pontes dissulfeto, formando duas cadeias (A e B), ligadas por um peptídeo C. Dentro de vesículas imaturas, ocorre à proteólise, que libera o peptídeo C da cadeia A e B (Figura 4) (STEINER, D. F.; CHAN, S. J. C.; RUBENSTEIN, A. H., 2011; FU; GILBERT; LIU, 2013).

Figura 4 - Etapas da síntese da insulina. A insulina é formada a partir do precursor pré-pró-insulina no RE. Através de reações de proteólise libera a pró-insulina no aparelho de Golgi. Posteriormente a pró-insulina é internalizada em vesículas, sofre nova proteólise, removendo o peptídeo C e formando a insulina madura liberada na circulação.



Fonte: Adaptado de <http://slideplayer.com/slide/2811303> Acesso em: 30/08/2015.

A insulina fica estocada no interior das células β aguardando algum estímulo para que ocorra o processo de exocitose. A exocitose das vesículas de insulina é estimulada, principalmente, em função da hiperglicemia (HENQUIN, 2000; HENQUIN et al., 2003). A glicose entra na célula β via difusão facilitada por transportador de glicose específico, GLUT2. No interior da célula a glicose é fosforilada à glicose 6-fosfato pela glicocinase e então, metabolizada. O metabolismo da glicose aumenta a relação ATP/ADP citoplasmática, provocando o fechamento de canais de potássio dependentes de ATP (K^+_{ATP}), causando despolarização da membrana extracelular, acarretando na abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, esta abertura aumenta o influxo de cálcio que, por sua vez, em altas concentrações, desencadeia o processo de exocitose e secreção de insulina na circulação (KOMATSU et al., 2013; DEL PRATO; TIENGO, 2001) (Figura 5).

Apesar da glicose ser o desencadeante principal da secreção de insulina outras enzimas associadas à membrana plasmática também podem auxiliar no processo secretório. Dentre estas enzimas se destacam a fosfolipase C (PLC) e a adenilato ciclase (AC). Estas enzimas podem ser ativadas pela

ligação de hormônios a receptores associados a proteína G presentes na membrana plasmática, sendo as proteínas G_q e G_s as vias responsáveis por esta interação com enzimas efetoras (WAUSON; LORENTE-RODRÍGUEZ; COBB, 2013; MOURAD; NENQUIN; HENQUIN, 2012; SHIBASAKI et al., 2014).

A PLC hidrolisa fosfolipídeos de membrana, resultando na formação de diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-inositol trifosfato (IP3). O DAG promove a ativação da proteína cinase C (PKC), a qual é dependente de Ca^{2+} e indispensável para que haja secreção de insulina. O IP3 por sua vez, desencadeia efluxo de Ca^{2+} do RE, o que reforça o aumento de cálcio intracelular (WAUSON; LORENTE-RODRÍGUEZ; COBB, 2013).

A ativação da AC resulta no aumento intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMP_c), provocando ativação de proteína cinase A (PKA), a qual também contribui para exocitose das vesículas de insulina. (DIAKOGIANNAKI; GRIBBLE; REIMANN, 2012; BALK-MOLLER; HOLST; KUHRE, 2014).

Figura 5 - Mecanismo de secreção de insulina pelas células β -pancreáticas. A glicose é internalizada pelo GLUT para dentro da célula, o metabolismo gera aumento da relação ATP/ADP. Esse aumento resulta no fechamento dos canais de K^+_{ATP} , provocando despolarização na membrana e consequente abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem. O aumento das concentrações intracelulares de cálcio é o estímulo necessário para que ocorra a fusão de vesículas e a secreção de insulina na circulação. Outros estímulos podem desencadear a secreção de insulina através de receptores acoplados a proteínas G que irão ativar vias da PLC ou AC, provocando aumento da secreção do hormônio.

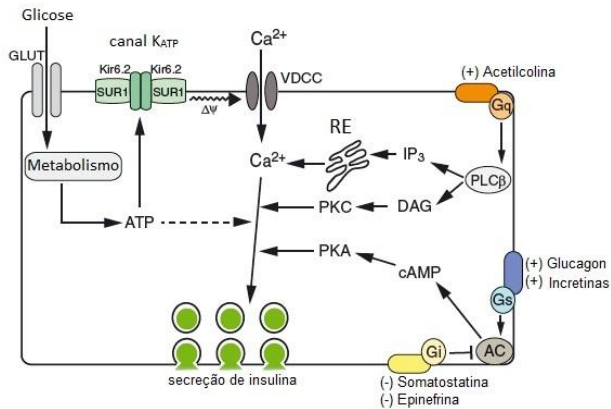
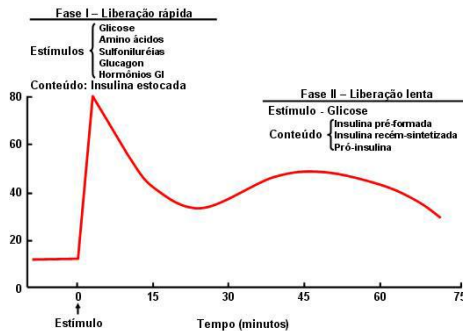


Figura 5 - Fonte: Adaptado de Shibasaki et al., 2014.

A secreção de insulina é caracteristicamente bifásica. A primeira fase é transitória e rápida, com duração de 4 a 10 min (Figura 6). Durante esta fase, as vesículas ancoradas à membrana das células β, são liberadas a partir do estoque ali presente. A primeira fase também é conhecida como desencadeadora, e tem o objetivo de direcionar a utilização da glicose da dieta, bem como inibir a produção hepática de glicose (DEL PRATO; TIENGO, 2001). Enquanto a concentração de glicose permanecer elevada, uma segunda fase de secreção de insulina é observada, esta é chamada de fase de manutenção e tem uma durabilidade estendida. Durante a segunda fase os sinais para secreção são amplificados e há ativação da síntese de mais insulina (HIRIART; AGUILAR-BRYAN, 2008; KAHN et al, 2006).

A insulina regula a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. A insulina também estimula a lipogênese no fígado. Nos adipócitos também reduz a lipólise, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação protéica nos tecidos (THORENS; MUEKLER, 2010; SCHEEPERS; JOOST; SCHURMANN, 2004).

Figura 6 - Fases de liberação da insulina. A liberação de insulina é bifásica. A primeira fase (cerca de 4 a 10 min) resulta da fusão de vesículas de insulina ancoradas a membranas das células β e tem como principal função estimular a utilização de glicose, ao mesmo tempo inibindo a produção hepática de glicose. A segunda fase tem por objetivo manter as concentrações basais de glicose.



Fonte: <http://pt.slideshare.net/CassyanoJCorrer/reviso-sobre-diabetes-mellitus-28197548> Acesso em: 05/09/2015.

1.5 Captação de glicose em tecidos insulino-dependentes

A captação de glicose por tecidos periféricos como tecidos muscular e adiposo, que necessitam e/ou metabolizam a glicose, é realizada através do transportador de glicose GLUT4. A insulina tem como principal ação nos tecidos sensíveis a este hormônio, desencadear a translocação dos transportadores GLUT4 dos estoques intracelulares para a membrana, para que o mesmo possa transportar a glicose para o interior da célula (LETO; SALTIEL, 2012; HOU; PESSIN, 2007).

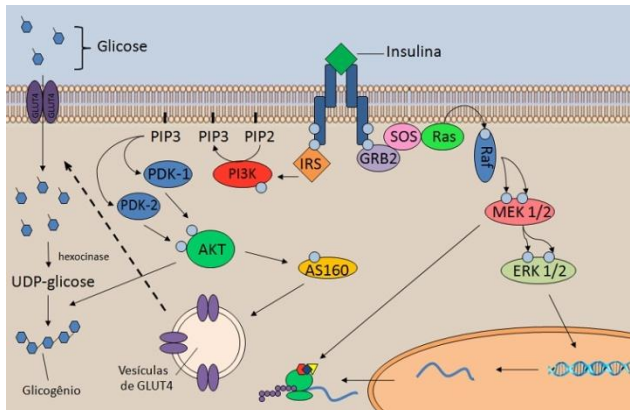
Para exercer os efeitos biológicos nestes tecidos, a insulina se liga a receptores específicos na membrana plasmática. O receptor de insulina (RI) é uma glicoproteína heterotetramérica pertencente à família de receptores tirosina cinases. O receptor transmembrana de insulina é formado por duas subunidades α e duas β . A ligação da insulina na subunidade α ativa a tirosina cinase da subunidade β , causando autofosforilação do receptor em resíduos de tirosina específicos

(CHANG; CHIANG; SALTIEL, 2004; HOFFMAN; ELMENDORF, 2011; WATSON; PESSIN, 2007; KLIP, A., 2009). Além disso, o receptor também sofre mudanças conformacionais que resultam no aumento ainda maior da atividade tirosina cinase do receptor. Uma vez o receptor ativado, ocorre fosforilação das proteínas substratos do receptor de insulina (IRS). Existem quatro isoformas de IRS de 1 a 4, sendo o IRS-1 o principal substrato do receptor de insulina no músculo. Já o IRS-2 parece estar envolvido no desenvolvimento das células β pancreáticas e ambas as isoformas são importantes para o metabolismo da glicose no fígado. O IRS-1 fosforilado recruta a fosfatidil-inositol-3-cinase (PI3K) através da subunidade reguladora p85, levando à ativação da subunidade catalítica p110. Uma vez ativado a PI3K catalisa a formação de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) na membrana plasmática. O PIP3 age como segundo mensageiro e ativa outras vias de sinalização, regulando a atividade da PDK-1 e PDK-2 (mTORC2). Após, as PDK-1 e PDK-2 fosforilam e ativam a proteína cinase B (PKB, também conhecida como Akt). Essa cinase está envolvida em vários efeitos biológicos da insulina, dentre eles efeitos em vias metabólicas como a de síntese de glicogênio através de fosforilação da proteína glicogênio sintase cinase 3 (GSK3) (HOFFMAN; ELMENDORF, 2011; CHANG; CHIANG; SALTIEL, 2004; WATSON; PESSIN, 2007; KLIP, A., 2009).

A ativação de Akt provoca principalmente a translocação das vesículas intracelulares de GLUT4 para a membrana plasmática, uma vez que no estado basal o GLUT4 se encontra armazenado no interior da célula. Esta translocação de vesículas se dá devido à fosforilação da proteína AS160 pela Akt. O processo de translocação e fusão do GLUT4 na membrana ocorrem através das SNAREs (Receptor de ligação ao fator solúvel sensível à N-Etilmaleimida), microtúbulos e filamentos de actina, que direcionam o movimento das vesículas da região perinuclear para a membrana em resposta à insulina (KLIP, A., 2009; HOFFMAN; ELMENDORF, 2011). No entanto, a disparidade entre a translocação do GLUT4 para a membrana e a captação de glicose pelos tecidos periféricos é frequentemente questionada, e estudos já indicam que há um aumento na atividade intrínseca do GLUT4 além da translocação induzida via

PI3K. Esta via independente de PI3K, mas complementar, como a via da p38 MAPK, provavelmente influencia no estado de fosforilação do GLUT4 na membrana plasmática (CAZAROLLI et al., 2013; FURTADO et al., 2003; RISCO & CUENDA, 2012). Além disso, a insulina desencadeia vias de sinalização que participam amplamente no crescimento e diferenciação celular, tais como as vias de MAPK. As vias nucleares (via MAPK e MEK) estão envolvidas na regulação de várias atividades celulares como a estimulação da expressão de transportadores de glicose, assim como outras proteínas das vias de sinalização celular, expressão gênica, mitose, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose, além de modular a ativação de fatores de alongamento da tradução proteica, como cascata da cinase eEF2K (GONZÁLEZ-TERÁN et al., 2013; RISCO & CUENDA, 2012; JUNG et al., 2011) (Figura 7).

Figura 7 - Sinalização periférica da insulina. A insulina, ao se ligar ao receptor, que se autofosforila, se tornando ativo e capaz de fosforilar substratos do receptor de insulina, o qual ativa a PI3K, que quando fosforilada catalisa a formação do PIP3. O PIP3 ativo modula a localização e atividade das proteínas PDK1 e PDK2, ambas agora possuem a capacidade de fosforilar a AKT, que quando ativada, fosforila a AS160 promovendo os processos que levam à mobilização de GLUT4 na membrana plasmática da célula. Por outro lado, quando o receptor de insulina está ativo, também tem a capacidade de ativar outra via, a das MAPK, que resulta em aumento da expressão gênica e proliferação celular, assim como modula a síntese proteica, principalmente através da ativação de fatores de alongamento (EF) presentes na etapa de alongamento da tradução proteica.



Fonte: Elaborado pela autora.

1.6 Resistência a insulina

A resistência a insulina se caracteriza por uma resposta metabólica diminuída dos tecidos periféricos (músculo, fígado e tecido adiposo) à insulina. Em consequência principalmente da menor captação de glicose pelos tecidos, o pâncreas produz e libera maiores quantidades de insulina tentando equilibrar a manutenção das concentrações glicêmicas normais. Assim, a hiperinsulinemia se torna um sinal evidente de perda da homeostase glicêmica (MUOIO; NEWGARD, 2008; WILCOX, 2005).

A resistência nos tecidos ao hormônio pode ser provocada pela redução da concentração e atividade do receptor de insulina, da concentração e fosforilação dos substratos do receptor de insulina (IRS), da atividade de proteínas intracelulares responsáveis pela cascata de sinalização da insulina e/ou ainda por defeitos na translocação e ativação do GLUT4 na membrana (MUOIO; NEWGARD, 2008; KHODABANDELOO et al., 2015).

O receptor de insulina, além de ser fosforilado em tirosina, também pode ser fosforilado em serina, o que diminui a transmissão de sinais, diminuindo a capacidade do receptor em se fosforilar em tirosina após estímulo de insulina. Essas fosforilações inibitórias causam prejuízo na cascata de

sinalização podendo provocar resistência a insulina (MUOIO; NEWGARD, 2008; KHODABANDELOO et al., 2015).

Uma das metodologias aplicadas atualmente para induzir modelos de resistência à insulina em animais na pesquisa científica visa à administração de glicocorticóides em altas doses e/ou a longo prazo. Os glicocorticóides são hormônios esteróides produzidos no córtex das glândulas adrenais sob o controle do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (ANDREWS & WALKER, 1999). Na prática clínica eles são amplamente utilizados como agentes antiinflamatórios e imunossupressores (SAKLATVALA, 2002). Em excesso, os glicocorticóides induzem resistência à insulina (KORACH-ANDRE et al., 2005; RAFACHO et al., 2008; STOJANOVSKA et al., 1990), como evidenciado na síndrome de Cushing (SAKLATVALA, 2002), por aumentar a produção hepática de glicose pela gliconeogênese e diminuir a captação pelos tecidos periféricos (DELAUNAY et al., 1997). Além disso, dependendo da dose e do tempo de tratamento, os glicocorticóides podem causar DM tipo 2 (HOOGWERF & DANESE 1999).

1.7 Receptores ativados por proliferador peroxissoma

Receptores ativados por proliferador peroxissoma (PPARs) são membros da superfamília de receptores nucleares de hormônios esteróides incluindo três isotipos conhecidos de PPAR- α , PPAR- γ , e PPAR- δ que podem ser encontrados principalmente no em células do tecido adiposo, mas também está presente em tecido muscular e hepático (BROWN; PLUTZKY, 2007; WILLSON, 2000). Estes receptores são ativados por ligantes, induzindo a transcrição de genes envolvidos em processos fisiológicos como o balanço energético, o metabolismo lipídico e a homeostase da glicose, atuando em diversos órgãos (LEE, C.H.; OLSON, P.; EVANS, R.M., 2003; MARX, et al., 2004b).

Agonistas de PPAR têm diferentes aplicações na prática clínica. Ligantes PPAR- α inclui os derivados de ácido fibríco (fibratos), que são utilizados atualmente para diminuir os triglicéridos (TG), enquanto aumenta substancialmente HDL-C,

como também, algum efeito de redução adicional no LDL-C (FRUCHART; STAELS; DURIEZ, 2001).

Agonistas de PPAR- γ , por outro lado, têm também efeitos sobre a glicose e o metabolismo lipídico reconhecido. O uso clínico destes agonistas PPAR- γ em pacientes diabéticos tipo 2 leva a um controle glicêmico melhorado e uma maior sensibilidade à insulina (GIANNINI; SERIO; GALLI, 2004). Além disso, estes fármacos também melhoraram o perfil lipídico de pacientes em risco de desenvolver aterosclerose e reduzir os níveis circulantes de marcadores inflamatórios (GIANNINI; SERIO; GALLI, 2004).

Ainda não se tem muito conhecimento sobre ligantes de PPAR- δ . Porém alguns trabalhos em modelos de animais mostram que agonistas de PPAR- δ podem ter utilidade terapêutica para a síndrome metabólica, aumentando o consumo de ácidos graxos no músculo esquelético e tecido adiposo (LUQUET, et al., 2005).

Os PPARs são ativados por ligantes endógenos ou exógenos, sendo que, após ativação, sofrem mudança conformacional, que permite a heterodimerização com o receptor retinóico (RXR), induzindo recrutamento de um ou mais co-ativadores (KOTA, et al., 2005). Este processo resulta no aumento da atividade transcricional de genes envolvidos em diferentes processos biológicos que vão culminar na melhora da sensibilidade a insulina geral em órgãos insulino-dependentes como tecido adiposo, muscular e hepático (KAHN & FLIER, 2000).

1.8 Tratamento da diabetes

O objetivo da terapia na diabetes está baseada na promoção da qualidade de vida do paciente, para tanto é necessário o controle dos sintomas agudos da doença e a prevenção das complicações crônicas. Quando possível, o tratamento de primeira escolha da DM é através da mudança do estilo de vida caracterizada por dieta e prática regular de exercícios físicos aliados ou não a terapia com antidiabéticos e/ou insulina (SBD, 2013; MERCK, 2014; FOWLER, 2007; KOSKI, 2006).

No caso da DM tipo 1 em que a insuficiência de insulina normalmente é total, o tratamento consiste na reposição direta do hormônio através de administração de insulina exógena. Para o tratamento da DM tipo 2 o tratamento se torna heterogêneo, uma vez que para alguns pacientes a prática de exercícios e da alimentação já é suficiente para normalizar os índices de glicemia (SBD, 2013; MERCK, 2014). Porém na maioria dos casos além da mudança no estilo de vida, também se torna necessário a utilização de tratamento com antidiabéticos aliados ou não a insulino terapia (SBD, 2013; MERCK, 2014).

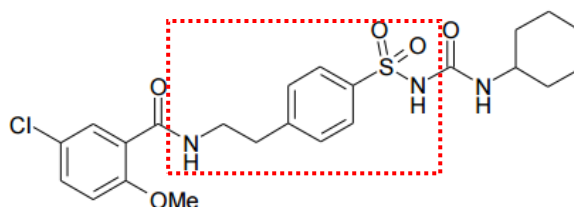
A escolha do tratamento medicamentoso, monoterapia ou associação entre medicamentos, segue vários critérios tais como o peso e idade do paciente, valores da glicemia de jejum e pós-prandial, valor da hemoglobina glicada (HbA1c), presença de complicações, outros distúrbios metabólicos e doenças associadas, assim como possíveis interações com outros medicamentos, reações adversas e contra-indicações (SBD, 2013; MERCK, 2014). Os antidiabéticos são classificados de acordo com o modo de ação: secretagogos de insulina (estimulam a secreção do hormônio) (BRISCOE; GRIFFITH; DAVIS, 2010; KORYTKOWSKI, 2004); os que diminuem a produção hepática de glicose; sensibilizadores de insulina (diminuem a resistência periférica ao hormônio) (DESAI; PANDIT; DODIYA, 2015; PHIELIX; SZENDROEDI; RODEN, 2011); e os inibidores das alfa-glicosidases (reduzem a velocidade de absorção de glicídios no trato gastro intestinal) (GHANI, 2015) e, mais recentemente os análogos do GLP-1 (aumentam a secreção de insulina após as refeições e promovem a supressão do glucagon) (RUSSELL-JONES; GOUGH, 2012; RUSSELL, 2012) e os inibidores de DPP-IV (aumentam a secreção de GLP-1) (GILBERT; KRUM, 2015; GIUGLIANO et al., 2013).

1.9 Glibenclamida

A glibenclamida pertence à classe dos antidiabéticos orais das sulfoniluréias de segunda geração, antidiabéticos secretagogos de insulina, que auxiliam no tratamento da DM tipo 2 através da indução do aumento da secreção de insulina pelo

pâncreas (BRISCOE; GRIFFITH; DAVIS, 2010; KORYTKOWSKI, 2004). As sulfoniluréias foram introduzidas no tratamento da DM2 há cerca de 50 anos e são constituídas por uma estrutura comum, a sulfa, associada à uréia que confere suas características anti-hiperglicêmica (BRISCOE; GRIFFITH; DAVIS, 2010; KORYTKOWSKI, 2004) (Figura 8).

Figura 8 - Estrutura química da glibenclamida



Fonte: Abdelmoneim, 2012.

O mecanismo de ação da glibenclamida já é bem descrito e se dá pela inibição dos canais de K^+_{ATP} , por uma ligação de alta afinidade com a subunidade SUR1 (GRIBBLE, TUCKER e ASHCROFT, 1997; GRIBBLE et al., 1998; GRIBBLE e ASHCROFT, 1999; RUSS et al., 1999). A glibenclamida também pode interagir com Kir6.2, porém com uma ligação de baixa afinidade. Estas interações levam a despolarização na membrana plasmática e seqüente abertura de canais de cálcio. O cálcio intracelular em altas concentrações no interior das células é o desencadeante fundamental para a secreção de vesículas de insulina para a circulação (GRIBBLE, TUCKER e ASHCROFT, 1997; GRIBBLE et al., 1998; GRIBBLE e ASHCROFT, 1999; RUSS et al., 1999).

