



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE DERIVADOS
FENÓXI-ACETOACETATOS EM RECEPTORES ATIVADOS POR
PROLIFERADORES PEROXISSOMAIS E
EM RECEPTORES DE HORMÔNIO TIREOIDEANO**

Karine Figueiredo de Andrade

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Lucília dos Santos

Dissertação submetida à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau em Mestre em Ciências da Saúde.

Karine Figueiredo de Andrade

Brasília, 2008.

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE DERIVADOS
FENÓXI-ACETOACETATOS EM RECEPTORES ATIVADOS POR
PROLIFERADORES PEROXISSOMAIS E
EM RECEPTORES DE HORMÔNIO TIREOIDEANO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília para a obtenção do Grau em Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Lucília dos Santos

2008

Trabalho realizado no Laboratório de Farmacologia Molecular e no
Laboratório de Isolamento e Transformação de Moléculas Orgânicas

Dedico esse trabalho aos meus pais Eduardo e Maria das Graças, meus irmãos Eduardo Júnior, Juliana e Jurema Karen e ao meu noivo Esdra.

Agradecimentos

Aos meus pais, que com incansável empenho estiveram sempre ao meu lado para que eu superasse mais esse desafio. Agradeço também por suas orações que me sustentaram e me fortaleceram ao longo dessa jornada. Aos meus irmãos pelos incentivos para que eu não desanimasse diante das dificuldades. A vocês, minha eterna gratidão!

Ao meu noivo pela imensurável compreensão, por sua dedicação e palavras de ânimo nos momentos difíceis. Com sua presença, tive mais motivação para tornar esse sonho em realidade. Amo você!

Meu muito obrigada ao Professor Luiz Alberto Simeoni por sua orientação e paciência mediante minhas limitações e teimosia. Sinceros agradecimentos pelos ensinamentos e pela confiança em mim depositada.

À professora Maria Lucília dos Santos por sua valorosa contribuição no desenvolvimento dos compostos, por sua disposição, paciência e ensinamentos. Agradeço-lhe por ter me agregado ao seu convívio de forma tão solícita.

À professora Inês Sabioni Resk pela realização dos espectros de Ressonância Magnética, auxílio na interpretação dos mesmos, pelas sugestões e participação na banca examinadora. Ao Sr. Wilson R. De Oliveira da Universidade de Brasília pelos espectros de Infravermelho. E ao Instituto de Química da Universidade de Brasília.

Ao professor Carlos Frederico de Souza Castro pela inestimável amizade e parceria desde a época de Iniciação Científica. Obrigada pela confiança!

Ao professor Francisco de Assis Rocha Neves pelos ensinamentos e acolhimento. Também à professora Dâmaris Silveira que promoveu a parceria com a professora Lucília.

Aos colegas de trabalho, em especial, à minha grande amiga Bete que chegou na metade do mestrado como um anjo e que foi um incentivo e apoio para a conclusão desse trabalho. Conte sempre comigo!

Às amigas Cristina e Rilva pela imensurável ajuda e amizade.

Aos meus queridos amigos Jonatas e Cintia por todos esses anos de convivência e incentivo nos momentos de desânimo. Muito obrigada de coração!

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia molecular: Adriana, Angélica, Daniela, Gustavo, Karime, Marlom, Ranieri, Rut, Viviane que ajudam a tornar a difícil rotina mais amena.

Aos amigos do Laboratório de Isolamento e Transformação de Moléculas Orgânicas: Dino, Luciana, Tarcísio e Wagner que carinhosamente me agregaram ao seu convívio e juntos compartilhamos muitas alegrias. Amei conhecer vocês!

Agradeço aos meus alunos. Vocês foram e sempre serão um dos maiores incentivos para que eu sempre busque conhecer um pouco mais.

E, sobretudo a **DEUS** que se tornou tão presente em minha vida na pessoa de todos vocês!!! Muito obrigada de coração!!!

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

Ar	–	Aril
Apo-B	–	Apolipoproteína B
ATP	–	Adenosina trifosfato
BOD	–	Demanda biológica de oxigênio
DBD	–	Domínio de ligação ao DNA
CCD	–	Cromatografia em Camada Delgada
CMV	–	Citomegalovírus
d	–	duplete
dd	–	duplo duplete
DITPA	–	Ácido 3,5-diiodotiropropiónico
DL ₅₀	–	Dose letal mínima
DM1	–	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	–	Diabetes Mellitus tipo 2
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DNA	–	Ácido desoxirribonucléico
DR	–	Repetição direta
EC	–	Concentração efetiva
ER	–	Receptor de estrogênio
FARMOL	–	Laboratório de Farmacologia Molecular
GLUT	–	Transportador para a glicose
GR	–	Receptor de glicocorticóide
HMG CoA	–	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HDL	–	Lipoproteína de alta densidade
IL6	–	Interleucina-6
IC	–	Intervalo de confiança
IMC	–	Índice de Massa Corporal
IRS	–	Substrato do receptor da insulina
IV	–	Infravermelho
LBD	–	Domínio de ligação ao ligante
LDL	–	Lipoproteína de baixa densidade
LITMO	–	Lab. de Isolamento e Transformação de Moléculas Orgânicas

Luc	–	Luciferase
m	–	Multiplete
mRNA	–	RNA mensageiro
NR	–	Receptor nuclear
OMS	–	Organização Mundial de Saúde
PBS	–	Tampão fosfato salino
PPAR	–	receptor ativado por proliferadores peroxissomais
PTAS	–	ácido <i>p</i> -tolueno sulfônico
RMN de ¹³ C	–	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de ¹ H	–	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RXR	–	Receptor do ácido retinóide
s	–	Simpleto
SFB	–	Soro fetal bovino
SUR	–	Receptor de sulfoniluréias
t	–	Triplete
TGB	–	Globulina de ligação à tiroxina
TH	–	Hormônio tireoideano
THRS	–	Resistência ao hormônio tireoideano
Tk	–	Timidina quinase
TMS	–	Tetrametilsilano
TNF α	–	Fator de necrose tumoral- α
TR	–	Receptor do hormônio tireoideano
TRE	–	Elemento responsivo do receptor do hormônio tireoideano
TSH	–	Hormônio estimulador da tireóide
TZD	–	Tiazolidinadionas
UCSF	–	Universidade da Califórnia, São Francisco - EUA
VDR	–	Receptor da vitamina D

Lista de Figuras

- Figura 1.** Domínios funcionais dos receptores nucleares.
- Figura 2.** Mecanismo de ação dos receptores do hormônio tireoideano.
- Figura 3.** Isoformas dos receptores do hormônio tireoideano.
- Figura 4.** Estrutura química dos hormônios tireoideanos.
- Figura 5.** Agonistas endógenos das isoformas do PPAR.
- Figura 6.** Estrutura química das estatinas.
- Figura 7.** Estrutura do 3,3',5-ácido triiodotetracético (Triac[®]).
- Figura 8.** Estrutura do 3,5-diiodotiropropiónico (DITPA).
- Figura 9.** Medicamentos utilizados no controle glicêmico.
- Figura 10.** Exemplos de compostos tiromiméticos.
- Figura 11.** Estrutura química do KAT-681.
- Figura 12.** Estrutura química dos ftalatos.
- Figura 13.** Estrutura química GW501516.
- Figura 14.** Espectro de RMN de ¹H do 5-bromosalicilaldeído
- Figura 15.** Espectro de RMN de ¹H do 3,5-dimetilfenol.
- Figura 16.** Espectro de RMN de ¹H do 5-bromo-*o*-anisaldeído.
- Figura 17.** Espectro de RMN de ¹H do 5-bromo-*o*-anisol etilenoacetil.
- Figura 18.** Espectro de RMN de ¹H da 5-bromo-*o*-anisaldeído-*N,N*-dimetil hidrazona.
- Figura 19.** Espectros de RMN de ¹H do 2,6-dimetil-4-hidróxi benzaldeído e do 2,4-dimetil-6-hidróxi benzaldeído.
- Figura 20.** Espectro de RMN de ¹H do bromoacetato de etila
- Figura 21.** Espectros de RMN de ¹H e de ¹³C do (4-formil-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (KF01)
- Figura 22.** Espectros de RMN de ¹H e de ¹³C do (2-formil-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (KF02).
- Figura 23.** Espectros de RMN de ¹H e de ¹³C do (3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (KF03).
- Figura 24.** Espectro de RMN de ¹H do (4-semicarbazona-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (KF04)

- Figura 25.** Espectro de RMN de ^1H do (2-semicarbazona-3,5-dimetilfenóxi)-acetato de etila (KF05)
- Figura 26.** Ausência do efeito tóxico de KF01, KF02 e KF03 em células U937.
- Figura 27.** Curva dose-resposta de T_3 nos receptores $\text{TR}\alpha$ e $\text{TR}\beta$.
- Figura 28.** Curva dose-resposta de KF01, KF02 e KF03 no receptor $\text{TR}\alpha$.
- Figura 29.** Curva dose-resposta de KF01, KF02 e KF03 no receptor $\text{TR}\beta$.
- Figura 30.** Avaliação da atividade de KF01, KF02 e KF03 na presença e ausência de T_3 mediada por $\text{TR}\alpha$.
- Figura 31.** Avaliação da atividade de KF01, KF02 e KF03 na presença e ausência de T_3 mediada por $\text{TR}\beta$.
- Figura 32.** Curvas dose-resposta de Bezafibrato nos receptores $\text{PPAR}\alpha$ e β/δ e de Rosiglitazona em $\text{PPAR}\gamma$.
- Figura 33.** Curva dose-resposta de KF01, KF02 e KF03 no receptor $\text{PPAR}\gamma$.
- Figura 34.** Avaliação da atividade de KF01, KF02 e KF03 na presença e ausência de rosiglitazona mediada por $\text{PPAR}\gamma$.
- Figura 35.** Estruturas químicas de duplo agonistas.
- Figura 36.** Curva dose-resposta de KF01, KF02 e KF03 no receptor $\text{PPAR}\alpha$.
- Figura 37.** Avaliação da atividade de KF01, KF02 e KF03 na presença e ausência de bezafibrato mediada por $\text{PPAR}\alpha$.
- Figura 38.** Curva dose-resposta de KF01, KF02 e KF03 no receptor $\text{PPAR}\beta/\delta$.
- Figura 39.** Avaliação da atividade de KF01, KF02 e KF03 na presença e ausência de bezafibrato mediada por $\text{PPAR}\beta/\delta$.
- Figura 40.** Avaliação da atividade de KF01, KF02 e KF03 na ausência das isoformas do receptor PPAR .
- Figura 41.** Avaliação da atividade de KF01, KF02 e KF03 na ausência e presença do ácido *cis*-9-retinóico mediada por Gal-RXR.
- Figura 42.** Avaliação da atividade de KF01, KF02 e KF03 na ausência e presença de dexamentasona mediada por GR

Lista de Esquemas

- Esquema 1.** Análise retróssintética de análogos do hormônio tireoideano
- Esquema 2.** Rotas sintéticas para a preparação dos fragmentos A e B.
- Esquema 3.** Preparação do 5-bromo-*o*-anisalaldeído
- Esquema 4.** Preparação do 5-bromo-*o*-anisol etilenoacetal
- Esquema 5.** Preparação da 5-bromo-*o*-anisol N,N-dimetil hidrazona
- Esquema 6.** Preparação do 2,6-dimetil-4-hidróxi benzaldeído e do 2,4-dimetil-6-hidróxi benzaldeído
- Esquema 7.** Preparação do bromoacetato de etila
- Esquema 8.** Preparação do (4-formil-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (KF01)
- Esquema 9.** Preparação do (2-formil-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (KF02)
- Esquema 10.** Preparação do (3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (KF03)
- Esquema 11.** Tentativa de acoplamento dos fragmentos A e B.
- Esquema 12.** Preparação do (4-semicarbazona-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (KF04).
- Esquema 13.** Preparação do (2-semicarbazona-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (KF05).

