



ALEKSANDRA ALVES SILVA

**Efeito de Inibidores Farmacológicos da iNOS na Sensibilidade e
Sinalização de Insulina em Animais Obesos**

**CAMPINAS
2009**



ALEKSANDRA ALVES SILVA

Efeito de Inibidores Farmacológicos da iNOS na Sensibilidade e Sinalização de Insulina em Animais Obesos

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica, área de concentração Biologia Molecular, Celular, Estrutural e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr Mário José Abdalla Saad

**CAMPINAS
2009**

UNIDADE BC
Nº CHAMADA _____
TURNO _____
V _____
TÍTULO _____
PRIMEIRO 84563
SEGUNDO 16-134-10
C. _____
PR. _____
DATA 11/08
CÓD III 470750

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Si38e Silva, Aleksandra Alves
Efeito de inibidores farmacológicos da iNOS na sensibilidade e sinalização de insulina em animais obesos / Aleksandra Alves Silva. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Mário José Abdalla Saad
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Óxido Nítrico Sintase. 2. Resistência à insulina. 3. Diabetes Mellitus tipo 2. I. Saad, Mário José Abdalla. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : "Effect of iNOS pharmacologic inhibitors in the insulin signalization and sensitivity in obese animal"

Keywords: • Nitric Oxide Synthase
• Insulin Resistance
• Diabetes Mellitus, type 2

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica
Área de concentração: Biologia Molecular, Celular, Estrutural e do Desenvolvimento

Banca examinadora:

Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad
Prof. Dr. Marco Antônio Carvalho-Filho
Profa. Dra. Rosangela Maria Neves Bezerra

Data da defesa: 20-02-2009



Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Aleksandra Alves Silva

Orientador: Prof. Dr. Mario Jose Abdalla Saad

Membros:

1. Prof. Dr. Rosangela Maria Neves Bezerra

2. Prof. Dr. Marco Antonio Carvalho Filho

3. Prof. Dr. Mario Jose Abdalla Saad

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 20/02/2009



“Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida e nela só se tem uma chance de fazer aquilo que quer. Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldades para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana. E esperança suficiente para fazê-la feliz. As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas. Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos. A felicidade aparece para aqueles que choram. Para aqueles que se machucam. Para aqueles que buscam e tentam sempre. E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas.”

Clarice Lispector



AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Mário José Abdalla Saad, pela aceitação sem ressalvas e por acreditar em minha capacidade. Pela humanidade e sabedoria compartilhada “as mensagens são subliminares” que contribuiu muito para minha formação não apenas como pesquisadora, mas principalmente como ser humano. E ao seu laboratório e aos “laboratórios irmãos”, este grupo de pessoas indescritíveis que contribuíram para meu crescimento e formação.

Ao Prof. Roberto Rittner pelos ensinamentos e agradável convívio e exemplo de organização e carisma para uma vida produtiva e estruturada. E ao seu laboratório, que nos acolheu amigavelmente, pela estrutura oferecida para a realização deste e de outros trabalhos.

A Profa. Nelci Fenalti Höehr e ao Prof. José Barreto Campello Carvalheira, por seu inestimável apoio, credibilidade e ensinamentos edificantes.

Aos Professores Lício Augusto Velloso e Roger Frigério Castilho pela atenção e conhecimento compartilhado.

Aos Doutores Rosangela Maria Neves Bezerra e Marco Antônio Carvalho-Filho pela atenção, conhecimento e tempo compartilhado.

Aos amigos e familiares próximos e distantes, pela paciência e carinho nos momentos de dificuldade e ausência. Aos colegas pós-graduandos, e alunos de iniciação científica, pela alegria e ajuda no ambiente de trabalho.

Aos funcionários dos Laboratórios e do Núcleo de Medicina Experimental, cujos préstimos foram indispensáveis para a realização deste trabalho.



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Insulina	13
1.2 Óxido Nítrico (NO)	19
1.3 Enzimas Sintetizadoras de Óxido Nítrico (NOS).....	20
1.4 Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS) e Resistência à Insulina.....	24
2. OBJETIVO	27
3. DESENHO EXPERIMENTAL.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Animais Experimentais	32
4.2 Síntese dos Compostos	34
4.3 Soluções Utilizadas	37
4.4 Reagentes e Anticorpos	39
4.5 Gavagem.....	39
4.6 Determinação de Glicose Plasmática e Insulina Sérica.....	40
4.7 Teste de Tolerância à Insulina (ITT)	40
4.8 Teste intraperitoneal de Tolerância à Glicose (ipGTT).....	41
4.9 Extração de Tecidos	41
4.10 Apresentação dos Dados e Análise Estatística	42
5. RESULTADOS	43
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÃO.....	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73



FIGURAS

Figura 1A.....	45
Figura 1B.....	47
Figura 1C.....	47
Figura 1D.....	48
Figura 1E.....	48
Figura 2.....	49
Figura 3A.....	51
Figura 3B.....	52
Figura 4A.....	54
Figura 4B.....	55
Figura 4C.....	56
Figura 4D.....	57
Figura 5A.....	59
Figura 5B.....	60
Figura 5C.....	61



ABREVIATURAS

Akt – Proteína quinase B/Akt

ATP- Adenosina trifosfato

cDNA – DNA (ácido desoxirribonucleico) complementar

nNOS/NOS 1 (Neuronal Nitric Oxide Synthase) – Óxido Nítrico Sintase neuronal

iNOS/NOS 2 (Inducible Nitric Oxide Synthase) – Óxido Nítrico Sintase induzível

eNOS/NOS 3 (Endotelial Nitric Oxide Synthase) – Óxido Nítrico Sintase endotelial

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

ELISA- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

GLUT 4 – Transportador de glicose 4

GTT – Teste de tolerância à glicose

IFN- γ - Interferon gama

IKK (IkappaB kinase) – Complexo enzimático com atividade serina-quinase

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

i.p.- Intraperitoneal

IR β (Insulin Receptor β) – Subunidade β do receptor de insulina

IRS 1/2 (Insulin Receptor Substrate 1/2) – Substratos 1 e 2 do receptor de insulina



I-SMT – Iodato de S-metilisotiouréia

ITT- Teste de tolerância à insulina

Kitt- Taxa de remoção da glicose

LPS- Lipopolissacarídeo

NaCl – Cloreto de sódio

Na₄P₂O₇ – Pirofosfato de sódio

NFκB (Nuclear Factor kappa B) – Fator de transcrição kappa B

NO – Óxido Nítrico

NOS - Óxido Nítrico sintases

NO₂ – Dióxido de Nitrogênio

O₂⁻ - Superóxido

ob/ob – Camundongo obeso com mutação no gene da leptina

ONOO⁻ - Peroxinitrito

PBS - Placebo

PI-3 quinase – Fosfatidil-inositol 3 quinase

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

S-H – Grupamento tiol

TNFα (Tumor Necrosis Factor α) – Fator de necrose Tumoral α



RESUMO

As óxido nítrico sintases (NOS) são divididas em dois grandes grupos de enzimas, NOS induzível (iNOS) e NOS constitutivas (cNOS). Embora o óxido nítrico (NO) seja um importante mediador de defesa do organismo, a produção excessiva de NO está envolvida na patogênese de muitas doenças inflamatórias e metabólicas. Alguns estudos demonstram que o óxido nítrico exógeno e o NO produzido pela iNOS pode induzir resistência à insulina em músculo e desempenha um papel importante na hiperglicemia de jejum. Este estudo teve como objetivo sintetizar e investigar o efeito de um potente e seletivo inibidor de atividade da iNOS, o Iodato de S-Metilisotiouréia (I-SMT) 5 mg/kg por dia, na hiperglicemia de jejum e na resistência à insulina em um modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Foram observados os parâmetros metabólicos e de sinalização celular da Proteína quinase B/Akt (Akt) e os resultados fornecem evidências de que o grupo tratado com I-SMT foi protegido contra o desenvolvimento de resistência à insulina, e intolerância à glicose induzida por dieta hiperlipídica. Portanto, propomos que potentes inibidores farmacológicos, com seletividade significativa pela iNOS podem representar uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da resistência à insulina e suas complicações como o diabetes tipo 2.

Palavras-chaves: Óxido Nítrico Sintases, Inibidores, Isotioureia, Resistência à Insulina e Diabetes tipo 2.



ABSTRACT

Nitric oxide synthase (NOS) has been divided into two major sub-enzymes, inducible NOS (iNOS) and constitutive NOS (cNOS). Although nitric oxide (NO) is an important defense mediator, the excessive production of NO has been involved in the pathology of many inflammatory and metabolic diseases. Some studies demonstrate that exogenous nitric oxide (NO) and the NO produced by iNOS can induce insulin resistance in muscle and plays an important role in fasting hyperglycemia. This study investigates the effect of a potent and selective iNOS activity inhibitor, the S-Methylisothiourrea Iodide (SMT-I) 5 mg/kg per day, in fasting hyperglycemia and insulin resistance in diet-induced obesity model. We observed the metabolic parameters and Akt signalization and these findings provide evidence that the SMT-I treated group are protected against the development of insulin resistance, glucose intolerance and diet-induced obesity. Therefore, we propose that highly selective inhibitors of iNOS activity may represent a novel therapeutic approach for the therapy of insulin resistance and its complications as type 2 diabetes.

Keywords: Nitric Oxid Synthases, Inhibitors, Isothiourrea, Insulin Resistance and Type 2 Diabetes.

1. INTRODUÇÃO

Com a descoberta da insulina há aproximadamente um século, muitos pesquisadores têm se dedicado ao estudo desse hormônio e seus mecanismos moleculares de ação.

Esses estudos são de extrema importância na compreensão dos mecanismos de resistência à insulina, presentes na fisiopatologia de diversas doenças, como obesidade e *diabetes mellitus* tipo 2, além de estar associada a outras enfermidades endócrinas como hipercortisolismo e acromegalia (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

O Diabetes é uma doença metabólica cuja característica principal é a hiperglicemia de jejum. Mesmo sendo conhecida desde a antiguidade, somente no último século ocorreram maiores avanços na compreensão de sua fisiopatologia.

A idéia de resistência à insulina como mecanismo fisiopatológico principal do Diabetes tipo 2 foi comprovada por estudos de Roth (KAHN; FLIER et al., 1976), Reaven (REAVEN, 1988) e Olefsky (KOLTERMAN; INSEL et al., 1980).

Atualmente, sabemos que a resistência à insulina acontece em vários tecidos envolvidos com seus efeitos metabólicos (DEFRONZO, 1988). No entanto, o aparecimento sintomático do Diabetes tipo 2 está relacionado a um evento posterior ao de resistência à insulina, que é a falência das células β do pâncreas, que num determinado momento evolutivo da doença perdem a capacidade de compensar a resistência à insulina, com o aumento de sua secreção (LEVY; ATKINSON et al. 1998; MATTHEWS; CULL et al. 1998).

1.1 Insulina

A insulina é hoje o hormônio anabólico mais conhecido e é essencial para a manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular. Esse

hormônio é secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições. 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 e nos adipócitos e reduz a lipólise, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação protéica.

A ação da insulina na célula inicia-se pela sua ligação ao receptor de membrana plasmática. Este receptor está presente em praticamente todos os tecidos dos mamíferos, mas suas concentrações variam desde 40 receptores nos eritrócitos circulantes até mais de 200.000 nas células adiposas e hepáticas. O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituída por 2 sub-unidades α e duas subunidades β , unidas por ligações dissulfeto (KAHN, 1985). A sub-unidade α é inteiramente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina. A sub-unidade β é uma proteína transmembrana responsável pela transmissão do sinal e possui atividade tirosina quinase (KASUGA; KARLSSON; KAHN, 1982). O ATP (adenosina trifosfato) age como doador de fosfatos e a fosforilação ocorre em resíduos tirosina. O mecanismo molecular exato da ação da insulina é desconhecido, mas parece depender da remoção do efeito inibitório da sub-unidade α sobre a atividade da sub-unidade β do seu receptor.

A insulina induz a autofosforilação do receptor, aumentando a sua capacidade de fosforilar um ou mais substratos protéicos intracelulares. A fosforilação de seus substratos dá início a uma série de eventos incluindo a cascata de reações de fosforilação e

defosforilação que regula os seus efeitos metabólicos e de crescimento (SUN; ROTHENBERG et al., 1991; WHITE; KAHN, 1994; WHITE, 1997).

O primeiro substrato protéico descrito recebeu o nome de substrato 1 do receptor de insulina ou IRS-1 (SUN et al., 1991). O DNA complementar (cDNA) do IRS-1 prevê uma proteína de 1235 aminoácidos, sendo inicialmente denominada pp185 por sua mobilidade eletroforética. Posteriormente, foi observado que uma outra proteína de 190 kDa, identificada como IRS-2, é rapidamente fosforilada nos grupos tirosina em resposta à insulina (CHEATHAM; KAHN, 1995). A fosforilação da tirosina permite sua associação a proteínas que possuem domínios SH2 e SH3 de reconhecimento específico para fosfotirosina.

Desta forma, as proteínas IRS-1/2 desempenham função essencial na transmissão do sinal insulínico e a fosforilação desses substratos permite a interação com diversas proteínas adaptadoras ou com atividade enzimática, caracterizando o efeito pleiotrópico da insulina.

Há uma estreita associação entre a enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase) com IRS-1/2 após estimulação com insulina (CARPENTER; CANTLEY, 1990). A PI 3-quinase é uma enzima que contém dois sítios SH2 e um SH3 (RUDERMAN et al., 1990) e é a mais bem estudada molécula sinalizadora ativada pela IRS-1. É uma serina/treonina quinase e tem um papel importante em muitos processos celulares, incluindo proliferação celular e captação de glicose. A molécula do IRS-1, quando fosforilada em tirosina, permite a sua associação ao domínio SH2 da subunidade regulatória da PI 3-quinase, levando à ativação da enzima (CHEATHAM; KAHN, 1995). Esta enzima catalisa a fosforilação do fosfatidilinositol (PI), do fosfatidil-inositol-4-fosfato (PI-4P) e do

fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PI-4,5P₂), resultando na estimulação do transporte de glicose (CHEATHAM; VIOHOS et al., 1994; FOLLI; SAAD et al., 1992).

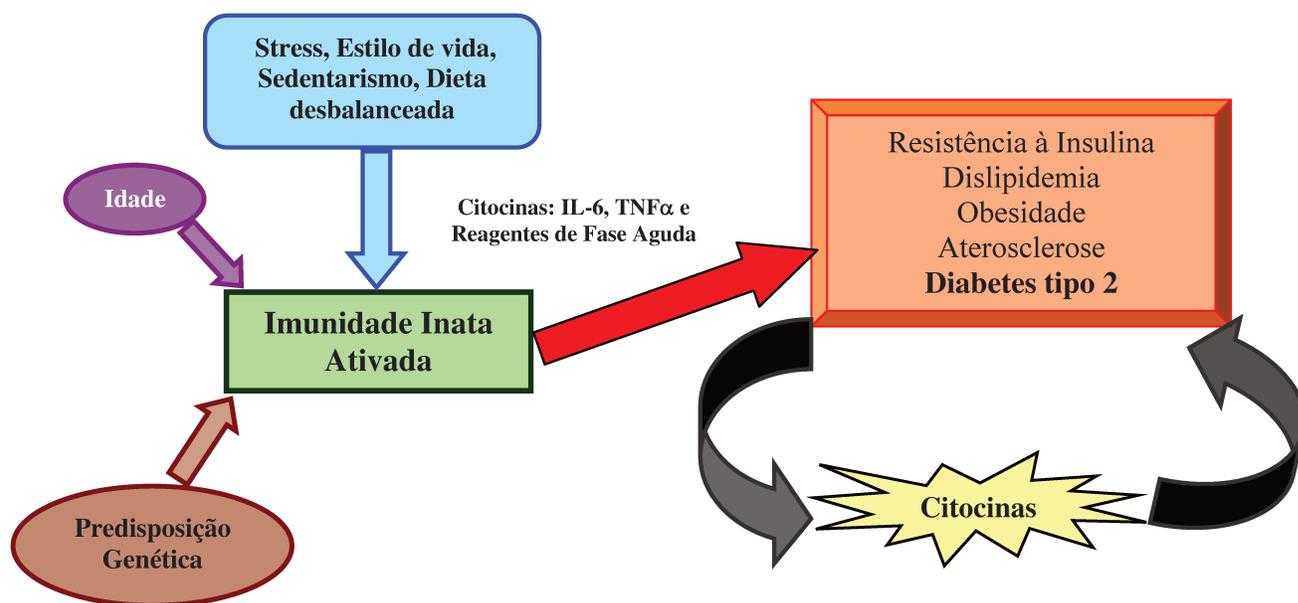
Algumas proteínas, como a p70S6K e Akt (proteína quinase B/PKB) são ativadas pela via ligada a PI 3-quinase (SHEPPERD; WITHERS; SIDDLE, 1998; YENUSH; WHITE, 1997) e têm um papel importante na regulação da expressão de genes e no crescimento celular em resposta a inúmeros estímulos (KUPRIYANOVA; KANDOR, 1999). Também foi observado em tecido adiposo, que a Akt em resposta ao estímulo da insulina encontra-se ligada a vesículas contendo o transportador de glicose – GLUT 4 (CARVALHO; SAAD, 1998).