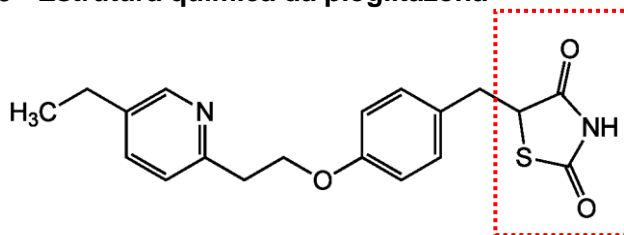
Para este fármaco a hipoglicemia e o ganho de peso são os principais efeitos colaterais preocupantes, isto acontece devido a alta indução de secreção de insulina que a droga induz. Frederico, M. J. et al., (2012), demonstrou que em ratos Wistar induzidos à hiperglicemia, a glibenclamida obteve índice insulinogênico de 1.98, o que pode levar a desgaste das células beta em longo prazo e ainda depleção das mesmas. Por isto, se faz necessário novos estudos com secretagogos de insulina no

intuito aumentar a atividade biológica e amenizar os efeitos indesejados.

1.10 Pioglitazona

A pioglitazona pertence à classe dos antidiabéticos orais, tiazolidinedionas, também chamados, glitazonas, amplamente utilizadas no tratamento da diabetes tipo 2. Caracteriza-se por apresentar na estrutura um anel diona responsável pelo efeito anti-hiperglicêmico dependente de insulina (DESAI; PANDIT; DODIYA, 2015; PHIELIX; SZENDROEDI; RODEN, 2011) (Figura 9).

Figura 9 - Estrutura química da pioglitazona



Fonte: Desai et al., 2010.

O principal mecanismo de ação se dá pela ligação a receptores PPAR γ (receptores ativados por proliferadores de peroxissoma do tipo gama) presentes no núcleo das células do tecido adiposo principalmente, contudo, podem também estar expresso nas células beta, tecido muscular e macrófagos. Esta interação culmina em mudança conformacional do receptor permitindo a ligação com o receptor de ácido retinóico e outros co-ativadores. Este complexo heterodímero formado interage com regiões do núcleo responsivas que vão determinar a transcrição de aproximadamente 500 genes, sendo que a maioria ainda não se tem total conhecimento sobre a atuação. Alguns estudos já comprovam que alguns genes induzidos por receptores PPARs têm influência principalmente no metabolismo de glicídios, lipídeos e na diferenciação celular (LUCONI; CANTINI; SERIO, 2010; CARIOU; CHARBONNEL; STAELS,

2012; KARAK et al., 2013). As proteínas, as quais a expressão é amplificada pela ação da pioglitazona, agem melhorando a ação da insulina no fígado e tecidos periféricos como tecidos muscular e adiposo, aumentando a sensibilidade ao hormônio nestes órgãos (LUCONI; CANTINI; SERIO, 2010; CARIOU; CHARBONNEL; STAELS, 2012; KARAK et al., 2013).

As glitazonas como um todo também são conhecidas por favorecer a diferenciação de adipócitos menores, que tem maior sensibilidade a insulina, e ainda, estimular a apoptose de adipócitos maiores, que liberam maior quantidade de ácidos graxos livres na circulação, além de secreção de TNF- α e IL-6, que agravam o quadro de resistência a insulina (AHMADIAN et al., 2013; POULSEN; SIERSBÆK; MANDRUP, 2012).

A ativação de receptores PPAR γ estimula genes do metabolismo de lipídeos, com conseqüente efeito benéfico ainda sobre as comorbidades da diabetes, como por exemplo, o risco de doenças cardiovasculares (RIZVI et al., 2014; SHAH; MUDALIAR, 2010).

1.11 Desenvolvimento de novos medicamentos

Os fármacos de origem sintética representam significativa parcela do mercado farmacêutico, estimado, em 2000, em 390 bilhões de dólares. Até 1991, entre 866 fármacos usados na terapêutica, 680 (79%) eram de origem sintética. Os restantes 186 (21%), correspondiam àqueles de origem natural ou semi-sintética. (CALIXTO & SIQUEIRA JÚNIOR, 2008).

Embora as substâncias fossem ensaiadas com objetivo terapêutico definido, muitos fármacos foram descobertos acidentalmente, por manifestarem efeitos importantes para o tratamento de outras doenças. O exemplo mais conhecido desse tipo de descoberta ainda é a penicilina, em 1928 por Alexander Fleming (MALERBA; ORSENIGO, 2001). A capacidade técnica para alterar de forma controlada a estrutura química das substâncias e o aumento do conhecimento sobre a relação entre estrutura e respectiva atividade biológica criaram as condições necessárias para a nova revolução na terapêutica medicamentosa (PALMEIRA FILHO; PAN, 2003).

A introdução de novos fármacos na terapêutica é necessária para o aperfeiçoamento do tratamento mais seguro e eficaz. A busca por medicamentos menos tóxicos resultou na introdução de substâncias sintéticas. A maioria dos fármacos disponíveis na terapêutica moderna é de origem sintética e/ou obtidos de processo de semi-síntese (OLIVEIRA e SILVA, 2008).

1.12 Modificação molecular

As modificações moleculares se baseiam em utilizar uma substância química bem determinada e de ação biológica conhecida, como modelo ou protótipo e daí sintetizar e ensaiar novos compostos que sejam congêneres homólogos ou análogos estruturais do fármaco matriz. Dentre os processos de maior relevância utilizados na modificação molecular a adição, replicação e hibridização molecular estão entre os mais utilizados (CALIXTO & SIQUEIRA JÚNIOR, 2008; BARREIRO, E. J., 2009).

Fármacos conhecidos podem ser usados como protótipos para produzir compostos similares. A modificação molecular dessas moléculas tem por objetivos preparar novas moléculas relacionadas quimicamente, de forma a melhorar a atividade farmacológica, minimizar a toxicidade e obter a formulação que sejam manipuladas pelos profissionais da saúde e aceitas pelos pacientes (CALIXTO & SIQUEIRA JÚNIOR, 2008; BARREIRO, E. J., 2009).

A hibridização molecular é um dos novos processos de criação e desenvolvimento de fármacos com base na combinação de porções farmacofóricas de diferentes substâncias bioativas conhecidas para produzir um novo composto híbrido com afinidade e eficácia melhorada, quando comparados com os fármacos originais (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007; BARREIRO, E. J., 2009).

Os compostos sintéticos apresentados neste trabalho, 4-[2-(2-fenil-4-oxo-1,3-tiazolidin-3-il)etil]benzeno-1-sulfonamida (FTEBS) e 4-{2-[2-(3,4-diclorofenil)-4-oxo-1,3-tiazolidin-3-il]etil}benzeno-1-sulfonamida (DTEBS) são exemplos deste tipo de modificação molecular. Eles possuem parte da estrutura da glibenclamida (4-(2-aminoetil)benzeno-sulfonamida) associado

ao anel 1,3-tiazolidin-4-ona da pioglitazona, com alguns radicais ligados buscando melhorar o perfil farmacológico das mesmas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar o efeito e o mecanismo de ação de compostos híbridos (FTEBS E DTEBS) que foram sintetizados através da junção da estrutura da glibenclamida associada à porção da pioglitazona na homeostase glicêmica.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o efeito antihiper-glicêmico e/ou hipoglicemiante dos compostos (FTEBS E DTEBS) em modelos experimentais de ratos hiper-glicêmicos por um período agudo de tratamento, por via intraperitoneal.
- Determinar o efeito dos compostos em estudo na secreção de insulina após tratamento agudo em ratos hiper-glicêmicos.
- Determinar o efeito dos compostos no conteúdo de glicogênio muscular e hepático após o tratamento agudo *in vivo* em ratos hiper-glicêmicos.
- Estudar o efeito dos híbridos em estudos *in vitro* na atividade de dissacaridases intestinais (maltase, lactase e sacarase).
- Estudar o efeito dos compostos em estudos *in vitro* na glicação de proteínas (glicose ou frutose + albumina).
- Estudar o efeito *in vitro* do análogo FTEBS na captação de ¹⁴C-deoxi-D-glicose em músculo esquelético de ratos normoglicêmicos (vias de sinalização intracelular no efeito insulinomimético).
- Estudar o efeito do análogo FTEBS no conteúdo total de GLUT4 em músculo esquelético de ratos normoglicêmicos.
- Determinar a influência do composto análogo FTEBS na síntese de RNAm de GLUT4 *ex vivo* no músculo esquelético de ratos normoglicêmicos.
- Determinar o efeito do análogo FTEBS em modelo animal de resistência à insulina induzidos por dexametasona.
- Analisar o efeito no perfil lipídico de animais resistentes a insulina tratados com FTEBS.

- Determinar o efeito antihipertrigliceridêmico do híbrido FTEBS em estudo com ratos hipertrigliceridêmicos por um período agudo de tratamento, por via oral.
- Estudar o efeito *in vitro* do análogo DTEBS no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas (vias de sinalização intracelular no efeito secretagogo de insulina).
- Avaliar a toxicidade dos análogos FTEBS e DTEBS através da dosagem de LDH sérico em período agudo e após 5 dias.

3. JUSTIFICATIVA

A busca de fármacos com melhor eficácia terapêutica e que contenham menos efeitos adversos para o tratamento de doenças humanas ainda é objeto de muito estudo. Entre as diversas estratégias utilizadas para o desenvolvimento de novos fármacos para a terapêutica, existem as modificações estruturais e/ou moleculares que atualmente se mostram promissoras. Estas consistem na modificação química de moléculas como homologação, simplificação e hibridação molecular, com o objetivo de aumentar a potência e segurança do perfil farmacológico do fármaco (CALIXTO & SIQUEIRA JÚNIOR, 2008; LIMA, 2007).

Estudos provenientes de pesquisas desenvolvidas no Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais/UFSC investigam novos compostos sintéticos com possível utilização para o tratamento da diabetes. Frederico et al., 2012; Frederico et al., 2013; Mascarello et al., 2014 demonstraram que análogos de acilhidrazonas, sulfonamidas e sulfoniltioureias sintéticas atuam no pâncreas e/ou em músculo esquelético contribuindo para a homeostasia da glicose. Além disso, o efeito antidiabético de sulfonamidas sintéticas baseado no fragmento estrutural de sulfoniluréias foi comprovado através da demonstração do efeito insulinomimético e secretagogo de insulina destes compostos em modelos agudos de hiperglicemia.

Apoiado nestes resultados anteriores, o presente trabalho busca dar continuidade aos estudos com o objetivo de investigar o mecanismo de ação de compostos sintéticos 4-[2-(2-fenil-4-oxo-1,3-tiazolidin-3-il)etil]benzeno-1-sulfonamida (FTEBS) e 4-{2-[2-(3,4-diclorofenil)-4-oxo-1,3-tiazolidin-3-il)etil] benzeno-1-sulfonamida (DTEBS) que amplificam o espectro de ação (secretagogos de insulina e sensibilizadores da insulina, em uma mesma molécula). Além disso, diferentes radicais adicionados a estas novas moléculas foram também investigados com o objetivo de selecionar uma melhor resposta metabólica.

A compreensão das vias de sinalização que medeiam à ação destes compostos em ilhotas pancreáticas ou em alvos de

ação da insulina, como a musculatura esquelética, é fundamental para a ação seletiva de novos fármacos propostos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Glicogênio, 2-(2-amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopirano-4-ona (PD 98059), cicloheximida, *trans*-1-(4-hidroxíciclohexil)-4-(4-fluorofenil)-5-(2-metoxipiridimidina-4-il)imidazol (SB239063), colchicina, N-etilmaleimida, wortmannin, acrilamida e bis-acrilamida, anti- β -actina de camundongo foram obtidos da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Anti-GLUT4 (sc-53566) foi obtido da Santa Cruz Biotechnology (California, USA). Glicose e solventes foram adquiridos da Vetec® (Florianópolis, SC, Brasil). Solvente para os procedimentos analíticos, etanol, metanol e HNMPA-(AM)₃ foram adquiridos da Merk (Darmstadt, Alemanha). O anticorpo conjugado a peroxidase, o substrato quimioluminescente da peroxidase Immobilon™ Western (HRP) e o kit de ELISA (EnzymeLinkedImmunoSorbentAssay) para determinação da insulina (catálogo nº EZRMI-13K) foi adquirido da Millipore (St. Charles, MO, Estados Unidos da América). [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 AnalyticalSciences (Boston, MA, EUA).

4.1.1 Animais

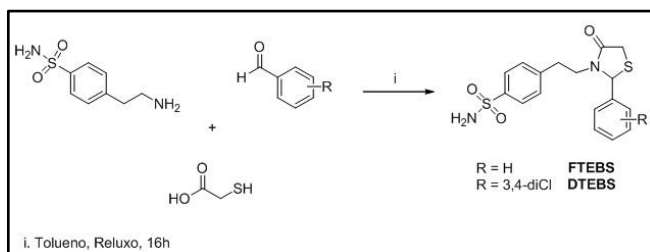
Ratos Wistar machos (180-200 g) foram mantidos em caixas plásticas com temperatura controlada (aproximadamente 21 ± 2 °C) com ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas entre 6 e 18 h). Os animais receberam alimento (Nuvital, Curitiba, PR, Brasil) e água *ad libitum*. Animais em jejum foram privados de alimento por 16 h, sendo permitido acesso livre à água. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo CEUA-UFSC PP00749).

4.1.2 Síntese e caracterização química dos compostos FTEBS e DTEBS

A síntese dos análogos FTEBS e DTEBS foi realizada a partir de colaboração com o laboratório de Síntese Química, sintetizados pela aluna Dr. Patrícia Devantier Neuenfeldt, orientanda do Prof. Dr. Ricardo José Nunes do departamento de química da UFSC.

Para a obtenção dos análogos FTEBS e DTEBS partiu-se da reação de ciclocondensação “one-pot” entre a amina, no caso a 4-(2-aminoetil) benzenosulfonamida, os benzaldeídos (benzaldeído ou 3,4-diclorobenzaldeído) e ácido mercaptoacético (Figura 10).

Figura 10 - Síntese dos análogos FTEBS e DTEBS. Hibridização entre a amina, no caso a 4-(2 aminoetil) benzenosulfonamida, os benzaldeídos (benzaldeído ou 3,4 diclorobenzaldeído) e ácido mercaptoacético para obtenção de FTEBS e DTEBS.



A síntese *one-pot* dos compostos foi realizada na proporção 1:1:3 (amina: benzaldeído: ácido), sob refluxo de tolueno (110°C), usando Dean-Stark por 16 horas. Para retirar o excesso do ácido mercaptoacético do meio reacional, foi adicionada uma solução saturada de bicarbonato de sódio formando uma fase orgânica e uma inorgânica. Após a separação das fases e evaporação do tolueno em

rotaevaporador, purificou-se a massa bruta por recristalização em etanol.

4.2 Métodos

4.2.1 Determinação da curva de tolerância à glicose

Ratos submetidos a jejum de 16 h foram divididos em dois grupos de seis animais: Grupo I, ratos hiperglicêmicos que receberam sobrecarga de glicose (4 g/kg; 8,9M); Grupo II, ratos hiperglicêmicos que receberam o tratamento (FTEBS e DTEBS) nas doses de 1 e 10 mg/kg. A glicemia foi mensurada antes de qualquer tratamento (tempo zero). Em seguida, os ratos receberam o tratamento (FTEBS e DTEBS) e após 30 min foram submetidos a sobrecarga de glicose. A curva de tolerância à glicose foi iniciada imediatamente após a sobrecarga de glicose e a glicemia foi mensurada no período de 15, 30, 60 e 180 min. Todos os tratamentos foram administrados por via intraperitoneal (LIU et al., 2015). O sangue foi coletado para determinação da glicemia pelo método da glicose oxidase (CAZAROLLI et al., 2009; FREDERICO et al., 2012)

4.2.2 Determinação da insulina sérica e estática

Foi dosada a insulina sérica a partir do soro de animais hiperglicêmicos tratados ou não com os análogos após 15, 30 e 60 min da sobrecarga de glicose. Para a insulina estática foi primeiramente isolado o pâncreas como descrito nesta metodologia e incubado na presença ou ausência de tratamento FTEBS e DTEBS (10 η M) durante 30 min. As amostras foram centrifugadas e uma alíquota de 100 μ L do sobrenadante foi utilizada para dosar a insulina estática liberada pela ilhota pancreática. A insulina (sérica e estática) foi mensurada por ELISA de acordo com instruções do fabricante. A faixa de valores detectado pelo kit de ensaio foi de 0,51 ng/mL a 4,8 ng/mL. Os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio para a insulina foram de 1,33 e 6,71, respectivamente, com uma sensibilidade de 0,1 ng/mL. A insulina foi estimada pela média das medidas em 450 nm com um leitor de placa ELISA (Organon Teknika,

Roseland, NJ, USA) por interpolação da curva padrão. As amostras foram analisadas em duplicatas e os resultados expressos como ng de insulina sérica por mL⁻¹ (CAZAROLLI et al., 2009).

4.2.3 Determinação da atividade das dissacaridases intestinais *in vitro*

O segmento do duodeno foi removido de ratos normais, lavado em 0,9% de solução de NaCl, secado sobre papel filtro, pesado, cortado, homogeneizado com NaCl a 0,9% (400 mg de duodeno por mL) e centrifugado (18000 r.p.m./8 min). O sobrenadante foi incubado a 37 °C durante 5 min com o substrato (maltose, sacarose e lactose) em tampão maleato (pH 6,0). O tratamento (FTEBS ou DTEBS) foi realizado 5 min antes da incubação com os substratos. Atividades da maltase, lactase e sacarase foram determinadas pelo método glicose oxidase de acordo com as recomendações do fabricante (PEREIRA et al., 2012). A atividade específica foi definida como a atividade da enzima (U) por mg de proteína (corresponde à quantidade de enzima que catalisa uma reação com velocidade de formação de 1 micromol de produto por minuto) (DAHLQVIST, 1984). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (1951), utilizando BSA como padrão.

4.2.4 Determinação da atividade anti-glicação

Os AGEs foram formados num sistema *in vitro* (adaptado de KIHIO et al., 2004). A glicose (500 mM) ou a frutose (300 mM) foram incubadas em tampão fosfato (PBS, pH 7,4; azida sódica 0,02%) com BSA (10 mg/ml) na ausência (controle) ou na presença dos tratamentos FTEBS e DTEBS (0,1 e 1 µg/ml). A fluorescência formada por AGEs foi medida com o Infinity M200 (TECAN) (excitação = 370 nm e emissão = 440 nm) antes do início da incubação (dia zero). Imediatamente após, a solução foi mantida em estufa com agitação e protegida da luz, a 37°C. A fluorescência foi medida no 7°, 14° e 28° dia (n = 8 poços) (KIHIO et al., 2004; KAPPEL et al., 2012).

4.2.5 Conteúdo de glicogênio

Para determinação do glicogênio muscular e hepático, músculo sóleo e fígado foram removidos dos ratos hiperglicêmicos (controle hiperglicêmico) e de ratos submetidos aos respectivos tratamentos (FTEBS e DTEBS) imediatamente após 3 h da sobrecarga de glicose. Os tecidos foram pesados e digeridos com KOH 33% sob fervura a 100 °C por 20 min. Após a fervura, foi adicionado etanol 96% e novamente, as amostras foram submetidas à fervura seguida de banho de gelo para precipitação do glicogênio. As amostras foram então centrifugadas a 1300 r.p.m. durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado solubilizado em água. O conteúdo de glicogênio foi determinado pelo tratamento com reagente de iodo e posterior leitura em espectrofotômetro a 460 nm. Os resultados foram expressos em mg de glicogênio/g de tecido (KRISMAN, 1962).

4.2.6 Captação de [U-¹⁴C]-2-desoxi-D-glicose no músculo sóleo de ratos

Foram utilizados músculos sóleos de ratos submetidos a jejum de 16 h. Fatias de músculo foram distribuídas entre os grupos controle e tratado (FTEBS). Os músculos foram dissecados, pré-incubados (30 min) e em seguida incubados (60 min) a 37 °C, O₂/CO₂ (95%:5%, v/v), pH 7,4 em Krebs Ringer bicarbonato (KRb) com uma composição de 122 mM de NaCl, KCl (3 mM), 1,2 mM de MgSO₄, 1,3 mM de CaCl₂, 0,4 mM de KH₂PO₄ e 25 mM de NaHCO₃. O análogo FTEBS (10 nM, 10 pM e 10 fM) foi adicionado ao meio de incubação (60 min) em presença ou ausência de HNMPA-AM (100 μM) (CASTRO et al., 2015), wortmannin (100 nM) (CASTRO et al., 2015), colchicina (1 μM) (CASTRO et al., 2015), N-etilmaleimida (1 nM) (KAPPEL et al., 2013), PD98059 (50 μM) (CASTRO et al., 2015), SB239063 (10 μM) (CAZAROLLI et al., 2013), actinomicina D (1 μM) (KAPPEL et al., 2013) ou cicloheximida (350 μM) (CASTRO et al., 2015). ¹⁴C-DG (0,1 μCi/mL) foi adicionada a cada amostra durante o período de incubação. Para a quantificação das proteínas totais foi usado o método de Lowry et al. (1951). Os

resultados da captação de glicose foram expressos como unidades de glicose captada em nmol/ mg de proteína (CASTRO et al., 2015 ; KAPPEL et al., 2013; CASTRO et al., 2014; CAZAROLLI et al., 2013).