Lista de Anexos

Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 33	87
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 33	88
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 37	89
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 37	90
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 34	91
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 34	92
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 35	93
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 35	94
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 36	95
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 36	96
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 38	97
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 38	98
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 39	99
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 39	100
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; Filme) de 41	101
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 41	102
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 42	103
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 42	104
Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 42	105
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; Filme) de 43	106
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 43	107
Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 43	108
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; Filme) de 44	109
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 44	110
Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 44	111
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 45	106
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO) de 45	107
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 46	106
Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO) de 46	107

Resumo

Os receptores nucleares (NRs) são de grande importância para o mercado mundial de fármacos por estarem envolvidos em mecanismos que influenciam diversas doenças que afetam a humanidade como, por exemplo, o *Diabetes Mellitus* (DM2), dislipidemia, aterosclerose, obesidade.

Dentre os NRs, os Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais (PPARs) e os Receptores do Hormônio Tireoideano (TRs) controlam importantes ações fisiológicas como regulação de processos inflamatórios, homeostase de glicose e lipídios (PPAR), diferenciação e crescimento celular e metabolismo (TR).

Atualmente, o tratamento do DM2 é feito majoritariamente com tiazolidinadionas (TZD), classe de fármacos que diminui a resistência insulínica. A terapia com hormônio tireoideano (HT) para reduzir o colesterol sérico apresenta limitações terapêuticas e efeitos cardíacos indesejáveis.

Os compostos sintetizados nesse trabalho: (4-formil-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (KF01), (2-formil-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (KF02) e o (3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (KF03) foram submetidos a ensaios para avaliar sua atividade biológica. No ensaio de toxicidade utilizando larvas de *Artemia salina*, todos os compostos avaliados apresentaram atividade e o composto KF03 mostrou-se 5,7 vezes mais ativo que o padrão positivo ($K_2Cr_2O_7$). Esse resultado indica que KF01, KF02 e KF03 possuem atividade citotóxica contra larvas de *Artemia salina*. Os ensaios de transfecção e gene-repórter em culturas de células U937, mostraram que KF02 apresentou ação pan-agonista mediada pelas três isoformas do PPAR (α , β/δ e γ), além de efeito sinérgico na presença de bezafibrato e de rosiglitazona (agonistas sintéticos do PPAR), KF03 apresentou um duplo agonismo na transcrição mediada por PPAR α e PPAR γ , e atuou sinérgicamente com os ligantes sintéticos desses receptores. Nos receptores do hormônio tireoideano (TR α e TR β), foi verificada ação agonista de KF02 e efeito sinérgico de KF01, KF02 e KF03 na presença do hormônio tireoideano (T3).

KF02 e KF03 mostraram-se promissores quanto à atividade biológica mediada por PPAR e TR e contribuem para trabalhos futuros no desenvolvimento de pan e

duplo agonistas de PPAR e ainda na busca de tiromiméticos β -seletivos capazes de atuar no controle do DM2, obesidade, aterosclerose e dislipidemia.

Palavras-chave: TR, PPAR, síntese orgânica, Síndrome Metabólica, tiromiméticos.

Abstract

Nuclear receptors (NRs) are of great importance for the worldwide drug market since they are involved in mechanisms which influence several diseases that affect humanity like, for instance, diabetes mellitus (DM2), obesity, dislipemia and atherosclerosis.

Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) and Thyroid Hormone Receptors (TR) control important physiologic actions as the regulation of inflammatory processes, glucose and lipid homeostasis (PPAR), differentiation and cellular growth and metabolism (TR).

Currently, the DM2 treatment is carried mainly by thiazolidinediones (TZD), a pharmacological category that reduces the insulin resistance. The therapy with thyroid hormone (TH) to reduce the serum cholesterol shows therapeutical limitations and undesirable cardiac effects.

The compounds synthesized in this project: (4-phormyl-3,5-dimethylphenoxy)-acet ethyl acetate (KF01), (2-phormyl-3,5-dimethylphenoxy)-acet ethyl acetate (KF02) and (3,5-dimethylphenoxy)-acet ethyl acetate (KF03), were submitted to trials to evaluate its biological activity. In the cytotoxicity test, using *Artemia salina* larvae, all compounds evaluated presented activity and the compound KF03 showed itself 5.7 more active than the positive pattern ($K_2Cr_2O_7$). This result indicates that KF01, KF02 and KF03 have antitumor activity. In the transfection and reporter gene trials in cell culture (U937 cells), the results showed that KF02 presented a pan-agonist action mediated by the three PPAR isoforms (α , β/δ and γ), besides a synergic effect in the presence of bezafibrate and rosiglitazone (PPAR synthetic ligands), KF03 presented a double agonism in the transcription mediated by PPAR α and γ , and acted synergically with the synthetic ligands of these receptors. In the thyroid hormone receptors (TR α and TR β), it was verified an agonist action of KF02 and a synergic effect of KF01, KF02 and KF03 in the presence of the thyroid hormone (T_3).

The B fragment derivatives (KF02 and KF03) showed themselves promising due to their biological activity mediated by PPAR and TR and these findings contribute to future studies in the development of pan and double PPAR agonists

and also in the search for β -selective thyromimetic substances able to act in the metabolic syndrome control.

Key-words: TR, PPAR, organic synthesis, reporter gene, synthetic ligands.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Acrônimos.....	VI
Lista de Figuras.....	VIII
Lista de Esquemas.....	X
Lista de Anexos.....	XI
Resumo.....	XII
Abstract.....	XIV
1.INTRODUÇÃO	
1.1 – Receptores Nucleares.....	1
1.1.2 – Mecanismo de Ação.....	3
1.2 – Receptores do Hormônio Tireoideano.....	4
1.2.1 – Ação Fisiológica dos Hormônios Tireoideanos.....	5
1.3 – Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais – PPAR.....	7
1.4 – Síndrome Metabólica.....	9
1.4.1 – Obesidade.....	9
1.4.2 – Diabetes Mellitus.....	10
1.4.3 – Farmacoterapia usual.....	11
1.5 – Compostos Sintéticos e Receptores Nucleares.....	15
1.5.1 – Tiromiméticos.....	16
1.5.2 – Compostos Sintéticos e PPARs.....	18
2. OBJETIVO.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 – Etapa Sintética.....	21
3.2 – Avaliação da Atividade biológica em larvas de <i>Artemia salina</i>.....	22
3.3 – Plasmídeos utilizados.....	22
3.3.1 – Transformação.....	23
3.3.2 – Purificação dos Plasmídeos.....	23
3.4 – Cultura de Células.....	24
3.4.1 – Transfecção e Ensaio de Gene Repórter.....	24

3.5 – Análise Estatística.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	
4.1 Análise Retrossintética.....	26
4.2 – Testes Biológicos.....	42
4.2.1 – Avaliação da atividade citotóxica.....	42
4.2.2 – Atividade agonista ou antagonista em receptores nucleares.....	45
5. CONCLUSÃO.....	61
6. PERSPECTIVAS.....	62
7. DADOS FÍSICO-QUÍMICOS.....	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
9. ANEXOS.....	86

1. Introdução

1.1. Receptores Nucleares

Os receptores nucleares (NRs) constituem um conjunto de proteínas e fatores de transcrição formando uma superfamília que interage com o DNA. Estão presentes em todo o reino animal e desempenham importantes ações fisiológicas nos vários estágios da vida como: homeostase, reprodução, crescimento, diferenciação e apoptose celular e metabolismo (LIN *et al.*, 2006).

Atualmente são conhecidos 48 genes que codificam 75 proteínas reguladoras da transcrição de seus respectivos genes no núcleo da célula (GRONEMEYER *et al.*, 2004).

Nesta superfamília estão inclusos os receptores para esteróides (ERs), vitamina D (VDR), retinóides (RXR), hormônios tireoideanos (TRs) e prostaglandinas (PPARs), além de receptores órfãos, assim denominados, uma vez que seus ligantes ainda não foram identificados e, portanto, sua função permanece desconhecida (GRONEMEYER *et al.*, 2004).

Os NRs têm suas funções ativadas pela ligação de uma molécula sinalizadora lipofílica. Por meio da ligação dessa molécula sinalizadora com o receptor é exercido o controle dos processos e respostas transcricionais. Os receptores atuam em conjunto com complexos co-ativadores quando na presença do seu ligante, participando da ativação da transcrição e, com o complexo correpressor, quando participam da repressão da transcrição na ausência do ligante.