Atualmente, a PI 3-quinase é a única molécula intracelular considerada essencial para o transporte de glicose (SHEPPERD; WITHERS; SIDDLE, 1998). As proteínas alvo conhecidas dessa enzima são a Akt e as isoformas atípicas da proteína quinase c (αPKC - ζ e λ), porém a função destas proteínas no transporte de glicose ainda não está bem estabelecida (CARVALHO; SAAD, 1998; KUPRIYANOVA; KANDOR, 1999; YENUSH; WHITE, 1997; SAAD; HARTMANN et al., 1995a).

A ação insulínica pode ser afetada de maneiras diferentes por estados fisiológicos ou fatores circulantes. A secreção ou administração em excesso de glicocorticóides, glucagon, catecolaminas e hormônio de crescimento induz resistência à insulina, presente tanto em humanos quanto em animais. Condições fisiológicas como a gestação e o "envelhecimento" também apresentam resistência à insulina. Com o uso de anticorpos específicos anti-receptor de insulina, anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-PI 3-quinase e antifosfotirosina, demonstrou-se, em cultura de células e em tecidos animais, que a resistência à insulina pode estar associada a alterações nas primeiras etapas da ação

insulínica após a ligação do hormônio ao seu receptor (CARVALHO; BRENELLI et al., 1996; SAAD; HARTMANN et al., 1995a; SAAD; HARTMANN et al., 1995b, SAAD; MAEDA et al., 1997; THIRONE; CARVALHO et al., 1997; VERSPOHL; AMMON, 1980).

Diversos estudos epidemiológicos realizados indicam a ligação, tanto da obesidade quanto do DM tipo 2, a um estado de inflamação subclínico, onde encontramos elevação do nível sérico de diversas citocinas inflamatórias (PICKUP, 2004). Hoje entendemos os adipócitos como células imunológicas ativas, produtoras de citocinas, que também possuem ação reguladora do mecanismo (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005).



Esquema 01 – Fatores desencadeantes e citocinas envolvidas na resposta inflamatória.

A primeira molécula a ligar os sistemas imune e metabólico foi o fator de necrose tumoral α (TNF α), (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993). Esta interleucina inflamatória foi descrita inicialmente como o princípio ativo que levava à

necrose tumoral em animais com infecção bacteriana (GRAY; AGGARWAL et al., 1984; PENNICA; NEDWIN et al., 1984).

Posteriormente foi identificada como mediador da hipertrigliceridemia e caquexia, observados em animais cronicamente parasitados (BEUTLER; MILSARK; CERAMI, 1985). Como todas as interleucinas, possui um grande número de ações fisiológicas, e desencadeia suas funções intracelulares a partir da ligação com seus receptores de membrana (HELLER; KRONKE, 1994).

Estudos realizados em modelos de animais com obesidade, e também em humanos obesos, mostraram uniformemente um aumento dos níveis de TNF α circulante (KATSUKI; SUMIDA et al., 1998). Nestes modelos observamos também um aumento dos níveis teciduais desta interleucina tanto em tecido adiposo quanto em tecido muscular (HOTAMISLIGIL; ARNER et al., 1995; SAGHIZADEH; ONG et al., 1996). Nos modelos animais com obesidade em que se observa menor resistência a insulina, observa-se também menor concentração sérica de TNF α (HOTAMISLIGIL; PERALDI et al., 1996). Outro achado interessante é que a administração de TNF α tanto a animais, quanto a seres humanos leva a um estado de resistência a insulina (LANG, 1992).

O grupo de evidências que define uma possível relação de causa e efeito entre TNF α e resistência à insulina, veio do estudo de modelos animais com mutação nos receptores de TNF α ou que não expressavam essa interleucina. Estes animais mostraram-se protegidos do desenvolvimento de resistência à insulina associada à obesidade, fosse ela dieteticamente ou geneticamente determinada. Mesmo o camundongo ob/ob, apesar de não ter sensibilidade à insulina, apresentou grande melhora (UYSAL; WIESBROCK et al., 1997).

Um dos principais mecanismos, de resistência à insulina, descritos é a fosforilação do IRS-1 em serina, notadamente a da posição 307. Isto impede que o IRS-1 seja posteriormente fosforilado em tirosina, e retrogradamente inibe a atividade tirosina-quinase do receptor de insulina. Duas serinas-quinases serão implicadas nesta ação, a JNK1 e o complexo IKK. Sendo este, possivelmente, um dos mecanismos moleculares pelo qual $TNF\alpha$ leva ao desenvolvimento de resistência à insulina (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005). Além disso, a $TNF\alpha$ é capaz de ativar um fator de transcrição chamado NF κ B que faz alça de retro-alimentação positiva na via inflamatória, aumentando a transcrição de diversas interleucinas relacionadas ao aparecimento de resistência à insulina, inclusive do próprio $TNF\alpha$.

Após a descoberta deste comportamento do $TNF\alpha$, outras interleucinas pró-inflamatórias mostraram-se capazes de ativar vias celulares relacionadas ao desenvolvimento de resistência à insulina, como IL6 e a IL-1B. Desta forma, estabeleceu-se uma relação de causa e efeito entre a ativação das vias inflamatórias e à obesidade com posterior desenvolvimento de resistência à insulina (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005).

A busca por explicações sobre os processos envolvidos na fisiopatologia do diabetes tem revelado fatores surpreendentes que participam na prevenção e desenvolvimento desta doença. Um grande exemplo é o óxido nítrico.

1.2 Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) é um gás, que apresenta um elétron desemparelhado na sua estrutura, portanto, é um radical livre. O NO foi inicialmente identificado como um dos

poluentes atmosféricos antes de ser implicado em funções biológicas nos mamíferos. Posteriormente, o NO foi identificado como sendo a molécula sinalizadora, proveniente do endotélio vascular, responsável pela dilatação dos vasos sanguíneos (PALMER; FERRIGE; MONCADA et al., 1987; IGNARRO; BUGA et al., 1987); Há mais de um século, a nitroglicerina vinha sendo utilizada como droga no tratamento da angina pectoris, mas o mecanismo de ação da droga era desconhecido.

Os experimentos que levaram à descoberta do NO como sinalizador no relaxamento vascular renderam aos pesquisadores Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro e Ferid Murad o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina de 1998. Um passo importante para o estudo dos efeitos do NO nos sistemas biológicos foi a identificação de enzimas capazes de sintetizá-lo.

Eram conhecidos os efeitos do NO exógeno, mas a afirmação deste como um mensageiro químico nos sistemas biológicos, ficou clara após a identificação das enzimas sintetizadoras de óxido nítrico (nitric oxide synthase, NOS).

1.3 Enzimas Sintetizadoras de Óxido Nítrico (NOS)

As enzimas sintetizadoras de NO receberam originalmente nomes derivados do local onde foram identificadas. Existem três isoformas conhecidas: a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (FORSTERMANN; CLOSS et al., 1994). As isoformas endotelial e neuronal são consideradas constitutivas, por serem expressas em condições fisiológicas basais. A atividade enzimática destas duas isoformas é dependente de cálcio/calmodulina (Ca^{2+}/CaM), portanto controlada pelas variações da concentração de cálcio intracelular. A

isoforma induzível de NOS é assim chamada por ser expressa quando as células são estimuladas por fatores específicos, como citocinas e lipopolissacarídeos (LPS). Diferente de eNOS e nNOS, iNOS é independente, ou ao menos, pouco dependente das concentrações de cálcio intracelular (GELLER; LOWENSTEIN et al., 1993), sendo sua atividade controlada principalmente pela expressão da enzima.

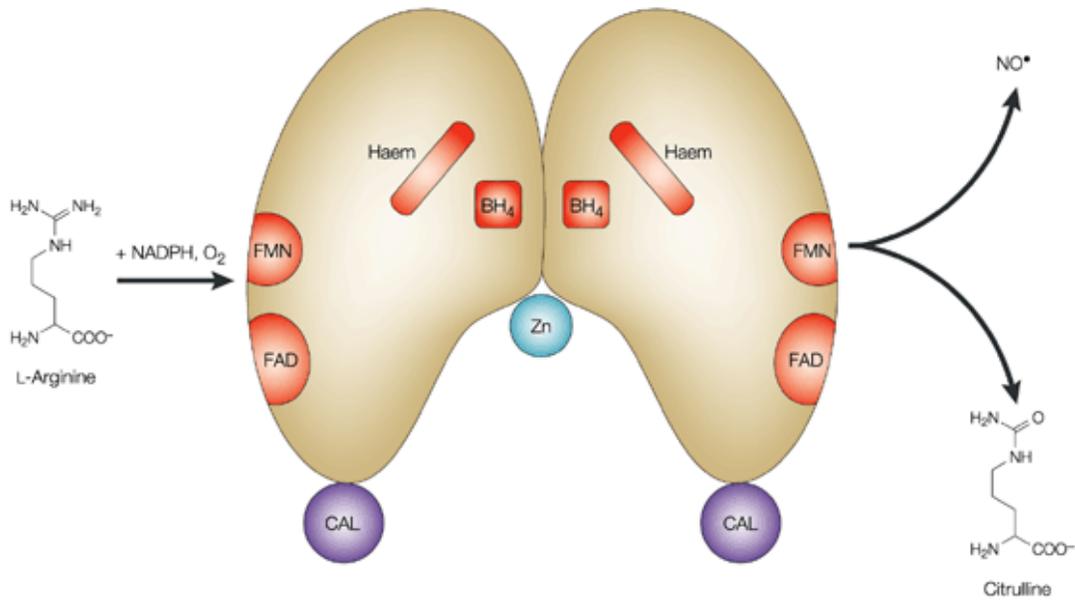
Outras nomenclaturas para as enzimas sintetizadoras de NO são: NOS1, NOSI, ncNOS e bNOS para a isoforma neuronal; NOS2, NOSII e macNOS para a isoforma induzível e NOS3, NOSIII e ecNOS para a isoforma endotelial (FORSTERMANN, 2000).

Em sua estrutura, as enzimas NOS apresentam um domínio C-terminal transportador de elétrons, denominado domínio redutor, um domínio ligante da calmodulina e um domínio oxidante que forma o sítio catalítico da molécula (FÖRSTERMANN, 2000). No domínio redutor, encontram-se os sítios de ligação para o co-substrato fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADPH) e para os cofatores flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN). No domínio oxidante, encontram-se os sítios de ligação para os cofatores ferroprotoporfirina IV (Heme), tetraidrobiopterina (H4B), co-substrato O₂ e para o substrato L-arginina (STUEHR; GHOSH, 2000).

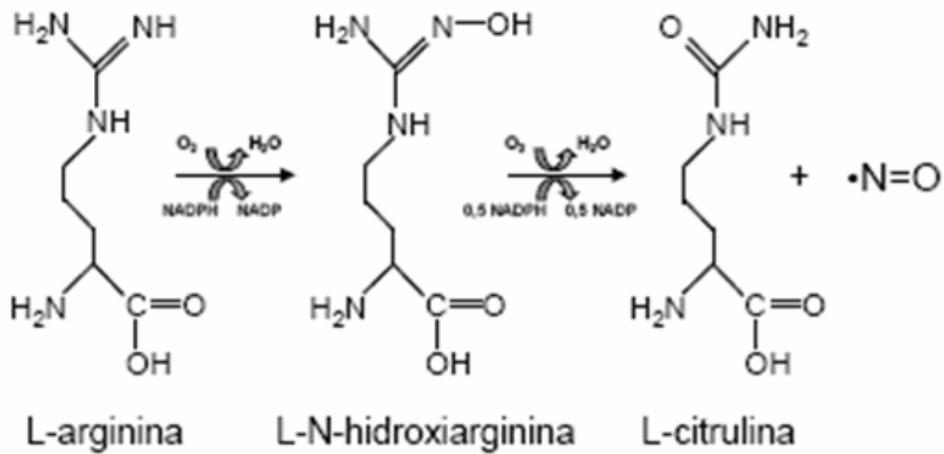
Entre os domínios redutor e oxidante, encontra-se o domínio de ligação da calmodulina. Próximo à porção de ligação da FMN, existe uma sequência (alça) de auto-inibição que controla a ligação da calmodulina. Durante a síntese de NO as flavinas adquirem elétrons do NADPH e os transfere para o ferro do grupamento heme, permitindo a ligação do oxigênio e catalisando a produção do NO a partir da L-arginina (STUEHR, 1997). Em nNOS e eNOS, esta transferência de elétrons é induzida pela ligação da CaM, diferente de iNOS, onde a ligação da calmodulina se dá de maneira quase que irreversível (CHO; XIE et al., 1992). Além disso, iNOS não apresenta o segmento de auto-inibição do

sítio de ligação da calmodulina (SALERNO; HARRIS et al., 1997). Estas observações são consistentes com o fato de que iNOS produz altas doses de NO quando expressa.

A síntese de NO pela família da NOS, dá-se através da oxidação da L-arginina formando L-citrulina. O processo pode ser descrito da seguinte forma: A L-arginina é inicialmente hidroxilada ao intermediário L-N-hidroxiarginina, em seguida ocorre oxidação da L-N-hidroxiarginina formando L-citrulina com geração concomitante de óxido nítrico, como demonstrado no esquema 02.



Nature Reviews | Drug Discovery



Esquema 02 – Síntese de Oxido Nítrico a partir da L-arginina catalisada pela NO Sintase.
Adaptado de Patrick Vallance & James Leiper. Nature Reviews Drug Discovery, 2002.

Alguns autores sugerem a existência de uma quarta isoforma de NOS, exclusivamente presente nas mitocôndrias, denominada de isoforma mitocondrial (mtNOS) (GHAFOURIFAR; RICHTER, 1997; LACZA; SNIPES et al., 2003), no entanto, a sua existência como uma isoforma diferente de eNOS ou iNOS ainda é controversa (ZANELLA; GIORDANO et al., 2004; LOPEZ; ESCAMES et al., 2006).

Embora a participação do óxido nítrico nas funções fisiológicas dos mamíferos seja reconhecida, a produção de alta concentração de NO, como a que se segue após a expressão da iNOS, pode influenciar negativamente outras funções biológicas.

Além disso, compostos químicos gerados em decorrência da reatividade do NO com outras moléculas, por exemplo as espécies reativas de oxigênio, podem gerar efeitos biológicos indiretos.

1.4 Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS) e Resistência à Insulina

A iNOS é uma proteína da via inflamatória e está relacionada à resistência à insulina. A endotoxemia é uma situação clínica relacionada à resistência à insulina, onde observamos maior produção hepática de glicose e menor captação muscular de glicose induzida por insulina (SPITZER; BAGBY et al., 1989; VIRKAMAKI; PUHAKAINEN et al., 1992). A infusão de lipopolissacarídeos (LPS), obtidos de bactérias gram-negativas, em ratos ou humanos é um modelo experimental de endotoxemia. Algumas horas após a infusão de LPS, dependendo da dose utilizada, observamos resistência à ação da insulina tanto em modelos animais quanto em humanos (VIRKAMAKI; YKI-JARVINEN 1995; AGWUNOBI; REID et al., 2000). Os mecanismos moleculares desta resistência à insulina induzida pela endotexemia ainda não foram completamente esclarecidos.

Estudos demonstram a expressão de iNOS tecidual aumentada após estímulo com certas interleucinas e depois da infusão de LPS. A iNOS parece estar relacionada ao controle de infestações intracelulares, tendo ação bactericida e bloqueadora da via metabólica de certos patógenos (BOGDAN, 2001). Inicialmente descrita em macrófagos, pode ter sua expressão tecidual induzida em vários tecidos diferentes, inclusive em tecidos insulino-sensíveis, como muscular, adiposo e hepático (KURREK et al., 1995; RIBIERE et al., 1996; KAPUR et al., 1997). Em tecido muscular a indução da iNOS parece estar associada ao desenvolvimento de resistência à insulina. O tratamento de culturas de células musculares com LPS, TNF- α e interferon- γ (IFN- γ) levou à diminuição da captação de glicose induzida por insulina, em paralelo ao aumento da expressão da iNOS. Este efeito sobre a captação de glicose foi impedido com o tratamento concomitante de um bloqueador da iNOS, a saber, aminoguanidina. Houve também redução da resistência à insulina induzida pela infusão de LPS quando os animais foram tratados com Aminoguanidina (BEDARD; MARCOTTE; MARETTE, 1997).