4.2.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western blott*

Para o homogeneizado total, o músculo sóleo foi incubado *in vitro* (60 min) com FTEBS (10 μ M) e sem tratamento (controle). Foi homogeneizado numa solução de lise contendo 2 mM de EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 6,8, SDS 4% (w/v) e a concentração total de proteína em seguida foi determinada pelo método de Lowry (1951). As frações de membrana plasmática do tecido muscular foram incubadas na presença ou ausência de FTEBS 10 μ M (60 min, 37°C em KRb) e foram preparadas como descrito por Nishiumi, Ashida (2007). Para a análise de eletroforese (homogeneizado total), as amostras foram dissolvidas em solução contendo 40% de glicerol, 5% de mercaptoetanol, 50 mM de Tris-HCl (pH 6,8) e aquecidos a 100°C durante 3 min. As amostras proteicas foram aplicadas em concentrações iguais em gel de poliacrilamida (12%), separadas por SDS-PAGE de acordo com o sistema descontínuo de Laemmli (1970) e transferidas para membranas de nitrocelulose em tampão de transferência. As membranas de nitrocelulose foram incubadas durante 2 h em solução de bloqueio contendo 5% de leite em pó desnatado e em seguida incubadas por 18 h a 4 °C com anti-GLUT4 diluído em uma razão de 1: 500. As membranas foram incubadas durante 2 h com anticorpo anti-IgG de rato (1:1000) e as bandas reativas foram visualizadas utilizando o kit de quimioluminescência do substrato de HRP Immobilon™ (CASTRO et al., 2014). As membranas de nitrocelulose foram quantificados após escâner em sistema ChemiDoc™ MP por determinação da densidade óptica da bandas em software ImageLab versão 4.1 (Bio-Rad) (CASTRO et al., 2014; KAPPEL et al., 2013; CASTRO et al., 2015).

4.2.8 PCR em Tempo real

Os músculos sóleo insolados foram incubado *in vitro* (60 min) com FTEBS (10 μ M) e sem tratamento (controle). O Ácido ribonucleico total foi extraído usando reagente de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com o protocolo do fabricante. Todas as amostras de RNA estavam livres de DNA contaminante, utilizando reagentes isentos de DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com o protocolo do fabricante. O de RNA (1 μ g) foi transcrito reversamente com Superscript III (Invitrogen). A amplificação por PCR em tempo real foi realizada usando 2 μ L de cDNA, *primers* específicos para cada gene e SYBR Green reagente (Invitrogen), em um volume final de 10 μ L. O método 2-($\Delta\Delta$ Ct) (Livak e Schmittgen, 2001) foi usado para calcular os valores $\Delta\Delta$ Ct. Além disso, β -actina foi utilizada como um controle interno de carga. As sequências de *primers* utilizados são as seguintes: GLUT4: senso: 5'-CGCGGCCTCCTATGAGATAC-3'; anti-senso: 5'-CCTGAGTAGGCGCCAATGA-3' β -actin: senso: 5'-TGTTACCAACTGGGACGA-3'; anti-senso: 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCA-3' (CASTRO et al., 2015).

4.2.9 Resistência à insulina

Os ratos foram divididos em 4 grupos: Grupo I, ratos que receberam veículo (salina), grupo II, ratos que receberam dexametasona (0,1 mg/kg), grupo III, ratos que receberam tratamento (FTEBS) na dose 10 mg/kg e grupo IV, ratos de receberam o tratamento 10 mg/kg e imediatamente após, receberam dexametasona (0,1 mg/kg). Os ratos foram induzidos e tratados diariamente com injeções por via subcutânea entre 8 h e 30 min e 9 h e 30 min, durante 5 dias consecutivos (RAFACHO, et al., 2008).

4.2.10 Teste de tolerância à insulina

Os animais induzidos a resistência a insulina e tratados com FTEBS e DTEBS (10 mg/kg) foram utilizados para esta técnica. Os ratos foram submetidos a jejum de no mínimo 6 h, receberam insulina (2 U/kg de peso corporal) que foi injetada por via subcutânea. O sangue foi coletado pela cauda nos tempos 0,

7, 14 e 28 min para a determinação da glicemia. Este teste mensura a sensibilidade à insulina utilizando a constante do desaparecimento da glicose (Kitt) como índice do metabolismo da glicose mediado pela insulina. O Kitt foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $Kitt = 0,693 \times 100 / t^{1/2}$. Onde, o $t^{1/2}$ representa a meia-vida do decaimento da glicose e foi determinado a partir do coeficiente angular da reta obtida pela regressão linear do logaritmo natural da glicose versus o tempo (RAFACHO, et al., 2008).

4.2.11 Perfil lipídico sérico

No sangue coletado dos ratos tratados ou não com dexametasona/ FTEBS foram dosados uma série de parâmetros bioquímicos com o intuito de verificar o perfil lipídico destes animais. Foram utilizados kits comerciais para triglicerídeos, colesterol total e HDL-colesterol. Para determinar a concentração sérica de LDL-colesterol e VLDL-colesterol foi usado a equação de *Friedewald* [Colesterol LDL= Colesterol Total - (HDL+ VLDL)] e [Colesterol VLDL= Triglicérides ÷ 5] respectivamente (Gold Analisa, Belo Horizonte, MG, Brasil) (RAFACHO et al., 2008).

4.2.12 Curva de tolerância oral a triglicerídeos

Ratos normais submetidos a jejum de 16 h foram divididos em dois grupos de seis animais: Grupo I, ratos que receberam emulsão via oral (contendo óleo de milho, ácido cólico, óleo de canola e colesterol diluídos em salina); Grupo II, ratos hipertrigliceridêmicos que receberam o tratamento via i.p. com o FTEBS (10 mg/kg). O sangue foi coletado antes de qualquer tratamento (tempo zero). Em seguida, os ratos receberam o tratamento (FTEBS) e após 30 min foi administrada a emulsão por via oral. O sangue foi coletado no período de 1, 2, 3,4, 5 e 6 h após a sobrecarga (KAZMI et al., 2013). O sangue foi coletado para a determinação dos triglicerídeos totais por kit comercial (Gold Analisa, Belo Horizonte, MG, Brasil).

4.2.13 Isolamento das ilhotas pancreáticas

O pâncreas de ratos euglicêmicos 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 (KRb) (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 pH 7,4) adicionado de HEPES (8 mM), glicose 3 mM (KRb-HEPES) e colagenase (10 mg) foi injetado cuidadosamente no ducto pancreático até o pâncreas estar totalmente distendido. O pâncreas foi removido e mantido numa placa de Petri com KRb-HEPES. Posteriormente, o tecido foi transferido para tubo cônico e centrifugado por 2 min. O sobrenadante foi descartado e foi realizada uma adição de 10 mL de KRb-HEPES livre de colagenase. Este processo foi repetido por 4 vezes, sendo o último realizado sem centrifugação. Alíquotas (100 µL) de ilhotas isoladas foram transferidas para microtubos contendo 300 µL de KRb-HEPES livre de colagenase. Após nova centrifugação o tampão foi removido e foi iniciado o ensaio com as ilhotas (KAPPEL et al., 2013b; CASTRO et al., 2014).

4.2.14 Captação de ⁴⁵Ca²⁺ em ilhotas pancreáticas

As ilhotas previamente isoladas foram incubadas (60 min) em incubador com agitação a 37°C em KRb-HEPES contendo 5 mM de glicose e ⁴⁵Ca²⁺ (0,1 µCi/mL). As ilhotas foram incubadas por 10 min em tampão KRb-HEPES com ou sem tratamento na presença ou ausência de inibidores/agonistas (estes adicionados 15 min restantes da incubação). Foram utilizados: glibenclamida (20 µM) (FREDERICO et al., 2012), diazoxide (250 µM) (FREDERICO et al., 2012), nifedipina (1 µM) (FREDERICO et al., 2012), flunarizina (10 µM) (CASTRO et al., 2015), tapsigargina (1 µM) (ZHAO et al., 2013), dantrolene (50 µM) (KAPPEL et al., 2013b), H-89 (10 µM) (KAPPEL et al., 2013b) e RO 310432 (50 µM) (KAPPEL et al., 2013b). Uma solução contendo cloreto de lantânio (10 mM) foi adicionada às amostras para interromper o fluxo de cálcio. Os tubos foram centrifugados e lavados com o mesmo tampão. Após, as ilhotas foram homogeneizadas em 0,5

N de NaOH e fervidas por 10 min. Alíquotas 50 μL do tecido digerido foram adicionadas a 1 mL de líquido de cintilação. A leitura da radioatividade foi realizada em cintilador (modelo LS 6500; Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA). Alíquotas de 10 μL da amostra foram utilizadas para quantificação de proteínas pelo método de Lowry (1951).

4.2.15 Dosagem sérica de lactato desidrogenase

A atividade sérica de lactato desidrogenase (LDH) foi determinada após 180 min de tratamento com FTEBS ou DTEBS por via intraperitoneal (10 mg/kg) em período agudo em ratos hiperglicêmicos. Também foi determinada após 24 h dos 5 dias de tratamento com dexametasona ou não (controle). Amostras de soro foram usadas para determinar atividade da LDH extracelular (CASTRO et al., 2014).

4.3 Análise estatística

Os dados são expressos como média \pm E.P.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 $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

Os análogos foram primeiramente estudados sobre o efeito em modelos hiperglicêmicos sobre a glicemia e insulinemia, para a partir destes resultados buscar estratégias que evidenciem o possível mecanismo de ação para cada composto.

5.1 Capítulo 1 - Estudo do efeito insulinomimético do FTEBS em músculo sóleo

5.1.1 Efeito do FTEBS na curva de tolerância à glicose e na secreção de insulina

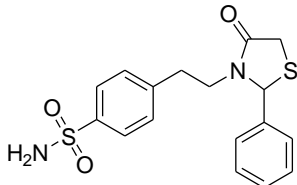
A Figura 11A mostra a estrutura química de FTEBS, baseada na porção funcional da estrutura da glibenclamida hibridizada à porção funcional da pioglitazona. A Figura 11B mostra a redução significativa na glicemia (em torno de 30%) obtida com o tratamento de 10 mg/kg e redução (em torno de 20%) com o tratamento de 1 mg/kg de FTEBS nos tempos 15, 30 e 60 min, quando comparado com o grupo controle. Ainda a dose de 10 mg/kg FTEBS mostra redução significativa após 60 min quando comparado ao tempo 15 min para a mesma dose. Diante dos resultados, a concentração de 10 mg/kg de FTEBS foi escolhida para estudos subsequentes, por apresentar melhor efeito na redução da glicemia. A Figura 11C demonstra o efeito dos protótipos na mesma dose de FTEBS (10mg/kg) para efeitos de comparação, como controle positivo. A Glibenclamida foi capaz de diminuir significativamente a glicemia de animais hiperglicêmicos em 15, 30 e 60 min, assim como FTEBS. Já com o tratamento com a pioglitazona é observado redução somente após 60 min de indução da hiperglicemia.

A Figura 12A e 12B apresenta o efeito de FTEBS na concentração sérica e estática de insulina respectivamente. Como observado, FTEBS aumentou significativamente a insulina sérica quando comparado com o controle após 15 min da sobrecarga de glicose. A partir área sobre a curva da glicose e insulina séricas foi determinado o índice insulínogênico (ASC

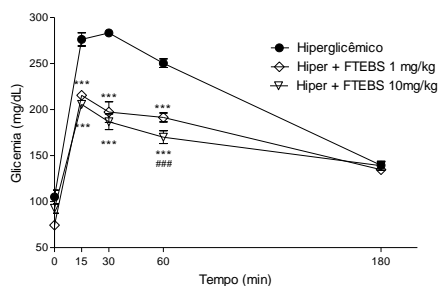
glicemia/ASC insulinemia x100) de FTEBS (10 mg/kg). Para esta dose FTEBS obteve 1.61 ml/mg de índice insulínogênico, aumentando em torno de 65% em relação ao grupo controle hiperglicêmico (0,56 ml/mg). O efeito estimulatório do FTEBS (10 η M) na secreção de insulina estática *in vitro* foi detectado após 10 min de incubação com o composto. A partir destes resultados foi investigado o mecanismo de ação do FTEBS na secreção de insulina em ilhotas pancreáticas.

Figura 11 - Efeito agudo do FTEBS na curva de tolerância a glicose. Estrutura do FTEBS (A), curva dose-resposta do FTEBS na curva de tolerância a glicose em ratos tratados por via i.p. com 1 e 10 mg/kg de FTEBS *in vivo* (B) e curva de Glibenclâmina e pioglitazona sobre a tolerância a glicose em ratos tratados por via i.p. com 10 mg/kg *in vivo* (C). Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n= 6. *** $p \leq 0,001$ comparado ao respectivo grupo controle hiperglicêmico. ### $p \leq 0,001$ comparado ao valor em 15 min dentro do grupo FTEBS 10 mg/kg.

A



B



C

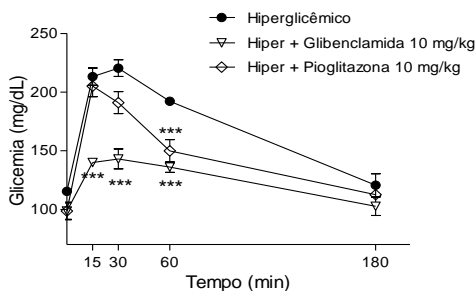
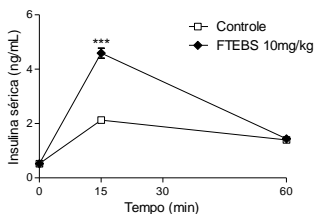
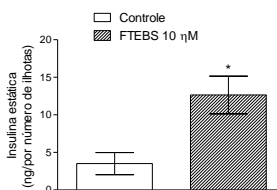


Figura 12 - Efeito do FTEBS na secreção de insulina. Efeito do FTEBS na secreção de insulina sérica em ratos hiperglicêmicos (A) $n=3$; Efeito do FTEBS na secreção de insulina estática em ilhotas pancreáticas isoladas (B) $n=15$. Incubação = 30 min. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. Significativo para $***p \leq 0,001$; $*p \leq 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle para cada caso.

A



B

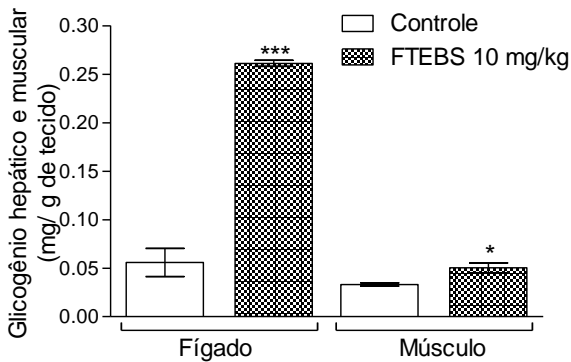


5.1.2 Efeito do FTEBS no conteúdo do glicogênio hepático e muscular

Para investigar os possíveis mecanismos envolvidos na atividade anti-hiperglicêmica deste composto, o conteúdo de glicogênio hepático e muscular foi determinado. Como observado na Figura 13, houve diferença significativa no conteúdo de glicogênio hepático (em torno de 300%) e muscular (em torno de 50%) com o tratamento com o FTEBS (10 mg/kg), quando comparado com o grupo controle. A partir dos resultados obtidos,

foram investigadas as possíveis vias de sinalização envolvidas neste aumento de conteúdo de glicogênio no tecido muscular.

Figura 13 - Efeito de FTEBS no conteúdo de glicogênio hepático e muscular. Efeito do FTEBS no conteúdo de glicogênio do fígado e do músculo sóleo em ratos hiperglicêmicos 180 min após o tratamento por via i.p. Os valores foram expressos como a média \pm E.P.M.; n = 6 para cada grupo. Estatisticamente significativo para ***p \leq 0,001; *p \leq 0,05 em comparação com o grupo de controle hiperglicêmico respectivo.

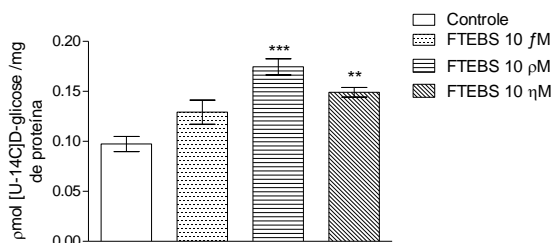


5.1.3 Estudo do mecanismo de ação do FTEBS no tecido muscular

A fim de investigar o aumento significativo do glicogênio muscular, uma curva dose resposta foi realizada para FTEBS através do ensaio *in vitro* na captação de ^{14}C -deoxi-glicose (^{14}C -DG) no músculo sóleo. A Figura 14 mostra o efeito estimulatório do FTEBS na captação de glicose após 1 h de incubação. O aumento significativo do FTEBS na captação de ^{14}C -DG representa em torno de 80% da captação na dose 10 μM comparada com o grupo controle. Por sua vez esta dose foi utilizada para os experimentos seguintes.

Figura 14 - Curva dose-resposta do FTEBS na captação de ^{14}C -glicose no músculo. Curva dose-resposta do FTEBS na captação [^{14}C]-glicose no músculo sóleo de ratos. Tempo de pré-

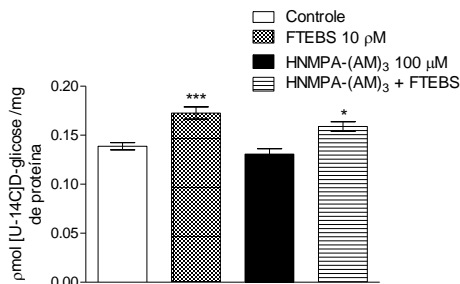
incubação = 30 min; tempo de incubação = 60 min. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M. . N = 6 para cada grupo. Significativo para ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle.



5.1.4 Estudo do mecanismo de ação do FTEBS na ação estimulatória na captação de ^{14}C -glicose no músculo sóleo

Com o objetivo de investigar se os efeitos do FTEBS na captação de glicose envolvem o receptor de insulina presente na membrana das células musculares foi utilizado o HNMPA-(AM)₃ (100µM), um inibidor da atividade tirosina cinase do receptor de insulina. A Figura 15 ilustra que na presença de HNMPA-AM o efeito estimulatório do FTEBS na captação de glicose não foi significativamente inibido quando comparada ao grupo tratado (FTEBS), indicando que o mecanismo de ação do composto não parece estar envolvendo diretamente a atividade de tirosina cinase do receptor de insulina na membrana.

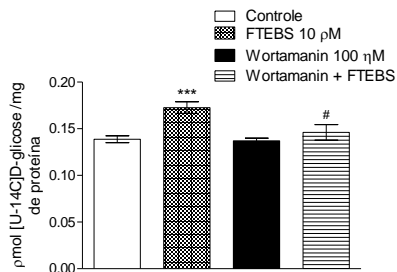
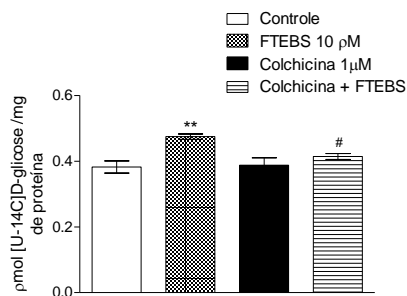
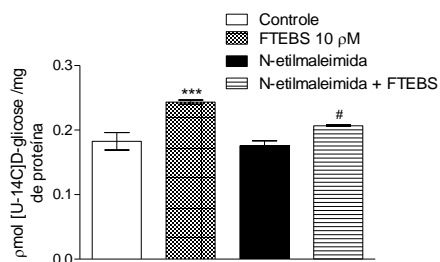
Figura 15 - Envolvimento do receptor de insulina na ação estimulatória do FTEBS na captação de glicose no músculo sóleo. Efeito do HNMPA-(AM) na ação estimulatória do FTEBS na captação de [^{14}C]-glicose no músculo sóleo de rato. Grupo controle = sem tratamento. Tempo de pré-incubação = 30 min; tempo de incubação = 60 min. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M.; n = 6 para cada grupo. Significativa para *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle.



5.1.5 Mecanismo do FTEBS na translocação e fusão do GLUT4 na membrana plasmática no músculo sóleo

O objetivo a seguir foi investigar as vias de sinalização intracelular envolvidas no mecanismo estimulatório do FTEBS na captação de glicose no músculo. Primeiramente, foi estudado o efeito do FTEBS na translocação de vesículas contendo GLUT4, bem como, a fusão da vesícula na membrana celular. Na presença de wortmannin (100 nM), um inibidor específico da PI3K; colchicina (1 µM), um agente despolimerizante de microtúbulos e N-etilmaleimida (1 mM), um inibidor do transporte vesicular foi detectado um efeito inibitório do FTEBS na captação de glicose na presença destes agentes indicando a participação de proteínas envolvidas na translocação de vesículas como a PI3K e os filamentos intermediários, além disso, sugerindo o papel do FTEBS na fusão de vesículas na membrana, em seu mecanismo de ação (Fig 16A, 16B e 16C, respectivamente).

Figura 16 - Efeito de inibidores da translocação e da fusão do GLUT4 na membrana plasmática na ação estimulatória do FTEBS na captação de glicose no músculo sóleo. Efeito do wortamanin (A), colchicina (B) e N-etilmaleimida (C) na ação estimulatória de FTEBS na captação de [¹⁴C]-glicose no músculo sóleo de rato. Grupo controle = sem tratamento. Tempo de pré-incubação = 30 min; tempo de incubação = 60 min. Os valores são expressos como a média ± E.P.M. ; n = 6 para cada grupo. Significativo para ***p ≤ 0,001; **p ≤ 0,01 em relação ao grupo controle. Significativa para #p ≤ 0,05 em relação ao grupo FTEBS.

