

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

EFEITOS METABÓLICOS *IN VIVO* DE
DERIVADOS BENZILIDENO-
TIAZOLIDINADIONAS

Tiago Gomes Araújo

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima

Recife, 2009

EFEITOS METABÓLICOS *IN VIVO* DE DERIVADOS BENZILIDENO- TIAZOLIDINADIONAS

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima

Recife, 2009

Araújo, Tiago Gomes

Efeitos metabólicos *in vivo* de derivados Benzilideno-Tiazolidinadionas/ Tiago Gomes Araújo. – Recife: O Autor, 2009.

50 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.CCB. Ciências Biológicas, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Tiazolidinadionas 2. Benzilideno-Tiazolidinadionas 3. dieta 4. hiperlipidemia 5. resistência insulínica. I Título.

615.012

CDU (2.ed.)

UFPE

615

CDD (22.ed.)

CCB – 2009- 028

TIAGO GOMES ARAÚJO

“Efeitos metabólicos *in vivo* de novos derivados benzilideno-tiazolidinadionas”

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado por:



Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima - Presidente



Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach B. Coelho – Inaminador interno



Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão – Examinador Interno



Prof. Dr. César Augusto da Silva – Examinador Externo

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre me dar forças nas horas que mais precisei.

Aos meus pais, por sempre me apoiarem e sempre acreditarem em minha capacidade.

A toda minha família, por sempre me incentivarem.

À Calina, meu porto seguro de todas as horas e meu anti-stress, que sempre demonstrou um apoio incondicional e um constante incentivo.

À Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima por ter acreditado no meu potencial e pela brilhante orientação, contribuindo intensamente para minha carreira.

Aos colegas do Laboratório: César, Adenor, Gisele e Dewson sempre amigos e dedicados.

Aos novos pequenos prodígios do nosso laboratório: Janaína, Luciana, Tiago e Caíque sempre no suporte dos trabalhos e dedicados.

Aos Professores do Departamento de Antibióticos: Profa. Dra. Suely Lins Galdino, Profa. Dra. Rosa Helena Veras Mourão (UFPA) e Profa. Dra. Maria do Carmo A. Lima, pela colaboração para realização desse trabalho.

A Ana Catarina, Bruno e Bianka, meus incríveis amigos, que sempre estiveram presentes em todas as etapas do desenvolvimento desse trabalho e que foram sem dúvida extremamente fundamentais pra realização do mesmo.

A todos os técnicos do departamento em que esse trabalho foi realizado, entretanto em especial a duas pessoas fundamentais: Sr. João Virginio e Flávio Castro.

A todos os meus queridos amigos de turma, entre outros. Que sempre estiveram presentes nos meus momentos de escape da “vida responsável”.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), e à Financiadora de Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	10
1.1 Importância do modelo experimental.....	10
1.2 Tiazolidinadionas (TZDs)	12
1.2.1 TZDs: Estrutura Química	12
1.2.2 TZDs – ativadores do receptor nuclear PPAR (<i>peroxisome proliferator-activated receptors</i>) do tipo γ	13
1.2.3 TZDs – Resistência Insulínica, Ácidos Graxos Livres, Modulação do Tecido Adiposo e dos Triglicerídeos	15
1.2.4 TZDs – Adipocitocinas.....	17
1.2.4.1 TNF- α	18
1.2.4.2 Interleucina-6 (IL-6).....	18
1.2.4.3 Adiponectina	19
1.2.4.4 Resistina	20
1.2.5 TZDs – Macrófagos e MCP-1.....	20
1.2.6 TZDs – Aterosclerose	20
1.2.7 TZDs – Doença do Fígado Gorduroso e Hepatotoxicidade.....	22
1.2.8 Ações das TZDs – “Overview”	23
2. Objetivos.....	24
3. Justificativa	25
4. Referências Bibliográficas	26
5. Capítulo I - Metabolic Effect of Novel Benzylidene Thiazolidinediones Derivatives in High-Fat Fed Mice.....	33
6. Conclusões	49
7. Anexos	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prevalência mundial do diabetes e projeção de aumento até 2030	10
Figura 2. Estrutura da Pioglitazona e Rosiglitazona	12
Figura 3. Via de síntese das benzilideno-tiazolidinadionas	13
Figura 4. Receptores nucleares PPARs e seus princípios de ação	14
Figura 5. Insulina: transdução de sinal	15
Figura 6. Resumo das alterações da resistência insulínica no tecido adiposo, e efeitos das TZDs	17
Figura 7. Interação de adiponectina e TNF- α no seu local de produção e suas funções no músculo esquelético	19
Figura 8. Formação da placa aterosclerótica	21
Figura 9. Mecanismo da célula hepática durante a doença do fígado gorduroso, e as conseqüências na resistência insulínica e sobrevivência celular	23
Figura 10. Resumos das ações das tiazolidinadionas sobre o metabolismo	23

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABCA-1** – Transportador Ligado à Adenosina Trifosfato
- ACS** – Acil CoA Sintase
- AGL** – Ácidos Graxos Livres
- AGM** – Ácidos Graxos Monoinsaturados
- AGP** – Ácidos Graxos Poliinsaturados
- AGS** – Ácidos Graxos Saturados
- aP₂** – Adipócito P₂
- DM** – Diabetes Mellitus
- FATP** – Transportador de Ácidos Graxos
- GLUT-4** – Glucose Transporter 4
- GQ2** – 5-(4 - cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona
- GQ5** – 5-(4- metoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona
- GQ6** – 5-(2,4-dimetoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona
- GQ10** – 5-(4- dimetilamino-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)- tiazolidina-2,4-diona
- HDL-c** – Lipoproteína de Alta Densidade
- IL-6** – Interleucina-6
- IRS-1** – Substrato do Receptor de Insulina
- JNK** – Jun N-terminal Quinase
- LDL** – Lipoproteína de Baixa Densidade
- LPL** – Lipase Lipoprotéica
- MCP-1** – Proteína Quimiotática de Monócito-1
- NF-κB** – Fator de Transcrição Nuclear κB
- NO** – Óxido Nítrico
- OLR-1** – Receptor para LDL Oxidada
- PAI-1** – Inibidor do Ativador de Plasminogênio-1
- PI₃k** – Fosfatidilinositol-3-quinase
- PPAR** – Peroxisome Proliferator-activated Receptor
- RXR** – Receptor X retinóico
- TNFα** – Fator de Necrose Tumoral alfa
- TZD** – Tiazolidinadiona

RESUMO

Tiazolidinadionas são agentes sensibilizadores de insulina que atuam ligando-se à PPAR- γ , que levam a alterações na expressão de reguladores chave da homeostase lipídica e resistência à insulina. Neste estudo, foi avaliado o efeito do tratamento com novos derivados de benzilideno tiazolidinadionas (BTZDs): 5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ2), 5-(4-metoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ5), 5-(2,4-dimetoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ6), 5-(4-dimetilamino-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ10) na resistência à insulina associada à hiperinsulinemia, hiperglicemia e hiperlipidemia, em camundongos, induzidas por dieta. Primeiramente, os camundongos foram submetidos a dois regimes dietéticos com dieta padrão ou dieta hiperlipídica, pelo período de 75 dias. Depois, os camundongos foram divididos aleatoriamente em 7 grupos (n=6). O grupo normal (NC), e o grupo controle submetido à dieta hiperlipídica (HFD-C), receberam veículo (carboximetilcelulose) e os outros grupos de camundongos receberam GQ2, GQ5, GQ6, G10 e Rosiglitazona (todos 30 mg/Kg/dia), respectivamente, uma vez por dia, diariamente, por via oral durante 15 dias. Todos os grupos de camundongos, com exceção do NC, foram submetidos à dieta hiperlipídica durante o período de tratamento. Os níveis de peso corporal, triglicerídeos, colesterol total, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), glicose de jejum (FSG) e insulina de jejum (FSI) foram analisados. O índice de resistência à insulina foi calculado usando o *homeostasis model assesment* (HOMA-IR). Nenhum dos tratamentos causou alterações significativas no peso corporal. Os níveis elevados de triglicerídeos, colesterol total, FSG e FSI dos grupos submetidos à dieta hiperlipídica foram reduzidos significativamente ($P<0,01$) pelas BTZDs e pela rosiglitazona em comparação com o grupo HFD-C. GQ5 foi 34% mais potente do que Rosiglitazona em termos de diminuição dos níveis de insulina ($P<0,05$). Os índices HOMA-IR dos grupos tratados com BTZDs e com Rosiglitazona foram significativamente melhores do que aqueles do grupo HFD-C. Além disso, somente GQ2 e GQ5 reduziram os níveis de AST quando comparados ao grupo HFD-C. Este estudo sugere que os derivados BTZDs não somente reduzem a resistência à insulina em camundongos sob dieta hiperlipídica, mas também a hiperinsulinemia, hiperglicemia e hiperlipidemia. Adicionalmente, nenhum deles exerceu algum efeito adverso no fígado ou no peso corporal.

Palavras-chave: Tiazolidinadionas; benzilideno-tiazolidinadionas; dieta; hiperlipidemia

ABSTRACT

Thiazolidinediones are insulin-sensitizing agents that working by binding to PPAR- γ , which leads to alteration in the expression of key regulators of lipid homeostasis, glucoregulatory and insulin resistance gene. In this study, it was evaluated the effect of treatment with novel benzylidene thiazolidinediones (BTZDs) derivatives: 5-(4-chloro-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (GQ2), 5-(4-methoxy-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (GQ5), 5-(2,4-dimethoxy-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (GQ6), 5-(4-dimethylamino-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (GQ10) on insulin resistance associated with hiperinsulinemia, hyperglycemia and hyperlipidemia in high-fat diet induced mice. Firstly, mice were allocated into two dietary regimens either chow diet or high fat diet, for the period of 75 days. After, the mice were randomly divided into 7 groups (n=6). The normal group (NC) and the high-fat diet control group (HFD-C) received vehicle (carboxymethylcellulose) and the other groups of mice were treated with GQ2, GQ5, GQ6, GQ10 and Rosiglitazone (all 30mg/Kg/day), once daily, orally for 15 days. All the groups except the normal group were on high-fat diet throughout the period of treatment. Body weight, serum triglyceride and total cholesterol levels, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), fasting serum glucose levels (FSG) and fasting serum insulin levels (FSI) of all groups were assayed. Insulin resistance index were calculated using homeostasis model assessment (HOMA-IR). None of the treatments caused any significant alteration on body weight. The elevated serum triglyceride, total cholesterol, FSG and FSI levels reduced significantly ($P<0.01$) by BTZDs and rosiglitazone treated groups in comparison with HFD-C group. GQ5 was 34% more potent than rosiglitazone in terms of decrease insulin levels ($P<0.05$). HOMA-IR indices of BTZDs and rosiglitazone treated groups were significantly ($P<0.01$) improved when compared to the HFD-C group. Moreover, only GQ2 and GQ5 were able to reduce the serum AST levels when compared with HFD-C group. This study suggests that these BTZDs derivatives not only reduces insulin resistance in high-fat fed mice, but also corrected associated hiperinsulinemia, hyperglycemia and hyperlipidemia. Additionally, none of them exerted any major adverse effect on the liver or body weight.

Keywords: Thiazolidinediones; benzylidene-thiazolidinediones; diet; hiperlipidemia

1. Introdução

1.1 Importância do modelo experimental

A maioria dos países está se defrontando com aumento de obesidade onde a origem pode ser explicada, pelo menos em parte, por um estilo de vida sedentário e uma anormal ingestão de calorias (HAAG E DIPPENAAR, 2005). Ainda, em países em desenvolvimento, nos quais a urbanização acelera a cada dia é observado um taxa alarmante na redução de atividade física inerente ao nosso moderno estilo de vida e também um grande aumento no consumo de gordura saturada (RAVUSSIN, 2005; CERF, 2007). Portanto, em inúmeros indivíduos o balanço de energia (o balanço entre a caloria ingerida e consumida) mostra-se positivo e a massa corpórea expande-se (SPIEGELMAN E FLIER, 2001). Esse conjunto de fatores tem aumentado o risco de várias doenças, tais como: diabetes tipo 2, hiperlipidemia, doenças cardiovasculares e alguns tipos câncer (KOPELMAN, 2000).

Um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento do diabetes mellitus (DM) é a obesidade, principalmente abdominal, causada na grande maioria pelo consumo excessivo de dietas rico em calorias originadas de gordura saturada e açúcares simples como frutose e sacarose (BRAY, NIELSEN e POPKIN, 2004; CERF, 2007). De acordo com dados obtidos na literatura, pode-se estimar que ainda neste século nosso país tenha aproximadamente 11 milhões de indivíduos com DM. Relatos do Sistema Único de Saúde (DATASUS) mostram que o DM é a quinta indicação de hospitalização e está entre as dez maiores causas de mortalidade no país (DATASUS, 2008).