Análises estruturais e funcionais indicam que os NRs exercem suas funções ativadas por ligantes, em domínios evolutivamente conservados e com funções específicas (LIN *et al.* 2006) (**Figura 1**), a saber:

i. O domínio amino-terminal (NH₂-T) possui seqüências variadas de aminoácidos entre os vários membros da superfamília e é a região menos conservada do receptor. Desempenha a função de transativação responsável pela interação com fatores de transcrição (co-ativadores) (GRONEMEYER *et al.*, 2004). Este domínio possui atividade celular específica sugerindo que esta região

da proteína contribui para a especificidade da ação entre as isoformas do receptor (LEE *et al.*, 1999).

ii. O domínio de ligação ao DNA (DBD) é a região mais conservada dos receptores nucleares. Está localizado na região central e é responsável pelo reconhecimento de seqüências específicas de DNA (elementos responsivos) e ativação dos genes. O DBD é delimitado por duas alças de zinco que o separam do LBD, conhecidas como região de dobradiça (*Hinge*), composta de quatro cisteínas coordenadas com íon zinco conservadas entre os NRs que é responsável pela alta afinidade do DBD pelo DNA (YEN, 2001).

iii. Por fim, o domínio carboxi-terminal (LBD), que promove a ligação do receptor ao hormônio. Possui seqüência de aminoácidos bem conservada entre os vários membros da superfamília. No entanto, divergem a fim de garantir seletividade com o ligante. Este domínio também possui função de ativação ligante induzida envolvido na interação transcricional com co-reguladores (co-ativadores e correpressores) (GRONEMEYER *et al.*, 2004). O LBD é a segunda região de ativação da transcrição (AF-2) (LIN *et al.* 2006).

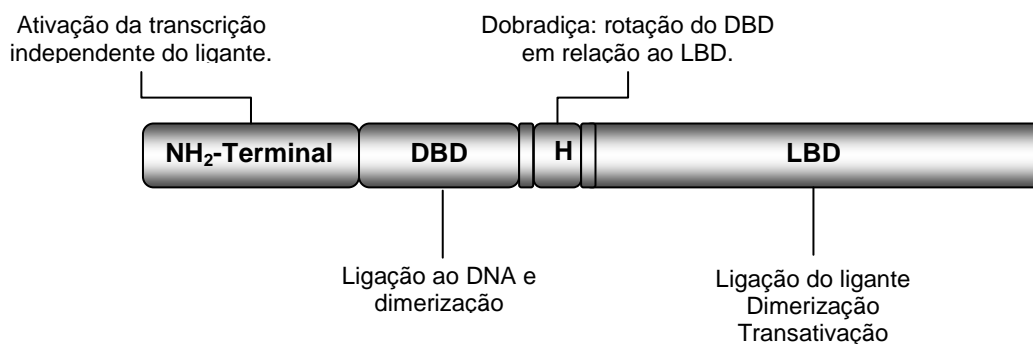


Figura 1. Estrutura linear representando os domínios funcionais dos receptores nucleares e suas funções: domínio amino-terminal (NH₂-T), domínio de ligação ao DNA (DBD), dobradiça (*Hinge*) e domínio de ligação ao ligante (LBD). Fonte: BARRA *et al.*, 2004)

1.1.2 - Mecanismo de Ação dos Receptores Nucleares

Para exercer sua ação transcricional, os NRs ligam-se diretamente a seqüências específicas do DNA, chamadas de elemento responsivo, que estão localizadas na região regulatória de genes alvo (CHIELLINI *et al.*, 2002). O elemento responsivo compreende uma seqüência hexanucleotídica AGGTCA, orientada na forma de repetições diretas (DRs), de palíndromo invertido ou palíndromo sem espaçamento (BARRA *et al.*, 2004).

Os TRs podem ligar-se a uma repetição direta separada por quatro nucleotídeos, chamada de DR-4 (AGGTCANNNNAGGTCA), sob a forma de palíndromo (TRE-Pal), ou ainda, palíndromo invertido (F2) (YEN, 2001). Por outro lado, o PPAR e o RXR se ligam a repetições diretas, separadas por um nucleotídeo, DR1 (AGGTANAGGTCA) (GILDE *et al.*, 2003).

A **Figura 2** mostra o mecanismo de ação do receptor do hormônio tireoideano. Na ausência do ligante, o receptor está homodimerizado e associado a proteínas co-repressoras que impedem a ação transcricional do receptor. No entanto, na presença do ligante o receptor se heterodimeriza com o RXR. O complexo com proteínas co-repressoras é dissociado e há o recrutamento de proteínas co-ativadoras. A mudança na conformação do receptor promove a interação com a maquinaria de transcrição basal e ativação das acetilases (responsáveis pela acetilação das histonas – condição fundamental para a ação da RNA polimerase II), iniciando a transcrição do mRNA (GRONEMEYER *et al.*, 2004).

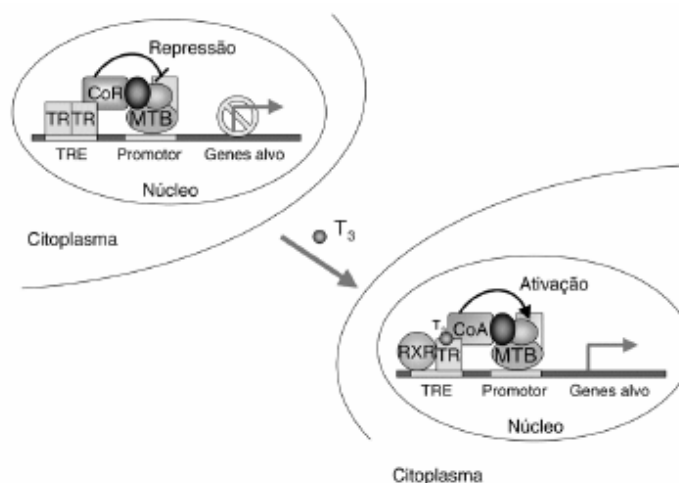


Figura 2. Mecanismo de ação dos TRs. Fonte: BARRA *et al.*, 2004.

Desordens funcionais dos NRs podem acarretar doenças proliferativas, reprodutivas e metabólicas, como o câncer, infertilidade, diabetes e obesidade (GRONEMEYER *et al.*, 2004).

1.2 – Receptores do Hormônio Tireoideano

Em humanos, dois genes codificam as isoformas TR α e TR β , localizados nos cromossomos 17 e 3, respectivamente. Cada gene codifica proteínas resultantes do processamento alternativo do RNA mensageiro (*splicing* alternativo) ou da utilização de promotores alternativos (BARRA *et al.*, 2004).

A expressão dos mRNA dos TRs varia com o desenvolvimento e com a diferenciação celular. Os mRNAs do TR α_1 , TR α_2 , TR β_1 e TR β_2 (**Figura 3**) são expressos em todos os tecidos e em níveis diferentes. As isoformas α_1 , β_1 e β_2 ligam-se ao hormônio e agem como fatores de transcrição (GROVER *et al.*, 2005) e apresentam as seguintes características: β_1 e β_2 diferem na região amino-terminal e α_1 e α_2 diferem na região carboxi-terminal, sendo que α_2 por não se ligar ao hormônio (T₃) pode inibir a transcrição mediada por TR β_1 e TR α_1 , provavelmente, por competir com a ligação ao elemento responsivo, agindo como repressor (BARRA *et al.*, 2004).



Figura 3. Estrutura primária das diferentes isoformas codificadas pelos genes receptores do hormônio tireoideano. As isoformas TR β_1 e TR β_2 são codificadas pelo gene THRB por meio da utilização de promotores alternativos e o gene THRA, por *splicing* alternativo (BARRA *et al.*, 2004).

TR α_1 e TR β_1 são expressos em quase todos os tecidos e em diferentes concentrações: TR α_1 é abundante no músculo esquelético, gordura marrom e no coração; TR β_1 , é expresso em grande quantidade no fígado, rim e cérebro; TR α_2 , ocorre restritamente no cérebro e TR β_2 é expresso principalmente na glândula pituitária (YEN, 2001).

As seqüências polipeptídicas de TR α e TR β são idênticas em 82% no LBD e 86% no DBD (CHIELLINI *et al.*, 1998). Há somente um aminoácido diferente nos resíduos de LBD: serina 227 (Ser227) no TR α_1 e aspargina 331 (Asn331) no TR β_1 , que interage com grupos polares dos ligantes dos TRs, conferindo mudanças significativas na seletividade dos subtipos de ligantes para as duas isoformas. Este resíduo não está diretamente em contato com o ligante, mas participa de uma rede de ligação de hidrogênio com a arginina (Arg320), organizado diferentemente, dependendo do ligante (YOSHIHARA *et al.*, 2001). O sítio de ligação do TR β é capaz de acomodar grupos volumosos na forma de anéis por meio da movimentação de resíduos de aminoácidos, como por exemplo a metionina 442 (Met442). Essa movimentação é, em parte, responsável pelo aumento da seletividade (HELMUT *et al.*, 2005).

1.2.1 – Ação fisiológica dos hormônios tireoideanos

A tireóide é uma glândula endócrina fundamental no crescimento e metabolismo humano. Constituída de dois lobos unidos pelo istmo, que está situada na região cervical, adiante da traquéia e é o maior órgão especializado da função endócrina no organismo humano. Sua função é sintetizar e secretar os hormônios tireoideanos (THs), mostrados na **Figura 4**, nas formas 3,5,3'-triiodotironina **(1)** (T₃) – que é a forma ativa do hormônio; 3,3',5'-triiodotironina **(2)** (rT₃ ou T₃ reverso) e 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina **(3)** (tiroxina ou T₄) - predominante (WEN *et al.*, 2007).

enzima que participa da síntese do colesterol. O colesterol diminui a ações dos THs provavelmente pelo aumento 7α -hidroxilase, enzima hepática que participa da conversão do colesterol a ácidos biliares. Assim, análogos dos THs (principalmente do hormônio ativo T_3) devem atuar como inibidores da HMG CoA redutase, estimulando a expressão da apolipoproteína AI (Apo AI) responsável por aumentar as lipoproteínas de alta densidade (HDL), promovendo a regulação do metabolismo e perda de peso, o que diminuiria o risco de aterosclerose. Os efeitos do T_3 no coração devem ser minimizados, pois aumentam a frequência, provocam arritmias e insuficiência cardíaca (BAXTER *et al.*, 2001).

1.3 – Receptor Ativado por Proliferador Peroxissomal – PPAR.

O PPAR foi identificado em 1990 com a primeira clonagem realizada em agentes proliferadores de peroxissoma em roedores (BOREL *et al.*, 2008). Atuam principalmente na regulação do metabolismo de lipídio e glicose, inflamações e angiogênese (WIESER *et al.*, 2008).

Dentre os receptores nucleares, os PPAR apresentam um dos maiores sítios de ligação (região responsável pela interação ligante-receptor). Quando comparado aos outros membros dos receptores nucleares, a característica contribui para o aumento das possibilidades de se encontrar agonistas ou antagonistas para esse receptor (GRONEMEYER *et al.*, 2004).