A**B****C**

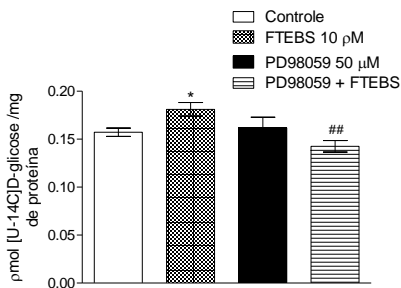
5.1.6 Influência da transcrição gênica e da síntese de proteínas no efeito estimulatório do FTEBS na captação de glicose no músculo sóleo

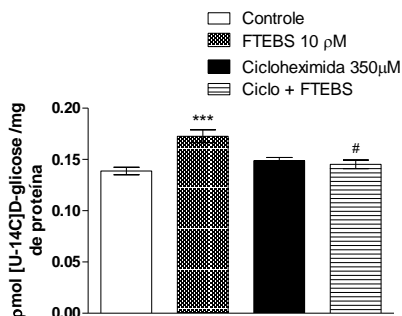
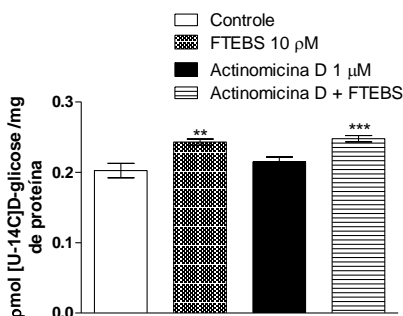
O objetivo dos experimentos a seguir foi estudar a influência da transcrição gênica e/ou síntese de novo de proteínas associada ao efeito estimulatório do FTEBS na captação de glicose no músculo sóleo. Para tanto, foi utilizado

PD98059 (50 μM), um inibidor da MAPK; cicloheximida (350 μM), um inibidor da síntese geral de proteínas e actinomicina D (1 μM), um inibidor de transcrição de DNA. O efeito estimulatório do FTEBS foi inibido após o pré-tratamento com PD98059 e cicloheximida (Figura 17A e 17B). No entanto, não houve diferença na captação de glicose entre o grupo tratado com FTEBS e o grupo FTEBS + actinomicina D. Estes resultados apontam que o mecanismo de ação do FTEBS na captação de glicose é, pelo menos, neste modelo experimental, independente da transcrição gênica, mas dependente da síntese proteica ativa (Figura 17C).

Figura 17 - Relação do efeito de FTEBS na cascata da MAPK e a síntese protéica. Efeito de PD98059 (A), cicloheximida (B) e actinomicina D (C) na ação estimulatória do FTEBS na captação de [^{14}C]-glicose no músculo sóleo de rato. Grupo controle = sem tratamento. Tempo de pré-incubação = 30 min; tempo de incubação = 60 min. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M.; n = 6 para cada grupo. Significativo para *** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle. Significativo para ## $p \leq 0,01$; # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo FTEBS.

A



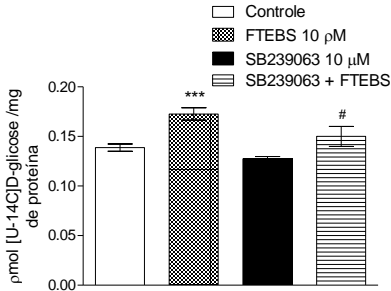
B**C**

5.1.7 Mecanismo de ação do FTEBS na captação de glicose e ativação do GLUT4 no músculo sóleo

A fim de investigar o mecanismo de ação de FTEBS na estimulação da captação de glicose muscular por via independente, mas complementar a via da PI3K, como a via da p38 MAPK foi utilizado SB239063 (10 μM), um inibidor da p38 MAPK. Como observado na figura 18, o efeito estimulatório do FTEBS na captação de glicose foi inibido pelo tratamento na presença de SB239063.

Figura 18 - Envolvimento da p38 MAPK no efeito estimulatório do FTEBS na captação de glicose. Efeito de SB239063 na ação estimuladora de FTEBS na captação de [¹⁴C]-glicose no músculo sóleo de rato. Grupo controle = sem tratamento.

Tempo de pré-incubação = 30 min; tempo de incubação = 60 min. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M.; n = 6 para cada grupo. Significativa para *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle. Significativa para # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo FTEBS.



5.1.8 Efeito do FTEBS na expressão do RNAm e no conteúdo total de GLUT4 no músculo sóleo.

Foi estudado o efeito do FTEBS na expressão do RNAm do GLUT4 no músculo sóleo através de RT-PCR. Observou-se que o tratamento com o composto não interferiu no conteúdo de RNAm do GLUT4 (Figura 19) corroborando com os resultados apresentados na figura 17C (actinomicina D).

Também foi verificado o efeito do FTEBS na síntese de GLUT4 por *Western blot*. A figura 20 mostra um aumento significativo de conteúdo total de GLUT4 na presença de FTEBS cerca de 80% comparado ao efeito da insulina. O tratamento foi bloqueado na presença de cicloheximida, um inibidor da tradução protéica no citosol, apontando o efeito do FTEBS na síntese *de novo* de GLUT4. Como esperado, a insulina estimulou o conteúdo de GLUT4 no músculo sóleo, funcionando como controle positivo do teste. A β -actina foi utilizada em todos os grupos como controle de carga proteica.

Figura 19 - Efeito do FTEBS na síntese de RNAm do GLUT4.

Efeito do FTEBS na síntese de RNAm do GLUT4 no músculo sóleo. Tempo de pré-incubação = 30min; tempo de incubação = 60 min. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M. com n = 10 para cada grupo.

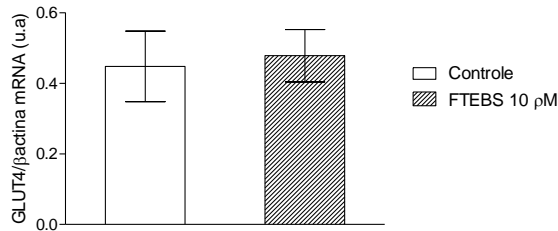
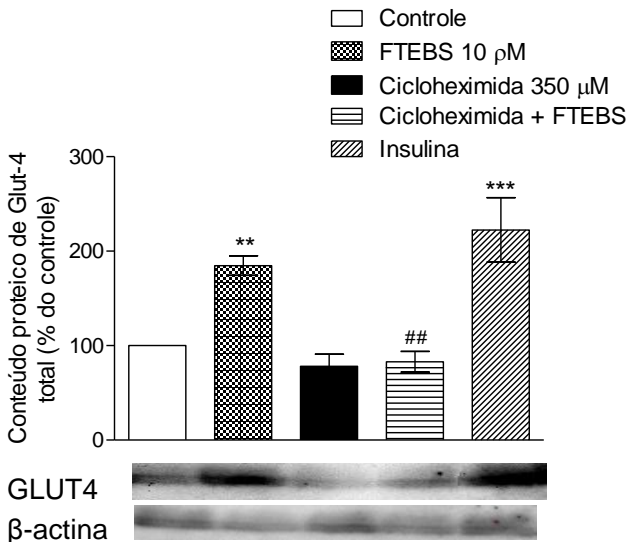


Figura 20 - Efeito do FTEBS no conteúdo protéico total de GLUT4. Efeito do FTEBS no conteúdo de GLUT4 total no músculo sóleo. Cicloheximida 350 mM estava presente durante a incubação, na presença ou ausência de FTEBS 10^{-12} M. β -actina foi utilizado como controle de carga proteica. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M; n = 6. Significativo para $***p \leq 0,001$; $**p \leq 0,01$ comparado com o grupo controle. Significativo para $##p \leq 0,01$ em relação ao grupo FTEBS.



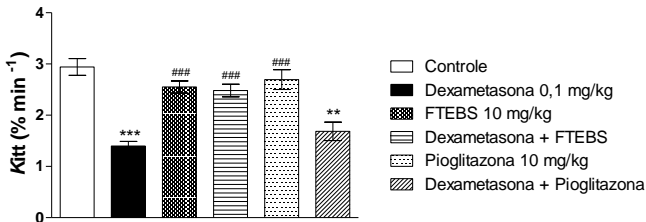
5.1.9 Efeito do FTEBS na resistência periférica à insulina

Foi estudado o efeito do FTEBS na resistência periférica insulínica, uma vez que seu protótipo, pioglitazona, já é

conhecido por seu efeito sobre a melhora na resistência a insulina em órgãos periféricos como tecido muscular. Para tanto, foi estudado o efeito do FTEBS em modelos de ratos induzidos com dexametasona (0,1 mg/kg) por 5 dias. A figura 21 mostra como o grupo tratado com FTEBS + dexametasona aumentou significativamente a sensibilidade à insulina sérica em relação ao grupo resistente.

Foi utilizado também a pioglitazona, conhecida na literatura pelo efeito na melhora da resistência a insulina a longo prazo (HANEFELD et al., 2011; KODAMA et al., 2013). De acordo com a figura 21, durante tratamento subcrônico de 5 dias com dexametasona não é possível observar melhora da resistência periférica com pioglitazona para a mesma dose, demonstrando maior eficiência de FTEBS em relação a pioglitazona.

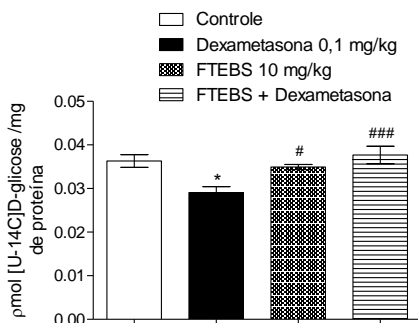
Figura 21 - Efeito de FTEBS na resistência periférica à insulina. Efeito do FTEBS e da pioglitazona no teste de tolerância à insulina em ratos resistentes induzidos por 5 dias de tratamento com dexametasona. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M.; n = 5. Significativo para *** $p \leq 0,001$ comparado com o respectivo grupo controle. Significativo para #### $p \leq 0,001$ em relação ao grupo dexametasona.



Analisou-se também a captação de ¹⁴C-glicose para animais resistentes e tratados com FTEBS. Na figura 22 se pode verificar que o grupo resistente tratado com FTEBS (FTEBS + Dexametasona) aumentou significativamente a captação de glicose quando comparado ao grupo resistente, corroborando com o resultado observado na figura 21.

Figura 22 - Efeito do FTEBS na captação de ¹⁴C-glicose no músculo sóleo. Efeito do FTEBS na captação de [¹⁴C]-glicose no

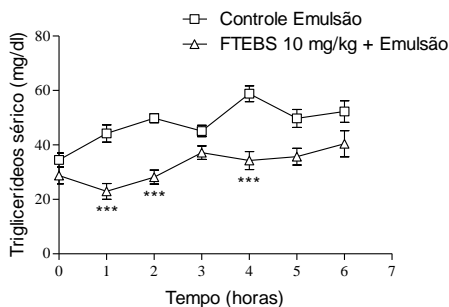
músculo sóleo em ratos resistentes induzidos por dexametasona. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M.; $n = 5$. Significativo para $*p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle. Significativo para $###p \leq 0,01$ comparado ao grupo dexametasona.



5.1.10 Efeito do FTEBS no teste de tolerância à emulsão lipídica

A Figura 23 mostra a significativa redução do triglicerídeo sérico obtida com o tratamento agudo com o FTEBS 10 mg/kg no teste de tolerância à emulsão lipídica nos tempos 1, 2 e 4 h, quando comparado com o controle.

Figura 23 - Efeito do FTEBS no teste de tolerância oral a triglicerídeo. Efeito do FTEBS na curva de tolerância oral a triglicerídeos em ratos normais tratados com emulsão lipídica. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M.; $n = 6$. Significativo para $***p \leq 0.001$ comparado ao grupo controle.

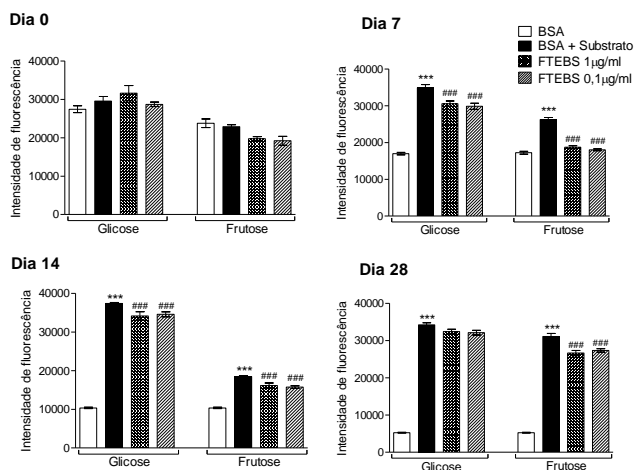


5.1.12 Efeito do FTEBS na formação de AGES

Em vista de analisar a influencia de FTEBS no desenvolvimento de comorbidades da diabetes foi avaliado a glicação de proteínas na presença de glicose ou frutose tratada ou não com FTEBS, em um sistema *in vitro*. No momento antecedente à incubação (dia 0), se observa a fluorescência intrínseca da albumina e do composto FTEBS, sem diferenças estatísticas entre os grupos (Fig. 25).

Como esperado, após 7 dias de incubação da albumina com glicose e frutose, se observou o aumento significativo da formação de AGES, através do aumento da fluorescência (Fig. 25). Os resultados obtidos para o ensaio de glicação apontam que o FTEBS reduziu significativamente a glicação da albumina na presença de glicose nas concentrações de 0,1 e 1 µg/mL após 7 e 14 dias de incubação. Quando incubada com frutose, a dose de 0,1 e 1 µg/mL reduziu significativamente a fluorescência após 7, 14 e 28 dias de incubação e, portanto, a formação de AGES (Fig. 25).

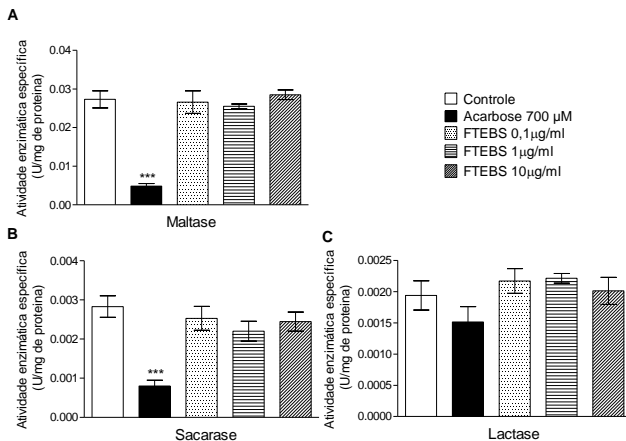
Figura 25 - Efeito do FTEBS na formação de AGes no modelo BSA/glicose, frutose. Efeito do FTEBS na formação de AGes em modelo BSA/glicose ou frutose *in vitro* através da medida de intensidade de fluorescência no dia 0, 7, 14 e 28. Os valores são expressos como a média ± E.P.M.; n= 8. ***p≤ 0,001 comparado ao grupo controle; #p≤ 0,05; ###p≤ 0,001 comparado ao grupo BSA glicada com substratos (glicose ou frutose).



5.1.13 Efeito do FTEBS na atividade de dissacaridasas intestinais

Avaliamos ainda outros possíveis mecanismos envolvidos na atividade anti-hiperglicêmica de FTEBS através de testes da atividade de dissacaridasas intestinais tratados com o composto. Não foi observada nenhuma alteração após incubação *in vitro* com o FTEBS (0,1, 1 e 10 µg/ml) na atividade da maltase, sacarase e lactase quando comparado com o controle (Fig. 26A, B e C respectivamente).

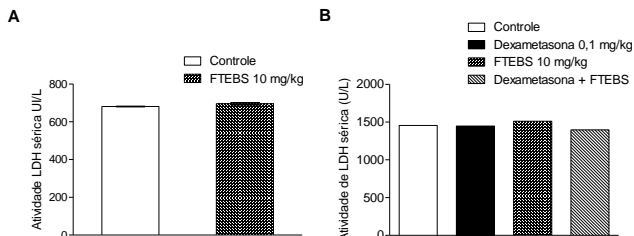
Figura 26 - Efeito do FTEBS na atividade de dissacaridasas intestinais. Efeito do FTEBS na atividade de dissacaridasas intestinais em ratos hiperglicêmicos 180 min após o tratamento por via i.p. Atividades da maltase (A), sacarase (B) e da lactase (C). Os valores foram expressos como a média ± E.P.M.; n = 8 para cada grupo. A acarbose foi utilizada para controle negativo. Significativo para $***p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle.



5.1.14 Toxicidade do FTEBS na atividade de LDH sérica

A medida da LDH sérica foi utilizada como indicador de toxicidade do composto. Como observado na Figura 27, FTEBS não alterou a atividade de LDH após 3 h de tratamento. Após 5 dias de tratamento com dexametasona também não houve diferença entre os grupos comparado ao grupo controle.

Figura 27 - Atividade da lactato desidrogenase na presença ou não de FTEBS em período agudo e após 5 dias de tratamento. Efeito do FTEBS na atividade da lactato desidrogenase no soro em período agudo (180 min) (A) e ratos resistentes à insulina induzidos com dexametasona após 5 dias de tratamento (B). Os valores são expressos como a média \pm E.P.M.; $n = 5$ para cada grupo.



5.2 Capítulo 2 - Estudo do efeito secretagogo do DTEBS em ilhotas pancreáticas

5.2.1 Efeito do DTEBS na curva de tolerância à glicose e na secreção de insulina *in vivo* e *in vitro*

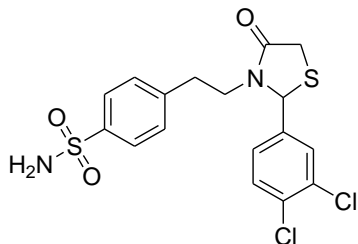
A figura 28A mostra a estrutura química de DTEBS, baseada na porção funcional da estrutura da glibenclamida associada à porção funcional da pioglitazona com radical 3,4-dicloro. A figura 28B mostra a significativa redução na glicemia de 23, 16 e 9 % obtida com o tratamento de 1 mg/kg nos tempos 15, 30 e 60 min respectivamente. Para a dose 10 mg/kg a glicemia reduziu 33, 32 e 30% de DTEBS nos tempos 15, 30 e 60 min respectivamente, quando comparado com o controle. Diante dos resultados, a concentração de 10 mg/kg de DTEBS foi escolhida para estudos subsequentes, por apresentar melhor efeito na redução da glicemia. Ainda na figura 28B se observa o aumento significativo do índice insulinogênico de DTEBS (10 mg/kg) em torno de 70% em relação ao grupo controle.

A figura 29A e 29B apresenta o efeito estimulatório do DTEBS na concentração sérica e estática (em ilhotas pancreáticas) de insulina respectivamente. Como observado, o DTEBS aumentou significativamente a insulina sérica comparado com o grupo controle após 15, 30 e 60 min da sobrecarga de glicose. A partir área sobre a curva da glicose e insulina séricas foi determinado o índice insulinogênico (ASC glicemia/ASC insulinemia x100) de DTEBS (10 mg/kg). Para esta dose DTEBS obteve 1.41 ng/mg de índice insulinogênico, aumentando em torno de 65% em relação ao grupo controle hiperglicêmico (0,63 ng/mg). Também houve aumento significativo da insulina estática em relação ao grupo controle após 10 min de tratamento *in vitro* das ilhotas isoladas. A partir disto foi investigado o possível mecanismo de ação do DTEBS na secreção de insulina, já que DTEBS mostrou um efeito mais sustentado que FTEBS.

Figura 28 - Efeito agudo do DTEBS na curva de tolerância à glicose. Estrutura do DTEBS (A) e curva dose-resposta do composto na glicemia de ratos hiperglicêmicos (receberam sobrecarga de glicose)

tratados com 1 e 10 mg/kg de DTEBS *in vivo* (B). Os valores são expressos como a média \pm E.P.M.; $n = 6$. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle.

A



B

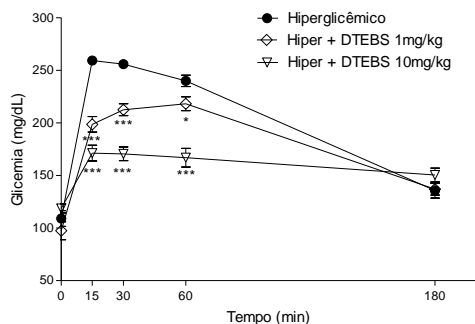
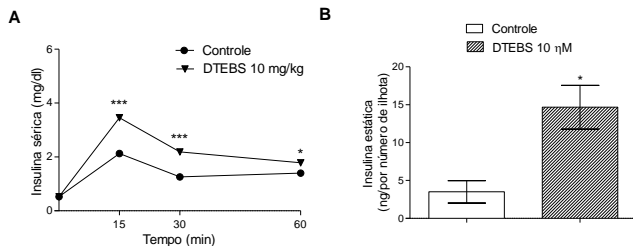


Figura 29 - Efeito de DTEBS na secreção de insulina *in vivo* e *in vitro*. Efeito do DTEBS na secreção de insulina no soro em ratos hiperglicêmicos (A), $n = 3$. Efeito do DTEBS na secreção de insulina estática em ilhotas pancreáticas isoladas (B), $n = 15$. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M. Significativo quando *** $p \leq 0,001$; * $p \leq 0,05$ comparado com o grupo controle.



5.2.2 Efeito do DTEBS no conteúdo de glicogênio hepático e muscular

A fim de investigar os possíveis mecanismos envolvidos na atividade anti-hiperglicêmica deste composto, foi determinado o conteúdo de glicogênio hepático e muscular. Como observado na Fig. 30, houve aumento significativo no conteúdo de glicogênio hepático (em torno de 300%), já o conteúdo de glicogênio muscular não houve alteração do tratamento com DTEBS (10 mg/kg) em relação ao controle. Também foi realizada curva dose-resposta do efeito do DTEBS na captação *in vitro* de ^{14}C -glicose no músculo. Estes resultados ilustrados na Fig. 31 mostram que não houve aumento significativo na captação de glicose muscular. A partir dos resultados obtidos, foram investigadas outras possíveis vias de sinalização que possam estar correlacionadas ao efeito anti-hiperglicêmico.