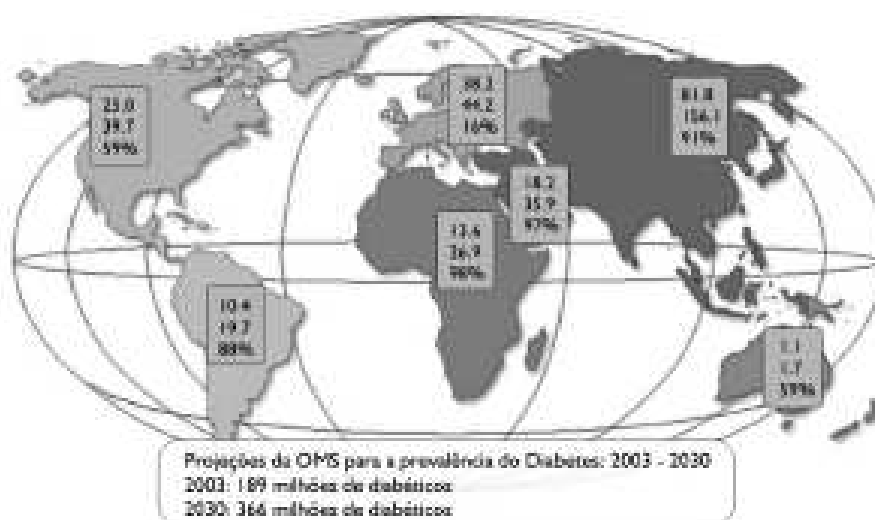


Figura 1. Prevalência mundial do diabetes e projeção de aumento até 2030 (WILD et al., 2004).

A dieta representa um fator ambiental que pode influenciar numa desordem metabólica (SUMIYOSHI, SAKANAKA e KIMURA, 2006). A ingestão de dieta rica em gordura tem demonstrado contribuir para o desenvolvimento de síndromes, tais como: hiperlipidemia, intolerância a glicose, hipertensão e ateroscleroses (MANN, 2002; FRIED E RAO, 2003).

Estudos para determinar os efeitos de gorduras sobre o perfil lipídico do sangue datam de 1950s (CHANG et al., 2004) e mostra que diferentes dietas compostas de gorduras podem modular os níveis do perfil lipídico dependendo da composição de ácidos graxos (NAGESWARI, BANERJEE e MENON, 1999; HU, STAMPFER e MANSON, 1999). Vale destacar as principais classes de ácidos graxos que compõem variadas dietas citadas na literatura, tais como: Ácidos Graxos Saturados (AGS), Ácidos Graxos Poliinsaturados (AGP) e Ácidos Graxos Monoinsaturados (AGM) (WILKES, BONEN, BELL, 1998; CINTRA et al., 2006). Ingestão de gordura na faixa de 40 a 75% do total de kilocalorias na forma de lipídio saturado pode afetar a absorção de colesterol, a síntese de colesterol hepático, a síntese de ácidos biliares, o número e atividade de receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL) (GARG e BLAKE, 1997; ROS, 2000), na aceleração da progressão de lesões glomerulares e tubulares renais (GAMBA et al., 2001). A dieta também é tida como um importante fator no desenvolvimento da hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, da resistência insulínica, da aterosclerose, da doença do fígado gorduroso e esteatose hepática não alcoólica (WILDING, 2006; BEGRICHE et al., 2006; CINTRA et al., 2006; SHARMA e STAELS, 2007).

O desenvolvimento de modelos animais incluindo coelhos, galinhas (GARCÍA-FUENTES et al., 2002) porcos (HILL et al., 2001), roedores (LUSIS, 2000) e primatas não humanos (LIMA et al., 1998) que possam ser estudados em laboratório, sob condições controladas, tem auxiliado na avaliação de eventos de hiperlipidemia. O uso de camundongo em pesquisas tem diversas vantagens sobre outras espécies (KRAUSE e PRINCEN, 1998; DAUGHERTY, 2002). Portanto, o estabelecimento de modelos experimentais é de suma importância para o estudo de patogêneses de complicações, testes de novas prevenções e modalidades de tratamento (RIZVI et al., 2003).

1.2 Tiazolidinadionas (TZDs)

1.2.1 TZDs: Estrutura Química

As tiazolidinadionas, glitazonas, são drogas sensibilizadoras da ação da insulina e representam hoje 21% das prescrições para pacientes com DM tipo 2 nos EUA e 5% na Europa (YKI-JARVINEN, 2005). Apresentam como característica de sua estrutura química, um anel diona, que confere a atividade anti-hiperglicêmica, o restante da molécula difere entre as drogas do grupo e é responsável pela especificidade farmacodinâmica e farmacocinética (FÜRN SINN e WALDHÄUSL, 2002). Inicialmente, várias tiazolidinadionas foram sintetizadas e se observou que elas apresentavam propriedades hipoglicemiantes, constatando que a ciglitazona, quimicamente 5-[4-(1-metilciclohexilmetoxi)-benzil] tiazolidina-2,4-diona, apresentava-se como a mais ativa da série (SOHDA et al., 1982). Em seguida, a mesma equipe de pesquisa constatou que esta substância também exercia efeitos sobre o metabolismo da glicose e de lipídios em vários modelos animais (SOHDA et al., 1982; FUJITA et al., 1983). A ciglitazona suprimia a síndrome diabética tipo 2 (hiperglicemia, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia), acompanhada de diminuição da resistência à insulina. A toxicidade apresentada pela droga, no entanto, inviabilizou seu uso na clínica. Atualmente, os fármacos do grupo disponíveis no mercado são, principalmente, a pioglitazona e a rosiglitazona (Figura 2). Contudo a busca por novos derivados mais eficientes e menos tóxicos tem sido constante.

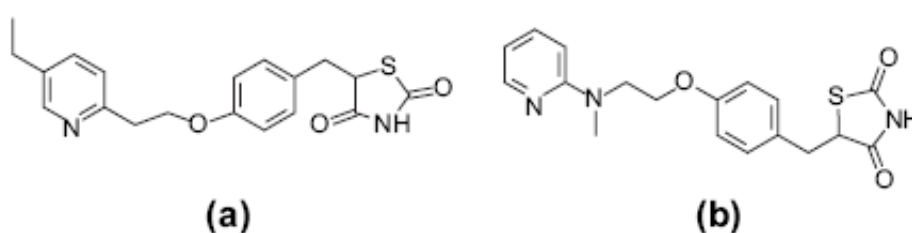


Figura 2. Estrutura da Pioglitazona (a) e Rosiglitazona (b) (Leite et al., 2007).

Através de reações de síntese orgânica, é possível a adição de outros grupamentos químicos ao anel diona. Em trabalho realizado por Mourão et al., (2005) foram sintetizados novos derivados de 5-benzilideno-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona por meio da via de síntese de benzilideno-tiazolidinadionas (Figura 3), sendo estes: 5-(4 - cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ2), 5-(4- metoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona

(GQ5), 5-(2,4-dimetoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ6) e 5-(4-dimetilamino-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ10). Esses compostos em camundongos diabéticos induzidos por aloxana apresentaram potencial hipolipidêmico e hipoglicemiante, contudo, com baixa toxicidade quando tratados por 15 dias.

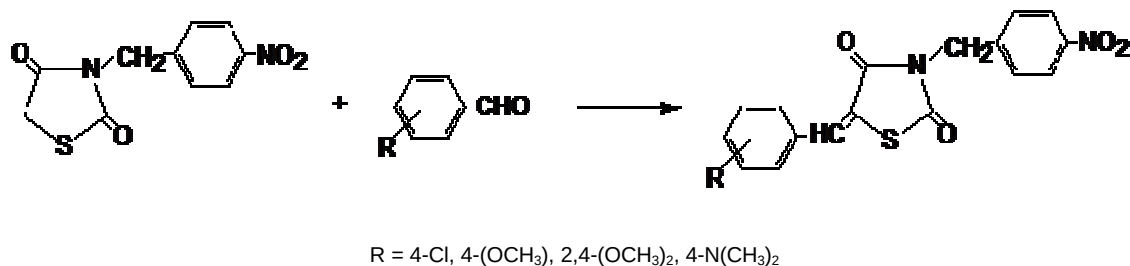


Figura 3. Via de síntese das benzilideno-tiazolidinadionas (Mourão et al., 2005).

Em outro trabalho executado pelo mesmo grupo de pesquisa, derivados de arilideno-tiazolidinadionas apresentaram uma redução nos níveis de glicemia e triglicerídeos de camundongos diabéticos induzidos por aloxana, após 15 dias de tratamento (Leite et al., 2007).

1.2.2 TZDs – ativadores do receptor nuclear PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptors*) do tipo γ

Tem sido demonstrado que as glitazonas têm como mecanismo de ação uma ligação a receptores nucleares PPAR γ (Figura 4), os quais pertencem a uma subfamília de receptores nucleares que regulam a expressão gênica em resposta a uma ligação. PPARs existem como heterodímeros obrigatórios com o receptor X retinóico (RXR) (TONTONNOZ et al., 1994; TONTONNOZ e SPIEGELMAN, 2008) e estão localizadas no núcleo no estado não ligado (BERGER et al., 2000). Após adesão ao ligante, uma mudança conformacional leva à liberação de um co-repressor e à ligação do co-ativador. As propriedades de ligação dos PPARs não são tão limitadas como os de outros receptores nucleares. Depois da adesão de um ligante e da ativação, os heterodímeros são capazes de aumentar ou reprimir qualquer expressão de gene através da ligação ao elemento responsivo à PPAR- γ na região promotora dos genes alvo, principalmente os relacionados ao metabolismo lipídico, glicídico e diferenciação celular (YANG, RACHEZ e FREEDMAN, 2000; YKI-JARVINEN, 2004). Um segundo mecanismo de ação do PPAR γ independeria de ligação direta com regiões responsivas do DNA e

resultaria em repressão à transcrição genética. Este mecanismo de ação estaria associado à atividade antiinflamatória e potencialmente anti-aterogênica do PPAR γ através da repressão do fator de transcrição nuclear kapa B (NF-kb). Este fator é responsável pela transcrição de diferentes citocinas, moléculas de adesão, metaloproteinases e outras proteínas que participam do processo aterosclerótico (ZHANG e YOUNG, 2002). Outro possível mecanismo de ação também independente da ligação do agonista com receptor PPAR γ foi recentemente descrito e estaria relacionado a uma influência na função mitocondrial (FEINSTEIN et al., 2005). Esta ação independente se daria por inibição do complexo 1 mitocondrial, alterando o estado de energia celular.

O receptor PPAR γ é expresso principalmente no tecido adiposo, mas também é expresso pelo fígado, tecido muscular, célula β , endotélio e macrófago (TONTONZOZ e SPIEGELMAN, 2008), e recentemente foi descrito também nas células hematopoiéticas (AKBIYIK et al., 2004). Seu principal ligante endógeno é um derivado da prostaglandina D2 (15 DPGJ2) resultante do metabolismo do ácido araquidônico (WILSON et al., 2000).

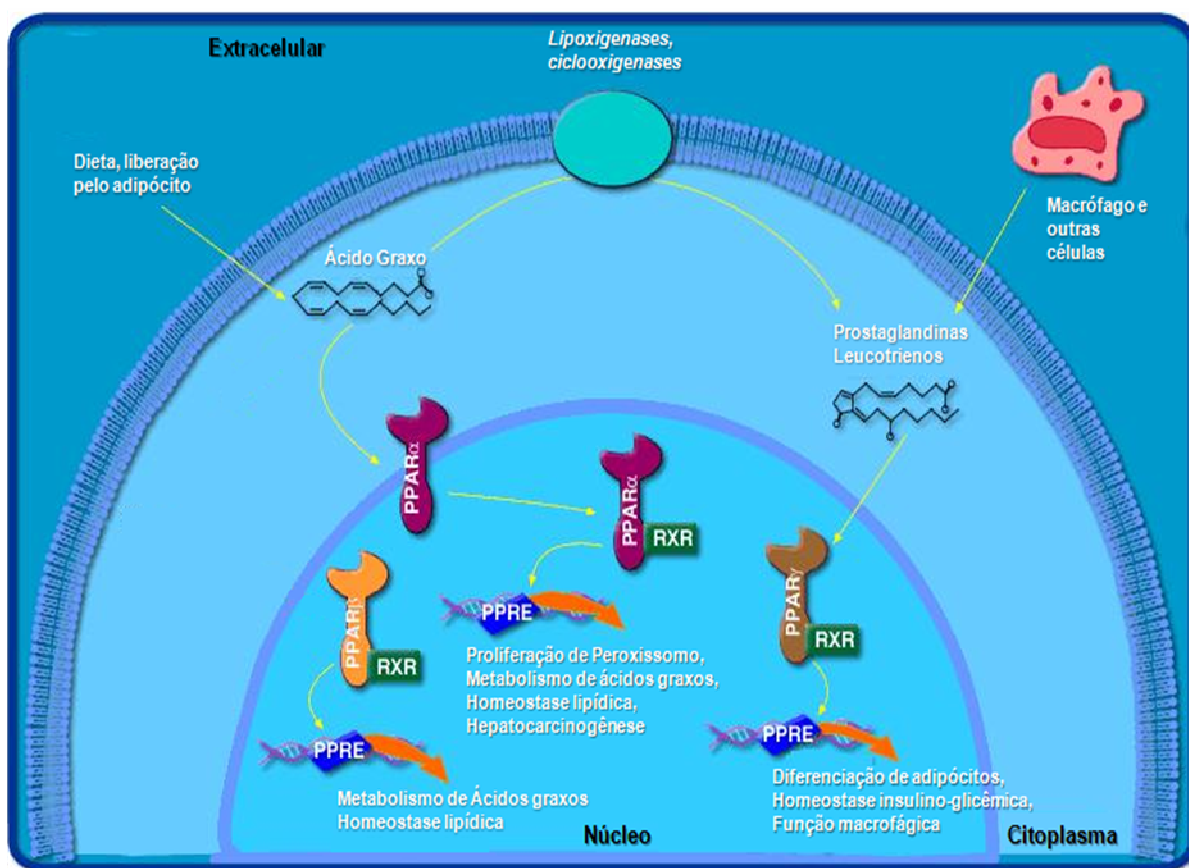


Figura 4. Receptores nucleares PPARs e seus princípios de ação (BIOCARTA, 2008).