Em humanos, o PPAR ocorre em três isoformas: PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ , codificadas por diferentes genes localizados nos cromossomos 22, 6 e 3, respectivamente (BOREL *et al.*, 2008). A seqüência de aminoácidos é altamente conservada. A homologia é superior a 80% entre as isoformas (WIESER *et al.*, 2008).

As três isoformas do PPAR são expressas no sistema nervoso central, no tecido reprodutivo: gônadas (testículos e ovários), útero, próstata, glândula mamária e hipófise (FROMENT *et al.*, 2006).

PPAR α é expresso no tecido adiposo, fígado, cérebro, coração e músculo esquelético (HERZLINCH *et al.*, 2007). Atua na oxidação e captação de ácidos graxos, regulação de lipoproteínas (redução de LDL) e atividade antiinflamatória

(SPINELLI *et al.*, 2008). Tem como ligantes endógenos ácidos graxos saturados e insaturados (WILLSON *et al.*, 2000).

PPAR β/δ é altamente expresso no tecido adiposo, rim, intestino e coração. Atua na oxidação de ácidos graxos, proliferação e diferenciação celular, regulação de processos inflamatórios e controle da aterosclerose (SPINELLI *et al.*, 2008). Ácidos graxos de cadeia longa formam a classe de ligantes endógenos (WIESER *et al.*, 2008). A ativação de PPAR β/δ , tem apresentado resultados significativos no controle da Síndrome Metabólica em modelos experimentais, regulando os níveis de colesterol (aumento dos níveis de HDL) (BASSÉNE *et al.*, 2006) e aumento da sensibilidade à insulina (LUQUET *et al.*, 2004).

PPAR γ é amplamente expresso no tecido adiposo, bem como no músculo esquelético, tecidos onde exerce a maior parte de suas ações metabólicas. Também é expresso em células endoteliais, musculatura lisa e macrófagos (CALKIN *et al.*, 2008). Esta isoforma constitui um importante mediador transcricional com ação fisiológica na adipogênese (diferenciação e maturação de adipócitos), homeostase da glicose (aumento da sensibilidade à insulina), metabolismo lipídico, regulação de processos inflamatórios e cardiovasculares (hipertensão, hipertrofia e insuficiência cardíaca e aterosclerose) (DUAN, *et al.*, 2008). Os ligantes endógenos do PPAR γ incluem um derivado da prostaglandina 15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ J₂ (15d-PGJ₂) (4), resultante do metabolismo do ácido araquidônico, além de ácidos graxos saturados (ácido palmítico) (5) e insaturados (ácido linoléico) (6). Entre os ligantes sintéticos as tiazolidinonas são as mais utilizadas (WILLSON *et al.*, 2000) (Figura 5).

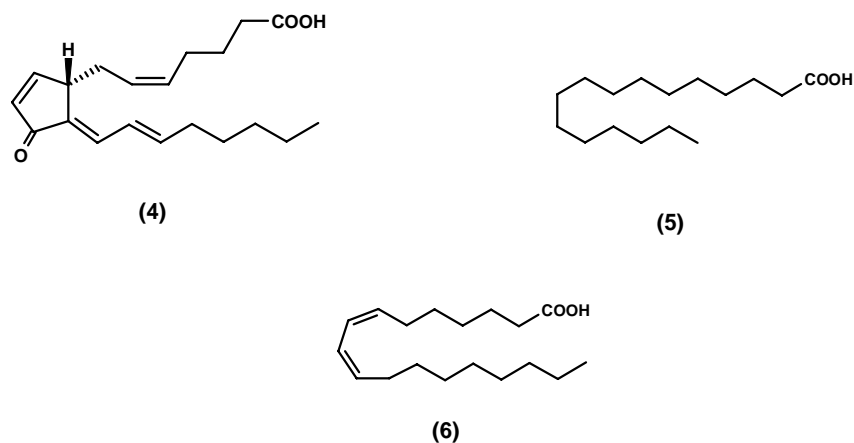


Figura 5. Estruturas químicas de alguns agonistas endógenos do PPAR

1.4 – Síndrome Metabólica

A síndrome metabólica constitui uma associação de fatores de riscos cardiovasculares incluindo hipertensão, obesidade, diabetes, resistência à insulina e dislipidemia (altos níveis de LDL) (WAUGH *et al.*, 2007). Essa associação de fatores é decorrente de processos inflamatórios relacionados ao aumento de tecido adiposo, citocinas ou macrófagos infiltrados no tecido. Além destes, outras citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral- α (TNF α) e a interleucina (IL6), produzidas no tecido adiposo, podem interferir na ação da insulina. (DANDONA *et al.*, 2002).

1.4.1 – Obesidade

Cerca de 1,2 bilhões de pessoas no mundo estão com sobrepeso e pelo menos 300 milhões delas são obesas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a obesidade é um dos dez maiores riscos evitáveis para a saúde. O estilo de vida é fator determinante para o desenvolvimento desta patologia. Está associada a distúrbios como hipertensão, diabetes, hipercolesterolemia, e doenças hepáticas (WILBORN *et al.*, 2005).

A obesidade é definida com base na relação da massa (kg), pela altura (m), o chamado Índice de Massa Corporal (IMC). Fatores genéticos, fisiológicos, comportamentais desempenham um papel significativo na etiologia da obesidade (POULAIN *et al.*, 2006).

Estudos epidemiológicos relatam que o aumento da incidência de doenças crônicas como dislipidemia, hipertensão, diabetes tipo 2 e doença cardíaca está associada ao aumento de massa corporal. Complicações comumente encontradas em pacientes obesos têm sido mais relacionadas com o excesso de gordura do que com o excesso de peso. A gordura abdominal constitui o maior fator de risco para doenças coronárias, diabetes tipo 2 e mortalidade (DESPRÉS *et al.*, 2001).

1.4.2 – Diabetes Mellitus

O diabetes manifesta-se basicamente de duas formas: o *Diabetes Mellitus* tipo 1 (DM1) e o *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2). O DM1 é caracterizado pela deficiência na produção de insulina devido à auto-destruição de células β -pancreáticas. O tratamento é feito com insulina exógena a fim de evitar o desenvolvimento de cetoacidose. Sua frequência é baixa em relação ao DM2, que representa mais de 90% dos casos. (ZIMMET *et al.*, 2001)

O DM2, é considerado uma epidemia global, atribuída à síndrome metabólica e a fatores de riscos cardiovasculares, agravados pela obesidade abdominal, dislipidemia, hipertensão e hiperglicemia (JAY *et al.*, 2007).

O DM2 é inicialmente caracterizado pela secreção anormal da insulina e/ou resistência desta em tecidos alvos: músculo, fígado e adipócitos (DEFRONZO *et al.*, 2004). Num estágio inicial, o pâncreas produz uma quantidade maior de insulina a fim de compensar a resistência e reduzir a taxa glicêmica. Se não tratada, a resistência evolui para um quadro de intolerância à glicose, e mesmo altos níveis de insulina não são capazes de reduzir a glicemia após a ingestão de alimentos (REAVEN, 1995).

A insulina é um hormônio anabólico, secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas de Langerhans. É importante na conservação e utilização da energia. Essas células não só produzem insulina, mas também secretam esse hormônio em quantidades apropriadas para manter os níveis de glicose plasmática dentro dos estreitos limites fisiológicos. A insulina exerce diversas ações biológicas, as quais incluem regulação de glicose e síntese de lipídeos e proteínas (LEIBIGER *et al.*, 2002).

A principal ação fisiológica da insulina é a regulação da homeostase da glicose, através da inibição da gliconeogênese (formação de glicose a partir de fontes diferentes de carboidratos) no fígado e estimulação da captação de glicose em tecidos insulino-sensíveis (tecido adiposo, músculos esquelético e cardíaco) pelo aumento da proteína transportadora de glicose (GLUT4) e de um compartimento intracelular para a membrana plasmática, o que resulta em um aumento da absorção de glicose. (CHEATHAM *et al.*, 2000) O receptor de insulina

é uma tirosina quinase, que sofre autofosforilação e catalisa a fosforilação de proteínas celulares, tais como membros da família IRS (Substrato do Receptor de Insulina). (LEIBIGER *et al.*, 2002).

1.4.3 – Farmacoterapia usual

Embora estudos relacionem educação alimentar e a atividade física entre os principais tratamentos para o excesso de peso e DM2, o uso de medicamentos acaba sendo recomendado para a maioria dos casos. A redução da taxa de glicose e do colesterol reduz significativamente os riscos de doenças cardiovasculares (McLAUGHLIN *et al.*, 2007)

Atualmente existem diferentes classes de fármacos que atuam no controle da dislipidemia (estatinas, hormônio tireoideano), da glicose (sulfoniluréias, biguanidas, inibidores de α -glicosidase e as tiazolidinadionas (TZDs), além de processos inflamatórios (fibratos).

As estatinas (**Figura 6**) atuam como potentes inibidores da HMG-CoA redutase, fundamental para a biossíntese do colesterol. Essa inibição reduz a secreção de lipoproteínas contendo apolipoproteína B (apo-B) e aumenta a síntese dos receptores de LDL (CHUNG *et al.*, 2000).

Os efeitos pleiotrópicos incluem a melhora da disfunção endotelial (aumento da liberação de óxido nítrico derivado do endotélio), efeitos antioxidantes diretos (inibindo a oxidação da LDL-C e VLDL-C) e indiretos, ação antiinflamatória e efeitos imunomodulatórios. Com relação aos níveis séricos de IL-6 e TNF- α , os estudos ainda apresentam resultados controversos sobre a capacidade das estatinas reduzirem significativamente estes marcadores (JORGE *et al.*, 2005).

A mevastatina (**7**) foi isolada em 1976 como produto metabólico de culturas de *Penicillium citrinium*, com afinidade cerca de 10.000 vezes maior pelo sítio enzimático em relação ao substrato da HMG-CoA redutase. No entanto, seu uso foi suspenso devido a complicações intestinais e hepáticas observadas em modelos experimentais (LIAO *et al.*, 2005).