Figura 30 - Efeito do DTEBS no conteúdo de glicogênio hepático e muscular. Efeito do DTEBS no conteúdo de glicogênio do fígado e músculo sóleo em ratos hiperglicêmicos 180 min após o tratamento por via i.p. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M.; $n = 6$ para cada grupo. Estatisticamente significativo para $**p \leq 0,01$ em comparação com o grupo controle hiperglicêmico.

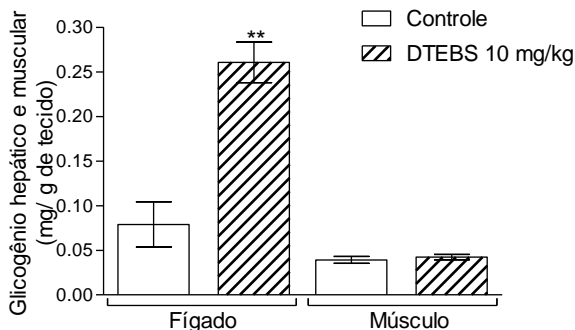
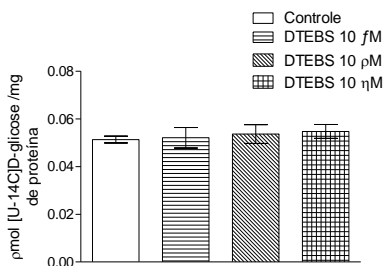


Figura 31 - Efeito do DTEBS na captação de ^{14}C -glicose no músculo sóleo. Curva dose-resposta do efeito do DTEBS na captação $[^{14}\text{C}]$ -glicose no músculo sóleo de ratos. Tempo de pré-incubação = 30 min; tempo de incubação = 60 min. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M.; $n = 6$ para cada grupo.

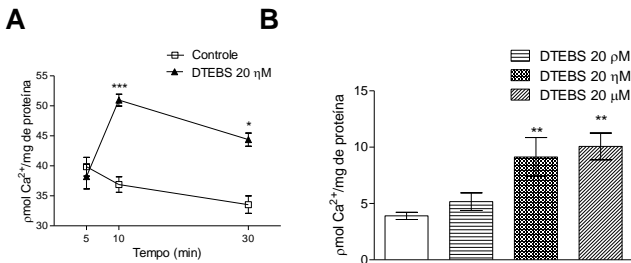


5.2.3 Curva de tempo e de dose-resposta do DTEBS no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas

Buscando investigar o mecanismo de ação do DTEBS na secreção de insulina, o influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas foi avaliado. A Fig. 32A representa o aumento significativo do influxo de cálcio (cerca de 40%) após 10 min de incubação. Esse aumento de influxo de cálcio em 10 min coincide com a primeira fase de secreção de insulina. Portanto, estes resultados indicam que o DTEBS tenha efeito significativo na primeira fase de secreção de insulina (vesículas prontamente liberáveis) e ainda produza efeito prolongado se estendendo ao período de

secreção hormonal que corresponde a segunda fase de liberação de vesículas de insulina (30 min), cerca de 30%. Os estudos seguintes foram conduzidos no tempo de 10 min a fim de avaliar a ação do DTEBS na primeira fase secretória. Foram estudadas as concentrações de 20 μM , 20 ηM e 20 μM do DTEBS no influxo de Ca^{2+} tendo como base a concentração da glibenclamida para o influxo de cálcio, já descrita na literatura (FREDERICO, 2013). Como mostra a Fig. 32B, o DTEBS estimulou o influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas na concentração de 20 ηM em torno de 130%, e na concentração de 20 μM em torno de 150%. Os estudos seguintes com DTEBS foram conduzidos com a menor concentração (20 ηM) que estimulou significativamente o influxo de cálcio.

Figura 32 - Curva de tempo e de dose-resposta do DTEBS no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas. Curva de tempo do DTEBS no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas (A); Curva dose-resposta do DTEBS no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas (B). Incubação= 5, 10 e 30 min (A). Pré-incubação= 60 min; Incubação = 10 min (B). Os valores são expressos como a média \pm E.P.M.; n = 6. Significativo para * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, comparado ao grupo controle.

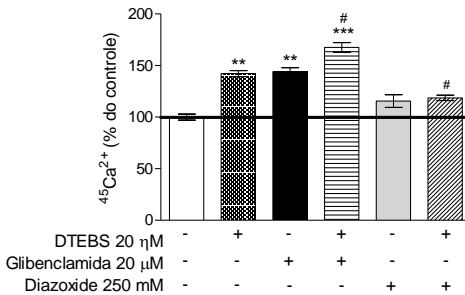


5.2.4 Envolvimento de canais de K^+_{ATP} no efeito estimulatório do DTEBS no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas

Para estudar o envolvimento destes canais na atividade estimulatória do DTEBS, foi utilizado a glibenclamida, que fecha canais de potássio, permitindo a despolarização essencial para a secreção de insulina. Foi utilizado também diazoxide, que impede o fechamento dos canais de potássio, impedindo a

despolarização da membrana. Como pode ser observado na Fig. 33, o DTEBS aumentou o influxo de cálcio quando comparado ao controle. Na presença de glibenclamida, este efeito foi potencializado, demonstrando que o DTEBS pode estar interagindo em sítio diferente da glibenclamida, agindo de forma sinérgica. Na presença de diazoxide se percebe a inibição do efeito do DTEBS no influxo de cálcio.

Figura 33 - Efeito do DTEBS no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em canais de potássio em ilhotas pancreáticas. Glibenclamida (20 μM) e diazoxide (250 μM) presentes durante 15 min na pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação= 60 min; Incubação = 10 min. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M.; n = 6. Significativo para ** $p < 0,01$; *** $p \leq 0,001$; comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$; comparado ao grupo DTEBS.

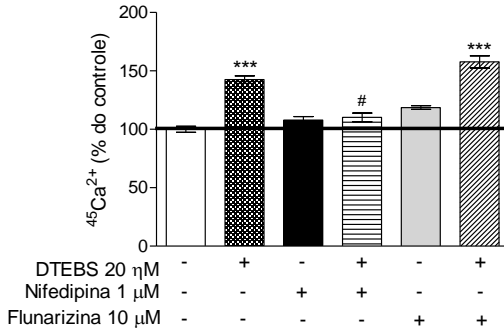


5.2.5 Envolvimento dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem no efeito estimulatório do DTEBS no influxo $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Pode ser observado na Fig. 34 que na presença de nifedipina, um inibidor de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L não alterou o influxo basal de cálcio, porém quando incubado juntamente com DTEBS, o efeito de ambos foi bloqueado, mostrando o envolvimento deste canal no estímulo para o influxo de cálcio. Já na presença de flunarizina, que inibe canais de Ca^{2+} do tipo T este bloqueio não foi observado.

Figura 34 - Influência dos canais de cálcio dependentes da voltagem no efeito estimulatório do DTEBS no influxo de

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas. Nifedipina (1 μM) e flunarizina (10 μM) presentes durante 15 min da pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação= 60 min; Incubação= 10 min. Os valores são expressos em média \pm E.P.M.; n = 6. Significativo para *** $p \leq 0,001$; comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$; comparado ao grupo DTEBS.

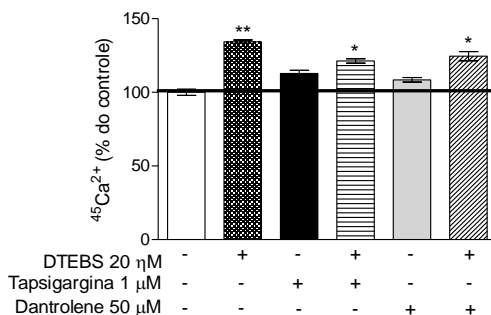


5.2.6 Envolvimento do cálcio dos estoques do RE no efeito estimulatório do DTEBS no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Foi estudado a participação do cálcio dos estoques no efeito estimulatório do DTEBS no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas ilhotas. Para tal, utilizamos bloqueadores de canais de cálcio presentes no retículo, como a tapsigargina, um bloqueador de ATPase dependente de cálcio na membrana do retículo endoplasmático (SERCA). Esta bomba ATPase é responsável pela recaptação de cálcio para dentro do RE, quando a concentração do mesmo está baixa no interior do RE. O bloqueio dessa bomba SERCA conduz à perda de cálcio do RE e aumento de cálcio no citosol da célula, mantendo a captação de cálcio extracelular basal. Outro mecanismo estudado, envolvendo o cálcio do RE, foi através do receptor de rianodina (RyR), esse receptor é ativado por uma pequena elevação da concentração de cálcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), provocando o efeito conhecido como liberação de cálcio induzida por cálcio, que amplifica o sinal de cálcio produzido por outros mecanismos, tal como a abertura de canais de cálcio presentes na membrana plasmática ou através da inibição da bomba SERCA (RANG,2007). Para estudar o RyR, foi utilizado o dantrolene, bloqueador deste receptor. Como observado na Fig.

35, tanto na presença de tapsigargina e de dantrolene, DTEBS manteve o efeito, aumentando o influxo de cálcio em relação ao controle.

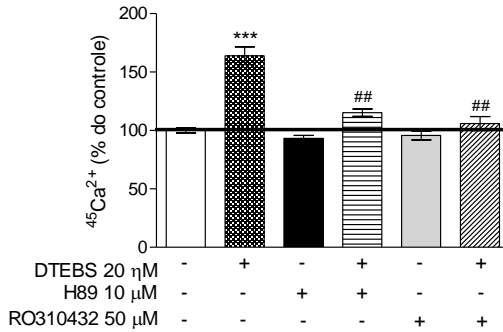
Figura 35 - Influência do cálcio dos estoques no efeito estimulatório do DTEBS no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas. Tapsigargina (1 μM) e Dantrolene (50 μM) presentes durante 15 min da pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação = 60 min; Incubação = 10 min. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M.; n = 6. Significativo para $**p < 0,01$ comparado ao grupo controle.



5.2.7 Envolvimento da PKA e PKC no efeito estimulatório do DTEBS no influxo $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Como pode ser observado na Fig. 36, o efeito do DTEBS foi suprimido na presença do inibidor H89, inibidor da proteína cinase dependente de AMPcíclico (PKA) e RO310432, inibidor da PKC, ativada pelo aumento nas concentrações de cálcio. A presença dos inibidores não alterou a captação basal de cálcio.

Figura 36 - Influência das cinases (PKA e PKC) no efeito estimulatório do DTEBS no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas. H89 (10 μM) e RO310432 (50 μM) presentes durante 15 min da pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação= 60 min; Incubação= 10 min. Os valores são expressos em média \pm E.P.M.; n = 6. Significativo para $***p \leq 0,001$; comparado ao grupo controle. Significativo para $##p < 0,01$; comparado ao grupo DTEBS.

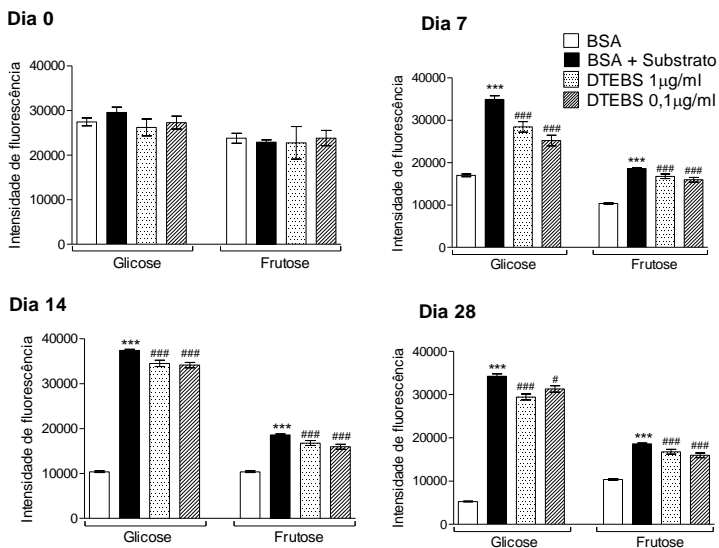


5.2.8 Efeito do DTEBS na formação de AGES

No momento antecedente à incubação (dia 0), se observa a fluorescência intrínseca da albumina e do composto DTEBS, sem diferenças estatísticas entre os grupos. A fluorescência intrínseca de DTEBS foi descontada a partir da leitura sem presença de glicose/frutose.

Como esperado, após 7 dias de incubação da albumina com glicose e frutose, se observou o aumento significativo da formação de AGES, através do aumento da fluorescência (Fig. 37). Os resultados obtidos para o ensaio de glicação apontam que o DTEBS reduziu significativamente a glicação na presença de glicose nas concentrações de 0,1 e 1 μg/mL após 7 e 14 e 28 dias de incubação. Quando incubada com frutose, a dose de 0,1 e 1 μg/mL também reduziu significativamente a fluorescência após 7, 14 e 28 dias de incubação e, portanto, a formação de AGES (Fig. 37).

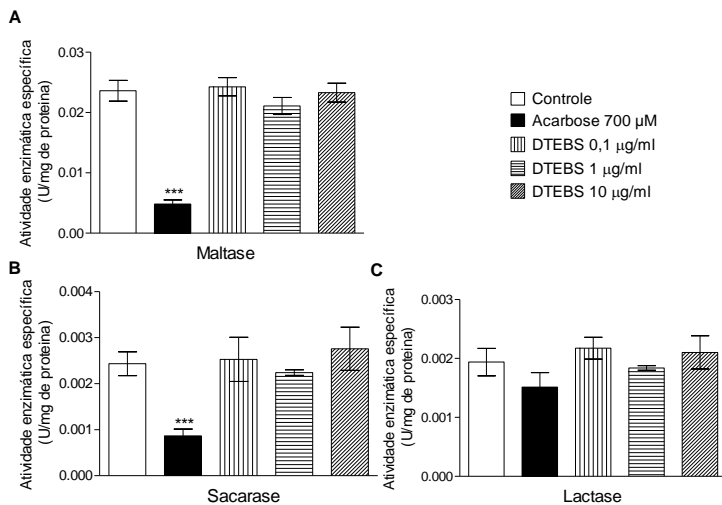
Figura 37 - Efeito do DTEBS na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose. Efeito do DTEBS na formação de AGEs em modelo BSA/glicose ou frutose *in vitro* através da medida de intensidade de fluorescência no dia 0, 7, 14 e 28. Os valores são expressos como a média ± E.P.M.; n = 8. Significativo para ***p ≤ 0,001 comparado ao grupo controle; Significativo para #p ≤ 0,05; ###p ≤ 0,001 comparado ao grupo BSA glicada (com glicose ou frutose).



5.2.9 Efeito do DTEBS na atividade de dissacaridases intestinais

Avaliamos ainda outros os possíveis mecanismos envolvidos na atividade anti-hiperglicêmica de DTEBS através de testes da atividade de dissacaridases intestinais tratados com o composto. Não foi observada nenhuma alteração após incubação *in vitro* na atividade da maltase, sacarase e lactase quando comparado com o controle (Fig. 38 A, B e C respectivamente).

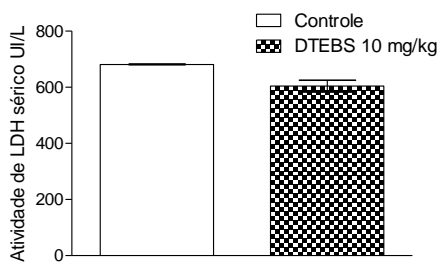
Figura 38 - Efeito de DTEBS na atividade de dissacaridases intestinais. Efeito do DTEBS nas dissacaridases intestinais em ratos normais. Foi avaliado a atividades da maltase (A), sacarase (B) e da lactase (C) *in vitro*. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M.; n = 8 para cada grupo. Significativo para $***p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle.



5.2.10 Toxicidade do DTEBS sobre atividade de LDH sérica

A dosagem da LDH sérica foi utilizada como indicador de citotoxicidade do composto para este modelo experimental agudo (180 min). Como observado na Fig. 39, o DTEBS não alterou a atividade da LDH após 3 h de tratamento.

Figura 39 - Atividade da lactato desidrogenase na presença ou não do DTEBS em período agudo de tratamento. Efeito do DTEBS na atividade da lactato desidrogenase no soro após 180 min em ratos hiperglicêmicos. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M.; n = 5 para cada grupo.



6. DISCUSSÃO

A pesquisa para desenvolvimento de novos fármacos se mostra cada vez mais crescente e se torna necessária para o aperfeiçoamento do tratamento de doenças crônicas como a diabetes, além da necessidade de implementação de tratamentos mais seguros e eficazes.

Ainda que a glibenclamida possua excelente efeito na redução da glicemia e diminua a hemoglobina glicada (HBA1c), possui graves efeitos colaterais, principalmente para o tratamento da diabetes, como o risco de hipoglicemia, o ganho de peso, exaustão e conseqüente perda da função da célula beta pancreática (RABUAZZO et al., 1992; BALL, FLATT e MCCLENAGHAN 2000; BALL et al., 2000).

Por sua vez, a pioglitazona também é utilizada em larga escala por portadores da DM2. É conhecida pelo efeito insulinomimético, diminuindo a resistência a insulina em tecidos periféricos como fígado, músculo e tecido adiposo (HANEFELD et al., 2011; KODAMA et al., 2013; DORKHAN et al., 2006). No entanto é também relatado o aparecimento de efeitos indesejados como edema, ganho de peso, e anemia (TAVARES, et al., 2005; BAILE, et al., 2000; BERRIA, et al., 2005; DORMANDY, et al., 2005).

O presente trabalho apresenta novas moléculas baseadas em modificações moleculares de fármacos já comercializados no mercado (glibenclamida e pioglitazona) acrescidos de diferentes radicais buscando um melhor perfil farmacológico destes análogos.

De acordo com Frederico et al. 2012, o modelo experimental de tolerância a glicose em ratos reproduziu o conhecido efeito hipoglicemiante da glibenclamida corroborado pela indução de secreção de insulina. Além disso, quando foram utilizados análogos sintéticos derivados de fragmentos estruturais de sulfonamidas, naquele mesmo estudo, também foi exibido perfil anti-hiperglicêmico para o mesmo modelo experimental.

Semelhante a seu precursor, glibenclamida, o composto denominado 4-[2-(2-fenil-4-oxo-1,3-tiazolidin-3-il)etil]benzeno-1-sulfonamida (FTEBS) demonstrou potencial efeito anti-

hiperglicêmico (Fig. 11) com índice insulínogênico (1,61 ng/mg) menor que o da glibenclamida (1,98 ng/mg) (FREDERICO, et al., 2013). A exaustão das células beta pancreáticas, ocasionado pela glibenclamida, está relacionada ao elevado índice insulínogênico (ASC glicemia/ASC insulínemia) devido a constante indução de secreção de insulina com o passar do tempo podendo provocar depleção das mesmas (YANG; BERGGREN, 2006). FTEBS se mostra efetivo na estimulação da secreção do hormônio levantando a hipótese de não sobrecarregar de forma exaustiva as células β pancreáticas uma vez que tem um índice insulínogênico menor que a glibenclamida. Ainda, o aumento da secreção de insulina estática vem reforçar a influência do efeito secretagogo de insulina do composto (Fig. 12B).

A pioglitazona também possui efeitos anti-hiperglicêmicos, principalmente por aumentar a sensibilidade periférica à insulina em tecidos insulino-dependentes, porém necessita de doses mais elevadas (de 15 - 45 mg/kg) que FTBES, assim como, períodos prolongados de tratamento (TAN et al., 2004; HERZ et al., 2003; ARONOFF et al., 2000).

Outros possíveis alvos também foram investigados para determinar o mecanismo anti-hiperglicêmico do FTEBS. O conteúdo de glicogênio pode ser considerado como um bom marcador para assegurar a atividade hipoglicemiante de um fármaco, pois este indica que a glicose está sendo captada e estocada no fígado e no músculo na forma de glicogênio, podendo ser através do aumento da glicogênese e aumento na captação de glicose. Considerando o efeito da glibenclamida na síntese de glicogênio no fígado (ABDEL AZIZ, 1996) e no músculo (FREDERICO, 2012), foi investigado o efeito periférico de FTEBS nestes tecidos. Em concordância com nossos resultados com a pioglitazona, a roziglitazona, pertencente à classe das glitazonas, foi estudada por HU et al., 2012, em miócitos musculares onde foi observado aumento significativo de glicogênio na presença de insulina.

FTEBS foi capaz de aumentar o conteúdo de glicogênio muscular e hepático (Fig. 13), indicando também um possível efeito insulinomimético. No entanto este efeito pode ser uma

consequência da secreção de insulina induzida por este composto.

A insulina, uma vez liberada, é responsável por estimular a captação de glicose, estimulando a síntese de glicogênio através da ativação da GS, bem como a glicólise para produção de energia. Para elucidar o efeito insulinomimético, o estudo na captação de glicose no músculo esquelético do análogo sintético se torna um alvo importante. De acordo com os resultados apresentados o FTEBS parece possuir maior potência na captação de glicose em músculo sóleo *in vitro* em relação à glibenclamida (MASCARELLO, 2014), já que necessita de baixas doses (10 nM e 10 µM) para aumentar o influxo de glicose neste tecido (Fig. 14). Estes resultados também condizem com a ação de seu precursor, tiazolidinediona que tem ação direta na indução da sinalização metabólica da insulina em células musculares (VERMA; SINGH; DEY, 2004; HU et al., 2012). Ainda, outras sulfoniluréias também aumentam a captação de glicose em músculo esquelético e adipócitos mediada por insulina (MULLER e WIED, 1993; RODRIGUEZ et al., 2004).