1.2.3 TZDs – Resistência Insulínica, Ácidos Graxos Livres, Modulação do Tecido Adiposo e dos Triglicerídeos

Em indivíduos normais é observado, que a ação da insulina inicia-se com a sua ligação a um receptor específico aumentando a atividade da tirosina quinase do receptor, que assim fosforila a si mesmo e a outras proteínas (IRS-1 – substrato do receptor de insulina) em diversos resíduos de tirosina que transmitem adiante o sinal. O IRS-1 pode promover a atividade de uma fosfatidilinositol-3-quinase (PI₃K), isso tem vários efeitos, dentre eles a incorporação de GLUT-4 (i.e. transportador de glicose regulado por insulina) à membrana, reforçando a captação de glicose no músculo e tecido adiposo (Figura 5.) (KOOLMAN e ROHM, 2005; AIRES, 2008). Vários estudos têm documentado redução na sinalização de insulina dos adipócitos após significativo consumo de dieta hiperlipídica, em particular, uma redução acentuada da fosforilação insulino-mediada da tirosina do substrato receptor de insulina-1 (IRS-1). Isto acontece principalmente devido a uma redução da expressão da proteína IRS-1 (RONDINONE et al., 1997). O aumento da atividade serina-quinase, que está associada à redução de fosforilação insulino-estimulada de tirosina, também tem sido observada em adipócitos primários na DM2 (CARLSON et al., 2003). A atividade insulino-mediada de fosfatidilinositol-3-quinase (PI₃K) é reduzida nestes indivíduos conduzindo a uma diminuição da atividade da proteína quinase B (CARVALHO et al., 2000). Além disso, a captação de glicose insulino-mediada *in vitro* é diminuída devido à insuficiência tanto na sinalização de insulina quanto na quantidade de mRNA e expressão protéica de GLUT4 (CARVALHO et al., 2001).

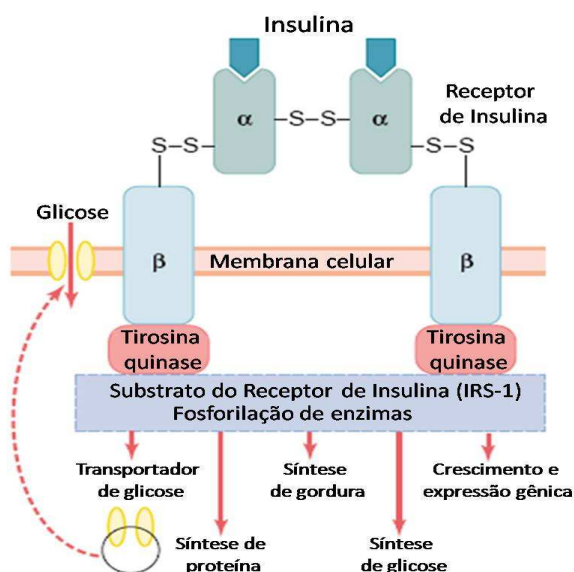


Figura 5. Insulina: transdução de sinal (GUYTON e HALL, 2006).

Além da redução da sinalização de insulina, existem indicações que a diferenciação do adipócito também é prejudicada. Adipócitos de indivíduos insulino-resistentes mostram diminuição da expressão de vários marcadores terminais de diferenciação dos adipócitos, tais como adipócito P2 (aP2) e adiponectina, e aumento do particionamento lipídico com um posterior alargamento das células adiposas existentes (YANG et al., 2004). Além disso, a atividade da lipase lipoprotéica (LPL) é reduzida no tecido adiposo de modelos animais e indivíduos com resistência à insulina associada a DM2, provavelmente devido ao aumento da produção de citocinas decorrente da resistência à insulina (TONTONNOZ e SPIEGELMAN, 2008). A redução global da atividade da LPL possivelmente contribui para a hipertrigliceridemia observada no diabetes. Tem sido reportado também que os genes e proteínas envolvidas no gasto de energia e nas características do fenótipo do tecido adiposo marrom são reduzidos em tecido adiposo de indivíduos insulino-resistentes (YANG, ENERBACK e SMITH, 2003).

TZD é um grupo de agentes usados no tratamento do DM2 que melhoram a sensibilidade insulínica nos tecidos periféricos, sem afetar significativamente a secreção de insulina a partir das células beta (WILDING, 2006). Tratamento de pacientes com TZDs consistentemente baixa glicose de jejum e pós-prandial além dos níveis de ácidos graxos e aumenta a HDL-c. Estas melhorias são geralmente acompanhadas por uma remodelação do tecido adiposo, onde estimulam a diferenciação de adipócitos pequenos, que apresentam como característica maior sensibilidade à insulina e a apoptose dos adipócitos maiores, que são os principais responsáveis pela liberação de ácidos graxos livres, secreção de TNF α e Interleucina 6 (IL-6) (LARSEN, TOUBRO e ASTRUP, 2003; TAN et al., 2004). A diminuição da liberação de ácidos graxos livres (AGL) tem efeitos benéficos na secreção e na sensibilidade à insulina. Tem sido reportado que as glitazonas redirecionam a captação dos AGL para o tecido adiposo por estímulo de proteínas como a aP2, que se ligam aos AGL e FATP/CD36 (i.e. proteína transportadora de ácidos graxos) que transportam AGL e colesterol para o adipócito (TAN et al., 2004), porém, paradoxalmente tem sido observado algum ganho de peso. Também é relatado que outros genes exibem aumento da expressão após a adição do ligante de PPAR γ , incluindo o gene da lipase lipoproteína (LPL) (TONTONNOZ e SPIEGELMAN, 2008), enzima hidrolítica que libera ácidos graxos de quilomícrons e lipoproteínas de densidade muito baixa na circulação, e torna-os disponíveis para absorção pelas células adiposas; e o gene da Acil CoA Sintase

(ACS) (SCHOONJANS et al., 1995), que unidireciona o fluxo de ácidos graxos para dentro das células através de um processo de esterificação.

Várias publicações têm relatado efeitos favoráveis das TZDs sobre a sinalização de insulina e a captação de glicose pelos adipócitos e tecido muscular. Recentemente foi relatado o efeito de glitazonas na expressão de diferentes moléculas de sinalização de insulina no tecido adiposo e muscular de pacientes insulino-resistentes, e observou-se um aumento na expressão do IRS-1 e GLUT-4, bem como uma melhora na fosforilação de tirosina tanto no receptor de insulina quanto no IRS (SHARMA e STAELS, 2007; TONTONNOZ e SPIEGELMAN, 2008).

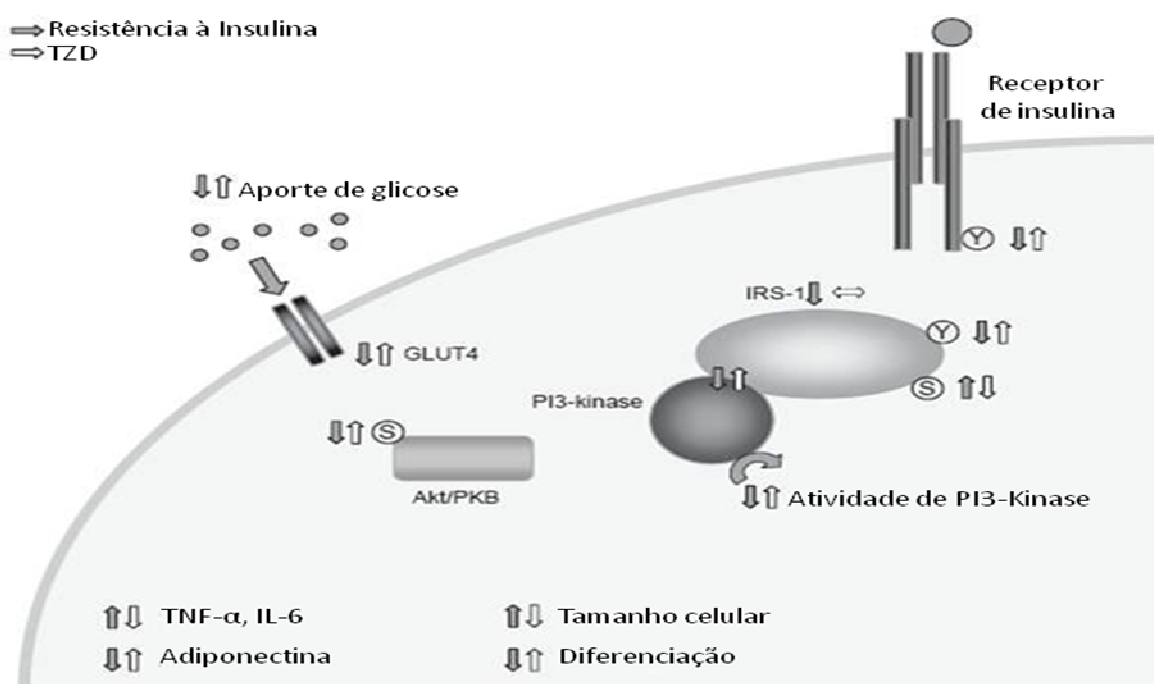


Figura 6. Resumo das alterações da resistência insulínica no tecido adiposo (setas escuras), e efeitos das TZDs (setas claras) (HAMMARSTEDT et al., 2005)

1.2.4 TZDs – Adipocitocinas

Moléculas secretadas a partir do tecido adiposo são vulgarmente designadas por adipocitocinas ou adipocinas e incluem várias citocinas, hormônios e fatores de crescimento. Obesidade freqüentemente muda a secreção de adipocinas devido ao aumento da massa do tecido adiposo. Além de adipocinas, os adipócitos expressam uma variedade de diferentes receptores de hormônios, citocinas e lipoproteínas. Algumas adipocinas estão associadas com a regulação de insulina e de expressão modulada pelos ligantes de PPAR γ , como demonstrado a seguir.

1.2.4.1 TNF- α

Hoje em dia, TNF- α é conhecida como uma proteína multifuncional envolvida na pró-inflamação, apoptose celular, metabolismo de lipídios e na resistência à insulina. Níveis de mRNA e proteína TNF- α mostraram-se altamente induzidos, em tecido adiposo de roedores obesos e diabéticos (HOTAMISLIGIL, SHARGILL e SPIEGELMAN, 1993). A mesma observação foi feita em tecido adiposo humano e concluiu-se que a expressão de mRNA TNF- α foi positivamente correlacionada com a massa de tecido adiposo. Além disso, os níveis de TNF α correlacionaram-se positivamente com a hiperinsulinemia (WELLEN e HOTAMISLIGIL, 2005).

Um dos principais efeitos moleculares da TNF- α é a ativação da NF- κ B, que regula muitos dos genes relacionados com a resistência à insulina (ARKAN et al., 2005). Por exemplo, a alta expressão de TNF- α suprime o fator de transcrição para o gene GLUT4 (ROTTER, NAGAEV e SMITH, 2003). TNF- α também suprime a expressão de PPAR γ (XING et al., 1997). A inibição do gene de TNF- α ou do receptor de TNF conduz a uma melhoria na sensibilidade insulínica em roedores. Além disso, TNF- α ativa a via JNK ((Jun N-terminal quinase) i.e. proteínas quinase ativadas por stresse), mediando um aumento da fosforilação em serina do IRS-1 e, assim, inibindo sua interação com receptores de insulina e reduzindo insulina-estimulada fosforilação em tirosina (LEE et al., 2003).

Estudos dos efeitos de TZD demonstraram supressão da ativação do promotor do TNF- α e, posteriormente, reduzida expressão do mRNA para TNF- α . O efeito inibitório do TNF- α sobre receptores de insulina e sinalização de IRS-1 é atenuado pelo TZDs, ou seja, o sinal de insulina é melhorado. TZDs também evitam a indução dos genes regulados por NF- κ B ativados por TNF- α (RUAN, POWNALL e LODISH, 2003). Ademais, níveis plasmáticos de TNF- α diminuem significativamente nos pacientes obesos tratados com TZDs (WELLEN e HOTAMISLIGIL, 2005).