Finalmente, há aumento da expressão da iNOS em músculo de modelos animais de diabetes e obesidade, como os ratos Zucker e os camundongos ob/ob. O tratamento com aminoguanidina também atenuou a resistência à insulina observada nestes animais (SHIMABUKURO; OHNEDA et al., 1997; PIERCY; TOSELAND; TURNER, 1998).

Este aumento da expressão da iNOS em modelos experimentais de obesidade sugere que esta é outra via da resposta imune inata que está ativada na obesidade, podendo ter participação fisiopatológica no desenvolvimento de resistência à insulina, de forma semelhante às vias inflamatórias anteriormente descritas.

Em 1997, Marete e seus colaboradores descreveram que tanto o NO liberado por drogas doadoras de NO, quanto o produzido pela iNOS, leva à diminuição da captação de glicose, tanto por células musculares em cultura, quanto por tecido muscular isolado de ratos. Estes achados sugerem uma participação direta do NO na indução da resistência à insulina a partir do aumento da expressão da iNOS. Além disso, mostraram que a resistência à insulina secundária a infusão de LPS, estava diretamente relacionada ao aumento da expressão da iNOS e maior produção de NO, em cultura de células musculares e em tecido muscular isolado de ratos (KAPUR; BEDARD et al., 1997).

Mais tarde em 2001, o mesmo grupo mostrou que camundongos geneticamente modificados, que não expressam a iNOS, não desenvolvem resistência à insulina apesar de ganharem peso quando submetidos à dieta hiperlipídica. Esta proteção metabólica está relacionada a uma preservação da capacidade da insulina de ativar o IR e a Akt no tecido muscular destes animais (PERREAULT; MARETTE, 2001).

Estes dados sugerem uma estreita relação entre a via de sinalização da iNOS com a via de sinalização da insulina, com uma possível regulação negativa da primeira em relação a segunda. No entanto, o efeito de inibidores farmacológicos da iNOS na resistência à insulina não foi totalmente elucidado.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi sintetizar derivados inéditos da isotiouréia, suficientemente seletivos e potentes, caracterizá-los através de métodos cromatográficos e de ressonância magnética nuclear, investigar e demonstrar o efeito destas novas moléculas como inibidores farmacológicos seletivos da iNOS, na sensibilidade e sinalização insulínica em fígado, músculo esquelético e tecido adiposo de animais induzidos à obesidade por tratamento com dieta hiperlipídica.

3. DESENHO EXPERIMENTAL

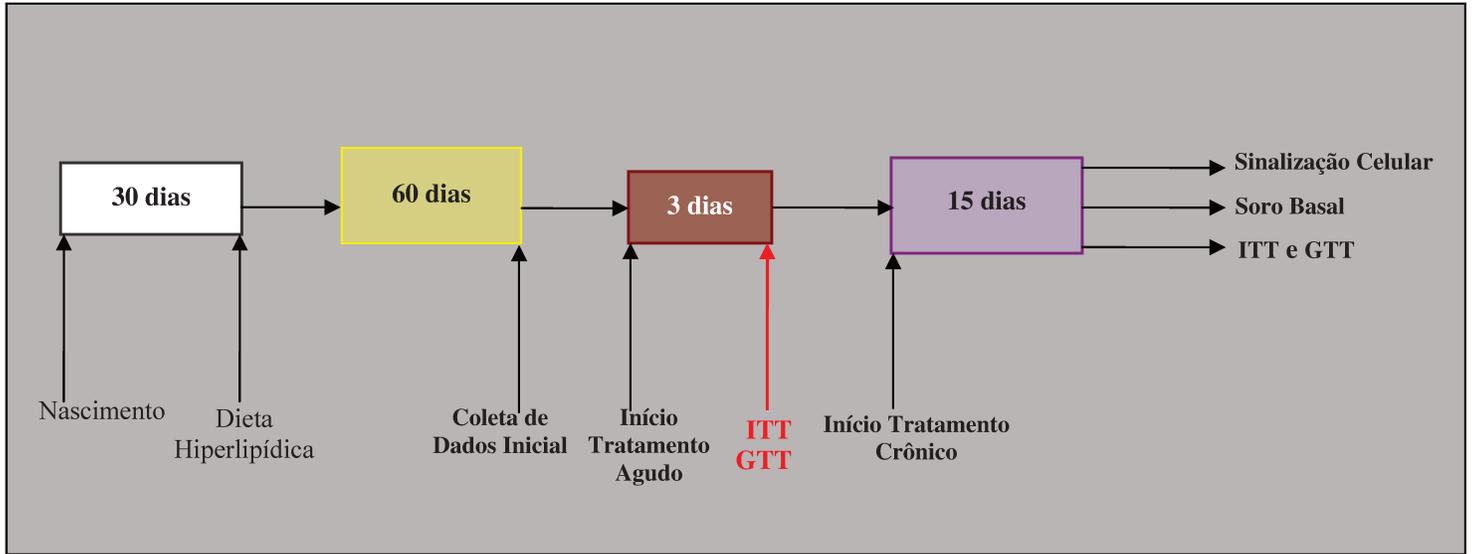


Figura 03. ↑ Intervenções e coleta de dados: Glicemia (mg/dl); Peso médio (g); N = 24 camundongos (4 Grupos)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais Experimentais

Todos os animais foram obtidos do Biotério Central da Unicamp (CEMIB) e mantidos em caixas individuais sob condição padronizada de iluminação (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. O tratamento foi ministrado de forma aguda, durante três dias, uma dose ao dia na concentração de 5,0 mg/kg pelo método de gavagem com aproximadamente 0,2 ml. Os procedimentos, como remoção de tecidos, foram realizados após o tratamento crônico de quinze dias com a droga e/ou placebo na água de ingesta dos animais, sendo I-SMT 5 mg/kg por dia o mesmo que 1 g/litro.

Foram utilizados camundongos Swiss macho com quatro semanas que receberam dieta regular, ração padrão para roedores (Purina), e água ad libitum. Esses animais foram divididos randomicamente em dois grupos; aqueles tratados com I-SMT e aqueles tratados com Placebo.

O mesmo modelo animal, com a mesma idade foi randomizado e recebeu dieta hiperlipídica (elaborada em nosso laboratório) por 8 semanas e água ad libitum. Esses animais foram divididos da mesma forma; aqueles tratados com I-SMT e aqueles tratados com Placebo.

A tabela abaixo sugere a composição da dieta hiperlipídica utilizada:

Componentes	Dieta Hiperlipídica (g/kg)
Gordura de Porco	330,00
Amido	123,50
Sacarose	100,00
Dextrina	132,00
Caseína	200,00
L-cisteína	3,00
Cloridrato de Colina	2,50
Óleo de Soja	0,00
Mistura de Sais	35,00
Mistura de Vitaminas	30,00
Fibras	50,00

Assim os animais foram randomicamente divididos em quatro grupos:

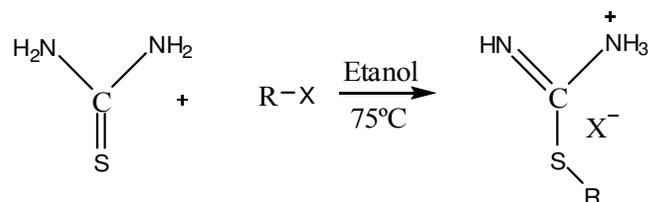
- Grupo Droga + Dieta Padrão: Camundongos que receberam tratamento com a droga e ração comercial para roedores;
- Grupo Placebo + Dieta Padrão: Camundongos que receberam tratamento com o Placebo (veículo) e ração comercial para roedores;
- Grupo Droga + Dieta Hiperlipídica: Camundongos que receberam dieta hiperlipídica e tratamento com a droga;
- Grupo Placebo + Dieta Hiperlipídica: Camundongos que receberam dieta hiperlipídica e tratamento com o Placebo (veículo).

Os compostos testados foram sintetizados no laboratório do professor Dr. Roberto Rittner (Instituto de Química da Unicamp) a partir da tiouréia. Esses compostos foram

sintetizados, analisados e tiveram determinação de pureza por HPLC, espectrofotometria de massa e ressonância magnética nuclear (^1H) e (^{13}C).

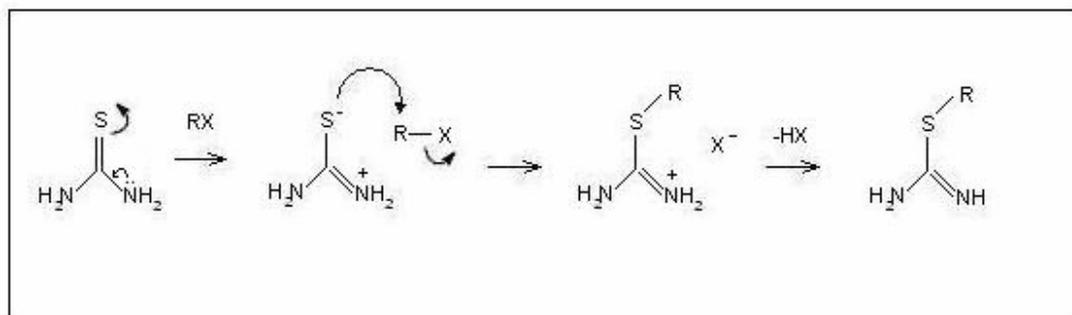
4.2 Síntese dos Compostos

Os compostos (1–4) foram sintetizados pela reação da tiouréia com o haleto correspondente - Reação 1 (S PRAGUE; JOHNSON, 1937), apresentando mecanismo geral semelhante (Reação 2).



R = (1) $\Phi\text{C}(\text{H})\text{CH}_3$, (2) CH_3 , (3) L-mentila e (4) $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$; X=Cl, Br ou I

Reação 1. Rota sintética dos derivados da tiouréia.



Reação 2. Mecanismo geral da reação.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de H^1 e C^{13} foram obtidos através do aparelho Bruker Avance DPX 250 (250 MHz para o ^1H e 63 MHz para o ^{13}C).

Preparo das Isotiouréias

- **Síntese fenil-etil-isotiouréia:**

Utilizando um balão de fundo redondo acoplado a um condensador de refluxo, adicionou-se a solução contendo Tiouréia (5,58 g; 0,90 mmol) e etanol 95% (40 ml); após a dissolução completa do composto foi acrescentado lentamente bromoetilbenzeno (10,3 g; 0,56. mmol). A solução foi deixada sob refluxo e agitação em banho de silicone a 75°C por 20 h. Ao término deste período e com a solução à temperatura ambiente, adicionou-se benzeno (20 ml) sendo observada a formação de um líquido viscoso de coloração amarelada. O benzeno foi rota-evaporado. A extração foi realizada com água e acetato de etila (1:1) (3 x 20 ml). Foi adicionado à fase orgânica sulfato de sódio anidro e deixado em repouso por 20 minutos. A solução foi filtrada e o solvente rota-evaporado. A recristalização foi realizada em acetona à 0°C, a solução foi filtrada em Buchner e o precipitado recolhido.

- **Síntese metil-isotiouréia:**

Utilizando um balão de fundo redondo acoplado a um condensador de refluxo, adicionou-se Tiouréia (2,79 g; 0,45 mmol) e etanol 95% (20 ml) após a dissolução do composto foi acrescentado lentamente iodeto de metila (3,97 g; 0,28 mmol). A solução foi deixada sob refluxo e agitação em banho de silicone à 75°C por 20 h. Ao término deste período e com a solução a temperatura ambiente, adicionou-se 20 ml benzeno sendo observado a formação de um líquido viscoso de coloração âmbar. O benzeno foi rota-evaporado. A extração foi realizada com água e acetato de etila (1:1), (3 x 20 ml). À fase

orgânica foi adicionado sulfato de sódio anidro sendo deixado em repouso por 20 minutos. A solução foi filtrada e o solvente evaporado. O composto foi recristalizado em acetato de etila à 0°C, a solução foi filtrada em Buchner e o precipitado foi recolhido.

- **Síntese mentil-isotiouréia:**

Não se observou reação direta entre L-mentol e a tiouréia (S PRAGUE; JOHNSON, 1937), sendo necessária à síntese prévia do cloreto de mentila (VOGEL'S, 1989). Utilizando um balão de fundo redondo acoplado com um condensador de refluxo e um funil de adição, adicionou-se o cloreto de mentila (89,8 g; 750 mmol) ao mentol (43,5 g; 250 mmols), por aproximadamente 1h, sendo deixado em refluxo durante 4 h à 80°C. Após o resfriamento da solução (temperatura ambiente), a mesma foi neutralizada, usando bicarbonato de sódio, obtendo 43,9 g de cloreto de mentila (rendimento de 93%). O cloreto de mentila previamente preparado (36 g; 159,6 mmol) foi adicionado lentamente à solução de tiouréia (10,2 g; 5,1 mmol) e etanol 95% (40 ml) em um balão de fundo redondo acoplado com um condensador de refluxo, sendo deixado sob refluxo e agitação por 40 h a 75°C. Ao término deste período e com a solução a temperatura ambiente, adicionou-se benzeno (20 ml) sendo observada a formação de um líquido viscoso de coloração âmbar. O benzeno foi rota-evaporado. A extração foi realizada com benzeno e acetato de etila (1:1), (3 x 20 ml). À fase orgânica foi adicionado sulfato de sódio anidro sendo deixada em repouso por 20 min. A solução foi filtrada em funil de Buchner e o solvente evaporado. Foi utilizado acetonitrila à temperatura de aproximadamente 70°C para efetuar a recristalização, a solução foi deixada em repouso por 24h à temperatura ambiente, sendo posteriormente filtrada e o precipitado recolhido.

- **Síntese isopropil-isotiouréia:**

Utilizando um balão de fundo redondo acoplado a um condensador de refluxo, adicionou-se a solução contendo Tiouréia (2,79 g; 0,45 mmol) e etanol 95% (20 ml). Após a dissolução do composto acrescentou-se lentamente iodeto de isopropila (5,13 g; 0,28 mmol). A solução foi deixada sob refluxo e agitação em banho de silicone a 75°C por 20 h. Ao término deste período e com a solução a temperatura ambiente, adicionou-se benzeno (20 ml) sendo observada a formação de um líquido viscoso de coloração amarelada. A extração foi realizada com água e acetato de etila (1:1), (3 x 20 ml). À fase orgânica foi adicionado sulfato de sódio sendo deixado em repouso por 20 min. O composto foi recristalizado em clorofórmio, a solução foi filtrada e o precipitado foi recolhido.

4.3 Soluções Utilizadas

- Tampão de extração (extrato total): foi utilizado para a extração das proteínas celulares dos tecidos estudados, contém: Trisma base pH 7,5 (hidroximetil amino metano) 100 mM, SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, EDTA (Ácido etileno-diamino tetracético) 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, pirofosfato de sódio 10 mM e ortovanadato de sódio 10 mM. O ortovanadato foi colocado no momento de utilização do tampão.
- Tampão de Laemmli (5X): foi usado para estocar o material extraído e sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida para eletroforese (SDS-PAGE), contém: azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%.

- Solução tampão utilizada na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): Trisma base 200 mM, glicina 1,52 M, EDTA 7,18 mM e SDS 0,4%. A solução é diluída 1:4 no momento de uso.
- Solução tampão para transferência: empregada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose, contém: Trisma base 25 mM, glicina 192 mM, Metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Mantida em estoque a 4°C.
- Solução tampão para SDS-PAGE - Gel de resolução (resolving): EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 750 mM, pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.
- Solução tampão para SDS-PAGE - Gel da fase de empilhamento (stacking) das proteínas: EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 50 mM, pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.
- Solução basal: solução básica utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas, contém: Cloreto de sódio (NaCl) 150 mM, Trisma base 10 mM, Tween 20 0,02%.
- Solução bloqueadora: utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose, após a transferência: 5% de leite em pó desnatado e 0,02% de azida sódica, dissolvidos em solução basal.
- Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado: Trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 2 mM e Triton X-100 0,5%.

- Solução para anticorpos: solução contendo anticorpos específicos que identificam as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Contém 0,3% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal.

4.4 Reagentes e Anticorpos

Utilizamos insulina regular humana (Humulin R) adquirida da Eli Lilly. Reagentes e aparelhos para eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) adquiridos da Bio-Rad (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina e ditioneitol (DTT), Triton X-100, Tween 20, e glicerol fornecidos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA).

A membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, 0.45 µm) foi obtida da Amersham (Aylesbury, UK). O agente anestésico tiopental sódico adquirido do Lab.Cristália (Itapira/SP, Brasil). Anti-Akt [Ser473] (9271, rabbit polyclonal) adquirido da Chemicon Int. (Temecula, CA, USA).