Para entendermos melhor qual o mecanismo de ação de FTEBS no efeito estimulatório sobre a captação de glicose no músculo foram utilizados inibidores de diversas etapas da sinalização insulínica, responsáveis pela entrada de glicose na célula muscular.

Inicialmente foi observado que FTEBS não possui influência no receptor de insulina presente na membrana da célula muscular para que o efeito na captação de glicose seja estimulado (Fig. 15). Por outro lado, FTEBS se mostrou atuante na via metabólica da insulina, através da ativação de vias como PI3K, determinante para translocação de vesículas de GLUT4 estocados para a membrana celular (Fig. 16A). RODRIGUEZ et al. (2004) relataram que as sulfonilureias promovem o transporte de glicose no músculo esquelético através da ativação da PI3K. Ainda, Mascarello et al. (2014) demonstraram ação insulinomimética de sulfonilureias, análogas a glibenclamida através do envolvimento de PI3K promovendo aumento da captação de glicose no músculo esquelético.

A fusão de vesículas contendo GLUT4 com a membrana plasmática se mostra essencial para que ocorra a captação de

glicose para dentro da célula muscular. Este transporte é mediado por microtúbulos e os filamentos de actina, responsáveis principalmente pelo direcionamento do movimento das vesículas da região perinuclear para a membrana em resposta à insulina. (HAJDUCH et al., 2001; KANZAKI, 2006). Os resultados demonstram que FTEBS tem efeito em células musculares através do aumento na translocação e fusão de vesículas GLUT4 na membrana plasmática (Fig. 16B e 16C). Semelhante ao efeito de FTEBS, Mascarello et al. (2014) demonstraram ação insulinomimética de análogos sintéticos de sulfoniutiureias através de ação desencadeada por captação de glicose envolvendo aumento da expressão de GLUT4 na membrana celular em músculo esquelético.

A insulina também estimula via de atividade da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), a ativação desta via regula várias atividades celulares, como expressão gênica, mitose, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose, além de modular fatores de ligação como eEF2K (GONZÁLEZ-TERÁN et al., 2013; RISCO & CUENDA, 2012; ALESSI et al., 1995). FTEBS foi capaz de promover ativação da via das MAPKs, implicando que FTEBS provavelmente regule a expressão de transportadores de glicose GLUT4 no músculo (Fig. 17A). Estes dados apontam pela primeira vez, a atividade de compostos análogos da glibenclamida na ativação da via das MAPKs na captação de glicose muscular em modelo *in vitro*. E ainda vem corroborar com Goetze et al., (2000) que mostrou ação da troglitazona (20 μ M), pertencente à classe das glitazonas, sobre o aumento da atividade de ERK1/2 (da via das MAPKs) estimulada por insulina em células musculares lisas.

Além disso, foi investigado se o FTEBS atua na etapa nuclear de síntese proteica, através do aumento da síntese de RNA (Fig. 19). Com base nos dados aqui mostrados se sugere que FTEBS, provavelmente, não esteja envolvido na transcrição do DNA para sintetizar o GLUT4. Este resultado é corroborado com o qPCR, onde FTEBS não estimulou a síntese de RNAm.

Foi relatado, estudos desenvolvidos com agonistas de PPAR γ que aumentam a expressão de gene GLUT4 em adipócitos (TAKAI; JIN; MIYAZAKI, 2011; HAMMARSTEDT et al., 2004; SANDOUK; REDA; HOFMANN, 1993) e em músculo

esquelético (HOFMANN; LORENZ; COLCA, 1991). Contudo, os resultados apresentados sugerem que a atividade de FTEBS parece estar envolvendo a síntese da proteína GLUT4 (Fig. 17B). Esta análise é reforçada com os resultados do Western blot utilizando anticorpo anti-GLUT4, onde o conteúdo total de GLUT4 é bloqueado na presença de inibidor da síntese proteica (Fig. 20). Com isso, a alteração na estrutura de FTEBS possa ter alterado/melhorado a resposta na regulação da expressão de GLUT4.

Estudos demonstram que a proteína cinase p38 ativada por mitógeno, quando fosforilada, possui a capacidade de ativação do GLUT4 na membrana celular (TREMBLAY et al., 2003). A partir dos resultados com FTEBS se pode também demonstrar atuação sobre a ativação direta do GLUT4 na membrana plasmática da célula muscular por fosforilação de p38-MAPK (Fig. 18). Na literatura, ainda não foi relatada a influência da glibenclamida e da pioglitazona na atuação com p38 em músculo esquelético. No entanto, é importante salientar o papel do envolvimento da p38 MAPK como mecanismo de ação de FTEBS.

Contudo, o mecanismo de ação do FTEBS na estimulação da captação de glicose no músculo parece envolver, além de um efeito na translocação, um aumento da síntese *de novo* de proteína (GLUT4), sem interferir na transcrição de DNA e consequente síntese de RNA, estando envolvida apenas na fase de alongamento da tradução proteica.

Estudos indicam que a resistência à insulina no músculo esquelético de indivíduos com diabetes melito tipo 2, ocorre não só por uma redução da magnitude da ação da insulina, mas também por um retardo no início da ação da insulina para estimular a captação de glicose. O tecido muscular é responsável por cerca de 80% da glicose captada da circulação estimulada pela insulina (ABDUL-GHANI; DEFRONZO, 2010).

A resistência à insulina no músculo esquelético também é relatada em associação com o processo de envelhecimento normal, dislipidemia (aumento de triglicerídeos no plasma/diminuição o HDL-c), e em associação com muitas doenças, assim como pode se desenvolver em doenças agudas graves, ou secundária ao estado inflamatório agudo que

prevalece (VAN CROMPHAUT; VANHOREBEEK; VAN DEN BERGHE, 2008). Além disso, a resistência à insulina no tecido muscular também pode se desenvolver secundariamente a uma terapia farmacológica, por exemplo, glicocorticóides (PAGANO et al, 1983), a terapia anti-HIV (HRUZ, 2008), e beta bloqueadores (JACOB et al, 1996).

A resistência à insulina se refere a uma diminuição na ação da insulina nos tecidos-alvo, responsivos à insulina, tais como o músculo esquelético, adipócitos, e fígado. No que diz respeito ao tecido muscular, a primeira ação da insulina é estimular a captação de glicose e seu metabolismo (LASRAM et al, 2014; ABDUL-GHANI; DEFRONZO, 2010; JOHNSON; OLEFSKY, 2013).

A pioglitazona, assim como a classe das tiazolidinedinas como um todo é conhecida pelo efeito na resistência periférica, através do aumento da transdução de genes que aumentam a sensibilidade a insulina. Este efeito ocorre principalmente devido à ligação e ativação a receptores ativados por proliferadores de peroxissoma do tipo gama (PPAR γ), responsáveis por aumentar a expressão de genes de proteínas do metabolismo de glicídios, lipídeos e na diferenciação celular. Sendo assim, a pioglitazona melhora a ação da insulina no fígado e tecidos periféricos como tecidos muscular e adiposo, aumentando a sensibilidade ao hormônio nestes órgãos (SOCCIO; CHEN; LAZAR, 2014; PHIELIX; SZENDROEDI; RODEN, 2011).

Estudos recentes mostram efeitos extrapancreáticos das sulfoniuréias, através da ativação de receptores nucleares PPAR γ e consequente melhora da sensibilidade à insulina em tecidos periféricos. (LEE et al., 2011; FUKUEN, et al 2005). No entanto, Tan et al., 2004 sugerem que os efeitos da pioglitazona possuem maior duração em comparação à glibenclamida para aumentar a sensibilidade a insulina em pacientes com diabetes tipo 2.

Deste modo, buscamos investigar então se esse aumento na captação de glicose estimulada por FTEBS no músculo sóleo dos ratos, poderia melhorar a sensibilidade à insulina em animais resistentes. Quando realizamos o tratamento dos animais resistentes com FTEBS, o mesmo melhorou a resistência à insulina, induzida por dexametasona em ratos (Fig. 21),

demonstrando um possível efeito *in vivo* do FTEBS neste modelo de resistência à insulina correlacionando com o que já havia sido demonstrado *in vitro*, na captação muscular de glicose neste trabalho (Fig. 22). A pioglitazona foi utilizada na mesma dose para efeitos de comparação da ação do FTEBS ao seu protótipo. A partir dos resultados se concluiu que o FTEBS possui maior eficiência que a pioglitazona em aumentar a sensibilidade da insulina neste modelo experimental.

Além disso, foram isolados os músculos sóleos destes ratos resistentes tratados ou não com FTEBS por 5 dias para análise *in vitro* do efeito na captação de ^{14}C -D-glicose. De acordo com os resultados o FTEBS reverteu à resistência a insulina induzida por dexametasona, corroborando com os resultados até aqui apresentados no efeito insulinomimético no tecido muscular.

Uma variedade de anomalias do metabolismo lipídico é descrita em estados insulinoresistentes, algumas das quais podem ser o resultado da própria resistência à insulina, enquanto que outras podem participar como causa desta resistência. O conceito de lipotoxicidade sustenta que as concentrações circulantes aumentadas de ácidos graxos e/ou acúmulo de lipídios no músculo e no fígado podem levar à resistência à insulina (SAMUEL; SHULMAN, 2012). Desta forma, lipotoxicidade é um fator que contribui para a fisiopatologia dos transtornos metabólicos na obesidade e diabetes melito tipo 2. Em geral, os ácidos graxos circulantes ativam células que interferem na ação da insulina ou ainda o metabolismo da gordura provoca a acumulação de produtos lipídicos intracelulares, que causam resistência à insulina (JOHNSON; OLEFSKY, 2013).

É bem conhecido que portadores da DM2 são mais susceptíveis a dislipidemias do que a população em geral. O perfil lipídico é determinante para o risco cardiovascular para estes pacientes.

Aghamohammadzadeh, et al. (2015) evidencia em seu estudo randomizado com 110 pacientes com idade entre 35-75 anos com DM descontrolada que a administração de pioglitazona (30 mg) durante 3 meses aumentou significativamente o HDL-C e subfrações de LDL aterogênico. Dormandy et al. (2005) demonstrou em um estudo randomizado com 5238 pacientes

com diabetes tipo 2, que tinham evidência de doença macrovascular, que a pioglitazona (15 - 45 mg) diminui a hemoglobina glicada, além de evidenciar diminuição de triglicerídeos e aumento do HDL colesterol, sem efeitos no colesterol total e LDL colesterol. Ainda, Monami et al., (2012) relatou em seu trabalho que a pioglitazona parece ter um efeito mais favorável na melhora do perfil lipídico do que as sulfonilureias.

Sendo assim, avaliamos também o perfil lipídico dos ratos resistentes tratados ou não com FTEBS. Este composto foi capaz de melhorar significativamente o perfil lipídico já com efeito per se (controle negativo), diminuindo as concentrações séricas de triglicerídeos totais, VLDL-c e aumentando a concentração sérica de HDL-c. Para os animais resistentes induzidos por dexametasona, o FTEBS foi capaz de aumentar significativamente a concentração sérica de HDL-c (Fig. 24). Pioglitazona foi administrada para este modelo na mesma dose que FTEBS e mostrou não alterar nenhum parâmetro do perfil lipídico. Este resultado evidencia que o FTEBS possa ser mais eficiente que a pioglitazona, pois demonstra efeito em menores doses *in vivo*.

A hiperglicemia persistente é o principal fator associado ao surgimento das complicações, principalmente devido a esta condição favorecer a glicação de proteínas e lipídios entre outros fatores, um processo bioquímico que resulta na formação dos produtos finais de glicação avançada, também chamados AGEs. Os AGEs são formados em situações de hiperglicemia prolongada e a glicação de proteínas altera a função celular e causa alterações em vários tecidos. Adicionalmente, a ligação dos AGEs com receptores específicos (RAGEs) pode levar a modificação na sinalização celular e aumentar a produção de radicais livres. Sendo assim, o acúmulo de AGEs e o aumento do estresse oxidativo contribuem com a patogênese das complicações decorrentes da diabetes (GOH; COOPER, 2008).

Outro efeito conhecido das sulfonilureias é o poder em reduzir AGES, que clinicamente está relacionado à redução da HbA1c (LI et al., 2008; LESLIE e COHEN, 2009). Além disso, tiazolidinedionas são relatadas por reduzir a expressão endotelial de receptores de AGEs (MARX et al., 2004a; TAN et al., 2007).

Para tanto, avaliamos o efeito do FTEBS sobre produtos finais de glicação avançada (AGEs). Os resultados mostram um efeito inibitório na formação dos AGEs indicando uma propriedade anti-glicação deste composto (Fig. 25).

As dissacaridasas presentes no epitélio intestinal são conhecidas pela quebra de ligações dos dissacáridos em monossacáridos constituintes, favorecendo a absorção de carboidratos como a glicose para a corrente sanguínea. Medicamentos como acarbose, que inibe a ação destas enzimas (α -glicosidasas), se mostra efetivo como uma das terapias para portadores da diabetes (GOMIS, 2008). Visto que a diminuição dos níveis de insulina induz um aumento anormal da atividade e expressão das dissacaridasas intestinais detectados em indivíduos diabéticos (DYER et al., 2002; LIU et al., 2011). Foi estudado também, se FTEBS teria ação em enzimas digestivas (dissacaridasas). Tandon, Srivastava e Pandey (1975), relataram efeito inibitório do tratamento com glibenclamida nas dissacaridasas intestinais em biópsias de humanos. No entanto FTEBS não alterou a ação das dissacaridasas intestinais (Fig. 26). Isto vem salientar que FTEBS atua de forma mais seletiva que a glibenclamida.

A LDH (lactato desidrogenase) é uma enzima citoplasmática, portanto aumento na concentração plasmática da mesma pode indicar dano celular. Sendo assim, foi avaliada a atividade de LDH sérica tanto em tratamento agudo com animais em modelo hiperglicêmico quanto em tratamento por 5 dias com animais em modelo resistentes induzidos com dexametasona. Para estes modelos experimentais não foi observado alteração na atividade da enzima LDH durante tratamento com FTEBS (Fig. 27).

Portanto, os resultados aqui apresentados sugerem que o FTEBS desempenha um importante papel na homeostasia glicêmica, através da melhora da sensibilidade à insulina através de estimulação da captação de glicose no músculo por mecanismos que envolvem a translocação e síntese de GLUT4, sem afetar a transcrição de novas proteínas,. Além de que, FTEBS também exibe efeito secretagogo de insulina em ilhotas pancreáticas. Ainda, FTEBS exibe um efeito importante de

proteção contra comorbidades relacionadas á diabetes, por sua ação anti-glicativa.

Outra molécula desenvolvida através da hibridização de porções da glibenclamida e da pioglitazona foi denominada 4-{2-[2-(3,4-diclorofenil)-4-oxo-1,3-tiazolidin-3-il] etil} benzeno-1-sulfonamida (DTEBS), para esta molécula além do protótipo já estabelecido para FTEBS, foi acrescido duas moléculasceptoras de elétrons de cloretos (Cl⁻) nas posições 3 e 4 no anel fenil. Derivados de chalconas sintéticas, com adição de radicais aceptores de elétrons (nitro) já mostraram efeitos anti-hiperglicêmicos em um modelo animal hiperglicêmico (ALBERTON et al., 2008).

Para os estudos conduzidos com DTEBS, foi avaliado primeiramente, o efeito na tolerância à glicose. O DTEBS demonstrou potente redução na glicemia. Este efeito perdurou após 60 min da sobrecarga de glicose, o que demonstra alta capacidade de manter um controle glicêmico, mesmo em tempo agudo (Fig. 28B).

A redução glicêmica na presença do DTEBS primeiramente foi atribuída a um efeito secretagogo de insulina, uma vez que, promoveu um aumento da concentração sérica de insulina após a sobrecarga de glicose mantendo esse aumento significativo também até os 60 min, corroborando a ação do DTEBS vista na redução da glicemia em modelo hiperglicêmico (Fig. 29A). Foi comprovado esse estímulo na secreção da insulina a partir do estudo da medida da insulina estática, onde o DTEBS também aumentou significativamente a insulina liberada (ng) por ilhota pancreática isolada (Fig. 29B). A eficiência do DTEBS para redução da glicemia está de acordo com os dados na glicemia e secreção de insulina da glibenclamida em ratos (SAKAMOTO et al., 2006; LEÓN-REYES, CASTAÑEDAHERNÁNDEZ e ORTIZ, 2009). A dose 10 mg/kg foi escolhida para os experimentos posteriores visto que, tenha tido maior perfil hipoglicemiante. No entanto, DTEBS, assim como FTEBS, obteve índice insulinogênico inferior ao da glibenclamida, o que nos leva a crer que DTEBS possa ter uma influencia menor que a glibenclamida em sobrecarregar as células β pancreáticas na secreção de insulina.

Radical acceptor de elétrons, assim como os cloretos presentes no anel fenil de DTEBS a partir de derivados de chalconas, foi identificado como um sensibilizador de insulina na captação de glicose em adipócitos 3T3-L1 (KAMEI et al., 2003). Contudo, outra via testada para avaliar um possível efeito insulinomimético do DTEBS foi estudar o conteúdo de glicogênio em tecido hepático e muscular (Fig. 30). Os resultados apresentados de DTEBS sugerem que a presença de aceptores de elétrons (Cl^-) na estrutura do DTEBS possa ter diminuído a afinidade desta molécula em alvos no músculo que proporcionam a captação de glicose. Os resultados em músculo sóleo tratados com DTEBS comprovam esta teoria, já que nas mesmas doses de FTEBS não há aumento significativo da captação de glicose (Fig. 31). A glibenclamida de acordo com Frederico et al. (2012) aumenta significativamente o conteúdo de glicogênio no músculo esquelético, mas não no fígado. Este aumento no conteúdo muscular pode estar ocorrendo devido à relevante indução de secreção de insulina da glibenclamida.

O aumento de influxo de cálcio em células β -pancreáticas é um evento primordial para a secreção de insulina (WOLLHEIM & SHARP, 1981; LIZCANO et al., 2002; SALTIEL et al., 2002; RUTTER & HODSON, 2013; GUERRERO-HERNANDEZ & VERKHRATSKY, 2014). Neste contexto, o mecanismo de ação do DTEBS foi estudado na captação do cálcio em ilhotas pancreáticas.

A partir dos resultados de curva de dose e tempo-resposta foram determinados 20 ηM e 10 min de incubação para os experimentos posteriores, na tentativa de atribuir o mecanismo de ação do influxo de cálcio na secreção de insulina de primeira fase em ilhotas pancreáticas, uma vez que DTEBS possui um efeito sustentado sobre a secreção de insulina até 60 min (Fig. 32A e 32B). Sequencialmente, para entender tal mecanismo usado por DTEBS, foram utilizados inibidores de diversas proteínas e canais envolvidos na via de sinalização intracelular da secreção de insulina.

Primeiramente foi investigado o canal de potássio dependente de ATP ($\text{K}^+_{\text{-ATP}}$), através da utilização do precursor de DTEBS, a glibenclamida, já descrita na literatura por seu efeito no bloqueio de canais de $\text{K}^+_{\text{-ATP}}$, causando despolarização

na membrana plasmática da célula beta pancreática e, conseqüente entrada de cálcio, processo primordial para que a secreção de insulina ocorra (RANG, 2007). DTEBS teve o efeito potencializado ao efeito da glibenclamida demonstrando que DTEBS possa interagir em sítio ativo diferente do canal da glibenclamida de forma sinérgica. Ainda, a atuação de DTEBS nos canais de K^+ foi confirmada quando utilizado agonista deste canal (Fig. 33). Isto indica que o canal de K^+_{-ATP} é essencial para a ação do DTEBS na estimulação do influxo de cálcio em ilhotas. Ainda, DTEBS demonstra maior efetividade que a glibenclamida por ter efeitos no influxo de cálcio em doses mais baixas nas mesmas condições metodológicas (FREDERICO et al., 2012; FREDERICO et al., 2013).

Sequencialmente foram estudados os canais de cálcio presentes na membrana plasmática da ilhota pancreática. Os resultados apresentados neste trabalho indicam que os canais de cálcio do tipo L formam parte do mecanismo de ação da captação de cálcio em células beta induzida por DTEBS (Fig. 34). Até o presente resultado o DTEBS exibe mecanismo de ação semelhante à glibenclamida, através do bloqueio de canais K^+_{-ATP} na membrana plasmática da célula beta, causando despolarização, abertura dos VDCCs do tipo-L, levando à captação de $^{45}Ca^{2+}$ e aumento na concentração citoplasmática de $^{45}Ca^{2+}$ estimulando a secreção de insulina (GRIBBLE, TUCKER e ASHCROFT, 1997; GRIBBLE et al., 1998; GRIBBLE e ASHCROFT, 1999; RUSS et al., 1999).

Foi estudado também o papel do cálcio interno, advindo do retículo endoplasmático no influxo de cálcio em ilhotas. Visto que a identificação de vias e compostos químicos que restaurem os níveis de cálcio no RE conduz notável modalidade terapêutica como intervenção farmacológica para a diabetes, prevenindo a morte das células β pancreáticas provocadas por estresse oxidativo (HARA et al., 2014). No entanto a estimulação do cálcio interno do RE não parece ser um dos mecanismo atuantes de DTEBS (Fig. 35). Este resultado reforça a importância da influência do cálcio extracelular no mecanismo de ação do DTEBS nas células β das ilhotas pancreáticas.