1.2.4.2 Interleucina-6 (IL-6)

A expressão de IL-6 no tecido adiposo e os níveis séricos de IL-6 foram positivamente correlacionados com obesidade e resistência à insulina (KERN et al., 2001; SHARMA e STAEELS, 2007). A expressão do gene e a secreção protéica

da adiponectina (discutidas abaixo) são reduzidas por IL-6 (SOPASAKIS et al., 2004). A IL-6 semelhante ao TNF- α , suprime a transcrição do gene IRS-1 e GLUT-4, bem como o PPAR γ (ROTTER, NAGAEV e SMITH, 2003). TZDs têm se mostrado capazes de reduzir os efeitos da IL-6, *in vitro* e *in vivo*. Uma diminuição da síntese e secreção de mRNA IL-6 foi encontrada em células tratadas com TZDs (LAGATHU et al., 2003; YKI-JARVINEN, 2004).

1.2.4.3 Adiponectina

A adiponectina é um hormônio de 30-kDa derivado do adipócito que existe como trímeros, hexâmeros e oligômeros com alto peso molecular (MAEDA et al., 2002). A redução dos níveis de adiponectina está fortemente associada com a obesidade e resistência à insulina. O tamanho da célula adiposa é inversamente correlacionado com a expressão gênica (YANG et al., 2004). Pacientes não obesos com baixos níveis de IRS-1 são marcadamente insulino-resistentes, exibindo hiperinsulinemia e redução dos níveis circulantes de adiponectina. Recentemente, verificou-se que PPAR γ é necessário para a transcrição gênica de adiponectina e que TZDs induzem esta transcrição. Tem sido demonstrado que as TZDs aumentam a secreção de adiponectina em linhagens celulares, modelos animais e em seres humanos (TONTONNOZ e SPIEGELMAN, 2008).

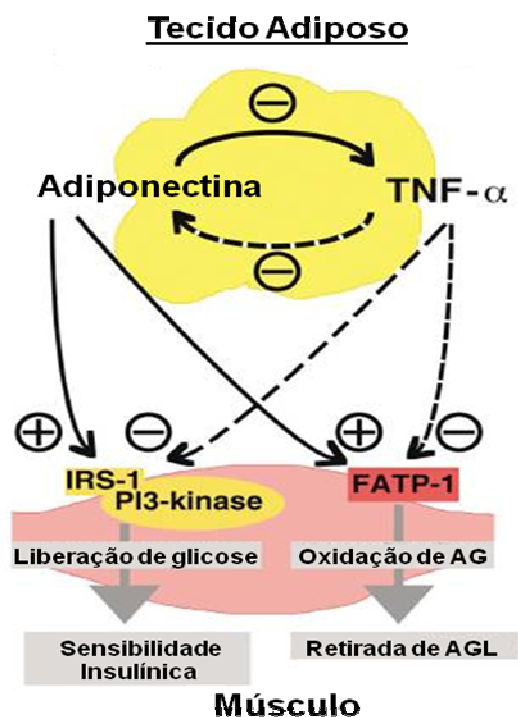


Figura 7. Interação de adiponectina e TNF- α no seu local de produção e suas funções no músculo esquelético (MAEDA et al., 2002).

1.2.4.4 Resistina

Resistina é um polipeptídeo de 12 kDa que foi pela primeira vez caracterizada em 2001. Como o nome indica, resistina foi a primeira proteína descoberta diretamente capaz de prejudicar a ação de insulina e de induzir resistência à insulina. Foi demonstrado que uma dieta rica em gordura bem como a obesidade aumenta a expressão da resistina e que tratamento com TZDs poderiam diminuir a expressão desse gene (WAY et al., 2001). Camundongos geneticamente deficientes em expressão da resistina apresentam níveis de glicose de jejum significativamente mais baixos, devido à redução na produção de glicose hepática (BANERJEE et al., 2004).

1.2.5 TZDs – Macrófagos e MCP-1

Após ingestão de dieta que induza a hiperlipidemia de forma significativa ocorre aumento no tamanho dos adipócitos, e conseqüentemente aumento da expressão e secreção de citocinas. Isso estimula as células do tecido adiposo para secretarem quimioatraentes como MCP-1, que recrutam monócitos e macrófagos. Os macrófagos recrutados induzem a produção de citocinas no tecido adiposo, que converte os sinais inflamatórios (por exemplo, ativação da via NF- κ B), levando a uma maior resistência à insulina e diminuição na regulação de vários genes relacionada com a função do adipócito. Como os adipócitos, macrófagos expressam PPAR γ e aP2, e a ligação das TZDs a estas células reduz a ativação de macrófagos e inibe a produção citocina. Em pacientes tratados com TZD é observado redução de MCP-1, com aparente diminuição no número de macrófagos e melhoramento da sensibilidade insulínica (SHARMA e STAELS, 2007; TONTONOV e SPIEGELMAN, 2008).

1.2.6 TZDs – Aterosclerose

Estudos demonstraram uma relação positiva entre os altos níveis lipídicos (colesterol e triglicerídeos) e um aumento de casos de aterosclerose. Caracteriza-se pelo acúmulo de células musculares lisas em proliferação e macrófagos carregados de oxLDL (LDL oxidado (modificado)), denominados células espumosas (*foam cells*), principalmente colesterol esterificado, na superfície íntima das artérias, conforme demonstrado na figura 8 (LIBBY, 2002).

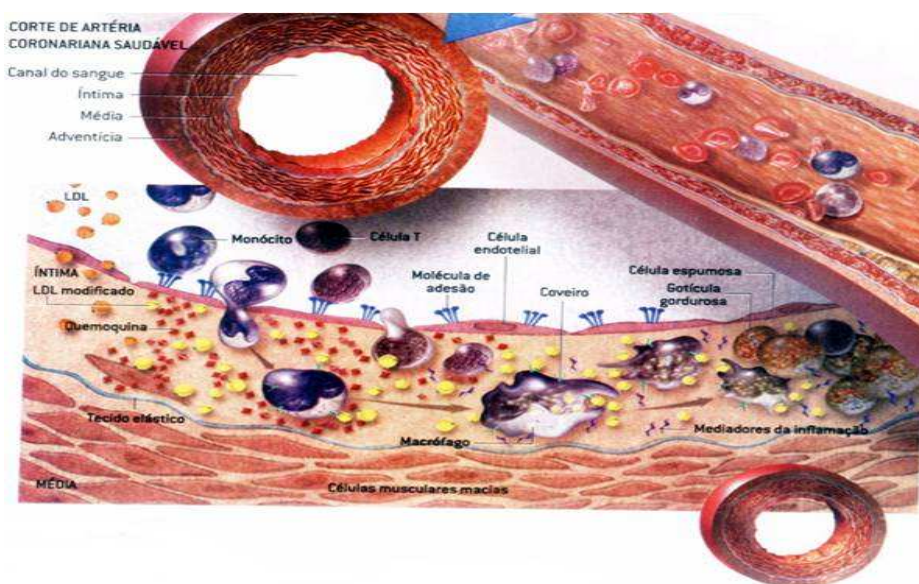


Figura 8. Formação da placa aterosclerótica (LIBBY, 2002).

Aparentemente, a rosiglitazona estimularia a expressão do receptor para oxLDL (OLR1) em adipócitos, que normalmente é expresso em células endoteliais (GUAN, 2002), de modo que induz aumento na captação de oxLDL e colesterol total pelos adipócitos diminuindo seus níveis na circulação com possibilidade de inibição da formação de placas ateroscleróticas (CHUI et al., 2005). Outra ação anti-aterogênica das TZDs, recentemente relatada na literatura, estaria associada à diminuição da afinidade de ligação entre as partículas de LDL e as moléculas complexas de proteoglicanos do endotélio vascular (CHUI et al., 2005). Esta ação resultaria em diminuição do tempo de permanência da LDL no subendotélio com menor probabilidade de oxidação da partícula e formação das células espumosas. As glitazonas também parecem atuar no processo de efluxo de colesterol através do estímulo à transcrição do transportador ligador à adenosina trifosfato (ABCA1). Esta proteína, transmembrana, atua no efluxo do colesterol e fosfolipídeos, permitindo que o colesterol se ligue à apolipoproteína A1 e inicie o processo de transporte reverso (TANNOCK et al., 2004). Em alguns trabalhos também foi observada diminuição da proteína C reativa ultra-sensível com as glitazonas (KOSHIYAMA et al., 2001).

O aumento dos níveis do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1) no endotélio é induzido por $TNF\alpha$ e outras citocinas, sendo um dos fatores que fazem parte do estado pró-trombótico frequentemente observado no paciente com DM2 e resistência insulínica (HAAG e DIPPENAAR, 2005). Estudos *in vitro* demonstraram

que a rosiglitazona e a pioglitazona modularam a expressão de PAI-1 independente da ativação do receptor PPAR γ (KUREBAYASHI et al., 2005). A redução dos níveis circulantes de PAI-1 em pacientes com DM2 resultaria em melhora do estado pró-trombótico.

A disfunção endotelial faz parte do processo fisiopatológico da aterosclerose e é caracterizada pela menor produção ou maior inativação do óxido nítrico (NO) (LIBBY, 2002). Em indivíduos normais, após ligação da insulina com seu receptor há ativação da NO sintase e, portanto, da produção de NO. Na resistência insulínica (DM2, hipertensão e obesidade), este processo encontra-se alterado, sendo o mecanismo mais provável a inativação do NO pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) no paciente diabético (WANG, GOALSTONE e DRAZNIN, 2005). As ROS e, portanto, o estresse oxidativo, resulta do efeito da hiperglicemia na ativação de vias metabólicas. Um dos mecanismos pelo qual as glitazonas melhorariam a função endotelial seria indireto e resultante da diminuição da glicemia e, portanto, da formação de ROS e dos AGL circulantes (DANDONA e ALJADA, 2004).

1.2.7 TZDs – Doença do Fígado Gorduroso e Hepatotoxicidade

Uma larga fração de pessoas com sobrepeso e obesas pode desenvolver esteatose hepática caracterizada por acúmulo de lipídio no fígado, principalmente os triglicerídeos. Atualmente é estimado que mais de 70% das pessoas diabética e obesas podem vir a apresentar a esteatose hepática (fígado gorduroso) (BEGRICHE et al., 2006).

Resistência insulínica periférica aumenta a mobilização de gordura periférica e os níveis de ácidos graxos livres (AGL). Entretanto, neste caso a oxidação no fígado ou a utilização do AGL está inibida. Assim, é observada uma tendência de aumento de triglicerídeos (TG) esterificado de AGL e uma redução na liberação do mesmo pelo fígado, levando a formação de depósitos de gordura no hepatócito. A peroxidase lipídica do microsomo e a β oxidação da mitocôndria encontram-se com suas atividades reduzidas pela resistência insulínica, que permite o fígado ficar mais sensível ao estresse oxidativo, principalmente a peroxidação lipídica. (WANG e LIU, 2003; BEGRICHE et al., 2006).

Apesar de a hepatotoxicidade ter sido verificada com o uso de troglitazona, o que motivou a retirada da droga do mercado. Recentemente, foi demonstrado que o uso da pioglitazona e a rosiglitazona em pacientes com esteatose hepática resultou em melhora do padrão hepático histológico, diminuição dos níveis de alanina aminotransferase e de gordura hepática (SCHOFF e LUBBEN, 2003; YKI-JARVINEN, 2004). Os autores atribuem este resultado à melhora da sensibilidade insulínica e na remoção de lipídios e glicose do fígado.

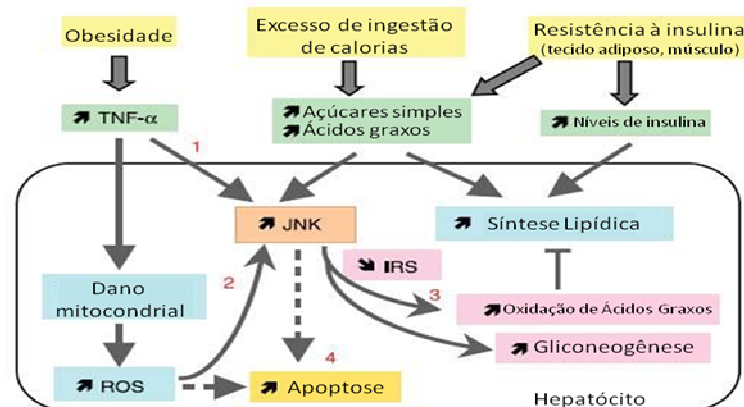


Figura 9. Mecanismo da célula hepática durante a doença do fígado gorduroso, e as consequências na resistência insulínica e sobrevivência celular (BEGRICHE et al., 2006).