4.5 Gavagem

Durante o tratamento agudo (3 dias) foi efetuado o procedimento de gavagem. Foi utilizada uma seringa descartável e uma agulha de metal com uma esfera na ponta (importante para inibir o erro de introduzir a agulha na traquéia do animal), para montagem do sistema de gavagem. O equipamento de gavagem está pronto quando a agulha se encontra firmemente acoplada à seringa. A agulha foi devidamente higienizada após cada administração e mantida em solução de álcool 70°GL durante seu armazenamento. O

animal imóvel teve a agulha de gavagem introduzida delicadamente pelo canto da boca, sobre a língua e sendo deslocada através do esôfago até chegar ao estômago. Por ser uma técnica invasiva optamos, no tratamento crônico (15 dias), pela administração da droga na água de ingesta, evitando possíveis reações inflamatórias que poderiam atrapalhar os resultados do estudo.

4.6 Determinação de Glicose Plasmática e Insulina Sérica

Os valores de glicose foram determinados em amostras de sangue da cauda com medidor de glicose usual (Glucometer, Bayer), pelo método da glicose oxidase, como descrito previamente (TRINDER, 1969). As concentrações de insulina foram determinadas por ensaio imunoenzimático, método ELISA (LINCO).

4.7 Teste de Tolerância à Insulina (ITT)

Após o tratamento dos animais conforme descrito anteriormente, eles foram mantidos em jejum por 6 h, e depois foi coletada amostra de sangue da cauda (tempo 0), injetada insulina (2,0 UI/1000 g de peso corpóreo) na cavidade peritoneal e a seguir coletadas amostras nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para determinação da glicose plasmática. A razão da constante de decaimento da glicose, (kitt) foi calculada usando a fórmula $0.693/t_{1/2}$. A glicose $t_{1/2}$ foi calculada, usando a análise da queda do quadrado da concentração de glicose plasmática durante o decaimento da fase linear (BONORA; MANICARDI et al, 1987).

4.8 Teste intraperitoneal de Tolerância à Glicose (ipGTT)

O ipGTT foi realizado antes e no final do tratamento com I-SMT, os camundongos foram mantidos em jejum durante o período noturno (12 horas). Foi coletada a primeira amostra de sangue (tempo 0) em seguida infundida uma solução de 20% de glicose (2,0 g/kg de peso corpóreo) na cavidade peritoneal. Amostras de sangue foram então coletadas da cauda dos animais nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos e utilizadas para determinação das concentrações de glicose e insulina.

4.9 Extração de Tecidos

Os camundongos foram anestesiados por injeção intraperitoneal com tiopental sódico e então manuseados 10-15 minutos depois, ou assim que a anestesia fosse comprovada pela ausência de reflexos corneal e podal. Cinco minutos após injeção de insulina (3,8 UI/kg i.p.) foram retirados fragmentos de fígado, músculo esquelético e tecido adiposo que foram imediatamente homogeneizados, em tampão de extração adequado, com Polytron durante 30 segundos; no final da extração foi adicionado Triton X-100 1% em todas as amostras e mantidas no gelo por 40 minutos antes da centrifugação. O extrato foi então centrifugado a 14.000 rpm e 4°C por 40 minutos para remover o material insolúvel. O sobrenadante foi utilizado para análise de proteínas e immunoblotting.

4.10 Apresentação dos Dados e Análise Estatística

Todos os resultados numéricos foram demonstrados e expressos como média \pm desvio da média seguido do número de experimentos. Os resultados de “Western blot” foram apresentados com comparações diretas das bandas protéicas nas auto-radiografias, as quais foram quantificadas através de densitometria usando o programa “Scion Image” (Scion Corp). Os dados foram analisados através do teste “t de Student’s”, comparando dois grupos; a análise de variância (ANOVA) foi seguida por análise de significância (Bonferroni) quando necessário, comparando os grupos droga e placebo. A significância estatística adotada foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Síntese das Isotiouréias e inibição da iNOS

Muitos dos inibidores farmacológicos da iNOS podem ser classificados de acordo com as suas características estruturais, tais como, aminoácido-análogos, aminoácidos heterocíclicos, amidinas, guanidinas, isoquinolinaminas, e isotiouréias. Porém estes inibidores não são suficientemente seletivos e potentes contra a isoforma induzível (iNOS), o que limita sua aplicação *in vivo*. A única classe de inibidores da iNOS submetidos a ensaios clínicos com seres humanos até a presente data foi dos L-lisina análogos (YOON; RYU et. al., 2007). Esta classe de aminoácido-análogos foram sintetizados e investigados em uma série de doenças inflamatórias, contudo não foram aprovadas para o tratamento de doenças inflamatórias, devido à inibição indesejada das NOS constitutivas (eNOS e nNOS).

Alguns grupos relatam que a isotiouréia inibe a expressão da iNOS e/ou a produção de óxido nítrico (NO). Além disso, uma série de inibidores da iNOS não aminoácido-análogos também estão sendo investigados e desejados (YOON; RYU et. al., 2007). Sendo assim, inibidores seletivos da iNOS são altamente desejáveis para regular a produção excessiva de NO sem alterar ou inibir qualquer outra isoforma que possui características benéficas para as funções fisiológicas.

Neste estudo foram sintetizados derivados da isotiouréia (Figura 1A), que é uma classe de inibidores sintéticos que possuem ação comprovada como inibidor das NOS, mais especificamente da iNOS (SZABÓ et al., 1994).

Sabe-se que as isotiouréias são potente inibidores das NOS *in vitro* mas não *in vivo* devido a sua fraca penetração celular. São moléculas pequenas e extremamente hidrosolúveis o que dificulta sua passagem e conseqüente absorção pela membrana plasmática das células, constituídas de lipopolissacarídeos. Por isso nosso intuito foi

inicialmente adicionar um grupamento lipofílico ou volumoso à isotiouréia, tornando-a anfifílica ou menos polar e provavelmente melhorando sua distribuição e absorção no organismo.

Mecanismo Geral de Síntese dos Compostos Químicos (Isotiouréias)

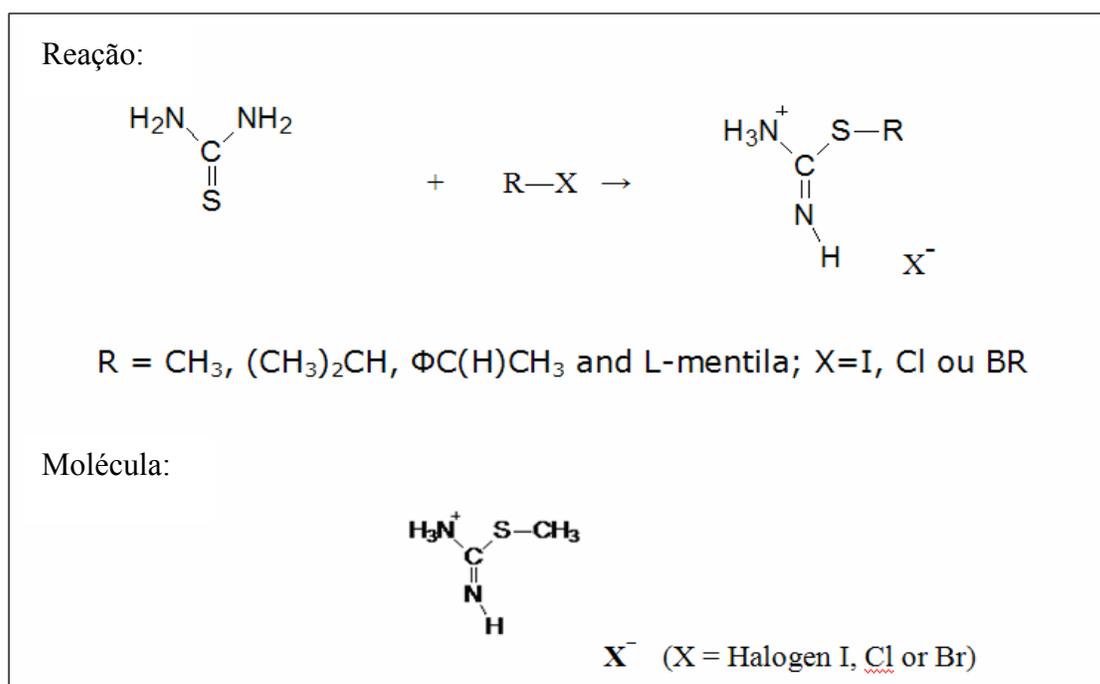
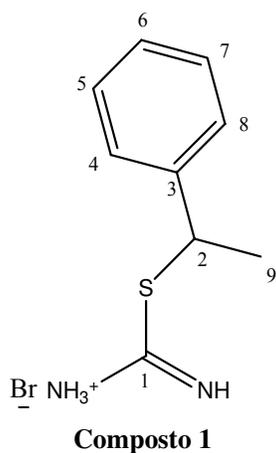


Figura 1A. Os compostos foram sintetizados pela reação da tiouréia com o haleto correspondente conforme representado.

O primeiro composto sintetizado foi o bromidrato de fenil-etil-isotiouréia (Figura 1 B e C), para testar sua ação utilizamos uma dose inicial de 3 mg/kg dia⁻¹ em camundongos swiss machos tratados com dieta hiperlipídica por 8 semanas, e foi observada uma alta mortalidade no grupo tratado com o composto. Foram testadas duas doses

subsequentes, 1,5 e 0,75 mg/kg por dia, mas a resposta foi semelhante. Devido a essa toxicidade muito elevada interrompemos o estudo com este composto.

O segundo composto sintetizado foi o iodato de metil-isotiouréia (Figura 1 D e E), que supomos, como as demais isotiouréias, possui uma ampla faixa de utilização conhecida em literatura, 0,5 – 50 mg/kg dia⁻¹, dependendo do modelo animal e da via de administração utilizada. Para determinar a dose terapêutica no modelo animal escolhido foi realizado o teste de endotoxemia com LPS e avaliação da curva de sobrevivência com as doses 10, 5 e 3 mg/kg dia⁻¹ (figura 2), determinando a menor dose com efeito protetor e maior janela terapêutica.



RMN ^1H em DMSO a 250 MHz, δ em ppm;
 9,2 (s, 1H); δ 7,5-7,4(5H, m,); 5,21 (q, 1H,
 $J=7\text{Hz}$); 1,62 (d, 3H, $J=7,2$).

RMN ^{13}C em DMSO a 250 MHz, δ em ppm;
 C_1 -168, 8; C_3 -140, 1; C_4 , 8-128, 9; C_5 , 7-129, 4;
 C_6 -127, 3; C_2 -45,3; C_8 -21,8.

Figura 1B. Fenil-etil-isotiouréia.

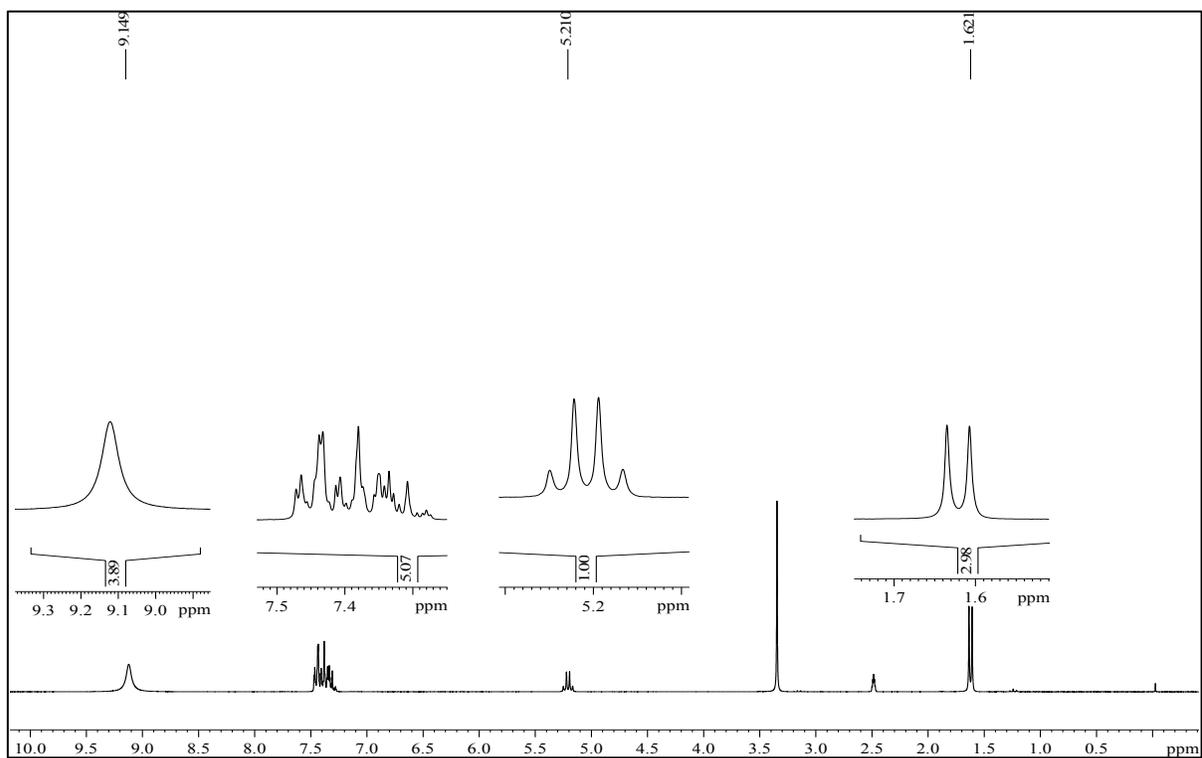
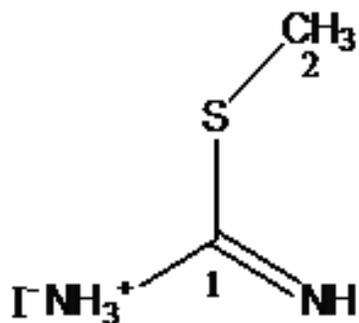


Figura 1C. Identificação - Espectro RMN ^1H da Fenil-etil-isotiouréia em DMSO à 25°C.



RMN ^1H em DMSO a 250 MHz, δ em ppm: 9,2 (s, 1H); 2,5 (s; 3H).

RMN ^{13}C em DMSO a 250 MHz, δ em ppm; C₁ 171,3; C₂ 13,4.

Figura 1D. Metil-isotiouréia.

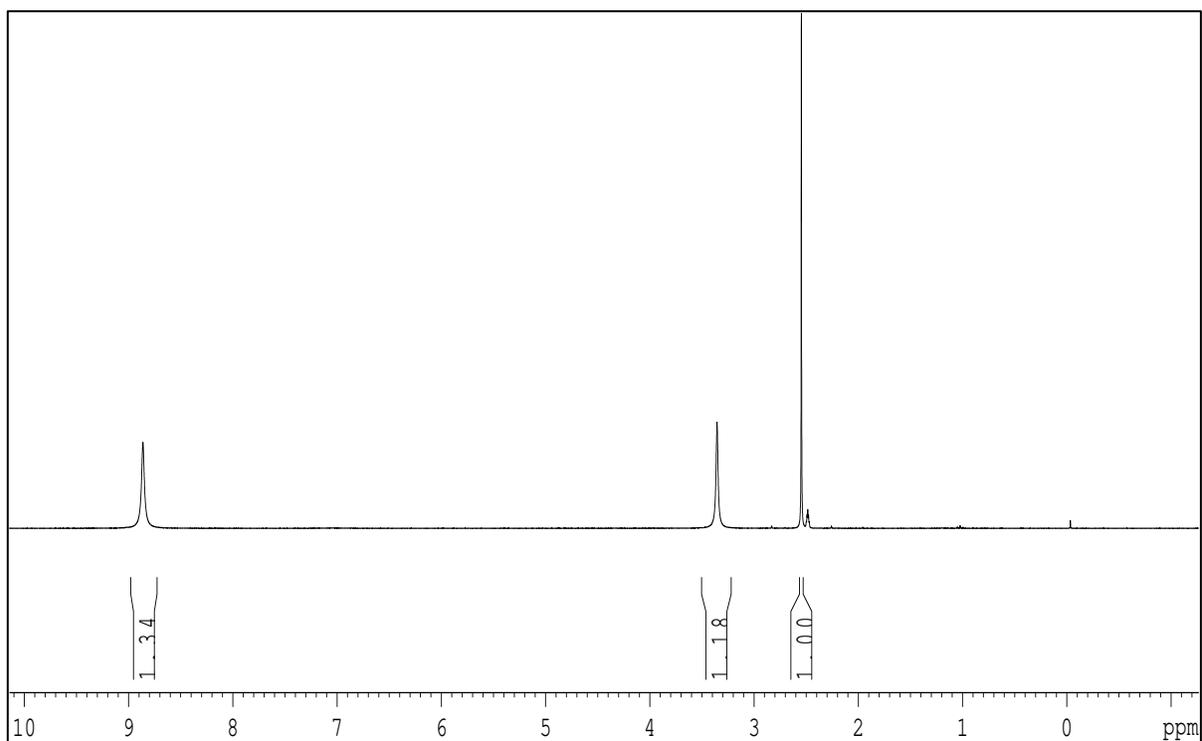


Figura 1E. Identificação - Espectro RMN ^1H da Metil-isotiouréia em DMSO á 25°C.