Entre as estatinas utilizadas atualmente estão: lovastatina **(8)** (Mevacor[®]), a pravastatina **(9)** (Pravachol[®]), simvastatina **(10)** (Zocor[®]), derivados semi-sintéticos, e fluvastatina **(11)** (Lescol[®]) (primeira estatina sintética), atorvastatina **(12)** (Lipitor[®]) e rosuvastatina **(13)** (Crestor[®])

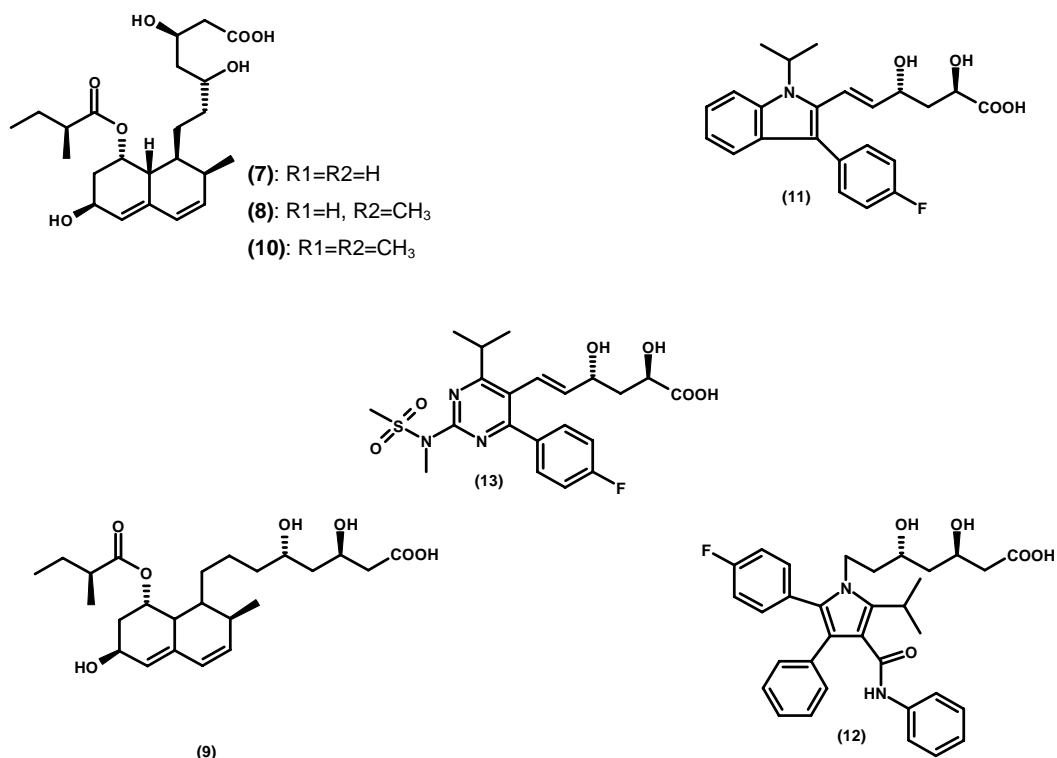


Figura 6. Estruturas químicas das estatinas.

O hormônio tireoideano ativo T₃ **(1)** também atua como redutor dos níveis de colesterol e metabolismo de lipoproteína (LDL) por meio da ativação mediada por TR β . No entanto, os efeitos cardíacos decorrentes da ativação mediada por TR α , restringem seu uso como agente hipolipidêmico (JOHANSSON *et al.*, 2005).

A terapia com THs só é recomendada para pacientes que apresentam hipotireoidismo pois os possíveis efeitos benéficos são contrabalanceados por efeitos deletérios, principalmente taquicardia e arritmias (GROVER *et al.*, 2005).

Cerca de 14% do T₃ é convertido em um análogo natural, o 3,3',5-ácido triiodotetracético (Triac) **(14)** via alteração da cadeia lateral de alanina, **(Figura 7)** (CARLIN *et al.*, 1993).

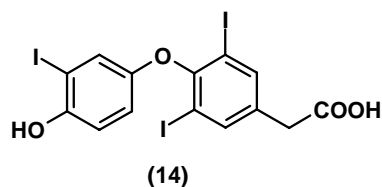


Figura 7. Estrutura do 3,3',5-ácido triiodotetracético (Tiac[®])

A ação fisiológica do Triac **(14)** ainda não está bem elucidada, mas este tem sido utilizado no tratamento da Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoideano (THRS) (MESSIER *et al.*, 2001), caracterizada pela hipossensibilidade aos THs e associada a elevados níveis séricos de T₃ **(1)**, T₄ **(3)** e TSH (YEN, 2003) decorrente de duas mutações próximas à região de dobradiça no LBD do TRβ (REUTRAKUL *et al.*, 2000). Dentre as manifestações clínicas estão: baixa estatura, redução de peso, taquicardia, perda auditiva, *deficit* de atenção, dislexia, retardo mental (KANESHIGE *et al.*, 2000).

O ácido 3,5-diidotiropropionico (DITPA) **(15)** mostrado na **Figura 8** tem sido testado em modelos experimentais para tratamento pós-infarto a fim de estimular a angiogênese (TOMANEK *et al.*, 1998).

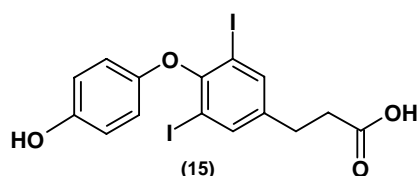


Figura 8. Estrutura do 3,5-diidotiropropionico (DITPA)

O DM2 é uma doença crônica e, em geral, está associada a outras disfunções, como hipertensão, doenças cardiovasculares, aterosclerose, dislipidemias, entre outras. O mercado farmacêutico oferece vários medicamentos que atuam no controle glicêmico. A **Figura 9** mostra alguns exemplos: sulfoniluréias (clorpropamida, **16**), inibidores da α-glicosidade (arcabose, **17**), biguanidas (metformina, **18**), tiazolidinadonas (pioglitazona **19**, rosiglitazona **20**, troglitazona, **21**) e bezafibrato **22 (Figura 10)** (BALAKUMAR *et al.*, 2007).

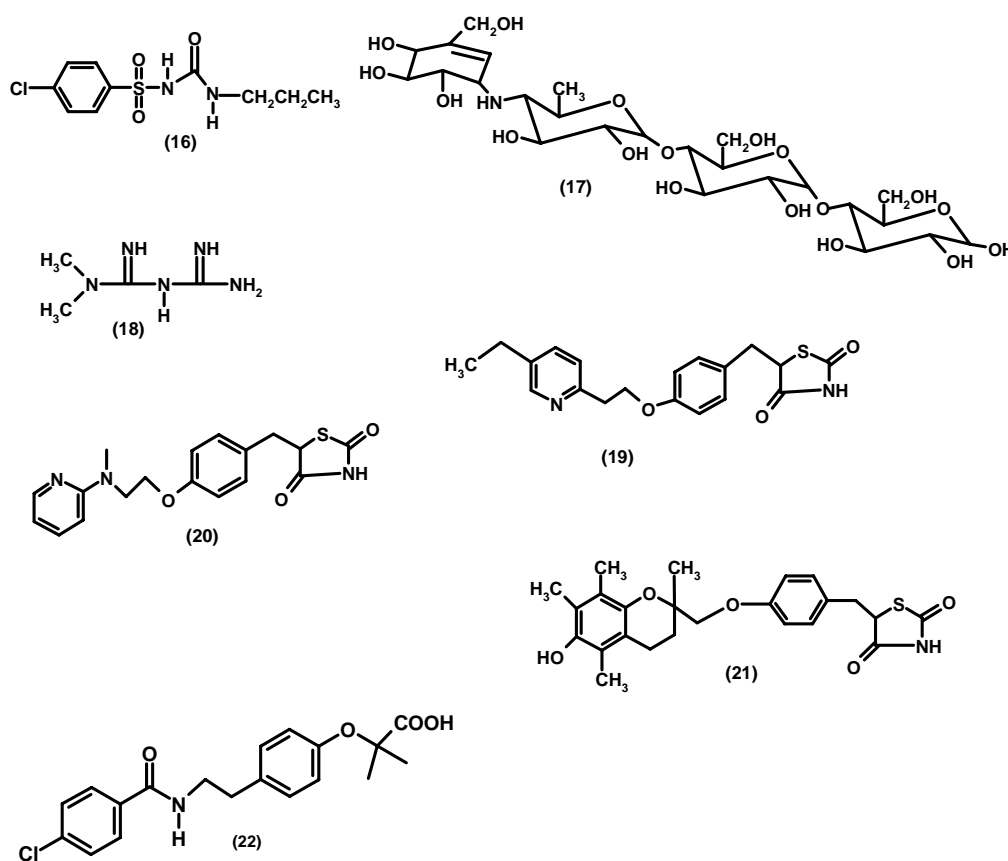


Figura 9. Estruturas químicas de alguns medicamentos disponíveis no mercado para o controle glicêmico no DM2.

A clorpropamida **(16)** é um fármaco da classe das sulfoniluréias que estimula a secreção de insulina pelo pâncreas por meio da ligação no receptor para sulfoniluréias (SUR1) presente nas células β pancreáticas, resultando no bloqueio dos canais de K^+ ATP-sensíveis, promovendo aumento do influxo de Ca^{2+} para o interior da célula. (YAN *et al.*, 2004).

Inibidores da α -glicosidade como a arcabose **(17)** reduzem a absorção de carboidratos após ingestão de alimentos. A inibição desta enzima retarda a absorção da glicose pelo intestino. Distúrbios gastrointestinais são os principais efeitos colaterais deste medicamento (CHIASSON *et al.*, 2002).

Na classe das biguanidas, destaca-se a metformina **(18)**. Sua principal ação está na supressão da gliconeogênese hepática e no aumento da

sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos. Possui como efeitos adversos distúrbios gastrointestinais (NATALI, *et al.*, 2004).

As TZDs mimetizam a ação dos agonistas endógenos agindo diretamente nos adipócitos aumentando a sensibilidade à insulina de tecidos-alvo por ativação de PPAR γ (GILDE *et al.*, 2003). Atuam no controle da glicemia de pacientes com DM2, além de processos inflamatórios e hipertensão (WILLSON *et al.*, 2000). Há duas hipóteses que poderiam explicar a atividade de PPAR γ na melhora da resistência à insulina: (i) a redução dos níveis séricos de ácidos graxos, por transferência de uma parcela dos ácidos graxos livres presentes na corrente sanguínea para o tecido adiposo, redução da lipólise e aumento da lipogênese nos adipócitos, e (ii) a regulação de genes importantes para o metabolismo da glicose e aumento da sinalização celular mediada pela insulina (BERGER *et al.*, 2002).