1.2.8 Ações das TZDs – “Overview”

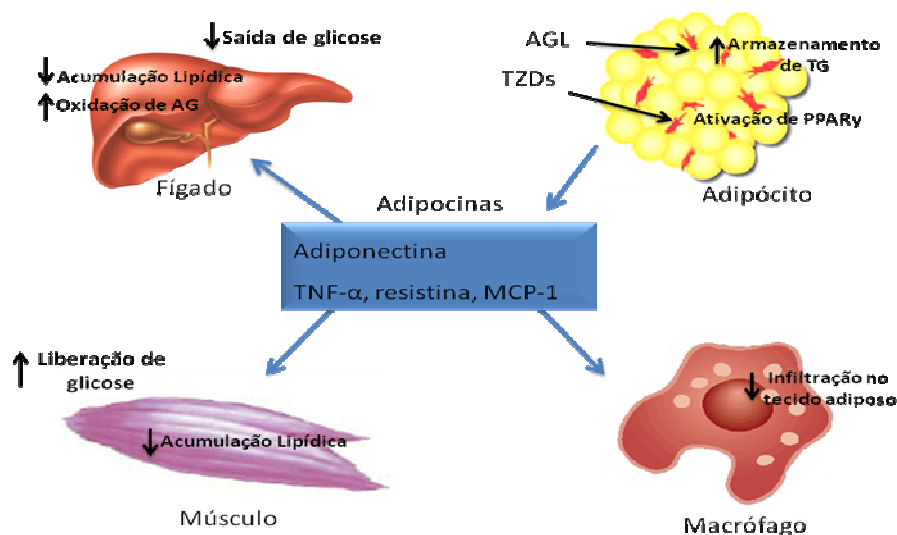


Figura 10. Resumos das ações das tiazolidinadionas sobre o metabolismo (TONTONNOZ e SPIEGELMAN, 2008).

2. Objetivos

Geral

Avaliar os efeitos metabólicos de novos derivados de benzilideno tiazolidinadionas: 5-(4 - cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ2), 5-(4- metoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ5), 5-(2,4-dimetoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ6) e 5-(4- dimetilamino-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ10) em camundongos com hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperglicemia e hiperinsulinemia induzidos por dieta rica em gordura.

Específicos

1. Desenvolver hiperlipidemia em camundongos utilizando dieta rica em gordura.
2. Quantificar os níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos, em animais controle e submetidos à dieta hiperlipidêmica.
3. Determinar se ocorre o desenvolvimento de resistência insulínica em animais submetidos à dieta hiperlipidêmica.
4. Investigar o potencial anti-hipercolesterolêmico e anti-hipertrigliceridêmico do tratamento, por via oral, com as drogas citadas anteriormente, nos animais submetidos à dieta hiperlipidêmica.
5. Avaliar o efeito do tratamento, com as drogas citadas, nos animais submetidos à dieta hiperlipidêmica, sobre o aspecto da resistência insulínica.
6. Realizar uma avaliação hepatotóxica preliminar das drogas citadas, por meio da análise dos níveis de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase.

3. Justificativa

Entre 1996 e 2000, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso comercial de novas glitazonas, para o uso em clínica médica, exemplo: a troglitazone, a rosiglitazone e a pioglitazone. Entretanto, os pesquisadores continuam desenvolvendo novos derivados de tiazolidinadionas buscando maior eficácia e menor efeito colateral (WIERZBICKI, 2004). Portanto, a investigação de novos derivados tiazolidínicos de baixa toxicidade, maior seletividade e efeitos no metabolismo lipídico e glicídico, são de interesse para ciência e tecnologia do Brasil.

4. Referências Bibliográficas

AIRES, M. M. Fisiologia. 3 ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan. 2008.

AKBIYIK, F.; RAY, D.M.; GETTINGS, K.F.; BLUMBERG, N.; FRANCIS, C.W.; PHIPPS, R.P. Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPAR γ , and PPAR γ agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes. **Blood** 104:1361-8, 2004.

ARKAN MC, HEVENER AL, GRETEN FR, MAEDA S, LI ZW, et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nat. Med.** 11:191–98, 2005.

BANERJEE, R.R.; RANGWALA, S.M.; SHAPIRO, J.S.; RICH, A.S.; RHOADES, B.; QI, Y.; WANG, J.; RAJALA, M.W.; LAZAR, M.A.; et. al. Regulation of fasted blood glucose by resistin. **Science** 303, 1195–1198, 2004.

BEGRICHE, K.; IGOUDJIL, A.; PESSAYRE, D.; FROMENTY, B. Mitochondrial dysfunction in NASH: Causes, consequences and possible means to prevent it. **Mitochondrion** (6), 1–28, 2006.

BERGER, J.; PATEL, H.V.; WOODS, J.; HAYES, N.S.; PARENT, S.A.; CLEMAS, J.; LEIBOWITZ, M.D.; ELBRECHT, A.; RACHUBINSKI, R.A.; CAPONE, J.P.; MOLLER, D.E. A PPAR γ mutant serves as a dominant negative inhibitor of PPAR signaling and is localized in the nucleus. **Mol. Cell Endocrinol.** 162, 57–67, 2000.

BIOCARTA. http://www.biocarta.com/pathfiles/m_PPARgPathway.gif
Acesso em Novembro de 2008.

BRAY, G.A.; NIELSEN, S.J.; POPKIN, B.M. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. **Am. J. Clin. Nutr.** 79, 537–543, 2004.

CARLSON, C.J.; KOTERSKI, S.; SCIOTTI, R.J.; POCCARD, G.B.; RONDINONE, C.M. Enhanced basal activation of mitogen-activated protein kinases in adipocytes from type 2 diabetes: potential role of p38 in the down regulation of GLUT4 expression. **Diabetes** 52 634–641, 2003.

CARVALHO, E.; ELIASSON, B.; WESSLAU, C.; SMITH, U. Impaired phosphorylation and insulin-stimulated translocation to the plasma membrane of protein kinase B/Akt in adipocytes from Type II diabetic subjects. **Diabetologia** 43, 1107–1115, 2000.

CARVALHO, E.; JANSSON, P.A.; NAGAEV, I.; WENTHSEL, A.M.; SMITH, U. Insulin resistance with low cellular IRS-1 expression is also associated with low GLUT4 expression and impaired insulin stimulated glucose transport, **FASEB J.** 15,1101–1103, 2001.

CERF, M.E. High fat diet modulation of glucose sensing in the beta-cell. **Med. Sci. Monit.** 13(1): RA12-17, 2007

CHANG, N.W.; WU, C.T.; CHEN, F.N.; HUANG, P.C. High polyunsaturated and monounsaturated fatty acid to saturated fatty acid ratio increases plasma very low density lipoprotein lipids and reduces the hepatic hypertriglyceridemic effect of dietary cholesterol in rats. **Nutr Res** 24:73– 83, 2004.

CHUI, P.C.; GUAN, H.P.; LEHERKE, M.; LAZAR, M.A. PPAR γ regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1. **J Clin Invest** 115:2244-56, 2005.

CINTRA, D.E.C.; COSTA, A.G.V.; PELUZIO, M.C.G.; MATTA, S.L.P.; SILVA, M.T.C.; COSTA, N.M.B. Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout, or chicken skin. **Nutrition** 22 197–205, 2006.

DANDONA, P.; ALJADA, A. Endothelial dysfunction in patients with type diabetes and the effects of thiazolidinedione antidiabetic agents. **J Diab Complic** 18:91-102, 2004.

DATASUS. <http://tabnet.datasus.gov.br/tabnet/tabnet.htm#Morbidade>
Acessado em Outubro 2008.

DAUGHERTY, A. Mouse models of atherosclerosis. **Southern Society for Clinical Investigation** 323, 3-10, 2002.

FEINSTEIN, D.L.; SPAGNOLO, A.; AKAR, C.; WEINBERG, G.; MURPHY, P.; GAVRILYUK, V.; et al. Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: is mitochondrial function the key?. **Biochem. Pharmacol.** 15;70: 177-88, 2005.

FRIED, S.K.; RAO, S.P. Sugar, hypertriglyceridemia, and cardiovascular disease. **Am J Clin Nutr.** 78:873S–80, 2003.

FUJITA, T.; SUGIYAMA, Y.; TAKETOMI, S.; SOHDA, T.; KAWAMATSU, Y.; IWATSUKA, H.; SUZUOKI, Z.. Reduction of insulin resistance in obese and/or diabetic animals by 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878, U-63,287, ciglitazone), a new antidiabetic agent. **Diabetes** 32(9):804-10, 1983.

FÜRNSINN, C.; WALDHÄUSL, W. Thiazolidinediones: metabolic actions *in vitro*. **Diabetologia** 45:1211-23, 2002.

GAMBA, C. V.; CARAVIELLO, Z. A.; DA SILVA, N.L.; GOMES, N.G.; GIL, Z.F. Effects of dietary lipids on renal function of aged rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 34, 265-269, 2001.

GARCÍA-FUENTES, E.; GIL-VILLARIANO, A.; ZAFRA, M.F.; GARCÍA-PEREGRÍN, E. Differential changes in the fatty acid composition of the main lipid classes of chick plasma induced by dietary coconut oil. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B** 133, 269-275, 2002.

GARG, M. L.; BLAKE, R. Cholesterol dynamics in rats fed diets containing either canola oil or sunflower oil. **Nutr. Res.** 17, 485, 1997.

GUAN, H.P. A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. **Nat Med** 8:1122-8, 2002.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Textbook of medical physiology. 11 ed. Elsevier Inc. Pennsylvania. 2006.

HAAG, M.; DIPPENAAR, N.G. Dietary fats, fatty acids and insulin resistance: short review of a multifaceted connection. **Med Sci Monit.** 11: RA359–67, 2005.

HAMMARSTEDT, A.; ANDERSSON, C.X.; ROTTER SOPASAKIS, V.; SMITH U. The effect of PPAR γ ligands on the adipose tissue in insulin resistance. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids** 73, 65–75, 2005.

HILL, B. J. F.; DIXON, J. L.; STUREK, M. Effect of atorvastatin on intracellular calcium uptake in coronary smooth muscles cells from diabetic pigs fed an atherogenic diet. **Atherosclerosis** 159, 117-124, 2001.

HOTAMISLIGIL, G.S.; SHARGILL, N.S.; SPIEGELMAN, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity linked insulin resistance. **Science** 259, 87–91, 1993.

HU, F.B.; STAMPFER, M.J.; MANSON, J.E. Dietary saturated fats and their food sources in relation to the risk of coronary heart disease in women. **Am J Clin Nutr** 70:1001– 8, 1999.

KERN, P.A.; RANGANATHAN, S.; LI, C.; WOOD, L.; RANGANATHAN, G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 280, E745–751, 2001.

KOOLMAN, J.; ROHM, K.H. Bioquímica: texto e atlas. 3 ed. Porto Alegre. Artmed. 2005

KOPELMAN, P.G. Obesity as a medical problem. **Nature** 404, 635–643, 2000.

KOSHIYAMA, H.; SHIMONO, D.; KUWAMURA, N.; MINAMIKAWA, J.; NAKAMURA, Y. Inhibitory effect of pioglitazone on carotid arterial wall thickness in type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab** 86(7);3452-60, 2001.

KRAUSE, B.R; PRINCEN, H.M.G. Lack of predictability of classical animal models for hypolipidemic activity: a good time for mice? **Atherosclerosis** 140, 15-24, 1998.

KUREBAYASHI, S.; XU, X.; ISHII, S.; SHIRAISHI, M.; KOUHARA, H.; KASAYAMA, S. A novel thiazolidinedione MCC-555 down regulates tumor necrosis factor- α -induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vascular endothelial cells. **Atherosclerosis** 182:71-7, 2005.

LAGATHU, C.J.; BASTARD, P.; AUCLAIR, M.; MAACHI, M.; CAPEAU, J.; CARON, M. Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 311, 372–379, 2003.

LARSEN, T.M.; TOUBRO, S.; ASTRUP, A. PPAR γ agonists in the treatment of type II diabetes is increased fatness commensurate with long-term efficacy? **Int J Obes Relat Metab Disord** 27:147-61, 2003.

LEE, Y.H.; GIRAUD, J.; DAVIS, R.J.; WHITE, M.F. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. **J. Biol. Chem.** 278, 2896–2902, 2003.

LEITE, L.F.C.C.; MOURÃO, R.H.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; HERNANDES, M.Z.; ROCHA NEVES, F.A.R.; VIDAL, S.; BARBE, J.; PITTA, I.R. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of arylidene-thiazolidinediones with potential hypoglycemic and hypolipidemic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry** 42 1263-1271, 2007.

LIBBY, P. Arteriosclerosis: o novo ponto de vista. *Scientific American Brasil*. n2. p.54-64, 2002.

LIMA, V. L. M.; SENA, V. L. M.; STEWART, B.; OWEN, J. S.; DOLPHIN, P. J. An evaluation of *Callithrix jacchus* (sagüi) as an experimental model for the dyslipoproteinemia of human *Schistosomiasis mansoni*. **Biochimica Biophysica Acta** 1393(3), 235-243, 1998.

LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature** 407, 233-241, 2000.

MAEDA, N.; SHIMOMURA, I.; KISHIDA, K.; NISHIZAWA, H.; MATSUDA, M.; MATSUZAWA, Y.; et. al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. **Nature Medicine** 8, 731 – 737, 2002.