Curva de Mortalidade e Seleção de Dose para o Tratamento com Iodato de S-metil-isotiouréia

Camundongos swiss machos tratados com dieta padrão (DP) foram submetidos ao teste com LPS de *Escherichia coli* (20 mg/kg em dose única intraperitoneal), modelo de endotoxemia, para determinação da dose utilizada nos testes biológicos. A dose de Iodato de S-metilisotiouréia (I-SMT) escolhida foi 5 mg/kg dia⁻¹ por apresentar boa proteção (80%) e maior janela terapêutica (menor dose-resposta efetiva), evitando uma possível superdose e efeitos colaterais.

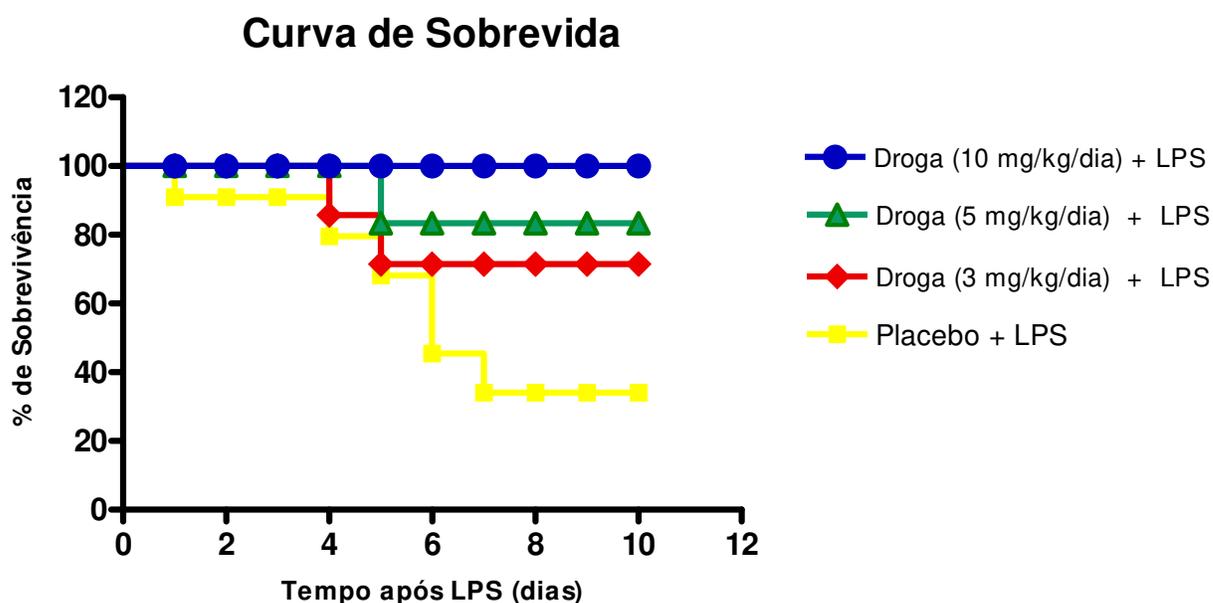


Figura 2. Efeito do I-SMT, em diversas doses, na sobrevida dos animais submetidos ao teste com LPS (20 mg/kg i.p.); n = 8–10 animais por grupo.

Peso, Ingestão Alimentar e Glicemia de Jejum ao Término do Tratamento com I-SMT

Camundongos swiss macho com quatro semanas foram submetidos à dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) por oito semanas. Após este período, os animais receberam tratamento com Iodato de S-metilisotiouréia (I-SMT) ou Placebo (PBS) por 15 dias. O peso médio dos camundongos em tratamento com I-SMT não apresentou diferença significativa estatisticamente em comparação com os animais tratados com PBS (DP I-SMT 32,6 +/- 1,5 vs DP PBS 34,8 +/- 2,3 ; DH I-SMT 49,1 +/- 1,7 vs DH PBS 52,2 +/- 2,6; $P > 0,05$, Figura 3A). A ingestão alimentar dos animais tratados com I-SMT também não diferiu dos animais tratados com PBS.

Foram determinadas, as glicemias de jejum inicial (antes do tratamento), durante o tratamento (15 dias) e o mesmo período após seu término, totalizando o acompanhamento de 30 dias para avaliação do efeito da droga. A glicemia de jejum dos animais tratados com I-SMT apresenta valores significativamente mais baixos em comparação com os animais tratados com PBS, $P < 0,05$ (Figura 3B).

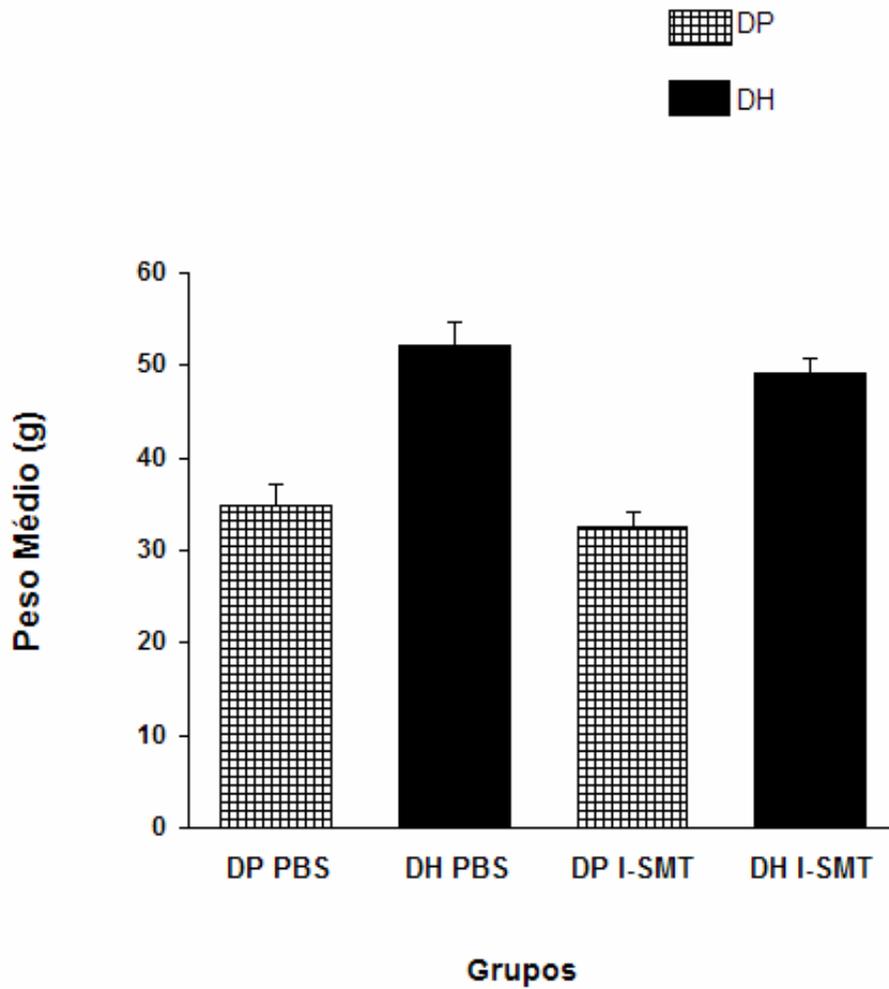


Figura 3A. Peso médio dos camundongos após 15 dias de tratamento com I-SMT e PBS, iniciado após oito semanas em dieta hiperlipídica. Diferenças não estatisticamente significativas; em todos os experimentos $n = 6-8$ animais.

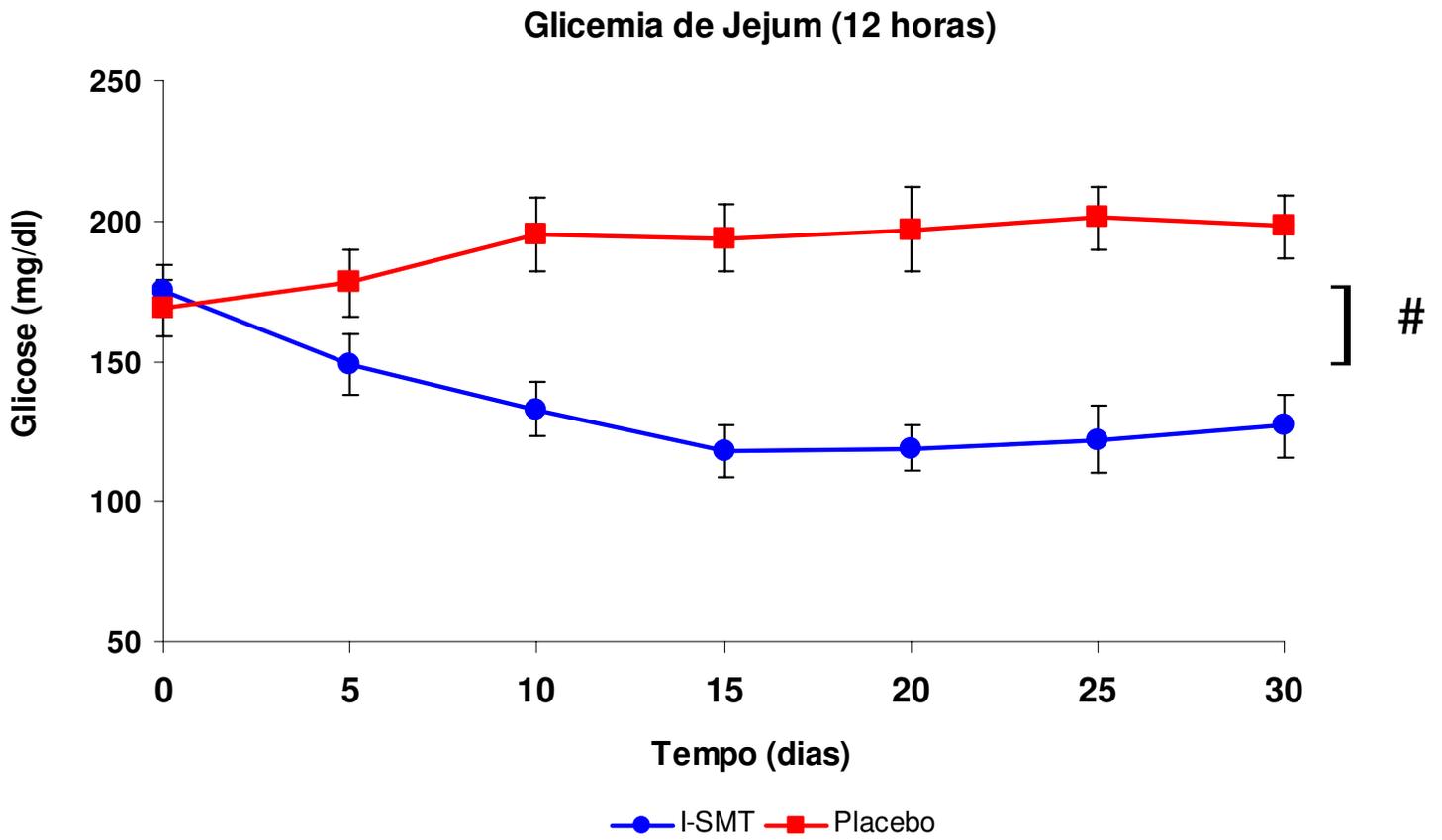


Figura 3B. Glicemia de jejum dos animais em DH, durante o tratamento (15 dias) e após o mesmo período com I-SMT ou Placebo. Em todos os experimentos n= 6-8 animais, # P<0,05.

Melhora na Sensibilidade à Insulina e Tolerância à Glicose em Animais Tratados com I-SMT

A sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose foram investigadas através dos testes intraperitoneais de tolerância à insulina (ITT) e de tolerância à glicose (GTT), respectivamente. Foram determinados também os níveis de insulina durante alguns pontos do GTT. A taxa de decaimento da glicose após infusão de insulina (Kitt) foi significativamente maior nos animais tratados com I-SMT em relação aos animais tratados com PBS (DH I-SMT 7,33 +/- 0,30 vs DH PBS 3,40 +/- 0,42; DP I-SMT 7,64 +/- 0,35 vs DP PBS 5,60 +/- 0,44; # P<0,05, Figura 4A), demonstrando que os animais tratados com I-SMT, um inibidor seletivo da iNOS, estão protegidos de resistência à insulina.

No GTT, após infusão de glicose, os níveis de glicose sanguínea do grupo DH I-SMT apresentaram uma acentuada queda vs. o grupo DH PBS, durante todo o teste; indicando proteção contra o desenvolvimento de intolerância à glicose. Neste trabalho foi realizado o GTT inicial, antes do início do tratamento com a droga, como parâmetro comparativo, para avaliar as conseqüências da DH no animal (Figura 4B). Este teste foi realizado nos mesmos animais após tratamento com a droga I-SMT ou placebo PBS permitindo uma dupla correlação, entre eles e entre os quatro grupos avaliados. Em todos os tempos do GTT pós-tratamento, os níveis glicêmicos dos animais tratados com I-SMT foram menores do que os animais que receberam o Placebo (Figura 4C), indicando que o tratamento com I-SMT (5mg/kg dia⁻¹) por 15 dias protegeu os camundongos da intolerância à glicose desencadeada pela DH. Além disso, observamos a mesma correlação na redução significativa dos níveis séricos de insulina durante o GTT, # P<0,05 (Figura 4D).

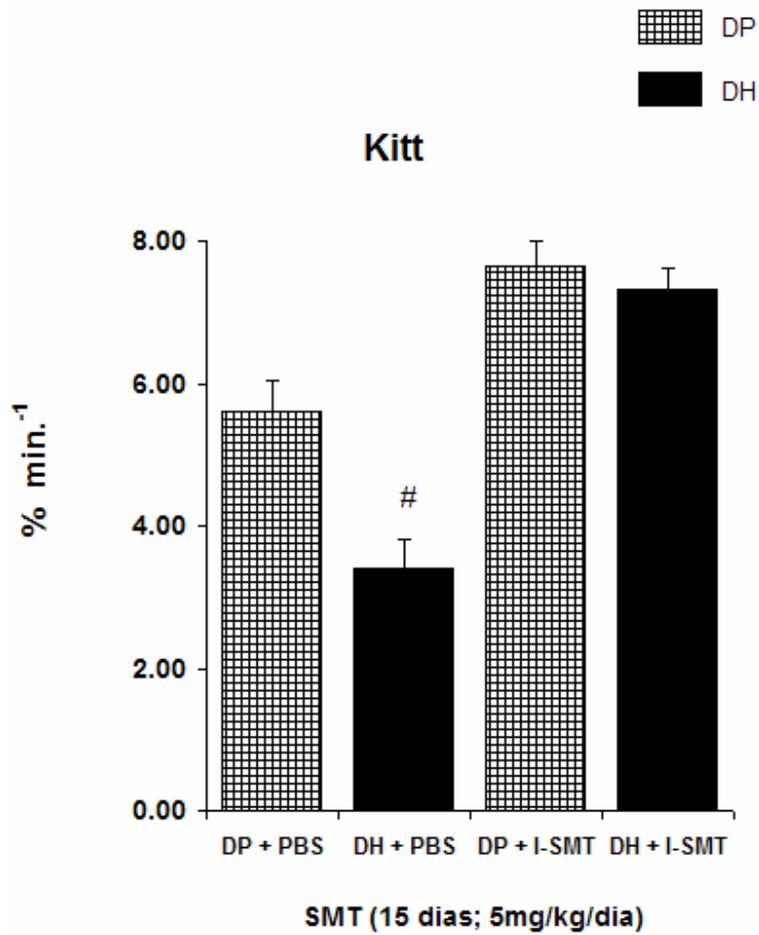


Figura 4A. Kitt – taxa de decaimento de glicose após infusão de insulina intraperitoneal, após o tratamento dos camundongos com I-SMT ou Placebo. Em todos os experimentos n= 6-8 animais. # P<0,05 (DH PBS vs todos os outros grupos).