Entre os principais exemplos de TZDs estão: pioglitazona **(19)**, rosiglitazona **(20)** e troglitazona **(21)**, que atuam diretamente no aumento da sensibilidade à insulina, regulação da glicose, redução dos níveis de ácidos graxos livres, marcadores inflamatórios e aterosclerose em pacientes insulino-resistente. No entanto, **(21)** (Rezulin[®]), teve seu uso suspenso devido grave ação hepatotóxica. Já **(20)** (Avandia[®]) e **(19)** (Actos[®]), apesar de não apresentarem a mesma ação tóxica sobre o fígado, também têm o uso clínico restrito por ocasionar, em modelos experimentais hipertrofia cardíaca e, em humanos, a formação de edemas e o ganho de peso (DUAN *et al.*, 2008).

O bezafibrato **(22)** é um ativador PPAR α e PPAR β/δ utilizado no tratamento contra dislipidemia, que regula os níveis de triglicerídeos em pacientes hiperlipidêmicos e reduz os riscos de doenças coronarianas (ROBINSON, 2008).

1.5 – Compostos sintéticos e Receptores Nucleares

Dos fármacos utilizados na terapêutica moderna, cerca de 85% são de origem sintética. Representam uma significativa parcela do mercado farmacêutico estimado em 510 bilhões de dólares, no ano de 2006. (BARREIRO *et al.*, 2008).

A ação terapêutica de fármacos resulta de interações destes com sistemas biológicos e é dependente de fatores relacionados com sua estrutura química e, conseqüentemente, de suas propriedades físico-químicas. Propriedades como: caráter eletrônico, hidrofóbico, ou estérico, determinam a interação fármaco – sistema biológico (TAVARES, 2004).

As propriedades físico-químicas de determinados grupos funcionais são de fundamental importância na fase farmacodinâmica dos fármacos, uma vez que a afinidade de um fármaco pelo seu biorreceptor é dependente do somatório das forças de interação dos grupamentos farmacofóricos com sítios complementares da biomacromolécula. As propriedades mais relevantes para a determinação da atividade biológica de fármacos compreendem: fatores físico-químicos (distribuição eletrônica, hidrofobicidade, estereoquímica e conformação), além de fatores farmacodinâmicos e farmacocinéticos que determinam a extensão, a velocidade de absorção e distribuição, bem como a capacidade de ligação ao sítio receptor até a sua biotransformação e excreção. Estas propriedades contribuem em maior ou menor grau para a atividade biológica da molécula e podem ser expressas por modelos matemáticos, que correlacionam descritores estruturais de compostos análogos com a atividade biológica (BARREIRO *et al.*, 2008).

A síntese de novos ligantes com ação mediada por receptores nucleares, com alvo terapêutico específico e propriedades farmacológicas para o tratamento da hipercolesterolemia e obesidade e diabetes, patologias de alta prevalências nas sociedades ocidentais modernas, tem motivado o desenvolvimento de fármacos mais efetivos, já que as formas atuais de tratamento apresentam limitações e não atendem de forma satisfatória o tratamento clínico dessas enfermidades (GROVER *et al.*, 2005).

1.5.1 – Tiromiméticos

A **Figura 10** apresenta os principais compostos tiromiméticos com ação TR β -seletiva: SKF L94901 (**23**), CGS26214 (**24**), CGS-23425 (**25**), DIMIT (**26**), GC-1 (**27**), GC-24 (**28**), KB141 (**29**).

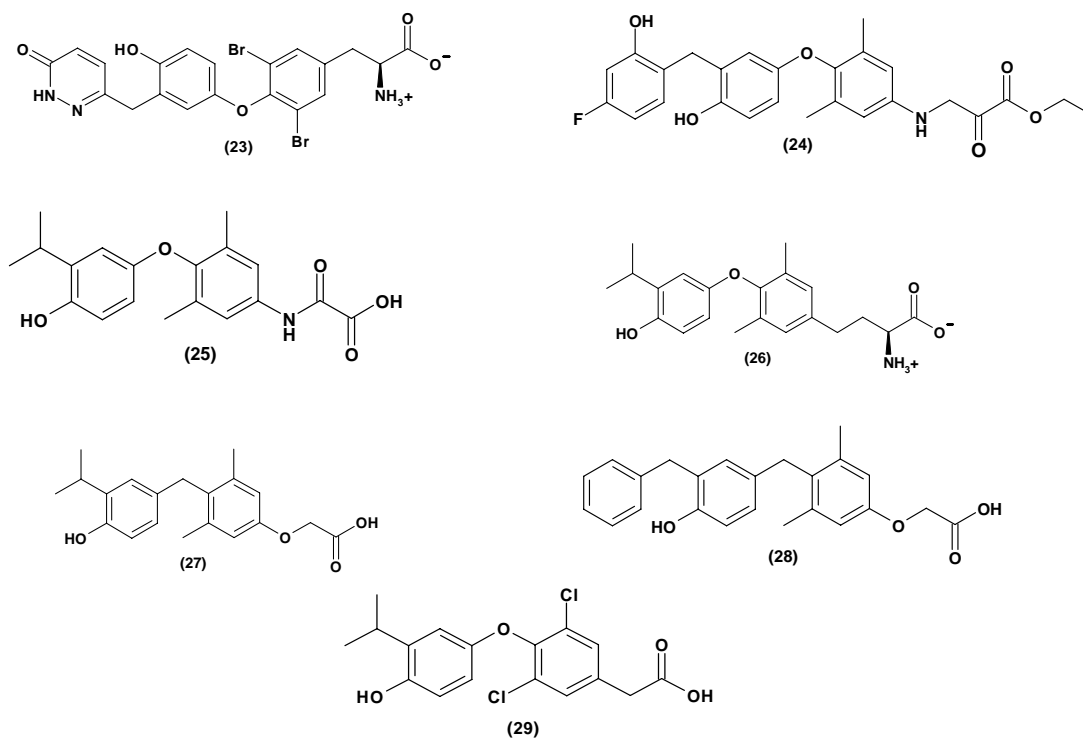


Figura 10. Estruturas químicas de alguns compostos tiromiméticos

De acordo com a literatura, o composto **23** reduziu os níveis de colesterol sem alterar funções cardíacas, mas como não exerceu efeitos sobre a taxa metabólica não é considerado satisfatório para o tratamento contra a obesidade (NESS *et al.*, 1998 e STEPHAN *et al.*, 1996).

Os análogos do ácido oxâmico e do ácido acético (**24**) e (**25**), respectivamente, apresentaram seletividade TR β e diminuição dos níveis de LDL, mas a frequência cardíaca foi aumentada em 30% em relação a T₃ (TAYLOR *et al.*, 1997).

O composto **29** confirmou em modelos experimentais que compostos tiromiméticos seletivos para o TR β 1 podem ser úteis no tratamento da hipercolesterolemia e obesidade (CHIELLINI *et al.*, 1998 e HANING *et al.*, 2007).

O composto GC-1, **27**, foi o primeiro tiromimético TR β -seletivo, testado *in vivo*, e que apresentou capacidade de diminuir os níveis plasmáticos de colesterol sem afetar funções cardiovasculares. Foi planejado a partir de **26**, que possui

afinidade com o TR cerca de 100 vezes menor que o T₃ (**1**) (YOSHIHARA *et al.*, 2003 e GROVER, *et al.*, 2003). Estudos em modelos experimentais mostraram que **27** diminuiu os níveis de colesterol, lipoproteínas, triglicerídeos e do peso corporal sem elevar a frequência cardíaca (GROVER *et al.*, 2003). A substituição da amida presente no composto **26** pelo ácido oxiacético no composto **27**, contribuiu de forma determinante para a seletividade deste último (BLEICHER *et al.*, 2008).

O KAT-681 (**30**) apresentado na **Figura 11**, tiromimético TR β seletivo apresentou efeito inibitório no desenvolvimento de alterações hepatocelular em ratos e atuou como agente quimioprotetor contra hepatocarcinogêses (HAYASHI *et al.*, 2004).

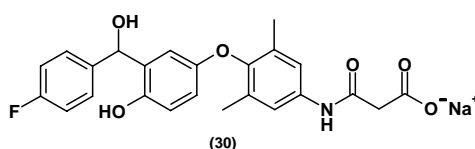


Figura 11. Estrutura química do KAT-681.

Um ponto relevante a respeito da seletividade TR β está relacionado à redução dos níveis de TSH. A repressão de TSH pode ocasionar um quadro de hipotireoidismo em alguns tecidos. Um agonista TR β seletivo deve elevar o ritmo metabólico sem afetar as funções cardíacas ou reduzir os níveis de TSH (GROVER *et al.*, 2005).

1.5.2 – Compostos Sintéticos e PPARs

Os ftalatos (**31**) mostrados na **Figura 12** são contaminantes ambientais. Em humanos, esses compostos podem alterar a função reprodutora e/ou causar feminização. A toxicidade dos ftalatos tem sido associada à ativação das isoformas α e γ do PPARs e os efeitos adversos sobre a saúde reprodutiva masculina e feminina (período pré e/ou pós natal) (LATINI *et al.*, 2008).

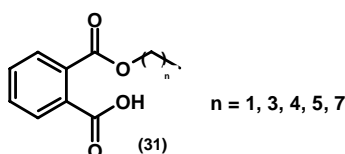


Figura 12. Representação geral dos ftalatos

Estudos mostram que as isoformas do PPAR têm papéis distintos na regulação metabolismo de lípidos, carboidratos e balanço energético. A ação do composto GW501516 **(32)** (**Figura 13**) mediada por PPAR β/δ induziu a expressão de genes envolvidos na β -oxidação, efluxo de colesterol intracelular, aumento da apolipoproteína-A1 (DRESSEL *et al.*, 2003).

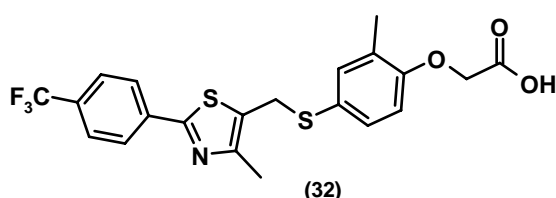


Figura 13. Estrutura química do GW501516.

Devido à importância de compostos com ação farmacológica específica e considerando a necessidade de novos ligantes que ajam de forma agonista nos receptores como TR e PPAR um grande campo de estudo surge nos dias atuais. Dessa forma, a síntese e a avaliação biológica de novos compostos e seus testes biológicos constituem uma poderosa ferramenta para a possível descoberta de novos fármacos.