MANN, J.I. Diet and risk of coronary heart diseases and type2 diabetes. **Lancet** 360:783–9, 2002.

MOURÃO, R.H.; SILVA, T.G.; SOARES, A.L.M.; VIEIRA, E.S.; SANTOS, J.N.; LIMA, M.C.A.; LIMA, V.L.M.; GALDINO, S.L.; BARBE, J.; PITTA, I.R. Synthesis and Biological Activity of Novel Acridinylidene and Benzylidene thiazolidinediones. **European Journal of Medicinal Chemistry** 40, 1129–1133, 2005.

NAGESWARI, K.; BANERJEE, R.; MENON, V.P. Effect of saturated, w-3 and w-6 polyunsaturated fatty acids on myocardial infarction. **J Nutr Biochem** 10:338–44, 1999.

RAVUSSIN, E. A NEAT way to control weight. **Science** 307, 530–531, 2005.

RIZVI, F.; PURI, A.; BHATIA, G.; KHANNA, A.K.; WULFF, E.M.; RASTOGI, A.K.; CHANDERA, R. Antidyslipidemic action of fenofibrate in dyslipidemic–diabetic hamster model. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 305, 215–222, 2003.

RONDINONE, C.M.; WANG, L.M.; LONNROTH, P.; WESSLAU, C.; PIERCE, J.H.; SMITH, U. Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94, 4171–4175, 1997.

ROS, E. Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. **Atherosclerosis**. 151, 357, 2000.

ROTTER, V.; NAGAEV, I.; SMITH, U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- α , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. **J. Biol. Chem.** 278, 45777–45784, 2003.

RUAN, H.; POWNALL, H.J.; LODISH, H.F. Troglitazone antagonizes tumor necrosis factor- α -induced reprogramming of adipocyte gene expression by inhibiting the transcriptional regulatory functions of NF- κ B. **J. Biol. Chem.** 278, 28181–28192, 2003.

SCATENA, R.; BOTTONI, P.; MARTORANA, G.E.; VINCENZONI, F.; BOTTA, G.; PASTORE, P.; GIARDINA, B. Mitochondria, ciglitazone and liver: A neglected interaction in biochemical pharmacology. **European Journal of Pharmacology** 567, 50–58, 2007.

SCHOFF, C.; LUBBEN, G. Post-marketing surveillance study of the efficacy and tolerability of pioglitazone in insulin resistant patients with type 2 diabetes in general practice. **Clin Drug Invest** 23:725-34, 2003.

SCHOONJANS, K.; WATANABE, M.; SUZUKI, H.; MAHFOUDI, A.; KREY, G.; WAHLI, W.; GRIMALDI, P.; STAELS, B.; YAMAMOTO, T.; AUWERX, J. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. **J. Biol. Chem.** 270, 19269–19276, 1995.

SHARMA, A. M.; STAELS, B. REVIEW: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Adipose Tissue: Understanding Obesity-Related Changes in Regulation of Lipid and Glucose Metabolism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** 92(2):386–395, 2007.

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

SOPASAKIS, V.R.; SANDQVIST, M.; GUSTAFSON, B.; HAMMARSTEDT, A.; SCHMELZ, M.; YANG, X.; JANSSON, P.A.; SMITH, U. High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator. **Obes. Res.** 12 454–460, 2004.

SPIEGELMAN, B.M.; FLIER, J.S. Obesity and the regulation of energy balance. **Cell** 104, 531–543, 2001.

SUMIYOSHI, M.; SAKANAKA, M.; KIMURA, Y. Chronic Intake of High-Fat and High-Sucrose Diets Differentially Affects Glucose Intolerance in Mice. **J. Nutr.** 136: 582–587, 2006.

TAN, M.H.; GALTZER, B.; JOHNS, D.; GILMORE, K.J. Pioglitazone as monotherapy or in combination with sulfonylurea or metformin enhances insulin sensitivity (HOMA-S or QUICKI) in patients with type 2 diabetes. **Curr Med Res Opin** 20:723-4, 2004.

TANNOCK, L.R.; LITTLE, P.J.; BARRET, P.H.R; WIGHT, T.N.; CHAIT, A. Thiazolidinedionas reduce the LDL binding affinity of non-human primate vascular cell proteoglycans. **Diabetologia** 47:837-43, 2004.

TONTONOZ, P.; HU, E.; GRAVES, R.A.; BUDAVARI, A.I.; SPIEGELMAN, B.M. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. **Genes Dev.** 8, 1224–1234, 1994.

TONTONOZ, P.; SPIEGELMAN, B.M. Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPARγ. **Annu. Rev. Biochem.** 77, 289–312, 2008.

WANG, J.T.; LIU, Y.L. Non-alcoholic fatty liver disease: the problems we are facing. **Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.**, 2(3):334-337, 2003.

WANG, C.C.L.; GOALSTONE, M.L.; DRAZNIN, B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. **Diabetes** 53:2735-40, 2005.

WAY, J.M.; GORGUN, C.Z.; TONG, Q.; UYSAL, K.T.; BROWN, K.K.; HARRINGTON, W.W.; HOTAMISLIGIL, G.S. Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator activated receptor gamma agonists, **J. Biol. Chem.** 276, 25651–25653, 2001.

WELLEN, K.E.; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation, stress, and diabetes. **J. Clin. Investig.** 115:1111–19, 2005.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalences of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care** 27:1047-153, 2004.

WILDING, J. Thiazolidinediones, insulin resistance and obesity: finding a balance. **Int J Clin Pract.** 60, 10, 1272–1280, 2006.

WIERZBICKI, A. S.. Lipid-lowering therapies in development. **Expert. Opin. Invest. Drugs.** v.13(11):1405-1418, 2004.

WILKES, J. J.; BONEN, A., BELL, R. C. A modified high-fat diet induces insulin resistance in rat eskeletal muscle but not adipocytes. **American Physiological Society.** 275: E679 – E686, 1998.

WILSON, T.M.; BROWN, P.J.; STERNBACH, D.D.; HENCE, B.R. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. **J Med Chem** 43:527-50, 2000.

XING, H.; NORTHROP, J.P.; GROVE, J.R.; KILPATRICK, K.E.; SU, J.L.; RINGOLD, G.M. TNF alpha-mediated inhibition and reversal of adipocyte differentiation is accompanied by suppressed expression of PPARgamma without effects on Pref-1 expression. **Endocrinology** 138, 2776–2783, 1997.

YANG, X.; ENERBACK, S.; SMITH, U. Reduced expression of FOXC2 and brown adipogenic genes in human subjects with insulin resistance. **Obes. Res.** 11, 1182–1191, 2003.

YANG, X.; JANSSON, P.A.; NAGAEV, I.; JACK, M.M.; CARVALHO, E.; SUNNERHAGEN, K.S.; CAM, M.C.; CUSHMAN, S.W.; SMITH, U. Evidence of impaired adipogenesis in insulin resistance. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 317, 1045–1051, 2004.

YANG, W.; RACHEZ, C.; FREEDMAN, L.P. Discrete roles for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor in recruiting nuclear receptor coactivators. **Mol. Cell Biol.** 20, 8008–8017, 2000.

YKI-JARVINEN, H. Thiazolidinediones. **N Engl J Med** 351:1106-18, 2004.

YKI-JARVINEN, H. The PROactive study: some answers, many questions. **Lancet** 366:1240-1, 2005.

ZHANG, X.; YOUNG, H.A. PPAR and immune system-what do we know. **Int Immunopharmacol** 2:1029-44, 2002.

5. Capítulo I - Metabolic Effect of Novel Benzylidene Thiazolidinediones Derivatives in High-Fat Fed Mice

Este artigo será submetido à revista internacional "European Journal of Pharmacology"
Fator de impacto: 2,37



ISSN: 0014-2999
Imprint: ELSEVIER

The European Journal of Pharmacology publishes full-length papers on the mechanisms of action of chemical substances affecting biological systems.

Metabolic Effect of Novel Benzylidene Thiazolidinediones Derivatives in High-Fat Fed Mice

Tiago Gomes Araújo¹, Caíque S. M. da Fonseca¹, Maria do Carmo Alves de Lima², Suely Lins Galdino², Ivan da Rocha Pitta², Vera Lúcia de Menezes Lima¹

¹Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

²Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

*Corresponding author:

Avenida Professor Moraes Rêgo, S/N, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil. Zip Code: 50670-420. Tel.: +55 81 2126 8540, Fax: +55 81 2126 8541. E-mail addresses: lima.vera.ufpe@gmail.com (Vera Lúcia de Menezes Lima)

Keywords: Thiazolidinediones; benzylidene-thiazolidinediones; high-fat diet, insulin resistance; hiperlipidemia

Abstract

Thiazolidinediones are insulin-sensitizing agents that working by binding to PPAR- γ , which leads to alteration in the expression of key regulators of lipid homeostasis, glucoregulatory and insulin resistance gene. In this study, it was evaluated the effect of treatment with novel benzylidene thiazolidinediones (BTZDs) derivatives: 5-(4-chloro-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (GQ2), 5-(4-methoxy-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (GQ5), 5-(2,4-dimethoxy-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (GQ6), 5-(4-dimethylamino-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (GQ10) on insulin resistance associated with hiperinsulinemia, hyperglycemia and hyperlipidemia in high-fat diet induced mice. Firstly, mice were allocated into two dietary regimens either chow diet or high fat diet, for the period of 75 days. After, the mice were randomly divided into 7 groups (n=6). The normal group (NC) and the high-fat diet control group (HFD-C) received vehicle (carboxymethylcellulose) and the other groups of mice were treated with GQ2, GQ5, GQ6, GQ10 and Rosiglitazone (all 30mg/Kg/day), once daily, orally for 15 days. All the groups except the normal group were on high-fat diet throughout the period of treatment. Body weight, serum triglyceride and total cholesterol levels, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), fasting serum glucose levels (FSG) and fasting serum insulin levels (FSI) of all groups were assayed. Insulin resistance index were calculated using homeostasis model assessment (HOMA-IR). None of the treatments caused any significant alteration on body weight. The elevated serum triglyceride, total cholesterol, FSG and FSI levels reduced significantly ($P<0.01$) by BTZDs and rosiglitazone treated groups in comparison with HFD-C group. GQ5 was 34% more potent than rosiglitazone in terms of decrease insulin levels ($P<0.05$). HOMA-IR indices of BTZDs and rosiglitazone treated groups were significantly ($P<0.01$) improved when compared to the HFD-C group. Moreover, only GQ2 and GQ5 were able to reduce the serum AST levels when compared with HFD-C group. This study suggests that these BTZDs derivatives not only reduce insulin resistance in high-fat fed mice, but also corrected associated hyperinsulinemia, hyperglycemia and hyperlipidemia. Additionally, none of them exerted any major adverse effect on the liver or body weight.

1. Introduction

During the last decades, the global prevalence of obesity and type 2 diabetes has increased epidemically which will impose an accelerating burden on society and health regulators (Hammarstedt et al., 2005). It is not surprising therefore that the incidence of type 2 diabetes and a conglomeration of several condition like dyslipidaemia, hypertension, insulin resistance, pro-thrombotic state, inflammation and fatty liver is increasing in the developing world at an alarming rate, with urbanization, which is accompanied by an increase in caloric intake with higher saturated fat consumption, and a sedentary lifestyle (Haag and Dippenaar, 2005; Pan et al., 2006). Clinical trials aimed at correcting abnormal lipid profiles and insulin resistance have targeted a family of nuclear transcription factors, the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) (Kim et al., 2008).

Thiazolidinediones (TZDs), such as rosiglitazone and pioglitazone, are insulin-sensitizing agents that working by binding to PPAR- γ , which leads to alteration in the expression key regulators of lipid homeostasis, glucoregulatory and insulin resistance genes (Hevener et al., 2001; Tontonoz and Spiegelman, 2008). TZDs have been shown to reduce plasmatic glucose, lipid, and insulin levels (Gross and Staels, 2007). In addition, PPAR- γ agonists enhance adipocyte differentiation and increase the insulin sensitivity of tissues (Norris et al., 2003). Owing to the estimated epidemic in type 2 diabetes and obesity, the increasing financial and social costs, and the complicated pathology of the diseases, identification of novel compounds are needed that address both insulin resistance and the dyslipidaemic components of the diseases (Leite et al., 2007).

The structural characteristic common to all TZDs is a thiazolidinedione ring, to which divergent molecular moieties are attached. Because different TZDs as well as compounds with structures resembling the thiazolidinedione ring carry comparable antidiabetic potentials, the thiazolidinedione ring is assumed to relate to antihyperglycaemic TZD action, whereas the substituted moieties seem to modulate pharmacokinetic and pharmacodynamic properties (Furnsinn and Waldhausl, 2002). In previous study, it was designed a research

of synthesis and biological evaluation of novel derivatives of the 5-benzylidene-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione substituted on the benzylidene moiety, in that work it was showed that the new compounds presented hypoglycaemic and hypotriglyceridaemic activity in alloxan induced diabetic mice (Mourão et al., 2005). Therefore, on the basis of such previous results, the current study was an attempt to evaluate these benzylidene thiazolidinediones (BTZDs) derivatives for their effect on blood lipid profile, blood glucose levels and insulin resistance in mice fed a high fat diet.