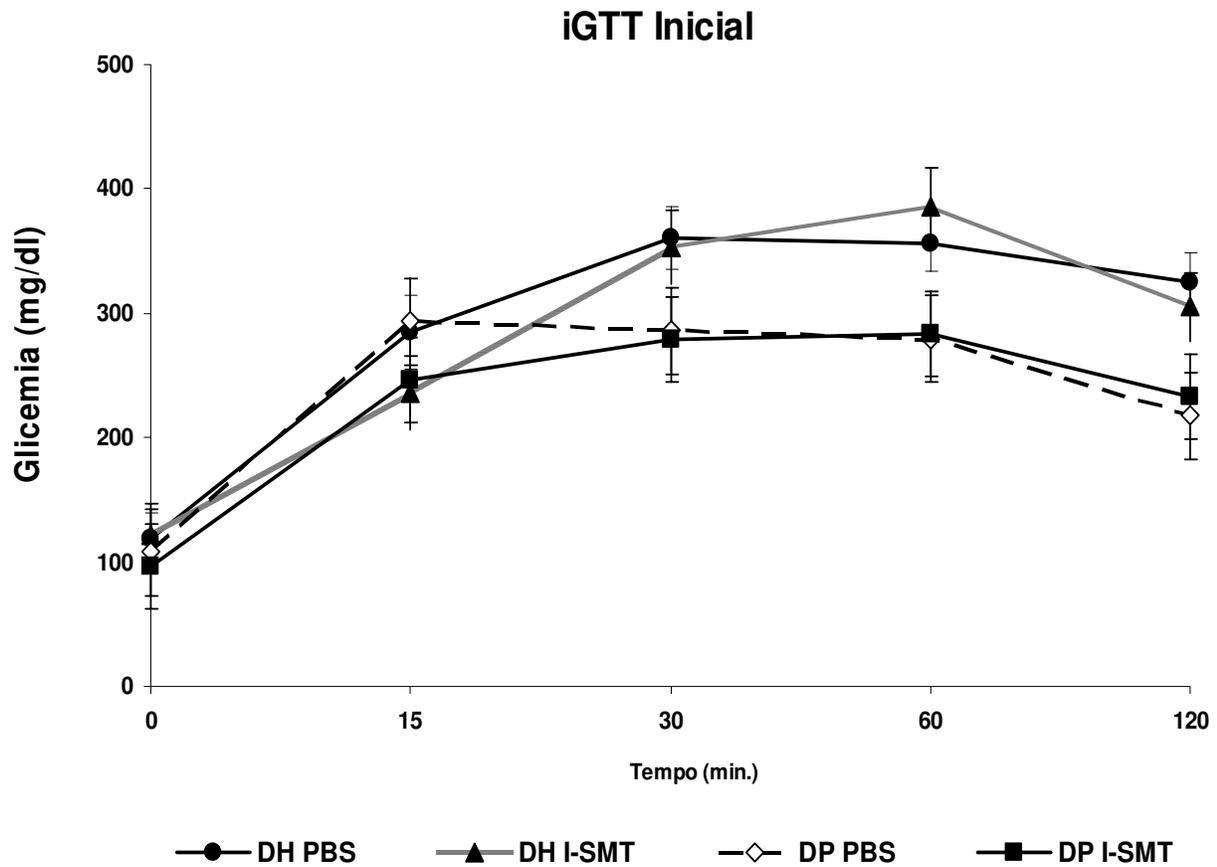


Figura 4B. GTT inicial, com 8 semanas de DH após infusão de glicose intraperitoneal (2g/kg de peso corpóreo), antes do tratamento com I-SMT ou Placebo. Em todos os experimentos n= 6-8 animais.

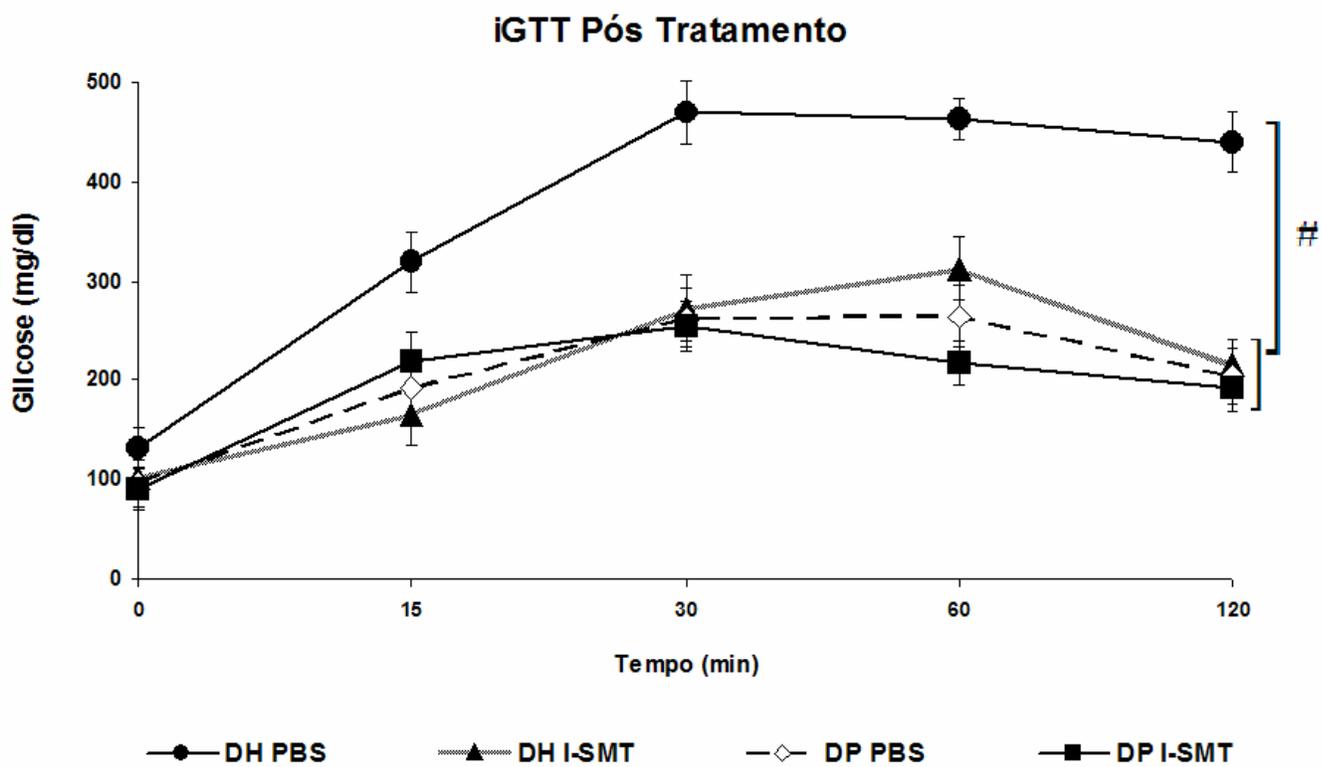


Figura 4C. GTT, após infusão de glicose intraperitoneal (2g/kg de peso corpóreo), depois do tratamento com I-SMT ou Placebo. Em todos os experimentos n= 6-8 animais. # P<0,05 (DH PBS vs todos os outros grupos).

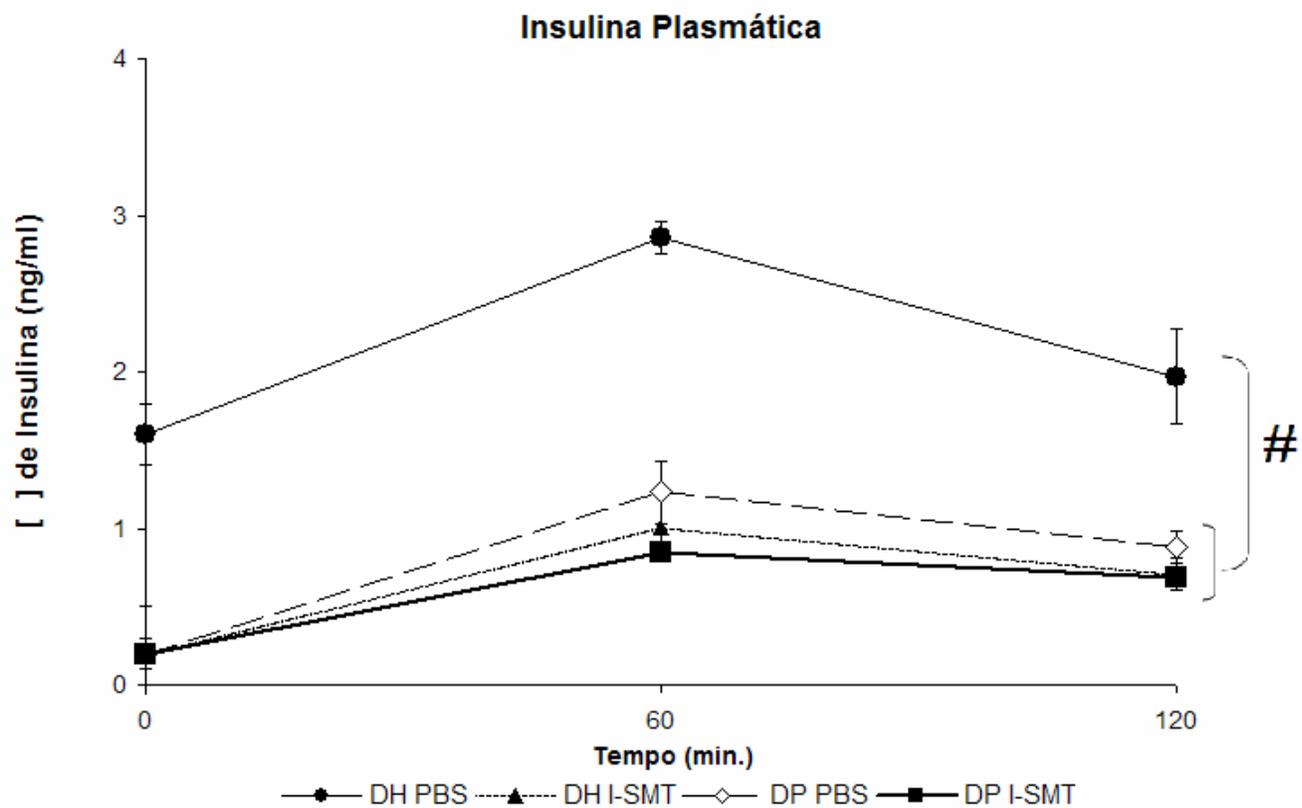


Figura 4D. Níveis séricos de insulina durante o GTT, depois do tratamento com I-SMT ou Placebo. Em todos os experimentos n= 6-8 animais. # P<0,05 (DH PBS vs todos os outros grupos).

Sinalização Insulínica em Fígado, Músculo e Tecido Adiposo de Animais Tratados com I-SMT

A Akt é uma serina/treonina quinase que modula diversas ações metabólicas da insulina, incluindo transporte de glicose, síntese protéica e de glicogênio (UEKI; YAMAMOTO-HONDA et al. 1998; JIANG; ZHOU et al. 2003). Para estudar os efeitos do tratamento com I-SMT sobre a Akt, realizamos um ensaio para medir o grau de fosforilação da Akt em serina 473, com e sem estímulo por insulina em fígado, músculo e tecido adiposo dos animais estudados. Como esperado a fosforilação em serina da Akt induzida por insulina estava reduzida em animais que receberam a dieta hiperlipídica (DH). Verificou-se que após tratamento com I-SMT, houve aumento significativo, acima de 60% ($P < 0,05$), da fosforilação da Akt, nos três tecidos, quando comparamos o grupo em DH PBS (Figura 5).

Assim podemos dizer que a via IR/IRS-1/PI 3/Akt 2 quinase foi mais ativada pela insulina após tratamento com I-SMT, e que os animais que receberam DH e Placebo apresentaram menor fosforilação da Akt tanto basal quanto após estímulo insulínico.

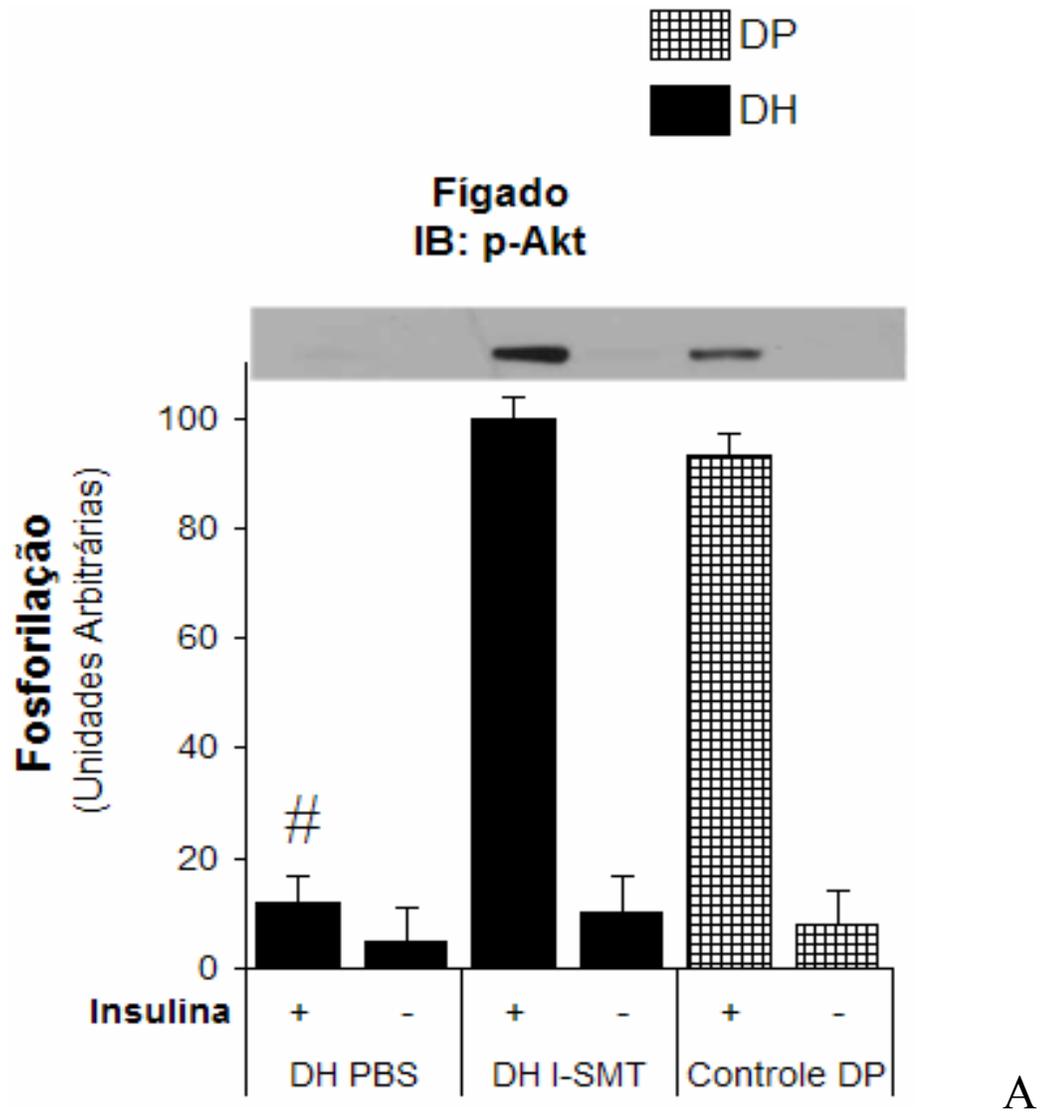


Figura 5A. Efeito da dieta hiperlipídica (DH) na via de sinalização da Akt através da fosforilação em serina 473 no Fígado. Os dados representam n = 6 – 8 camundongos por grupo. # P<0,05 (DH PBS vs todos os outros grupos).