2. OBJETIVO

Considerando a grande prevalência de *Diabetes Mellitus* tipo 2, obesidade, dislipidemia e doenças cardiovasculares e a necessidade da busca de novas alternativas ou novos fármacos úteis no arsenal terapêutico, o seguinte objetivo foi proposto:

2.1 Objetivo Geral

- Desenvolvimento de moléculas capazes de atuar nos receptores nucleares TR e PPAR.

- Síntese e avaliação biológica de moléculas nos receptores nucleares TR e PPAR.

2.2 Objetivos Específicos

- Planejamento e sintetizar novos compostos com possíveis atividades (agonistas ou antagonistas) em receptores nucleares.

- Testar a ação agonista ou antagonista em receptores nucleares.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Etapa Sintética

Procedimentos gerais

As reações e procedimentos químicos foram realizados no Laboratório de Isolamento e Transformações de Moléculas Orgânicas (LITMO) sob a supervisão da Prof^a. Dra. Maria Lucília dos Santos. Os testes biológicos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Molecular (FARMOL), sob a supervisão do Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni.

Os reagentes e solventes utilizados foram adquiridos de fornecedores comerciais (Aldrich, Vetec ou Merck) e utilizados sem purificação adicional, salvo nas reações em que foram necessitados com maior grau de pureza.

As análises de cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de silicagel suportada em alumínio 60F₂₅₄/0,2mm (Merck), utilizando como reveladores: luz ultravioleta, iodo, solução de vanilina sulfúrica, dinitrofenilidrazina (DNPH) e/ou solução etanólica de ácido molibdofosfórico a 5%.

Os produtos foram purificados via recristalização, cromatografia sob pressão (*Flash Column Chromatography*) ou por cromatografia rápida em coluna seca (*Dry Flash*), usando como suporte silicagel 60 (0,04-0,06mm) e como eluente hexano-acetato de etila em concentrações apropriadas.

Os pontos de fusão foram determinados no bloco Köfler e apresentados sem correção.

Os espectros da região do infravermelho (IV) foram registrados no espectrômetro Bomem Hartmann & Braun (MB – 100), com valores de ν_{\max} expressos em cm^{-1} .

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram registrados em espectrofotômetro Varian Mercury Plus (300 MHz, 7,05 T), utilizando como solventes: clorofórmio deuterado (CDCl_3) e dimetilssulfóxido (DMSO). Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (ppm) com referência ao tetrametilsilano (TMS), e os padrões de multiplicidade definidos por: **s** (simpleto), **d** (duplete), **t** (triplete), **m** (multiplete), **dd** (duplo duplete), **bl** (banda larga).

3.2– Avaliação da Atividade Biológica

Toxicidade a larvas de *Artemia salina* (Meyer et al., 1982)

Ovos de *A. salina* foram colocados para eclosão em solução salina (sal marinho sintético, 36,5 g/L), por 48 horas, com aeração e iluminação constantes.

Para o preparo das diluições, as amostras foram solubilizadas em 0,2 mL de DMSO e o volume completado para 20 mL com a solução salina. Desta solução foram preparadas as diluições seriadas, distribuídas em tubos de ensaio, em triplicata. Em cada tubo foram adicionadas 10 larvas de *Artemia salina*. Os tubos foram mantidos sob iluminação e após 24 horas, as larvas sobreviventes foram contadas.

Como controle negativo foram utilizados 3 tubos contendo 0,2 mL de DMSO em solução salina (nas mesmas condições do ensaio) e 10 larvas de *Artemia salina*. O controle positivo (2,00 mg de $K_2Cr_2O_7$) foi submetido às mesmas condições do ensaio.

O cálculo da DL_{50} foi feito utilizando o programa PROBITOS.

3.3– Plasmídeos utilizados

Os plasmídeos de expressão utilizados para os ensaios de transfecção foram: CMV-Luc, TR α , TR β , PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ , PPRE-tk-Luc e TRE-tk-Luc. Esses plasmídeos contêm as seqüências de cDNA que codificam os respectivos receptores, sob o controle do citomegalovírus (CMV).

Os plasmídeos-repórter utilizados nos ensaios possuem o elemento responsivo para o PPAR (DR1) e TR (DR4) clonados imediatamente acima do promotor mínimo (-32/+45) da timidina quinase (tk), ligado à seqüência que codifica o gene da luciferase, resultando nas construções: PPRE-tk-Luc e TRE-tk-Luc. Além disso, o promotor do citomegalovírus foi fusionado ao gene que codifica a enzima luciferase (CMV-Luc), gerando um plasmídeo produzindo luciferase constitutivamente. Todos os plasmídeos foram gentilmente cedidos pelo Dr. John Baxter do *Metabolic Research Unit, University of California (UCSF), USA*.

3.3.1 – Transformação

Para a replicação dos plasmídeos de interesse foram utilizadas cepas de bactérias *Escherichia coli* DH5 α .

Em um tubo de microcentrífuga, 100-1000 ng do plasmídeo a ser transformado foram incubados com 50 μ g da cepa de bactérias durante 30 minutos em gelo. Após esse período, as células foram submetidas a um choque térmico quando colocadas em banho a 42°C por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado em 500 μ L de meio de cultura LB (5 g de extrato de levedura, 10 g de triptona e 10 g de NaCl (Sigma[®]) em 1 litro de água destilada) sem antibiótico. Esta cultura foi incubada por 1 hora a 37°C em BOD (*Biologic Oxygen Demand*).

Após esse período, 50 μ L da transformação foram plaqueados em placa de Petri contendo meio de cultura LB com 1,5% de ágar e 0,1 mg/mL de ampicilina e novamente incubada por 16 horas a 37°C em BOD. As células que expressaram o gene de resistência a ampicilina foram transformadas e formaram colônias.

3.3.2 – Purificação de Plasmídeos

Após o processo de transformação, uma colônia resistente da cepa de bactérias foi selecionada e colocada para crescer em 5 mL de meio LB contendo 5 μ L de ampicilina (100 mg/mL) por um período de 4 a 6 horas a 37°C em incubadora com agitação – *shaker*. Em seguida, foram inoculadas em 500 mL do mesmo meio de cultura e colocada para crescer por 16 horas a 37°C sob agitação em *shaker*.

Após esse período, as bactérias foram separadas do meio por centrifugação e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi utilizado para extração e purificação dos plasmídeos feito de acordo com o protocolo do *Quiagen Plasmid Maxi Kit*. A purificação dos plasmídeos por esse *kit* baseia-se na afinidade do DNA por uma coluna de troca iônica, onde sua carga negativa interage com a carga positiva da resina desta mesma coluna.

3.4 – Cultura de células

Foram utilizadas células derivadas de promonócitos humanos (U937) obtidas do Centro de Cultura de Células da Universidade das Califórnia, São Francisco (UCSF – *University of California, San Francisco*) e do Banco de Células do Rio de Janeiro. Estas células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (GIBCO®), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) em uma incubadora a 37°C com 5% de CO₂.

3.4.1 – Transfecção e Ensaio de Gene-Repórter

Os ensaios de transfecção e gene-repórter são métodos utilizados na pesquisa e identificação de ligantes para receptores nucleares (CHIELLINI, *et. al.*, 1998). As células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em 0,5 mL de solução de PBS (*Phosphate Buffered Saline*), contendo 0,1% de dextrose. Em seguida foram misturadas a 3,0 µg do plasmídeo repórter e a 2,0 µg do plasmídeo de expressão e transferidas para cuvetas (Gene Pulser® cuvette Bio-Rad) e eletroporadas em eletroporador (gerador de pulso Bio-Rad) com voltagem de 300 mV e 950 µF que promove a abertura da membrana plasmática e favorece a entrada na célula do plasmídeo repórter e de expressão.

As células foram transferidas para tubos contendo meio RPMI 1640 com 10% SFB e ressuspensas. A seguir, foram plaqueadas em placas de 12 poços Corning® (1,0 mL/poço) e tratadas com: a) veículo (DMSO:EtOH, 2:3), usado como controle negativo; b) com os controles positivos (agonistas): T₃ Sigma® (10⁻⁶ M) para TR α e TR β ; rosiglitazona (Sigma®) (10⁻⁵M) ou bezafibrato (Sigma®) (10⁻⁴M) para PPAR γ , PPAR α e β/δ ; e ainda, com os compostos KF01 (**42**), KF02 (**43**) e KF03 (**44**) na concentração de 10⁻⁴M na presença ou ausência dos controles positivos. As células foram então incubadas por um período de 18 a 24 horas.

Para o ensaio de gene-repórter foi utilizado o *kit luciferase assay with reporter lysis buffer* (Promega). Após o período de incubação, as células foram transferidas para microtubos de centrífuga de 1,5 mL e centrifugadas por 2 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi aspirado e descartado. Ao precipitado celular formado foram adicionados 150 µL do tampão de lise do *kit reporter lysis*

buffer 5X (Promega). Posteriormente foi agitado em *vortex* e incubado a 4°C por, no mínimo, 20 minutos. Para a determinação da atividade da luciferase, foram adicionados 20 µL de luciferina *kit promega corp* a 20 µL do lisado celular. A emissão de luz gerada pela reação enzimática entre luciferina e luciferase foi quantificada por um luminômetro, o qual gera resultados em unidades relativas de luz. A taxa de ativação do receptor em questão (ou seja, quantas vezes o receptor foi ativado por um determinado ligante) foi calculada pela divisão dos valores obtidos pelas amostras tratadas com os compostos ou agonistas (controles positivos) pelos valores das amostras tratadas com o veículo. Cada ensaio foi realizado, no mínimo, por três vezes e em triplicata.

A atividade de KF01, KF02 e KF03 também foi testada nos receptores de glicocorticóide humano (GR), no receptor do ácido cis-9-retinóico humano (RXR) e no gene-repórter dirigido pelo promotor do citomegalovírus (CMV-Luc). Foram utilizados 3,0 µg do plasmídeo-repórter e 1,5 µg do plasmídeo de expressão. No caso do CMV-Luc, foi utilizado 1µg nos ensaios de transfecção. O gene-repórter CMV-Luc é ativado constitutivamente e não tem sua atividade alterada com a adição dos agonistas de receptores acima citados.