2. Material and methods

2.1 Materials

A novel BTZDs derivatives: 5-(4-chloro-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (GQ2), 5-(4-methoxy-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (GQ5), 5-(2,4-dimethoxy-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (GQ6), 5-(4-dimethylamino-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (GQ10) were synthesized as described earlier (Mourão et al., 2005). Rosiglitazone (5-(4-{2-[methyl(pyridine-2-yl)amino]ethoxy}benzyl)-1,2-thiazolidine-2,4-dione) was purchased from (GlaxoSmithKline, Brazil). For oral administration, the new compounds and rosiglitazone was suspended in a vehicle composed of 0.5% carboxymethyl cellulose (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)). Other chemicals used in this study were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

2.2 Animals

Adult Swiss albino male mice, 35-40g, bred in the Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM) were housed under a 12/12 h light/dark cycle in a controlled environment (room temperature: $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, humidity: $55 \pm 5\%$) provided with feed (Labina, Purina Brazil Ltd.) and water *ad libitum*. All animals protocols of the experiment were approved by the Animal Care and Use Committee at the Federal University of Pernambuco and are in accordance with the guidelines for Care and Use of Laboratory Animals.

2.3 Experimental group and drug administration

Firstly, mice were allocated into two dietary regimens either chow diet or high fat diet *ad libitum*, respectively, for the period of 75 days. The high fat diet containing: oxen brain, butter and standard chow. After, the mice were randomly divided into seven groups, each group having 6 mice. The normal group (NC) and the high-fat diet control group (HFD-C) received vehicle, once daily, orally for 15 days. The other groups of mice received GQ2, GQ5, GQ6, GQ10 and Rosiglitazone (all 30mg/Kg/day), respectively, once daily, orally for 15 days. All the groups of mice except the normal group were on high-fat diet throughout the period of treatment. Before and on the 16th day, after an overnight fasting, the blood samples were withdrawn, with a capillary, from mice-cavernous sinus under light ether anesthesia for biochemical parameters determination. After the last measurement the mice were sacrificed by decapitation.

2.4 Biochemical Assay

The serum was separated by centrifugation (3500 x g, 5 min). Serum glucose, triglyceride, total cholesterol and the activity of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were directly measured by enzymatic spectrophotometric methods (Labtest Diagnostica, Brazil). The remaining serum samples were then stored at - 20°C, till the insulin levels were determined by automated microparticle enzyme immunoassay (MEIA) (Abbott Laboratories, IL) (Rood et al., 1999) with mouse insulin as a standard. Insulin sensitivities were estimated using homeostasis model assessment - estimated insulin resistance (HOMA-IR); $HOMA-IR = [\text{fasting serum insulin } (\mu\text{U/mL}) \times \text{fasting serum glucose (mmol/L)}] / 22.5$ (Mather, 2009).

2.5 Statistical Analysis

Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. Analyses were carried out with the computer – based statistical software, SPSS (SPSS for Windows, version 11.0, Chicago, IL). To determine treatment effect and compare differences among group means, data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1 Serum lipids levels

The effect of BTZDs derivatives on serum lipids were examined at the end of the treatment (Fig. 1 and Fig. 2). The elevated serum triglyceride levels was significantly ($P < 0.01$) reduced by 42%, 44%, 28%, 23% and 43% respectively in GQ2, GQ5, GQ6, GQ10 and rosiglitazone treated groups, when compared to the HFD-C group (Fig. 1). The serum total cholesterol levels showed considerably reduction ($P < 0.01$) by 40%, 27%, 36%, 22% and 35% respectively in GQ2, GQ5, GQ6, GQ10 and rosiglitazone treated groups, as compared to the HFD-C group (Fig. 2).

3.2 Fasting serum glucose levels, serum insulin levels and insulin resistance index (HOMA-IR)

Table 1. Lists fasting serum glucose levels (FSG), fasting serum insulin levels (FSI) and HOMA-IR in all groups. The elevated FSG were brought back to normal levels in GQ2, GQ5, GQ6, GQ10 and rosiglitazone treated groups (by 29%, 46%, 36%, 38% and 44%, respectively). Treatment with GQ2, GQ5, GQ6, GQ10 and rosiglitazone significantly reduced FSI ($P < 0.01$) by 27%, 65%, 33%, 56% and 48%, in comparison with HFD-C group. GQ5 was 34% more potent than rosiglitazone in terms of decrease insulin levels ($P < 0.05$). Insulin sensitivity, as accessed by HOMA-IR indices of GQ2, GQ5, GQ6, GQ10 and rosiglitazone treated groups were significantly ($P < 0.01$) improved by 49%, 81%, 57%, 73% and 71%, respectively, when compared to the HFD-C group.

3.3 Serum activities of ALT and AST

Serum ALT and AST activities in all groups are shown in Table. 2. An elevation in ALT and AST was seen in HFD-C when compared to the NC group. After 15 days of treatment no difference was evident in ALT levels among the groups. When the data were compared with HFD-C group, only GQ2 and GQ5 were able to reduce the activity of AST ($P < 0.01$) by 12% and 17%, respectively.

3.4 Weight gain

A significant elevation in body weight was seen in control mice fed a high-fat diet in comparison to their normal diet fed counterparts. However, none of the drugs treatments caused any significant alteration on body weight (Table 2).

4. Discussion

Diet represents one environmental factor that can influence a metabolic disorder. This effects is well documented in animals and humans consuming diets with a fat content >50% of total calories provides hyperlipidaemia and insulin resistance (Riccardi et al., 2004). The administration of high-fat diet for 75 days to mice caused a significant elevation of serum triglycerides, cholesterol and glucose levels, while also producing insulin resistance and alterations on AST and ALT levels. One the most promising new classes of drugs are the TZDs, such as rosiglitazone and pioglitazone, its use in recent years has proven to be effective in improving insulin resistance and helping patients resume normal glycaemic control. (Wilding, 2006; Uwaifo and Ratner, 2007). In the course of searching for more efficient and potent antidiabetic compounds, in order to treat type 2 diabetes and obesity, this study now describes novel thiazolidinediones analogues, as designed as a novel benzylidene thiazolidinediones derivatives (GQ2, GQ5, GQ6 and GQ10), which demonstrated an effective improvement on insulin resistance and blood lipid

and glucose profile with no adverse effect on the liver or body weight in high-fat diet induced mice.

It should be considered that PPAR γ agonism ameliorated the 'lipid overload' condition in obese, dyslipidaemic rats by: 1) increasing the ability of the adipose tissue to take up and store plasma free fatty acid, 2) enhancing insulin mediated suppression of systemic fatty acid mobilization, 3) lowering hepatic triglyceride production and augmenting plasma triglyceride clearance (Edgley et al., 2006), 4) increasing of lipoprotein lipase activity that releases fatty acids from chylomicrons and very low density lipoprotein in the circulation (Laplante et al., 2007) and 5) upregulating of oxidized low density lipoprotein receptor 1 (LDLR1) that plays a significant role in oxLDL and total cholesterol uptake in adipocytes (Chui et al., 2005). Our data showed that the BTZDs and rosiglitazone reduced serum triglyceride and total cholesterol levels, with emphasis on therapeutic effect of GQ2 and GQ5. These results corroborate with Srinivasan et al. (2004) that demonstrated high dose of pioglitazone (30mg/kg p.o.) for 2 weeks reduced total cholesterol and triglycerides levels in high-fat diet fed rats, they also showed that the effect in reducing total cholesterol levels was possible because of the high dose used. However, previous studies with TZDs showed different effects on total cholesterol levels, it was observed either increase or decrease on total cholesterol levels (Gegick and Altheimer, 2004; Uwaifo and Ratner, 2007; Stolar et al., 2008). Our results stick out the amelioration on lipid profile by GQ2 and GQ5 treatment that appeared more effective than rosiglitazone treatment.

Elevated serum insulin along with mild hyperglycaemia and hyperlipidaemia are the hall marks of insulin resistance, a major metabolic disorder characterized by a decline in the ability of insulin to elicit a response from target tissue (Pathan et al., 2008). Novel BTZDs was shown, like rosiglitazone, to diminish fasting hyperglycemia, fasting hyperinsulinemia and improve insulin resistance in high-fat fed mice as determined by the HOMA which was developed by Matthews et al. (1985). Furthermore, GQ5 was found to be more potent than rosiglitazone treatment in reducing the insulin levels. Insulin resistance is often associated with compensatory hyperinsulinemia to maintain normal glucose levels. Typically, the improvement in insulin sensitivity during TZDs is often associated with reduced serum insulin levels. However,

the mechanism of the reduced circulating insulin levels remains uncertain, but has been partly attributed to reduced demand on beta-cell secretion (due to improvement in peripheral insulin) (Tiikkainen et al., 2004; Osei et al., 2007). Additionally, the increase on glucose utilization (largely a muscle function) and, at higher doses, inhibition of endogenous glucose production (largely a liver function) by TZDs (Chao et al., 2000), can help to explain the FSG reduction in this study.

In high-fat diet induced mice, triglyceride esterified from free fatty acids and cholesterol shows increasing trend whereas secreted by the liver shows decreasing trending, thus leading to fat deposits in hepatocyte. Lipid peroxidase of microsome was up-regulated and β -oxidation of mitochondrion was down-regulated by insulin resistance, which make the liver more sensitive to oxidative stress (Wang and Liu, 2003). TZD therapy is strongly associated with a decrease in hepatic fat content, this effect is obtained from amelioration in insulin resistance (Sharma and Staels, 2007). In this study, only GQ2 and GQ5 treated groups presented reduction on AST levels (mitochondrial enzyme), but failed to reduce serum ALT levels (cytoplasmatic enzyme) in short treatment (2 weeks). Other studies demonstrated that treatment with TZDs was able to reduce the circulating levels of liver transaminases (ALT and AST) in longer treatment (after 48 week) (Buckingham, 2005). In addition, serum transaminases (AST and ALT) are enzymes, which are of value in the diagnosis of hepatotoxicity (Jaeschke et al., 2002). None of the treatments produced any significant elevation of serum transaminases. This indicates that in the short term and in the dose employed the drugs do not exert any adverse effects on the liver.

Weight gain is side effect that may be associated with TZD treatment, particularly when using higher doses (Pathak et al., 2002). In this study, the new compounds and rosiglitazone, had no effect on body weight. However, this result could have a relationship with the short period of treatment. Thus, this also requires further investigation.

In summary, novel BTZDs derivatives not only reduced insulin resistance in high-fat fed mice, but also corrected the associated hyperinsulinemia, hyperglycaemia and hyperlipidaemia. Moreover, it also lowered the enzymatic activity of serum AST, which usually rise as sequel to hiperlipidemia. None of

them exerted any major adverse effect on the liver or body weight. Given that type 2 diabetes and obesity disease has become a major health problem worldwide, the exploration of BTZDs derivatives for the treatment of type 2 diabetes and obesity disorders, particularly those related to dietary factors, would be speculated. Furthermore, the safety and efficacy of these novel compounds in clinical and its underlying mechanism remain to be investigated.

Acknowledgements

We thank CNPq, CAPES and FACEPE for financial support. We are also grateful to the technician João Virgínio for their support for the studies.

References

- Buckingham, R.E., 2005. Thiazolidinediones: Pleiotropic drugs with potent anti-inflammatory properties for tissue protection. *Hepatology*. 33, 167-70.
- Chao, L., Marcus-Samuels, B., Mason, M.M., Moitra, J., Vinson, C., Arioglu, E., Gavrilova, O., Reitman, M.L., 2000. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J. Clin. Invest.* 106, 1221-8.
- Chui, P.C., Guan, H.P., Lehrke, M., Lazar, M.A., 2005. PPAR γ regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor. *J. Clin. Invest.* 115, 2244–2256
- Edgley, A.J., Thalén, P.G., Dahllöf, B., Lanne, B., Ljung, B., Oakes, N.D., 2006. PPAR γ agonist induced cardiac enlargement is associated with reduced fatty acid and increased glucose utilization in myocardium of Wistar rats. *Eur. J. Pharmacol.* 538, 195–206.
- Furnsinn, C., Waldhausl, W., 2002. Thiazolidinediones: metabolic actions *in vitro*. *Diabetologia* 45, 1211-1223.
- Gegick, C.G., Alheimer, M.D., 2004. Thiazolidinediones: comparison of long-term effects on glycemic control and cardiovascular risk factors. *Current Medical Research and Opinion* 20, 919-930.
- Gross, B., Staels, B., 2007. PPAR agonists: multimodal drugs for the treatment of type-2 diabetes. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 21, 687–710.

Hevener, A.L., Reichart, D., Janez, A., Olefsky, J., 2001. Thiazolidinedione treatment prevents free fatty acid-induced insulin resistance in male wistar rats. *Diabetes* 50, 2316-2322.