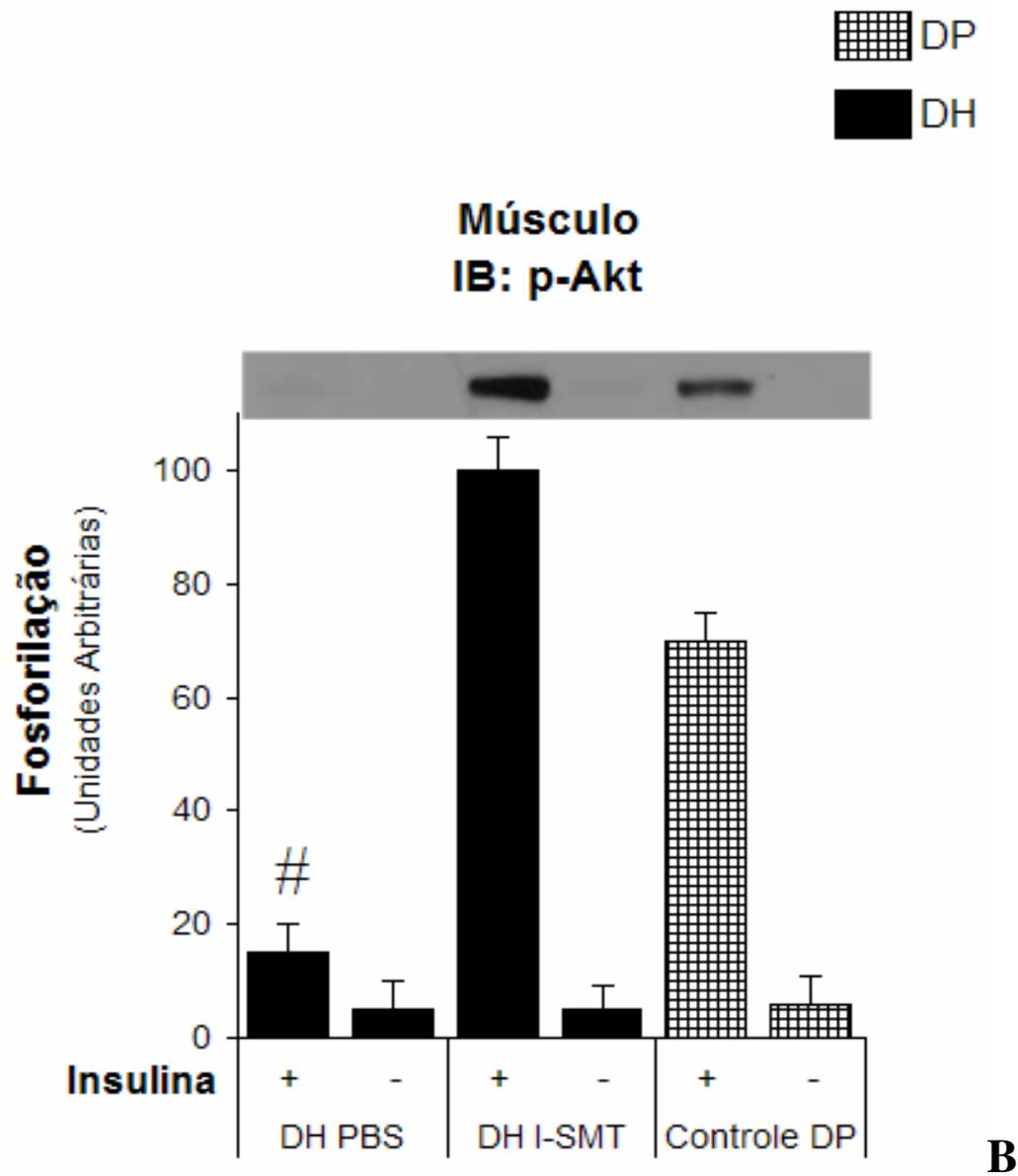
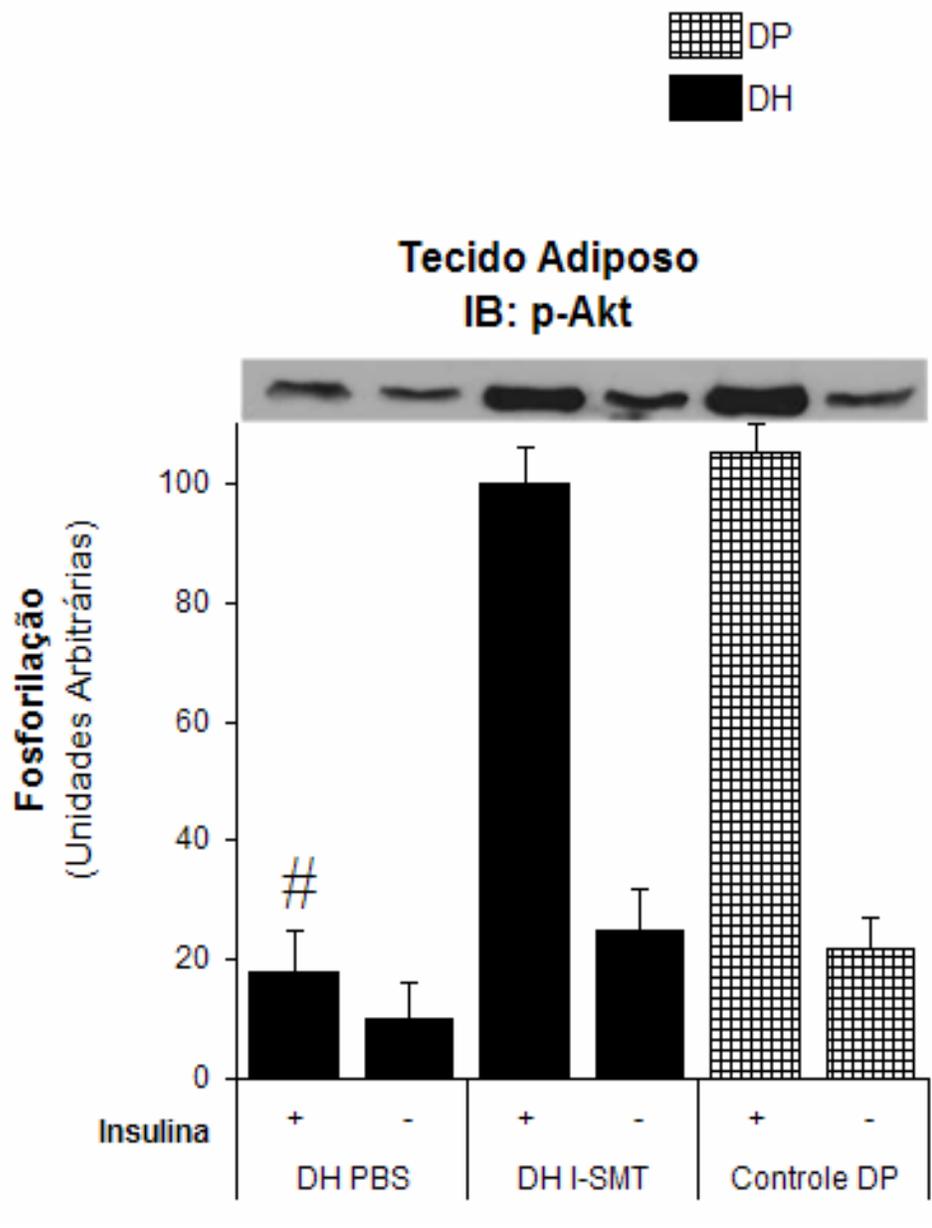


Figura 5 B. Efeito da DH na via de sinalização da Akt através da fosforilação em serina no Músculo. Os dados representam n = 6 – 8 camundongos por grupo. # P<0,05 (DH PBS vs todos os outros grupos).



C

Figura 5C. Efeito da DH na via de sinalização da Akt, fosforilação em serina no Tecido Adiposo. Os dados representam n = 6 – 8 camundongos por grupo. # P<0,05 (DH PBS vs todos os outros grupos).

6. DISCUSSÃO

O Diabetes é uma doença metabólica crônica cuja característica definidora é a hiperglicemia de jejum; resultado da deficiência, resistência à insulina ou ambos. Conhecida desde a antiguidade, somente no último século começamos a compreender seu mecanismo fisiopatológico complexo e multifatorial.

Hoje, sabe-se que a resistência à insulina que leva ao desenvolvimento do diabetes, acontece em vários tecidos envolvidos com seus efeitos (DEFRONZO, 1988). No fígado, há maior produção de glicose e gliconeogênese. Em tecido muscular há uma menor captação de glicose induzida por insulina. No hipotálamo, há, em modelos animais, também um menor efeito anorexígeno deste hormônio (CARVALHEIRA; RIBEIRO et al. 2003). No tecido adiposo, a captação de glicose está diminuída, mas seus efeitos de crescimento e hipertrofia não, contribuindo para o desenvolvimento da obesidade (KAHN, 1994).

Durante a evolução e seleção natural pela qual passaram todas as espécies, ocorreu uma adaptação genotípica com tendência ao acúmulo de energia no tecido adiposo branco. A sobrevivência dos animais estava relacionada à sua capacidade de estocar energia em épocas de fartura, para épocas de maior escassez e demanda energética, assim como, à sua capacidade de combater patógenos e infecções.

Os sistemas de armazenamento energético, assim como os sistemas de reconhecimento de antígenos são amplamente conservados desde espécies mais primitivas de organismos pluricelulares, como a *Drosophila*, até os mamíferos. Recentemente acumulam-se estudos e evidências que estes dois sistemas são interdependentes. Faz parte da resposta imunológica normal a mobilização de energia dos estoques para combater o agente agressor (KHOVIDHUNKIT; KIM et al. 2004).

Diversos estudos epidemiológicos ligam tanto a obesidade quanto o diabetes tipo 2 a um estado de inflamação sub-clínico, com elevação do nível sérico de diversas citocinas inflamatórias (PICKUP, 2004).

Hoje, entendemos o adipócito como uma célula imunologicamente ativa, produtora de citocinas, que possui ação reguladora também do metabolismo. Sendo assim, o conector que faltava para relacionar esta interdependência começou a ser elucidado nas duas últimas décadas, com o reconhecimento de que a obesidade, que é estado de armazenamento e fatura energética, está relacionada a um estado de inflamação subclínica e tem como conseqüências à aterosclerose, hipertensão arterial e resistência à insulina (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005).

A primeira molécula a ligar os sistemas imune e metabólico foi o fator de necrose tumoral α (TNF α), (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993). Após a descoberta deste comportamento do TNF α , outras interleucinas pró-inflamatórias mostraram-se capazes de ativar vias celulares relacionadas ao desenvolvimento de resistência à insulina, como IL6 e a IL-1B. Estas citocinas inflamatórias, quando liberadas, induzem a ativação da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), levando a produção de elevados níveis de óxido nítrico, que são liberados, juntamente com espécies reativas de oxigênio. Desta forma, estabeleceu-se uma relação de causa e efeito entre a ativação das vias inflamatórias, e conseqüentemente da iNOS, à obesidade com posterior desenvolvimento de resistência à insulina (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005).

As NOS constitutivas (eNOS e nNOS) apresentam forma monomérica, são cálcio-calmodulina dependente e tem peso molecular de 133 kDa. São expressas continuamente na ausência de agentes indutores, com síntese basal de concentração picomolar. Ao contrário,

a iNOS não depende de cálcio para sua ativação, mas a síntese de mRNA é necessária para sua atividade, além de não ser detectável em condições basais. LPS ou endotoxinas bacterianas, e citocinas como TNF α , IL-6, IL-1 β ou IF- γ induzem a síntese de iNOS, de 2 a 4 horas após a exposição ao agente. A iNOS requer síntese protéica para expressão e sua atividade persiste por mais de 24 horas. Após a indução, iNOS sintetiza NO em concentrações nanomolares, 1000 vezes maior que as NOS constitutivas (eNOS e nNOS), esta indução é responsável pelas propriedades citotóxicas do NO no organismo (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

Algumas horas após infusão de LPS, dose dependente, observa-se também resistência à ação insulínica, tanto em modelos animais, quanto em humanos (VIRKAMAKI; YKI-JARVINEN, 1995; AGWUNOBI; REID et al. 2000). O mecanismo de expressão da iNOS é um importante componente do sistema imune inato, e parece estar relacionado à ação insulínica e ao controle de infestações intracelulares, tendo poder bactericida e poder de bloquear a via metabólica de certos patógenos (BOGDAN, 2001).

O tratamento de culturas de células musculares com LPS, TNF- α e interferon γ leva a diminuição da captação de glicose induzida por insulina, em paralelo ao aumento da expressão da iNOS. Este efeito sobre a captação de glicose é impedido por tratamento concomitante com um bloqueador da iNOS. Este aumento da expressão da iNOS em modelos experimentais de obesidade sugere que esta é outra via da resposta imune inata que está ativada na obesidade, podendo ter participação fisiopatológica no desenvolvimento de resistência à insulina, de forma semelhante às vias inflamatórias anteriormente descritas.

Sabe-se que o bloqueio mais específico da iNOS, atenua a resistência à insulina associada a indução desta enzima tanto em modelos animais de obesidade, quanto de

endotoxemia (BEDARD; MARCOTTE et al., 1997; SHIMABUKURO; OHNEDA et al., 1997; PIERCY; TOSELAND et al., 1998). E que a inibição farmacológica da iNOS pode ter efeito benéfico nos casos de inflamação, choque séptico e outras doenças associadas a essa via de sinalização, como por exemplo, artrite crônica, diabetes, rejeição de transplantes e alguns tipos de câncer.

Szabó e sua equipe demonstraram que o sulfato de S-methylisothiourea, inibidor seletivo da iNOS, tem menor efeito colateral como por exemplo excessiva vasoconstrição e isquemia, do que os relatados com a inibição da eNOS. Além de demonstrar que a S-methylisothiourea (SMT) é um potente inibidor de atividade da iNOS (SZABÓ et al., 1994). Podemos observar que diversos trabalhos demonstram a eficiência da SMT como inibidor específico da iNOS no tratamento de inflamações e sépsis. Entretanto, nos casos de diabetes tipo 2, obesidade e resistência à insulina, que apresentamos anteriormente como estados subclínicos de inflamação (PICKUP, 2004), o efeito da SMT não tinha sido ainda investigado.

Com base nestes estudos sobre a elucidação dos mecanismos de inibição da iNOS é que decidimos propor a síntese e a investigação do efeito de derivados da isotiouréia, como inibidores farmacológicos seletivos da iNOS, através da via de sinalização da Akt, em fígado, músculo e tecido adiposo de animais tratados com dieta hiperlipídica. Avaliou-se ainda os parâmetros metabólicos característicos da resistência à insulina, como, hiperglicemia de jejum, intolerância à glicose e sensibilidade à insulina.

Sabe-se ainda que as isotiuréias são potentes inibidores das NOS *in vitro*, mas não *in vivo* devido a sua fraca penetração celular. São moléculas pequenas e extremamente hidrossolúveis o que dificulta sua passagem e consequente absorção pela membrana plasmática das células, constituídas de lipopolissacarídeos. Por esta razão decidimos neste

estudo inicialmente adicionar um grupamento lipofílico ou volumoso à isotiouréia, tornando-a anfifílica ou menos polar e provavelmente melhorando sua absorção e distribuição *in vivo*.

O primeiro composto testado foi o bromidrato de S-fenil-etil-isotiouréia e para avaliar sua ação utilizamos uma dose baixa, menor do que a mínima utilizada em literatura para os derivados conhecidos da isotiouréia (5 mg/kg dia⁻¹). Assim utilizamos 3 mg/kg dia⁻¹ em camundongos swiss machos e observou-se uma alta toxicidade e mortalidade, no grupo tratado com o composto. Foram testadas outras duas doses subseqüentes, diminuídas pela metade, mas a resposta foi semelhantemente tóxica. Devido a essa toxicidade muito elevada interrompemos o estudo com este composto até possível esclarecimento quanto as suas propriedades terapêuticas *in vivo*. O segundo composto testado foi o iodato de S-metil-isotiouréia e para determinar a dose terapêutica em nosso modelo animal foi realizado o teste de endotoxemia com LPS e avaliada a curva de sobrevivência com diversas doses para determinar a menor dose com efeito protetor e maior janela terapêutica possível.

A síntese dos compostos derivados da isotiouréia de maneira geral foi de fácil execução, obtendo-se rendimentos satisfatórios, em torno de 75%. Porém houve algumas dificuldades na purificação dos mesmos. Este estudo também se mostrou importante, pois a partir da tiouréia S- substituída será possível obter novas drogas com maior afinidade e potencial de ação apresentando menores efeitos colaterais.

A ingestão diária alimentar foi semelhante nos grupos dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DH). Os animais tratados com I-SMT não apresentaram diferença significativa de peso corpóreo *vs.* grupo tratado com Placebo. Avaliou-se ainda a glicemia de jejum (12 horas), durante o tratamento e duas semanas após o mesmo, e verificou-se que o grupo tratado (I-SMT) teve uma melhora significativa, tanto em DH quanto em DP, com

os animais obesos apresentando resultados próximos ao fisiologicamente normal (100 mg/dl).

Para investigar a sensibilidade insulínica e a tolerância à glicose, realizamos os testes de ITT e GTT, respectivamente. Como esperado os animais em DH e Placebo apresentam resistência à insulina e intolerância à glicose, e os animais em DH tratados com I-SMT apresentam melhora significativa tanto na sensibilidade à insulina quanto na tolerância à glicose conforme apresentado.

Em animais intactos a sensibilidade à insulina é experimentalmente aferida a partir da avaliação da curva de decaimento da glicemia após infusão de insulina. Tanto maior é a sensibilidade à insulina, quanto maior é a inclinação da curva de queda da glicemia em função do tempo, após infusão de sobrecarga de insulina. A razão obtida a partir da inclinação desta curva define uma constante chamada Kitt (BONORA; MOGHETTI et al., 1989). Nos animais tratados com a droga inibidora da iNOS, I-SMT, houve aumento significativo do Kitt, refletindo proteção ao estado de resistência à insulina.