Na literatura, não há relatos da influência da glibenclamida e da pioglitazona sobre o cálcio interno em células beta

pancreáticas. No entanto, Hara, T. et al. (2014) mostra em seu estudo que o tratamento com pioglitazona pode impedir o efluxo de cálcio do RE e atenuar a morte celular de células β sob várias condições de estresse. Os resultados de DTEBS mostram que o mecanismo de ação para a secreção de insulina não envolve o cálcio interno do retículo. No entanto, não foi avaliado o papel de DTEBS no cálcio interno em condições de estresse.

Investigou-se ainda o envolvimento de proteínas cinases no aumento do influxo de cálcio resultante do tratamento com DTEBS. A ativação das proteínas cinases como PKA e PKC, esta relacionada com cascatas de transdução de sinais no interior das células beta, podendo levar a um ligeiro aumento no influxo de Ca^{2+} (RORSMAN et al., 2012). O DTEBS induz a estimulação do influxo de cálcio através da fosforilação de proteínas cinases PKA e PKC, aumentando a concentração de cálcio intracelular de ilhotas pancreáticas (Fig. 36). Isto faz relação com estudos onde foi demonstrado que a fosforilação da PKC modula os CCDV do tipo L em células beta, corroborando o envolvimento da PKC na atividade dos CCDV para secreção de insulina (ARKHAMMAR et al., 1994; BENES et al., 1999).

Portanto a partir destes resultados, se pode sugerir que o DTEBS aumente o influxo de cálcio através de uma possível ação nos canais de K^+_{ATP} , canais de cálcio do tipo L dependentes de voltagem e ainda tenha efeito a partir da ativação de proteínas cinases PKA e PKC presentes em ilhotas pancreáticas.

Adicionalmente, foi estudado um provável mecanismo de proteção da DTEBS em pacientes diabéticos quanto às comorbidades do diabetes causados pela hiperglicemia crônica. Para tanto, avaliamos o efeito do composto nos produtos finais de glicação avançada (AGES) *in vitro*.

Sulfonamidas derivadas da glibenclamida também estão associadas à regulação da produção de AGES (FREDERICO, 2014). Além disso, sulfoniuréis estão relacionadas clinicamente à redução da HbA1c (LI et al., 2008; LESLIE e COHEN, 2009). Assim como, tiazolidinedionas são relatadas por reduzir a expressão endotelial de receptores de produtos finais de glicação avançada (MARX et al., 2004a; TAN et al., 2007). Semelhante a seus precursores, DTEBS também reduziu a glicação com glicose e frutose, nas concentrações avaliadas (Fig. 37).

Com o intuito de investigar outros mecanismos em que DTEBS poderia ter sua ação anti-hiperglicêmica, foi avaliado o efeito sobre a atividade das dissacaridases intestinais *in vitro*. Como observado, DTEBS parece não inibir a atividade das dissacaridases intestinais, não tendo atuação efetiva por esta via independente de insulina nas concentrações testadas (Fig. 38). Estes resultados vão de acordo com o efeito da glibenclamida nas dissacaridases intestinais *in vivo*, já que na presença de glibenclamida 10 mg/kg, mesma dose testada para DTEBS, não há diferença significativa (FREDERICO, 2014).

Adicionalmente foi avaliada ainda a atividade de LDH sérica em tratamento agudo com animais em modelo hiperglicêmico, visto que a elevação da LDH pode ser verificada quando há dano tecidual inespecífico. Para este modelo experimental agudo não foi observada alteração na atividade da enzima LDH durante tratamento com DTEBS, quando comparado ao grupo controle (Fig. 39).

Portanto, se pode sugerir com os resultados aqui apresentados que o DTEBS desempenha um importante papel na homeostase glicêmica, através de efeito secretagogo de insulina em ilhotas pancreáticas. O mecanismo de ação do DTEBS parece envolver canais de K^+_{ATP} , canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L e ainda fosforilação de proteínas cinases como PKA e PKC, induzindo aumento do influxo de cálcio no interior das células β , passo limitante para que haja maior quantidade de insulina sendo secretada na circulação. Ainda, o DTEBS demonstra efeito importante para proteção contra co-morbidades relacionadas á diabetes, por sua ação anti-glicativa.

Com base nos resultados deste trabalho se pode analisar inicialmente que a hibridização da glibenclamida e da pioglitazona pode trazer resultados favoráveis no que diz respeito ao perfil farmacológico destes fármacos. Tanto o FTEBS como o DTEBS demonstraram efeitos semelhantes ao de seus protótipos em menor dose, o que pode por sua vez diminuir as chances de efeitos indesejados destes tratamentos em longo prazo.

No entanto, apenas o FTEBS se mostrou como uma molécula de ação dual ou mista, agindo em mecanismo já descrito da glibenclamida (ação secretagoga de insulina) como

também em ações conhecidas da pioglitazona (diminuição da resistência a insulina em tecidos periféricos). Ainda, FTEBS mostra maior efetividade em relação a seus precursores.

Ainda, DTEBS têm efeito secretagogo aliado também a menores doses que a utilizada pela glibenclamida *in vitro*, além de possuir índice insulínogênico abaixo da glibenclamida o que diminuiria as chances de perda da função das células β pancreáticas, um dos principais efeitos adversos da glibenclamida (YANG; BERGGREN, 2006).

Contudo, ainda é necessário mais estudos com estes compostos no sentido de avaliar os possíveis efeitos adversos e caracterizar os efeitos biológicos de maneira a desvendar se estas novas estruturas possam se tornar medicamentos mais atraentes do que a glibenclamida e a pioglitazona, já disponíveis no mercado para tratamento da diabetes.

7. CONCLUSÃO

Diante do que foi exposto neste trabalho podemos concluir que ambos os híbridos, o FTEBS e o DTEBS, possam desempenhar importante papel na homeostasia glicêmica.

O FTEBS exibe efeito insulíno mimético através da estimulação da captação de glicose no músculo através de mecanismo que envolve a translocação e síntese de GLUT4, sem afetar a transcrição de novas proteínas, melhorando a sensibilidade à insulina em animais resistentes (Fig. 40). Além disso, FTEBS exibe ainda efeito secretagogo em ilhotas pancreáticas.

O DTEBS age como secretagogo de insulina em ilhotas pancreáticas. Esta ação envolve canais de K^+_{ATP} , canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L e ainda fosforilação de proteínas cinases como PKA e PKC, culminando na estimulação da secreção de insulina (Fig. 41).

Ainda, tanto o FTEBS como o DTEBS exibem efeito importante na proteção contra as co-morbidades relacionadas à diabetes, por ação anti-glicativa.

Figura 40 - Mecanismo de ação do FTEBS na captação de glicose no músculo esquelético. Mecanismo de ação do FTEBS na captação de glicose no músculo esquelético, segundo os protocolos e doses experimentais testados no presente trabalho.

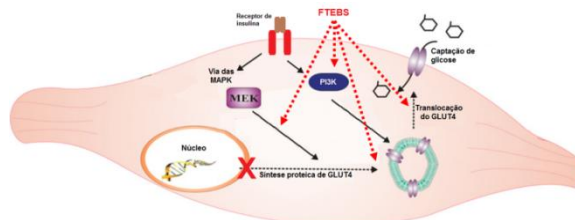
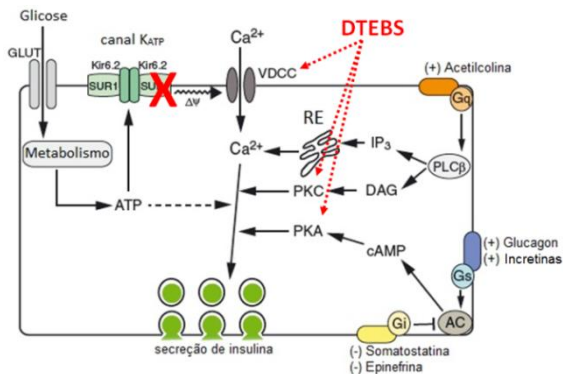


Figura 41 - Mecanismo de ação do DTEBS no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas. Mecanismo de ação do DTEBS no influxo de cálcio, segundo os protocolos e doses experimentais testados no presente trabalho.



8. REFERÊNCIAS

ABDEL AZIZ, A.H. et al. Nadolol-glibenclamide interaction: relevance to carbohydrate metabolism in hyperglycaemic rats. **Pharmacological Research**, v.34 p.11-15, 1996.

ABDELMONEIM, A. S. et al. Variations in tissue selectivity amongst insulin secretagogues: a systematic review. **Diabetes, Obesity And Metabolism**, Canadá, v. 14, n. 2, p.130-138, 3 nov. 2011.

ABDUL-GHANI, M. A. & DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of Insulin Resistance in Skeletal Muscle. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 1-19, 2010.

AGHAMOHAMMADZADEH, N. et al. The effect of pioglitazone on weight, lipid profile and liver enzymes in type 2 diabetic patients. **Therapeutic Advances In Endocrinology And Metabolism**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.56-60, 6 mar. 2015.

AHMADIAN, M. et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. **Nature Medicine**, California, v. 99, n. 5, p.557-566, 7 maio 2013.

ALESSI D. R. et al. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. **J Biol Chem**, v. 270, 27489-27494, 1995.

ALTENHOFEN, D. **Estudo do efeito e do mecanismo de ação de isoflavonas naturais com potencial efeito antidiabético**. 2014. 165 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). **Diabetes Basics**. Data from the 2014 National Diabetes Fact Sheet. Disponível em: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/statistics/> Acesso em: 30.08.2015.

ANDREWS, R. C.; WALKER, B. R. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. **Clin. Science**, v.96, p.513-523, 1999.

ARAÚJO, J. R.; MARTEL, F. Regulação da Absorção Intestinal de Glicose: Uma Breve Revisão. **Arq Med**, v. 23, p. 35-43, 2009.

ARONOFF, S. et al. Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: a 6-month randomized placebo-controlled dose-response study. **Diabetes Care**, New Jersey, v. 23, n. 11, p.1605-1611, 1 nov. 2000.

ASHCROFT, F.M.; RORSMAN, P. Electrophysiology of the pancreatic β -cell. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v.54 p.87-143, 1989.

AUTHIER, F. et al. Les protéases multifonctionnelles de la famille des insulinasés. **Biochimie Métabolisme Signal**, Paris, v. 13, p.601-606, 1997.

BAILE, C. A.; DELLA-FERA, M. A. Regulation of metabolism and body fat mass by Leptin. **Annual Reviews**, v. 20, p. 105-127, 2000.

BALK-MOLLER, E., HOLST, JENS JUUL, EHRENREICH KUHRE, RUNE. Incretin secretion: direct mechanisms - Metabolism - Diapedia, The Living Textbook of Diabetes, 2014. Disponível em: <http://www.diapedia.org/metabolism/incretin-secretion-directmechanisms>. Acesso em: 10/09/2015.

BALL, A.J. et al. Drug-induced desensitization of insulinotropic actions of sulfonylureas. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.29 p.234-239, 2000.

BALL, A.J.; FLATT, P.R.; MCCLENAGHAN, N.H. Desensitization of sulphonylurea- and nutrient-induced insulin secretion following

prolonged treatment with glibenclamide. **European Journal of Pharmacology**, v.24 p.327-333, 2000.

BARREIRO, E. J. A química medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Revista Virtual de Química**. Rio de Janeiro, v.1, n.1, p.26-34, 2009.

BASTA, G.; SCHMIDT, A.M; DE CATERINA, R . Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. **Cardiovasc Res**, v.63, p. 582- 592, 2004.

BERRIA R, et al. Fluid retention and hemodilution are not associated with reduction in hematocrit and hemoglobin following pioglitazone and rosiglitazone treatment in type 2 diabetes mellitus. **Diabetologia** 2005;48(suppl.1):A17.

BERTRAND, C.; VALET, P.; CASTAN-LAURELL, I. Apelin and energy metabolism. **Front Physiol** v. 6, p. 1-5, 2015.

BOWLING, F. L.; RASHID, S. T.; BOULTON, A. J. M. Preventing and treating foot complications associated with diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol**, Manchester, v. 11, n. 10, p.606-616, 18 ago. 2015.

BRISCOE, V. J; GRIFFITH, M. L; DAVIS, S. N. The role of glimepiride in the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Expert Opinion On Drug Metabolism & Toxicology**, Usa, v. 6, n. 2, p.225-235, fev. 2010.

BROWN, J.D.; PLUTZKY, J. Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets. **Circulation**, 2007, 115, 518-533.

CALCUTT, N. A. et al., Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications- from animal models to clinical trials. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, p. 417-429, 2009.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**. Bahia, v.78, suplemento 1, p.98- 106, 2008.

CARIOU, B; CHARBONNEL, B; STAELS, B. Thiazolidinediones and PPAR γ agonists: time for a reassessment. **Trends In Endocrinology & Metabolism**, France, v. 23, n. 5, p.205-215, maio 2012.

CASTRO, A. J. 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. **Biochim Biophys Acta**, v. 1850, p. 51-61, 2015.

CASTRO, A. J. G. et al. Betulinic acid and 1,25(OH) $_2$ vitamin D3 share intracellular signal transduction in glucose homeostasis in soleus muscle. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 48, p. 18-27, 2014.

CAZAROLLI, L. H. et al. Insulin signaling: a potential signaling pathway for the stimulatory effect of kaempferitrin on glucose uptake in skeletal muscle. **Eur J Pharmacol**, v. 712, p. 1-7, 2013.

CAZAROLLI, L. H. et al. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C- (2"-O-alpha-L-rhamnopyranosyl)-beta-Lfucopyranoside on [14C] glucose uptake. **Chem Biol Interact**, v. 179, p. 407-412, 2009.

CHANG, L.; CHIANG, S.H.; SALTIEL, A.R. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. **Mol Med**, v. 10, p. 65–71, 2004.

DAHLQVIST, A. Assay of intestinal disaccharidases. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 44, p. 169-172, 1984.

DEL P. S.; TIENGO, A. The importance of first-phase insulin secretion: implications for the therapy of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 17, p. 1164-1174, 2001.

DELAUNAY, et al. Pancreatic b-cells are important targets for the diabetogenic effects of glucocorticoids. **J. Clin. Invest.**, v.8, p.2094-2098, 1997.

DESAI, N. C; PANDIT, U. P; DODIYA, A. Thiazolidinedione compounds: a patent review (2010 – present). **Expert Opinion On Therapeutic Patents**, India, v. 25, n. 4, p.479-488, abr. 2015.

DEVLIN, T.M.; MICHELACCI, Y.M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. 7ª Ed. São Paulo: Editora Blücher, 2011.

DIAKOGIANNAKI, E.; GRIBBLE, F. M.; REIMANN, F. Nutrient detection by incretin hormone secreting cells. **Physiol Behav**, v. 106, n. 3, p. 387-93, 2012.

DORKHAN, M. et al. Glycaemic and nonglycaemic effects of pioglitazone in triple oral therapy of patients with type 2 diabetes. **J Intern Med**, Suécia, v. 260, n. 2, p.125-133, ago. 2006.

DORMANDY, J. et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macrovascular Events): a randomised controlled trial. **The Lancet**, London, v. 366, n. 9493, p.1279-1289, out. 2005.

DROZDOWSKI, L.A.; THOMSON, A.B. Intestinal sugar transport. **World J Gastroenterol**, v. 12, p.1657-1670, 2006.

EBOH, C; CHOWDHURY, T. A. Management of diabetic renal disease. **Annals Of Translational Medicine**, London, v. 3, n. 11, p.1-8, jun. 2015.

ESSER, N. et al. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes Research And Clinical Practice**, Belgium, v. 105, n. 2, p.141-150, ago. 2014.

FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES. Disponível em: www.idf.org/diabetesatlas Acesso em: 30/08/2015.

FOWLER, M. J. Diabetes Treatment, Part 2: Oral Agents for Glycemic Management. **Clin Diabetes**, v. 25, p. 107-109, 2007.

FREDERICO, M. et al. Acylhydrazones contribute to serum glucose homeostasis through dual physiological targets. **Currents Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 19, p. 2049-2058, 2012.

FREDERICO, M. J. S. et. al. Antidiabetic effects of sulfonamide derivatives based on structural fragment of sulfonylureas. **Curr Trends Med Chem**, v. 7, 2013.

FREDERICO, M.J.S. **Estudo do efeito e do mecanismo de ação das sulfonamidas e acilhidrazonas sintéticas na homeostasia da glicose**. 2014. 167 f. Tese (Doutorado) - Curso de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

FRUCHART, J.C.; STAELS, B.; DURIEZ, P. The role of fibric acids in atherosclerosis. **Curr. Atheroscler. Rep.**, 2001, 3, 83-92.

FU, Z.; GILBERT, E. R.; LIU, D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. **Curr Diabetes Rev**, v. 9, p. 25-53, 2013.

FUKUEN, S. et al. Sulfonylurea Agents Exhibit Peroxisome Proliferator-activated Receptor Agonistic Activity. **The Journal of biological chemistry**, v.280, p23653-23659, 2005.

FURTADO, L.M.; POON, V.; KLIP, A. GLUT4 activation: thoughts on possible mechanism. **Acta Physiol Scand**, v. 178, p. 287–296, 2003.

GHANI, U. Re-exploring promising α -glucosidase inhibitors for potential development into oral anti-diabetic drugs: Finding needle in the haystack. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, Saudia Arabia, v. 103, p.133-162, out. 2015.

GIANNINI, S.; SERIO, M.; GALLI, A. Pleiotropic effects of thiazolidinediones: taking a look beyond antidiabetic activity. **J. Endocrinol. Invest.**, 27, 982-991, 2004.

GILBERT, R. e; KRUM, H. Heart failure in diabetes: effects of anti-hyperglycaemic drug therapy. **The Lancet**, Toronto, v. 385, n. 9982, p.2107-2117, maio 2015.

GIUGLIANO, D. et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes therapy – focus on alogliptin. **Dovepress**, Italy, v. 7, n. 1, p.989-1001, set. 2013.

GOETZE, S. et al. Troglitazone Inhibits Mitogenic Signaling by Insulin in Vascular Smooth Muscle Cells. **Journal Of Cardiovascular Pharmacology**], v. 35, n. 5, p.749-757, maio 2000.

GOH, S.; COOPER, M. E. The Role of Advanced Glycation End Products in progression and Complications. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, p.1143-1152, 2008.

GOMES, M. B. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009. Disponível em: http://www.proac.uff.br/farmacoclinica/sites/default/files/diretrizes_09_final_0.pdf. Acesso em: 30/08/2015.

GOMIS, R. Inibidores de las disacaridasas. **Endocrinol Nutr**, v. 55, p. 13-16, 2008.

GONZÁLEZ-TERÁN, B. et al. Eukaryotic elongation factor 2 controls TNF- α translation in LPS-induced hepatitis. **J Clin Invest**, v. 123, p. 164- 178, 2013.

GRIBBLE, F.M. et al. Tissue specificity of sulphonylureas: studies on cloned cardiac and beta-cell K⁺ -ATP channels. **Diabetes**, v.47 p.1412-1418, 1998.

GRIBBLE, F.M.; ASHCROFT, F.M. Differential sensitivity of β -cell and extrapancreatic K^+ -ATP channels to gliclazide. **Diabetologia**, v.42 p.845-848, 1999.

GRIBBLE, F.M.; TUCKER, S.J.; ASHCROFT, F.M. The interaction of nucleotides with the tolbutamide block of K^+ -ATP currents: a reinterpretation. **The Journal of Physiology**, v.504 p.35-45, 1997.

GUERRERO-HERNANDEZ, A.; VERKHRATSKY, A. Calcium signalling in diabetes. **Cell Calcium**, v. 56, p. 297-301, 2014.

HAJDUCH, E., LITHERLAND, G.J., HUNDAL, H.S. Protein kinase B (PKB/Akt) – a key regulator of glucose transport? **FEBS Lett**, v. 492, p. 199–203, 2001.

HAMMARSTEDT, A. et al. Improved insulin sensitivity and adipose tissue dysregulation after short-term treatment with pioglitazone in non-diabetic, insulin-resistant subjects. **Diabetologia**, Suiça, v. 48, n. 1, p.96-104, 29 dez. 2004.

HANEFELD, M. et al. Double-blind, randomized, multicentre, and active comparator controlled investigation of the effect of Pioglitazone, Metformin, and the combination of both on cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes receiving stable basal insulin therapy: the PIOCMB study. **Cardiovasc Diabetol**, Alemanha, v. 10, n. 1, p.65-74, 2011.

HENQUIN, J. C. et al. Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion. *Eur J Clin Invest*, v. 33, p. 742-750, 2003.

HENQUIN, J. C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. **Diabetes**, v. 49, p. 1751-1760, 2000.

HERMAN, M. A.; KAHN, B. B. Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. **J Clin Invest**, v.116, p.1767-75, 2006.

HERZ, M. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial of the effects of pioglitazone on glycemic control and dyslipidemia in oral antihyperglycemic medication-naive patients with type 2 diabetes mellitus. **Clinical Therapeutics**, Indianapolis, v. 25, n. 4, p.1074-1095, abr. 2003.

HIRIART, M.; AGUILAR-BRYAN, L. Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 295, p. 1298-1306, 2008.

HIRSHMAN, M.f. et al. Pioglitazone Treatment for 7 Days Failed to Correct the Defect in Glucose Transport and Glucose Transporter Translocation in Obese Zucker Rat (fa/fa) Skeletal Muscle Plasma Membranes. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, Boston, v. 208, n. 2, p.835-845, mar. 1995.

HOFFMAN, N. J.; ELMENDORF, J. S. Signaling, cytoskeletal and membrane mechanisms regulating GLUT4 exocytosis. **Cell**, 22, p. 110-116, 2011.

HOFMANN, C; LORENZ, K; COLCA, J. R.. Glucose Transport Deficiency in Diabetic Animals Is Corrected by Treatment with the Oral Antihyperglycemic Agent Pioglitazone*. **Endocrinology**, Illinois, v. 129, n. 4, p.1915-1925, out. 1991.