Haag, M., Dippenaar, N.G., 2005. Dietary fats, fatty acids and insulin resistance: short review of a multifaceted connection. *Med. Sci. Monit.* 11, RA359–67.

Hammarstedt, A., Andersson, C.X., Rotter Sopasakis, V., Smith, U., 2005. The effect of PPAR γ ligands on the adipose tissue in insulin resistance. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 73, 65–75.

Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pessayre, D., Lemasters, J.J., 2002. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 65, 166-76.

Kim, M.K., Chae, Y.N, Son, M.H., Kim, S.H., Kim, J.K., Moon, H.S., Park, C.S., Bae, M.H., Kim, E., Han, T., Choi, H., Shin, Y.A., Ahn, B.N., Lee, C.H., Lim, J.I., Shin, C.Y., 2008. PAR-5359, a well-balanced PPAR α/γ dual agonist, exhibits equivalent antidiabetic and hypolipidemic activities *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol.* 595, 119–125.

Laplante, M., Festuccia, W.T., Soucy, G., G  linas, Y., Lalonde, J., Deshaies, Y., 2007. Involvement of adipose tissues in the early hypolipidemic action of PPAR γ agonism in the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R1408–R1417.

Leite, A.C.R., Araújo, T.G., Carvalho, B.M., Medeiros, M.C., Lima, V.L.M., 2004. Hiperlipidemia induzida por dieta rica em c  rebro de boi. 2nd International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology – SBBQ, 305-307.

Leite, L.F.C.C., Mourão, R.H, Lima, M.C.A., Galdino, S.L., Hernandez, M.Z., Rocha Neves, F.A.R., Vidal, S., Barbe, J., Pitta, I.R., 2007. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of arylidene-thiazolidinediones with potential hypoglycemic and hypolipidemic activities. *European Journal of Medicinal Chemistry* 42, 1263-1271.

Mather, K., 2009. Surrogate measures of insulin resistance: of rats, mice and men. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E398-E399.

Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., Turner, R.C., 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and

beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412–419.

Mourão, R.H., Silva, T.G., Soares, A.L.M., Vieira, E.S., Santos, J.N., Lima, M.C.A., Lima, V.L.M., Galdino, S.L., Barbe, J., Pitta, I.R., 2005. Synthesis and Biological Activity of Novel Acridinylidene and Benzylidene thiazolidinediones. *European Journal of Medicinal Chemistry* 40, 1129–1133.

Norris, A.W., Chen, L., Fisher, S.J., Szanto, I., Ristow, M., Jozsi, A.C., Hirshman, M.F., Rosen, E.D., Goodyear, L.J., Gonzalez, F.J., Spiegelman, B.M., Kahn, C.R., 2003. Muscle-specific PPAR γ -deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J. Clin. Invest.* 112, 608-618.

Osei, K., Gaillard, T., Schuster, D., 2007. Thiazolidinediones increase hepatic insulin extraction in African Americans with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus: A pilot study of rosiglitazone. *Metabolism* 56, 24-9.

Pan, S.I., Yang, R., Dong, H., Yu, Z., Ko, K.M., 2006. Bifendate treatment attenuates hepatic steatosis in cholesterol/bile salt- and high-fat diet-induced hypercholesterolemia in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 552, 170–175.

Pathak, R., Afaq, A., Blonde, L., 2002. Thiazolidinediones in the treatment of managed care patients with type 2 diabetes. *Am. J. Manag. Care.* 8 (16 Suppl), S483-94.

Pathan, A.R., Gaikwad, A.B., Viswanad, B., Ramarao, P., 2008. Rosiglitazone attenuates the cognitive deficits induced by high fat diet feeding in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 589, 176-9.

Riccardi, G., Giacob, R., Rivellese, A.A., 2004. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clinical Nutrition* 23, 447–456.

Rood, J.C., Lovejoy, J.C., Tulley, R.T., 1999. Comparison of a radioimmunoassay with a microparticle enzyme immunoassay of insulin for use with the minimal model method of determining whole-body insulin sensitivity. *Diabetes Technology & Therapeutics* 1, 463-468.

Sharma, A. M., Staels, B., 2007. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Adipose Tissue: Understanding Obesity-Related Changes in Regulation of Lipid and Glucose Metabolism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92, 386–395.

Srinivasan, K., Patole, P.S., Kaul, C.L., Ramarao, P., 2004. Reversal of glucose intolerance by pioglitazone in high fat diet-fed rats. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 26, 327-333.

Stolar, M.W., Hoogwerf, B.J., Boyle, P.J., Gorshow, S.M., Wales, D.O., 2008. Managing Type 2 Diabetes: Going Beyond Glycemic Control. *J. Manag. Care Pharm.* 14 (Suppl B), s2-19.

Tiikkainen, M., Häkkinen, A.M., Korsheninnikova, E., Nyman, T., Mäkimattila, S., Yki-Järvinen, H., 2004. Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 53, 2169-76.

Tontonoz, P., Spiegelman, B.M., 2008. Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR γ . *Annu. Rev. Biochem.* 77, 289–312.

Uwaifo, G.I., Ratner, R.E. 2007. Differential Effects of Oral Hypoglycemic Agents on Glucose Control and Cardiovascular Risk. *Am. J. Cardiol* 99, 51B–67B.

Wang, J.T., Liu, Y.L., 2003. Non-alcoholic fatty liver disease: the problems we are facing. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 2, 334-7.

Wilding, J., 2006. Thiazolidinediones, insulin resistance and obesity: finding a balance. *Int. J. Clin. Pract.* 60, 10, 1272–1280.

Figures and Tables

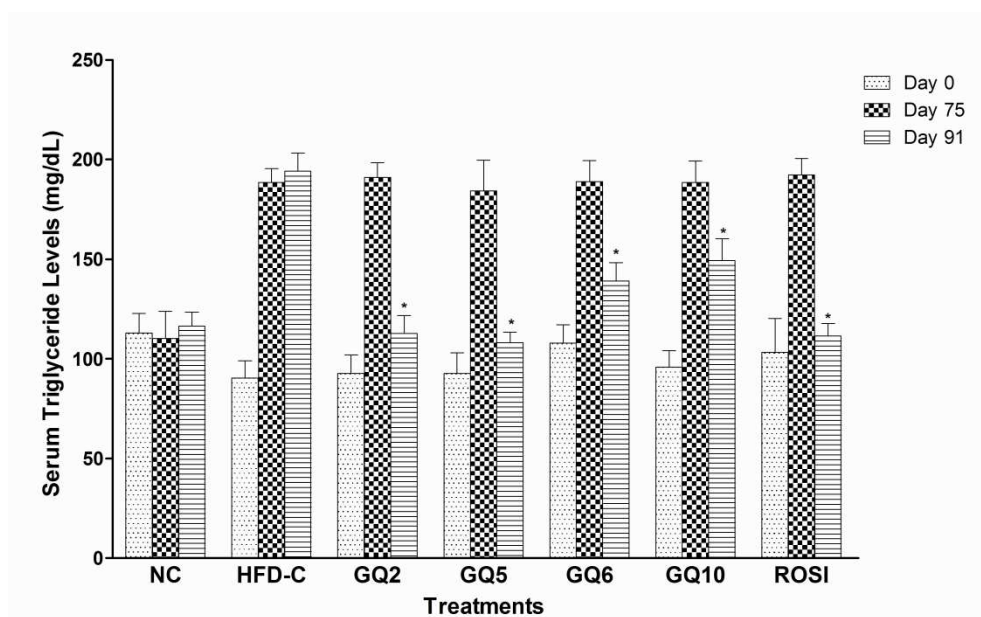


Fig. 1. The effects of treatments on serum triglyceride levels are given. Day 0, Day 75 and Day 91 indicate the fasting serum triglyceride level before high-fat diet induction, after high-fat diet induction and after 15 days treatments, respectively. All mice except normal control received high-fat diet along throughout the study (i.e. from Day 0 to Day 91). ROSI refers to rosiglitazone treated groups. The values represent the mean $\pm$ S.E. (n=6). One-way ANOVA with Tukey's post hoc test was applied. *P<0.01 vs. HFD-C.

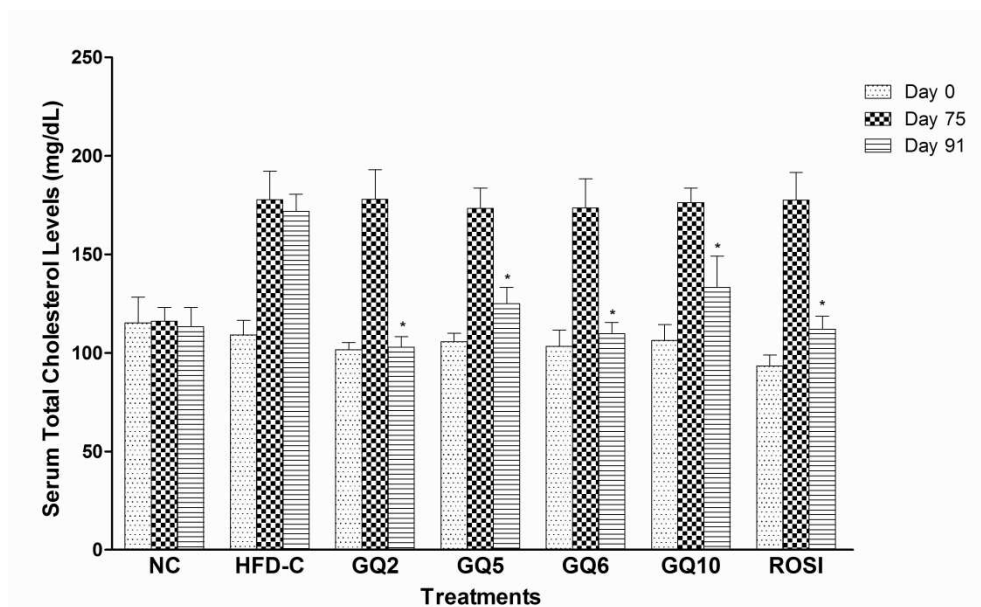


Fig. 2. The effects of treatments on fasting serum total cholesterol levels are given. Day 0, Day 75 and Day 91 indicate the fasting serum total cholesterol levels before high-fat diet induction, after high-fat diet induction and after 15 days treatments, respectively. The values represent the mean $\pm$ S.E. (n=6). One-way ANOVA with Tukey's post hoc test.

* P<0.01 vs. HFD-C.

Table 1. Effect of BTZDs derivatives on fasting serum glucose and insulin, and homeostasis model assessment values for insulin resistance (HOMA – IR)

	FSG (mmol/L)	FSI (μU/mL)	HOMA-IR
NC	6.52 ± 0.43	5.93 ± 0.15	1.72 ± 0.13
HFD-C	9.47 ± 0.86	34.68 ± 2.29	14.64 ± 2.06
GQ2	6.71 ± 0.38 *	25.28 ± 3.37 *	7.52 ± 0.93 *
GQ5	5.12 ± 0.27 *	12.03 ± 1.43 * †	2.74 ± 0.42 *
GQ6	6.06 ± 0.39 *	23.31 ± 3.83 *	6.28 ± 1.08 *
GQ10	5.88 ± 0.53 *	15.15 ± 0.92 *	3.96 ± 0.45 *
ROSI	5.28 ± 0.44 *	18.16 ± 0.08 *	4.26 ± 0.37 *

Data represent the end of treatment (Day 91). ROSI refers to rosiglitazone treated group. Values given are the mean ± S.E. (n=6). * P<0.01 vs. HFD-C; † P<0.05 vs. ROSI.

Table 2. Effect of BTZDs derivatives on body weight and serum ALT and AST levels.

	Body Weight (g)	ALT (U/L)	AST(U/L)
NC	39.9 ± 1.3	63.83 ± 6.54	101.51 ± 11.84
HFD-C	51.3 ± 2.4	87.53 ± 14.13	190.45 ± 8.81
GQ2	49.3 ± 2.2	80.72 ± 7.88	166.91 ± 7.51 *
GQ5	50.6 ± 1.7	88.48 ± 8.88	157.75 ± 9.09 *
GQ6	49.0 ± 3.5	84.41 ± 5.94	191.90 ± 9.90
GQ10	50.1 ± 2.3	90.70 ± 8.23	196.63 ± 12.32
ROSI	50.2 ± 2.8	82.98 ± 14.01	172.08 ± 3.45

Data represent the end of treatments (Day 91). Values given the mean ± S.E. (n=6). * P<0.01

6. Conclusões

1. Os camundongos submetidos à dieta rica em gordura desenvolveram resistência insulínica associada à hiperinsulinemia, hiperglicemia e hiperlipidemia.
2. Os novos derivados de BTZDs apresentaram um potencial anti-hipercolesterolêmico e anti-hipertrigliceridêmico, em camundongos alimentados com dieta rica em gordura.
3. O tratamento com os novos compostos promoveu melhoramento significativo sobre o aspecto da resistência insulínica em camundongos submetidos à dieta rica em gordura.
4. Aparentemente o tratamento com os novos compostos não apresentaram hepatotoxicidade como efeito adverso, bem como não provocaram alterações no peso dos animais.

7. Anexos