O aumento dos níveis séricos de insulina no estado basal é outro indicativo de resistência à insulina. Neste estudo o grupo DH I-SMT apresentou resultados de insulina no estado basal significativamente inferior ao grupo DH PBS. Em conjunto, estes dados indicam que animais tratados com um inibidor seletivo da iNOS, a saber I-SMT, são protegidos contra o desenvolvimento de resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica.

A insulina inicia sua cascata de sinalização intracelular após ligação à subunidade α do seu receptor transmembrana, o que provoca uma mudança conformacional e consequente auto-fosforilação da subunidade β , que ativa sua capacidade tirosina-quinase. Ocorre então associação e fosforilação do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), que

uma vez fosforilado, se associa e ativa a fosfatidil inositol 3 quinase (PI 3 quinase), passo fundamental para a ativação da Akt, serina-quinase que modula tanto ações metabólicas quanto de crescimento desencadeadas pela insulina. (CARVALHO; SAAD, 1998; KUPRIYANOVA; KANDOR, 1999; CARVALHO-FILHO et al., 2005).

A Akt é uma serina/treonina quinase que modula diversas ações metabólicas e de crescimento da insulina, incluindo transporte de glicose, síntese protéica e de glicogênio (UEKI; YAMAMOTO-HONDA et al., 1998; VAN WEEREN; BRUYN et al., 1998; JIANG; ZHOU et al., 2003). Sua ativação pela insulina é mediada pela formação de fosfatidil inositol a partir da ativação da PI 3 quinase pelo IRS-1 ou IRS-2. Vários estudos implicam a Akt como proteína importante para a translocação de GLUT 4 para superfície celular (BROZINICK; ROBERTS et al., 2003).

No entanto, parece que as isoformas de Akt sinalizam em diferentes sentidos. A Akt1 em direção ao crescimento celular e a Akt2 em direção a translocação do GLUT 4. Em modelos genéticos que não expressam Akt observamos retardo do crescimento, e suas células tem maior tendência a apoptose. Estes animais não apresentam hiperglicemia ou resistência aos efeitos metabólicos da insulina (CHEN; XU et al., 2001; CHO; MU et al., 2001; CHO; THORVALDSEN et al., 2001). Estes achados são compatíveis com os encontrados no bloqueio da expressão do IRS-1, e mostram a importância da via IRS-1/PI 3 quinase/Akt1 na modulação do crescimento realizada por insulina e IGF-1.

Camundongos modificados que não expressam a Akt2 desenvolvem hiperinsulinemia, hiperglicemia e intolerância à glicose. Este achado reflete a importância da via IRS-1/PI 3 quinase/Akt2 para efetuação dos efeitos metabólicos da insulina (CHO; MU et al., 2001).

Para estudar os efeitos do tratamento com I-SMT sobre a Akt, realizamos um ensaio para medir o grau de fosforilação da Akt em serina 473, mediante estímulo insulínico e na sua ausência em fígado, músculo e tecido adiposo dos animais estudados. Como esperado a fosforilação em serina da Akt induzida por insulina estava reduzida em animais que receberam DH. Verificou-se que após tratamento com I-SMT, houve aumento significativo, acima de 60% ($P < 0,05$), da fosforilação da Akt, nos três tecidos, quando comparados com o grupo em DH Placebo.

Em conjunto estes resultados proporcionam uma correlação dos parâmetros moleculares e bioquímicos com os resultados *in vivo* de aumento à sensibilidade insulínica e diminuição da intolerância à glicose no grupo tratado com I-SMT em comparação com o grupo PBS. Estes dados indicam que a iNOS é um modulador importante nas doenças inflamatórias e metabólicas como a diabetes tipo 2 e que a proteína quinase Akt é um importante indicador da via sinalizadora de insulina nessas doenças.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que um inibidor farmacológico da iNOS, o iodato de S-metilisotiouréia, melhora a tolerância a glicose, a sensibilidade e sinalização de insulina em fígado, músculo e tecido adiposo de animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Nossos dados sugerem que um inibidor seletivo e específico da iNOS representa um importante alvo terapêutico para o tratamento da síndrome metabólica e suas consequências como obesidade e diabetes tipo 2.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agwunobi, A.O., Reid, C., et al. "Insulin resistance and substrate utilization in human endotoxemia." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2000; v.85, n.10, 3770-778.
2. Bedard, S., Marcotte, B. and Marette, A. "Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase." *Biochem J*. 1997; 325: 487-493.
3. Beutler, B., Milsark, I.W. and Cerami, A.C. "Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin." *Science*. 1985; 229: 869-871.
4. Bogdan, C. "Nitric oxide and the immune response." *Nat Immunol*. 2001; 2: 907-916.
5. Bonora, E., Moghetti, P., et al. "Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies." *J Clin Endocrinol Metab*. 1989; 68(2): 374-378.
6. Bonora, E., Manicardi, V., et al. "Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance." *Diabetes Metab*. 1987; 2: 116-121.
7. Brian, S., Furniss, H., Antony, J., Smith, P.W.G., Tatchell, Austin R. *Vogel's*; 5ª edição 1989.
8. Brozinick, J.T., Roberts, B.R., et al. "Defective signaling through Akt-2 and -3 but not Akt-1 in insulin-resistant human skeletal muscle: potential role in insulin resistance." *Diabetes*. 2003; 52(4): 935-941.
9. Carpenter, C.L. and Cantley, L.C. "Phosphoinositide kinases." *Biochemistry*. 1990; 29: 11147-156.
10. Carnevalheira, J.B.C., Ribeiro, E.B., et al. "Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats." *Diabetologia*. 2003; 46(12): 1629-640.
11. Carnevalheira, J.B.C., Zecchin, H. and Saad, M.J.A. "Vias de Sinalização da Insulina." *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002; vol. 46, no. 4, 419-425.
12. Carnevalheira, C.R.O., Brenelli, S.L., et al. "Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats." *Endocrinology*. 1996; 137: 151-159.
13. Carnevalheira, C.R.O. and Saad, M.J.A. "Resistência à insulina induzida por glicocorticóides: investigação de mecanismos moleculares." *Arq Bras Endocrinol Metab*. 1998; 42: 13-21.

14. Carvalho-Filho, M.A., Ueno, M., et al. "S-Nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance." *Diabetes*. 2005; 54: 959–967.
15. Cerqueira, N.F. and Yoshida, W.B. "Nitric oxide: review." *Acta Cir Bras*. 2002; Nov-Dec; 17(6).
16. Cheatham, B. and Kahn, C.R. "Insulin action and the insulin signaling network." *Endocr Rev*. 1995; 16: 117-138.
17. Cheatham, B., Viohos, C.J., et al. "Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of p70S6 kinase, DNA synthesis and glucose transporter translocation." *Mol Cell Biol*. 1994; 14: 4902-911.
18. Chen, W.S., Xu, P.Z., et al. "Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene." *Genes Dev*. 2001; 15(17): 2203-208.
19. Cho, H., Mu, J., et al. "Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)." *Science*. 2001; 292(5522): 1728-731.
20. Cho, H., Thorvaldsen, J. L., et al. "Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice." *J Biol Chem*. 2001; 276(42): 38349-352.
21. Cho, H.J., Xie, Q.W., et al. "Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages." *J Exp Med*. 1992; v.176, n.2, 599-604.
22. DeFronzo, R.A. "Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM." *Diabetes*. 1988; 37(6): 667-687.
23. Folli, F., Saad, M.J.A., et al. "Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat." *J Biol Chem*. 1992; 267: 22171-177.
24. Forstermann, U., Closs, E.I., et al. "Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions." *Hypertension*. 1994; v. 23, 1121- 131.
25. Forstermann, U. "Regulation of Nitric Oxide Synthase Expression and Activity." In: Mayer, B., (Ed.). *Nitric Oxide*. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2000; 71-91.
26. Geller, D.A., Lowenstein, C.J., et al. "Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes." *Proc Natl Acad Sci U.S.A*. 1993; v.90, n.8, 3491- 495.

27. Ghafourifar, P. and Richter, C. "Nitric oxide synthase activity in mitochondria." *FEBS Lett.* 1997; v.418, n.3, 291-296.
28. Gray, P.W., Aggarwal, B.B., et al. "Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumor necrosis activity." *Nature.* 1984; 312, 721-724.
29. Heller, R.A. and Kronke, M. "Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways." *J Cell Biol.* 1994; 126: 5-9.
30. Hotamisligil, G.S., Arner, P., et al. "Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance." *J Clin Invest.* 1995; 95, 2409-415.
31. Hotamisligil, G.S., Peraldi, P., et al. "IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α and obesity-induced insulin resistance." *Science.* 1996; 5249: 665-668.
32. Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S. and Spiegelman, B.M. "Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance." *Science.* 1993; 259, 87-91.
33. Ignarro, L.J., Buga, G.M., et al. "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1987; v.84, n.24, 9265-269.
34. Jiang, Z.Y., Zhou, Q.L. et al. "Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing." *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003; 100(13): 7569-574.
35. Kahn, C. R. "Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes." *Diabetes.* 1994; 43(8): 1066-84.
36. Kahn, C.R. "Current concepts of the molecular mechanism of insulin action." *Ann Rev Med.* 1985; 36: 429-451.
37. Kahn, C.R., Flier, J. S. et al. "The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans. Insulin-receptor disorders in man." *N Engl J Med.* 1976; 294(14): 739-745.
38. Kapur, S., Bedard, S., et al. "Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action." *Diabetes.* 1997; 46: 1691-700.
39. Kasuga, M., Karlsson, F.A. and Kahn, C.R. "Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor." *Science.* 1982; 215: 185-187.

40. Katsuki, A., Sumida, Y., et al. "Serum levels of tumor necrosis factor- α are increased in obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus." *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 859–862.
41. Khovidhunkit, W., Kim, M.S., et al. "Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host." *J Lipid Res.* 2004; 45(7): 1169-196.
42. Kolterman, O.G., Insel, J., et al. "Mechanisms of insulin resistance in human obesity: evidence for receptor and postreceptor defects." *J Clin Invest.* 1980; 65(6): 1272-284.
43. Kupriyanova, T.A. and Kandor, K.V. "Akt-2 binds to Glut-4-containing vesicles and phosphorylates their component proteins in response to insulin." *J Biol Chem.* 1999; 274: 1458-464.
44. Kurrek, M.M., Zapol, W.M., et al. "In vivo lipopolysaccharide pretreatment inhibits cGMP release from the isolated-perfused rat lung." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1995; 269: L618-L624.
45. Lacza, Z., Snipes, J.A., et al. "Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS." *Free Radic Biol Med.* 2003; v. 35, n. 10, 1217-228.
46. Lang, C.H. "Rates and tissue sites of noninsulin- and insulin-mediated glucose uptake in diabetic rats." *Proc Soc Exp Biol Med.* 1992; 199: 81-87.
47. Levy, J., Atkinson, A.B. et al. "Beta-cell deterioration determines the onset and rate of progression of secondary dietary failure in type 2 diabetes mellitus: the 10-year follow-up of the Belfast Diet Study." *Diabet Med.* 1998; 15(4): 290-296.
48. Lopez, L.C., Escames, G., et al. "Identification of an inducible nitric oxide synthase in diaphragm mitochondria from septic mice: its relation with mitochondrial dysfunction and prevention by melatonin." *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; v. 38, n. 2, 267-278.
49. Mathews, D.R., Cull, C.A. et al. "UKPDS 26: Sulphonylurea failure in non-insulin-dependent diabetic patients over six years. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group." *Diabet Med.* 1998; 15(4): 297-303.
50. Palmer, R.M., Ferrige, A.G. and Moncada, S. "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." *Nature.* 1987; v. 327, n. 6122, 524-526.
51. Pennica, D., Nedwin, G.E., et al. "Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin." *Nature.* 1984; 312, 724–729.

52. Perreault, M. and Marette, A. "Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle." *Nat Med.* 2001; 7: 1138-143.
53. Pickup, J.C. "Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes." *Diabetes Care.* 2004; 27: 813-823.
54. Piercy, V., Toseland, C.D. and Turner, N.C. "Potential benefit of inhibitors of advanced glycation end products in the progression of type II diabetes: a study with aminoguanidine in C57/BLKsJ diabetic mice. *Metabolism.* 1998; 47: 1477-480.
55. Reaven, G.M. "Banting lecture 1988 - Role of insulin resistance in human disease." *Diabetes.* 1988; 37(12): 1595-1607.
56. Ribiere, C., Jaubert, A.M., et al. "White adipose tissue nitric oxide synthase: a potential source for NO production." *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 222: 706-712.
57. Ruderman, N., Kapeller, R., et al. "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin." *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1990; 87: 1411-415.
58. Saad, M.J.A., Hartmann, L.G.G., et al. "Effect of glucagon on insulin receptor substrate-1 (IRS-1) phosphorylation and association with phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase)." *FEBS Lett.* 1995a; 370: 171-174.
59. Saad, M.J.A., Hartmann, L.G.G., et al. "Modulation of early steps in insulin action in the liver and muscle of epinephrine treated rats." *Endocrine.* 1995b; 3: 755-759.
60. Saad, M.J.A., Maeda, L., et al. "Defects in insulin's signal transduction in liver and muscle of pregnant rats." *Diabetologia.* 1997; 40: 179-186.
61. Saghizadeh, M., Ong, J.M., et al. "The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance." *J Clin Invest.* 1996; 97: 1111-1116.
62. Salerno, J.C., Harris, D.E., et al. "An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase." *J Biol Chem.* 1997; v. 272, n. 47, 29769-777.
63. Shepperd, P.R., Withers, D.J. and Siddle, K. "Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signaling." *Biochem J.* 1998; 333: 471-490.
64. Shimabukuro, M., Ohneda, M., et al. "Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease." *J Clin Invest.* 1997; 100: 290-295.
65. Spitzer, J.J., Bagby, G.J., et al. "Altered control of carbohydrate metabolism in endotoxemia." *Prog Clin Biol Res.* 1989; 286: 145-165.

66. S Prague, J.M. and Johnson, T.B. J. Am Chem Soc. 1937; 59: 1837-840.
67. Stuehr, D.J. and Ghosh, S. "Enzymology of Nitric Oxide Synthases." In: Mayer, B., (Ed.). Nitric Oxide. Berlin, Germany: Springer. 2000; 33-70.
68. Stuehr, D.J. "Structure-function aspects in the nitric oxide synthases." Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1997; v. 37, 339-359.
69. Sun, X.J., Rothenberg, P., et al. "Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein." Nature. 1991; 352: 73-77.
70. Szabo, C., Southan, G.J. and Thiernemann, C. "Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothioureia sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase." Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1994; 91: 12472-476.
71. Thirone, A.C.P., Carvalho, C.R.O., et al. "Chronic treatment with growth hormone modulates the early steps of insulin signal transduction in the liver and muscle rats." Mol Cell Endocrinol. 1997; 130: 33-42.
72. Trinder, P. "Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen." J Clin Pathol. 1969; 2: 158-161.
73. Ueki, K., Yamamoto-Honda, R. et al. "Potential role of protein kinase B in insulin-induced glucose transport, glycogen synthesis, and protein synthesis." J Biol Chem. 1998; 273(9): 5315-322.
74. Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., et al. "Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function." Nature. 1997; 389: 610-614.
75. Van Weeren, P.C., Bruyn, K.M., et al. "Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB." J Biol Chem. 1998; 273(21): 13150-156.
76. Verspoh, E.J. and Ammon, H.P. "Evidence for presence of insulin receptors in rat islets of Langerhans." J Clin Invest. 1980; 65(5): 1230-237.
77. Virkamaki, A. and Yki-Jarvinen, H. "Role of prostaglandins in mediating alterations in glucose metabolism during acute endotoxemia in the rat." Endocrinology. 1995; 136: 1701-706.
78. Virkamaki, A., Puhakainen, I., et al. "Mechanisms of hepatic and peripheral insulin resistance during acute infections in humans." J Clin Endocrinol Metab. 1992; 74: 673-679.
79. Wellen, K.E. and Hotamisligil, G.S. "Inflammation, stress, and diabetes." J Clin Invest. 2005; 115: 1111-119.

80. White, M.F. and Kahn, C.R. "The insulin signaling system." *J. Biol Chem.* 1994; 261: 1-4.
81. White, M.F. "The insulin signalling system and the IRS proteins." *Diabetologia.* 1997; 40 (Suppl. 2): S2-S17.
82. Yenush, L. and White, M.F. "The IRS-signaling system during insulin and cytokine action." *Bio Essays.* 1997; 19: 491-500.
83. Yoon, J.K., Ryu, J.H., et al. "Design and synthesis of urea and thiourea derivatives and their inhibitory activities on lipopolysaccharide-induced NO production." *Bioorg Med Chem Lett.* 2007; 17, 3317-321.
84. Zanella, B., Giordano, E., et al. "Nitric oxide synthase activity in rat cardiac mitochondria." *Basic Res Cardiol.* 2004; v. 99, n. 3, 159-164.