HOOGWERF, B.; DANESE R.D. Drug selection and the management of corticosteroidrelated diabetes mellitus. **Rheum. Dis. Clin. North. Am.**, v.25, p.489-505, 1999.

HOU, J.C.; PESSIN, J.E. Ins (endocytosis) and outs (exocytosis) of GLUTs trafficking. **Curr Opin Cell Biol**, v. 19, p. 466-473, 2007.

HRUZ, P. W. HIV protease inhibitors and insulin resistance: lessons from in-vitro, rodent and healthy human volunteer models. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 3, p. 660–665, 2008.

HU, S. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Decouples Fatty Acid Uptake from Lipid Inhibition of Insulin Signaling in Skeletal Muscle. **Molecular Endocrinology**, [s.l.], v. 26, n. 6, p.977-988, jun. 2012.

JACOB, S. et al. Differential effect of chronic treatment with two betablocking agents on insulin sensitivity: the carvedilol-metoprolol study. **J Hypertens**, v. 14, p. 489–494, 1996.

JOHNSON, A. M. F. and OLEFSKY, J. M. The Origins and Drivers of Insulin Resistance. **Cell**, v. 152, p. 673-684, 2013.

JUNG, G. A. et al. Methylation of eukaryotic elongation factor 2 induced by basic fibroblast growth factor via mitogen-activated protein kinase. **Exp Mol Med**, v. 43, p. 550-560, 2011.

KAHN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. **The Journal Of Clinical Investigation**, Usa, v. 106, n. 4, p.473-481, ago. 2000.

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

KANZAKI, M. Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. **Endocrine J**, v. 53, p. 267–293, 2006.

KAPPEL, V. D. et al, The role of calcium in intracellular pathways of rutin in rat pancreatic islets: potential insulin secretagogue effect. **Eur J Pharmacol**, v. 702, p. 264–268, 2013b.

KAPPEL, V. D. et al. Involvement of GLUT-4 in the stimulatory effect of rutin on glucose uptake in rat soleus muscle. **J Pharm Pharmacol**, v. 65, p. 1179–1186, 2013a.

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

KAZMI, I. et al. Antiobesity potential of ursolic acid stearyl glucoside by inhibiting pancreatic lipase. **European Journal Of Pharmacology**, India, v. 709, n. 1-3, p.28-36, jun. 2013.

KELLETT, G. L.; BROT-LAROCHE, E. Apical GLUT2 A Major Pathway of Intestinal Sugar Absorption. **Diabetes**, v. 54, p. 3056-3062, 2005.

KHODABANDELOO, H. et al. Molecular and cellular mechanisms linking inflammation to insulin resistance and beta cell dysfunction. **Translational Research**, Iran, p.1-27, set. 2015.

KIHO, T. et al. Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 68, p. 200-205, 2004.

KLIP, A. The many ways to regulate glucose transporter 4. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 34, p.481-487, 2009.

KODAMA, N. et al. Effects of Pioglitazone on Visceral Fat Metabolic Activity in Impaired Glucose Tolerance or Type 2 Diabetes Mellitus. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Japan, v. 98, n. 11, p.4438-4445, nov. 2013.

KOMATSU, M. et al. Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. **J Diabetes Investig**, v. 4, p. 511-516, 2013.

KOMATSU, M. et al. Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. **Journal Of Diabetes Investigation**, Japão, v. 4, n. 6, p.511-516, 15 maio 2013.

KORACH-ANDRE, M. et al. Relationship between visceral adiposity and intramyocellular lipid content in two rat models of insulin resistance. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.288, p.E106-E116, 2005.

KORYTKOWSKI, M. T. Sulfonylurea Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: Focus on Glimepiride. **Pharmacotherapy**, Pittsburgh, v. 5, n. 24, p.606-620, maio 2004.

KOSKI, R.R. Practical review of oral antihyperglycemic agents for type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Educ**, v. 32, p.869-876, 2006.

KOTA, B; HUANG, T; ROUFOGALIS, B. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacological Research**, Australia, v. 51, n. 2, p.85-94, fev. 2005.

KRASIKOV, V. V.; KARELOV, D. V.; FIRSOV, L. M. alpha-Glucosidases. **Biochem** (Mosc), v. 66, p. 267-281, 2001.

KRISMAN, C. R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. **Anal Biochem**, v. 4, p. 17-23, Jul 1962.

KUMAR, Naresh; DEY, Chinmoy S. Metformin enhances insulin signalling in insulin-dependent and -independent pathways in insulin resistant muscle cells. **British Journal Of Pharmacology**, India, v. 137, n. 3, p.329-336, out. 2002.

LASRAM, M. M. et al. A review on the molecular mechanisms involved in insulin resistance induced by organophosphorus pesticides. **Toxicology**, v. 322, p. 1-13, 2014.

LEE, C.H.; OLSON, P.; EVANS, R.M. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. **Endocrinology**, 144, 2201-2207, 2003.

LEE, K. W. et al. Effects of Sulfonylureas on Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ Activity and on Glucose Uptake by Thiazolidinediones. **Diabetes Metab J**, v. 35, p340-347, 2011.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. 6ª Ed. SP: Sarvier, 2014.

LEÓN-REYES, M.R.; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G.; ORTIZ, M.I. Pharmacokinetic of diclofenac in the presence and absence of glibenclamide in the rat. **Journal of pharmacy e pharmaceutical sciences: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences**, v.12 p.280-287, 2009.

LESLIE, R.D.; COHEN, R.M. Biologic variability in plasma glucose, hemoglobin A1c, and advanced glycation end products associated with diabetes complication. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v3 p.635-643, 2009.

LETO, D.; SALTIEL, A. R. Regulation of glucose transport by insulin traffic control of GLUT4. **Nature Rev Mol Cell Biol**, v. 13, p. 383-396, 2012.

LETURQUE, A.; BROT-LAROCHE, E.; LE GALL, M. Carbohydrate intake. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 108, p. 113-127, 2012.

LETURQUE, A.; BROT-LAROCHE, E.; LE GALL, M. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. **Am J Physiol Endocrinol Metab** v. 296, p. 985-992, 2009.

LI, W. et al. Antiglycation Effect of Gliclazide on In Vitro AGE Formation from Glucose and Methylglyoxal. **Experimental Biology And Medicine**, [s.l.], v. 233, n. 2, p.176-179, 1 fev. 2008.

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Quím. Nova**, vol.30, n.6, pp. 1456-1468, 2007.

LIU, Y. et al. Jinlida reduces insulin resistance and ameliorates liver oxidative stress in high-fat fed rats. **J Ethnopharmacol**, v. 162, p. 244- 252, 2015.

LIZCANO, J. M.; ALESSI, D. R. The insulin-signalling pathway. **Curr Biol**, v. 12, p. 236-238, 2002.

LOCHNER, A.; MOOLMAN, J. A. The many faces of H89: a review. **Cardiovasc Drug Rev**, v. 24, p. 261-74, 2006.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-275, 1951.

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

LUQUET, S. et al. Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes. **Biochim. Biophys. Acta**, 1740, 313-317, 2005.

MALERBA, F.; ORSENIGO, L. Innovation and market structure in the dynamics of the pharmaceutical industry and biotechnology: towards a history friendly model. **DRUID Nelson and Winter Conference**, Aalborg, 12-15 jun. 2001. Disponível em: http://www.druid.dk/conferences/nw/paper1/malerba_orsenigo.pdf
Acesso em: 29 set. 2015.

MARX, N. et al. Thiazolidinediones Reduce Endothelial Expression of Receptors for Advanced Glycation End Products. **Diabetes**, [s.l.], v. 53, n. 10, p.2662-2668, 24 set. 2004a.

MARX, N.; DUEZ, H.; FRUCHART, J.C.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. **Circ. Res.**, 2004b, 94, 1168-1178.

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

MELONI, A. R. et al. Treatment of patients with type 2 diabetes with exenatide once weekly versus oral glucose-lowering medications or insulin glargine: achievement of glycemic and

cardiovascular goals. **Cardiovasc Diabetol**, San Diego, v. 12, n. 1, p.48-62, 2013.

MERCK. The Merck manual professional edition: Diabetes mellitus, 2014. Disponível em: http://www.merckmanuals.com/professional/endocrine_and_metabolic_disorders/diabetes_mellitus_and_disorders_of_carbohydrate_metabolism/diabetes_mellitus_dm.html. Acesso em: 10/08/15.

MONAMI, M. et al. Effects on Lipid Profile of Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitors, Pioglitazone, Acarbose, and Sulfonylureas: Meta-analysis of Placebo-Controlled Trials. **Advances In Therapy**, Italy, v. 29, n. 9, p.736-746, 24 ago. 2012.

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

MULLER, M.; WIED, S. The sulfonylurea drug, glimepiride, stimulates glucose transport, glucose transporter translocation, and dephosphorylation in insulin-resistant rat adipocytes in vitro. **Diabetes**, v.42 p.1852-1867, 1993.

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

MUOIO, D. M.; NEWGARD, C. B. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes. *Nature Rev Mol Cell Biol*, v. 9, p. 193-205, 2008.

OLIVEIRA, S.M.; SILVA, J.B.P. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de hidantoínas. **Quím. Nova.**; v.31, n.3, 614-622, 2008.

PAGANO, G. et al. An in vivo and in vitro study of the mechanism of prednisone-induced insulin resistance in healthy subjects. **J Clin Invest**, v. 72, p. 1814–1820, 1983.

PALMEIRA FILHO, P.L.; PAN, S.S.K. Cadeia farmacêutica no Brasil: avaliação preliminar e perspectivas. **BNDES Setorial**, n.18, p.3-22, 2003.

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

PEREIRA, D. F. et al. Influence of the traditional Brazilian drink Ilex paraguariensis tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**, v. 19, p. 868-877, 2012.

PEREIRA, R. A relação entre Dislipidemia e Diabetes Mellitus tipo 2. **Cadernos Unifoa**, Rio de Janeiro, p.89-94, 2011.

PFEIFER, M.A. et al. Potentiation of insulin secretion to non-glucose stimuli in normal man by tolbutamide. **Diabetes**, v.29 p.335- 340, 1980.

PHIELIX, E; SZENDROEDI, J; RODEN, M. The role of metformin and thiazolidinediones in the regulation of hepatic glucose metabolism and its clinical impact. **Trends In Pharmacological Sciences**, Austria, v. 32, n. 10, p.607-616, out. 2011.

POSTAL, B. G. et al. Mechanism of Action of Nutraceuticals on Intestine to Ameliorate Glucose Homeostasis: Follow-up Studies by an In Situ Approach. **Journal Of Cell Science & Therapy**, Florianópolis, v. 05, n. 03, p.162-171, 2014.

POULSEN, L. L. C.; SIERSBÆK, M; MANDRUP, S. PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, Denmark, v. 23, n. 6, p.631-639, ago. 2012.

PRIETO, D; CONTRERAS, C; SANCHEZ, A. Endothelial Dysfunction, Obesity and Insulin Resistance. **Current Vascular Pharmacology**, Spain, v. 12, n. 3, p.412-426, 31 maio 2014.

RABUAZZO, A.M. et al. Glyburide and tolbutamide induce desensitization of insulin release in rat pancreatic islets by different mechanisms. **Endocrinology**, v.131 p.1815-1820, 1992.

RAFACHO, A. et al. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. **Pancreas**, v.36, p.284–293, 2008.

RANG, H.P. et al. Farmacologia. **Elsevier**, 6ª ed. 2007.

RISCO, A.; CUENDA, A. New Insights into the p38 γ and p38-MAPK Pathways. **J Signal Transduct**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

RIZVI, A. A. et al. Adipokines and Lipoproteins: Modulation by Antihyperglycemic and Hypolipidemic Agents. **Metabolic Syndrome And Related Disorders**, Columbia, v. 12, n. 1, p.1-10, fev. 2014.

RODRIGUEZ, E. et al. Phosphatidylinositol 3-cinase activation is required for sulfonylurea stimulation of glucose transport in rat skeletal muscle. **Endocrinology**, v.145 p.679-685, 2004.

RORSMAN, P.; BRAUN, M.; ZHANG, Q. Regulation of calcium in pancreatic α - and β -cells in health and disease. **Cell Calcium**, v. 51, p. 300–308, 2012.

RUSS, U. et al. Coexpression with the inward rectifier K⁺ channel Kir6.1 increases the affinity of the vascular sulfonylurea receptor SUR2B for glibenclamide. **Molecular Pharmacology**, v.56 p.955-961, 1999.

RUSSELL, S. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: a review of direct comparisons of efficacy, safety and patient satisfaction. **International Journal Of Clinical Pharmacy**, London, v. 35, n. 2, p.159-172, 22 dez. 2012.

RUSSELL-JONES, D; GOUGH, S. Recent advances in incretin-based therapies. **Clin Endocrinol**, Oxford, v. 77, n. 4, p.489-499, 11 set. 2012.

RUTTER, G. A.; HODSON, D. J. Minireview- intrainlet regulation of insulin secretion in humans. **Mol Endocrinol**, v. 27, p. 1984-1995, 2013.

SAKAMOTO, K. et al. Disappearance of glibenclamide-induced hypoglycemia in Wistar-Kyoto rats. **Biological e pharmaceutical bulletin**, v.29 p.574-576, 2006.

SAKLATVALA, J. Glucocorticoids: do we know how they work? **Arthritis, Res.**, v.4, p.146- 150, 2002.

SALTIEL, A. R.; PESSIN, J. E. Insulin signalling pathways in time and space. **Trends Cell Biol**, v. 12, p. 65-71, 2002.

SAMUEL, V. T. & SHULMAN, G. I. Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. **Cell**, v. 148, p. 852- 871, 2012.

SANDOUK, T; REDA, D; HOFMANN, C. The antidiabetic agent pioglitazone increases expression of glucose transporters in 3T3-F442A cells by increasing messenger ribonucleic acid transcript stability. **Endocrinology**, [s.l.], v. 133, n. 1, p.352-359, jul. 1993.

SANTOS, D.R. III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** ; 77 (S3): 1-48, 2001.

SCHAAN, B. D.A.; HARZHEIM, E.; GUS, I. Perfil de risco cardíaco no diabetes mellitus e na glicemia de jejum alterada. **Revista de Saúde Pública**. v.38, n.4, p. 529-536; 2004.

SCHEEPERS, A.; JOOST, H. G.; SCHURMANN, A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal

and aberrant function. **J Parenter Enteral Nutr**, v. 28, p. 364-371, 2004.

SCHEFFEL, R. S. et al. Prevalência de complicações micro e macrovasculares e de seus fatores de risco em pacientes com Diabetes Melito do Tipo 2 em atendimento ambulatorial. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.50, n.3, p.263-267; 2004.

SHAH, P; MUDALIAR, S. Pioglitazone: side effect and safety profile. **Expert Opin. Drug Saf.**, California, v. 9, n. 2, p.347-354, mar. 2010.

SHIBASAKI, T. et al. Cooperation between cAMP signalling and sulfonylurea in insulin secretion. **Diabetes Obes Metab**, Japan, v. 16, n. 1, 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. **Glucose Uptake: Regulation, Signaling Pathways & Health Implications**. **Nova Science Publishers**, New York, 1, p.1-44, 2013.

SOCCIO, R.; CHEN, E.; LAZAR, M. Thiazolidinediones and the Promise of Insulin Sensitization in Type 2 Diabetes. **Cell Metabolism**, Korea, v. 20, n. 4, p.573-591, out. 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Tratamento e acompanhamento do Diabetes mellitus: Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2013.

SOUZA, L.J. Prevalência de Diabetes Mellitus e Fatores de Risco em Campos dos Goytacazes, RJ. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. v.47 n.1, 2003.

STEINER, D. F.; CHAN, S. J. C.; RUBENSTEIN, A. H. Biosynthesis of Insulin. **Compr Physiol**, v. 21, p. 49-78, 2011.

STOJANOVSKA, L., ROSELLA, G.; PROIETTO, J. Evolution of dexamethasone-induced insulin resistance in rats. **Am. J. Physiol.**, v.258, p.E748-E756, 1990.

SWEENEY, G. et al. High Leptin Levels Acutely Inhibit Insulin-Stimulated Glucose Uptake without Affecting Glucose Transporter 4 Translocation in L6 Rat Skeletal Muscle Cells. **Endocrinology**, Canada, v. 142, n. 11, p.4806-4812, nov. 2001.

TAKAI, S; JIN, D; MIYAZAKI, M. Irbesartan Prevents Metabolic Syndrome in Rats via Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ . **J Pharmacol Sci**, v. 116, n. 3, p.309-315, 2011.

TAN, K. C. B. et al. Thiazolidinedione increases serum soluble receptor for advanced glycation end-products in type 2 diabetes. **Diabetologia**, China, v. 50, n. 9, p.1819-1825, 18 jul. 2007.

TAN, M. et al. Effects of pioglitazone and glimepiride on glycemic control and insulin sensitivity in Mexican patients with type 2 diabetes mellitus: A multicenter, randomized, double-blind, parallel-group trial. **Clinical Therapeutics**, Paris, v. 25, n. 5, p.680-693, maio 2004.

TAN, M.H. et al. Sustained effects of pioglitazone vs. glibenclamide on insulin sensitivity, glycaemic control, and lipid profiles in patients with Type 2 diabetes. **Diabet Med**. v.8, p859-866, 2004.

TANDON, R.K.; SRIVASTAVA, L.M.; PANDEY, S.C. Increased disaccharidase activity in human diabetics. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.6 p.621-625, 1975.

TAVARES V, et al. Association between Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma2 gene and insulin sensitivity in Brazilian patients with type-2 diabetes mellitus. **Diabetes Obes Metab**. v. 7, p.605–11, 2005.

THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st Century. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, p. 141-145, 2010.

TREMBLAY, F.; DUBOIS, M.; MARETTE, A. Regulation of Glut4 Traffic and Function by Insulin and Contraction in Skeletal Muscle. **Front Biosci**, v. 8, p.1072-1084, 2003.

TSIANI, E. et al. Stimulation of glucose uptake and increase of plasma membrane content of glucose transporters in L6 skeletal muscle cells by the sulfonylureas gliclazide and glyburide. **Endocrinology**, v.136 p.2505-2512, 1995.

VAN CROMPHAUT, S. J., VANHOREBEEK, I. and VAN DEN BERGHE, G. Glucose metabolism and insulin resistance in sepsis. **Cur Pharm Des**, v. 14, p. 1887–1899, 2008.

VERMA, N. K; SINGH, J; DEY, C. S. PPAR- γ expression modulates insulin sensitivity in C2C12 skeletal muscle cells. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 143, n. 8, p.1006-1013, dez. 2004.

VIEGAS-JUNIOR, B. C. et al. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, São Paulo, v. 14, n. 17, p.1829-1852, 1 jul. 2007.

VLASSARA, H; STRIKER, G. E. Advanced Glycation Endproducts in Diabetes and Diabetic Complications. **Endocrinology And Metabolism Clinics Of North America**, New York, v. 42, n. 4, p.697-719, dez. 2013.

WAJCHENBERG, B. L. et al. Posicionamento oficial da SBD nº 5. Dislipidemia no paciente diabético: aspectos etiopatogênicos, clínicos e terapêuticos. **Revista Brasileira de Medicina**, suplemento especial 5/2007.

WAN, T. et al. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic retinopathy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, China, v. 74, p.145-147, ago. 2012.

WATSON, R. T.; PESSIN, J. E. GLUT4 translocation- The last 200 nanometers. **Cell Signal**, v. 19, p. 2209–2217, 2007.

WAUSON, E. M.; LORENTE-RODRÍGUEZ, A; COBB, M. H. Minireview: Nutrient Sensing by G Protein-Coupled Receptors. **Molecular Endocrinology**, Texas, v. 27, n. 8, p.1188-1197, ago. 2013.

WEINSTEIN, Steven P. et al. Effects of thiazolidinediones on glucocorticoid-induced insulin resistance and GLUT4 glucose transporter expression in rat skeletal muscle. **Metabolism**, New York, v. 42, n. 10, p.1365-1369, out. 1993.

WILCOX, G. Insulin and Insulin Resistance. **Clin Biochem Rev**, Australia, v. 26, n. 1, p.19-39, maio 2005.

WILKINSON, S. E.; PARKER, P. J.; NIXON, J. S. Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. **Biochem J**, v. 294, p. 335-337, 1993.

WILLIAMS, F; JOHNSON, D; BAUER, E. [12S]-Insulin Metabolism by the Rat Liver In Vivo: Evidence That a Neutral Thiol-Protease Mediates Rapid Intracellular Insulin Degradation. **Metabolism**, Minnessota, v. 39, n. 3, p.231-241, 1990.

WILLSON, T.M., et al. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. **J. Med. Chem.**, 43, 527-550, 2000.

WITZEL, I. et al. Identifying Common Genetic Risk Factors of Diabetic Neuropathies. **Frontiers In Endocrinology**, Japan, v. 6, p.1-18, 28 maio 2015.

WOLLHEIM, C. B.; SHARP, G. W. G. Regulation of Insulin Release by Calcium. **Physiol Rev**, v. 61, p. 914-973, 1981.

XIE, W. et al. Hypolipidemic Mechanisms of Ananas comosus L. Leaves in Mice: Different From Fibrates but Similar to Statins. **J Pharmacol Sci**, China, v.103, n.3, p.267-274, 2007.

YANG, S.N.; BERGGREN, P.O. The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology. **Endocrine Reviews**, v.27 p.621-676, 2006.

ZHAO, Y. et al. GW9508 inhibits insulin secretion by activating ATP-sensitive potassium channels in rat pancreatic-cells. **Journal of Molecular Endocrinology**, Australia, v. 51, n. 1, p.69-77, 29 abr. 2013.