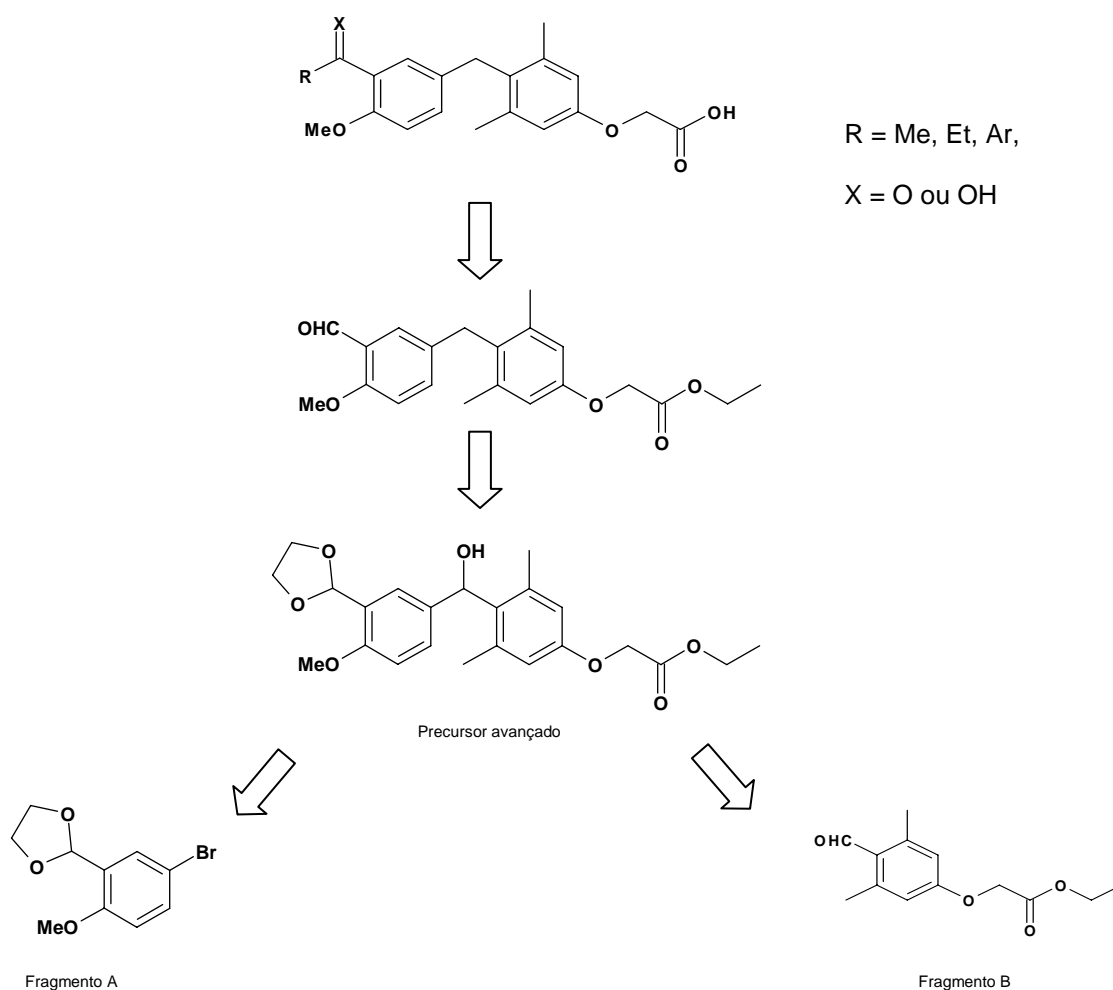
3.5– Análise Estatística

Os dados apresentados representam as médias dos experimentos ± erro padrão de, no mínimo, três ensaios em triplicata. Os dados foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA), utilizando as múltiplas comparações seguido de Newman-Keuls Multiple Comparision por meio de software GraphPad Prism 3.0.

4. Resultados e discussões:

4.1- Análise Retrossintética

A partir da análise retrossintética dos análogos do HT foram identificados os fragmentos A e B que, a princípio, poderiam ser acoplados por metodologias clássicas (por exemplo, reações com organometálicos) para preparação dos análogos desejados, onde R seria representado por uma variedade de grupos substituintes.



Esquema 1. Análise retrossintética de análogos do hormônio tireoideano.

Para obtenção dos fragmentos A e B, respectivamente, foram utilizados como matérias-primas o 5-bromosalicilaldeído (**33**) e o 3,5-dimetilfenol (**37**), os quais foram obtidos de fornecedores comerciais (Aldrich® e Fluka®). Ambas as matérias-primas foram caracterizadas por espectroscopia de IV e RMN de ^1H .

O espectro do IV de (**33**) (Anexo, p. 87) apresentou uma banda de absorção em 3439 cm^{-1} correspondente ao estiramento da ligação do grupo OH. A absorção em 1674 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação C=O, em 2842 e 2763 cm^{-1} estiramento de ligação C-H característicos de grupo aldeído e na região de 1591 a 1460 cm^{-1} estiramento de ligações C=C de aromático. O espectro de RMN de ^1H (Anexo, p. 88) mostrado na **Figura 14** apresenta um simpleto em $10,93$ ppm correspondente ao aldeído e outro simpleto em $9,84$ ppm correspondente à hidroxila fenólica e os picos em $7,68$ ppm, $7,62$ ppm e $6,93$ ppm correspondentes ao sistema aromático.

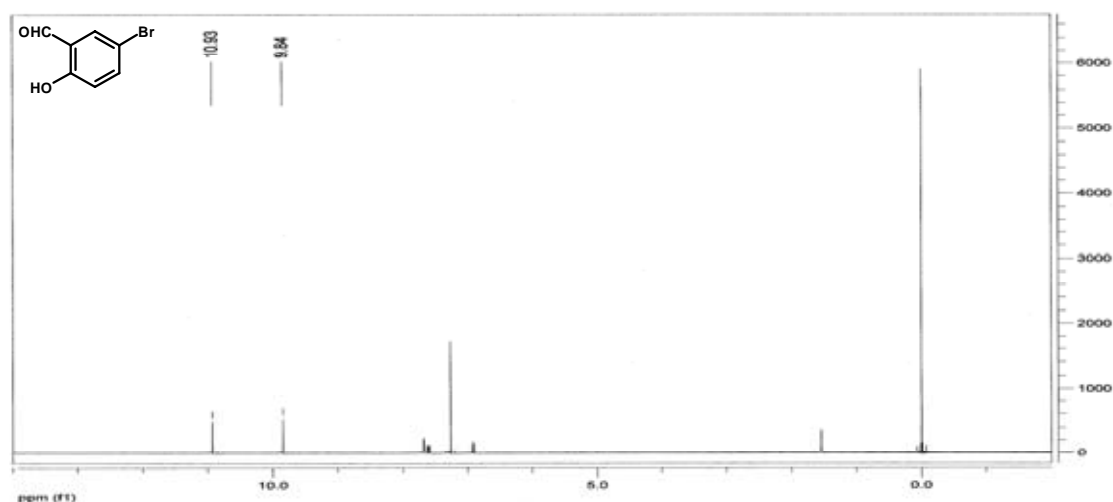


Figura 14. Espectro de RMN ^1H do 5-bromosalicilaldeído (**33**).

Já o espectro do IV (Anexo, p. 89) de (**37**) apresentou banda de absorção em 3286 cm^{-1} , característica de estiramento da ligação O-H. Na região de 1591 a 1474 cm^{-1} estiramento de ligações C=C do sistema aromático. As absorções em 2917 cm^{-1} e em 2850 cm^{-1} correspondem a estiramentos, simétrico e assimétrico, dos grupos metila. O espectro de RMN de ^1H (Anexo, p. 90) (**Figura 15**) apresenta dois simpletos em $6,61$ ppm e em $6,49$ ppm atribuídos aos hidrogênios

aromáticos, um simpleto largo em torno 4,81 ppm da hidroxila fenólica e o simpleto em 2,28 ppm correspondente os dois grupos metila.

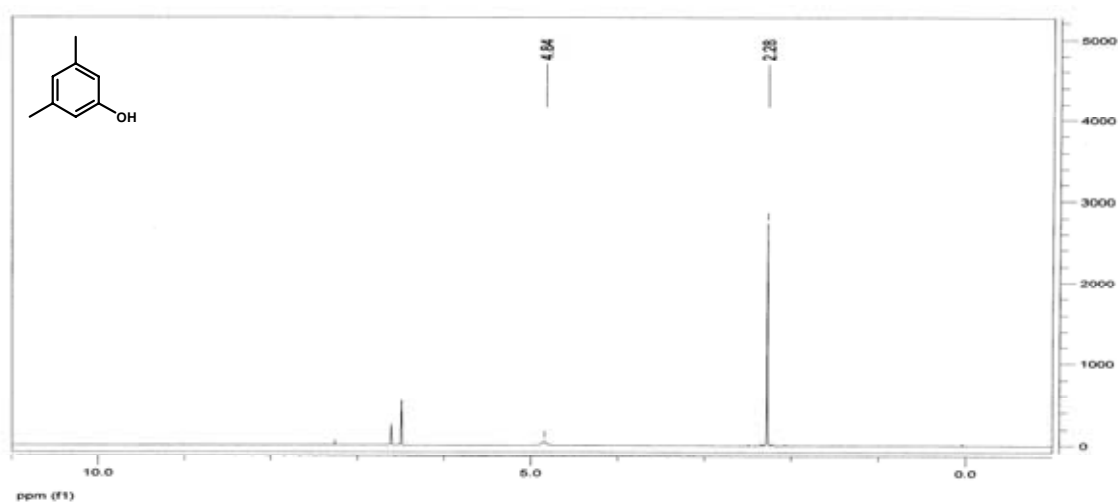
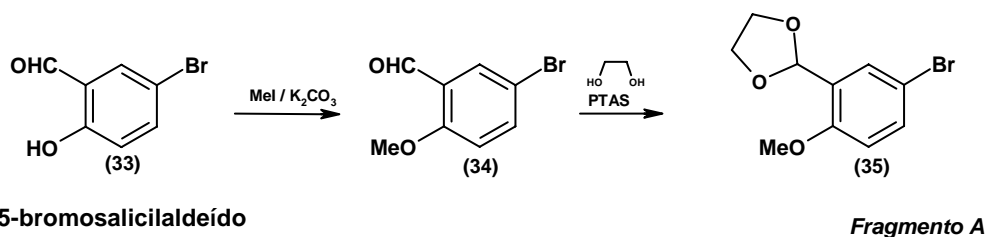


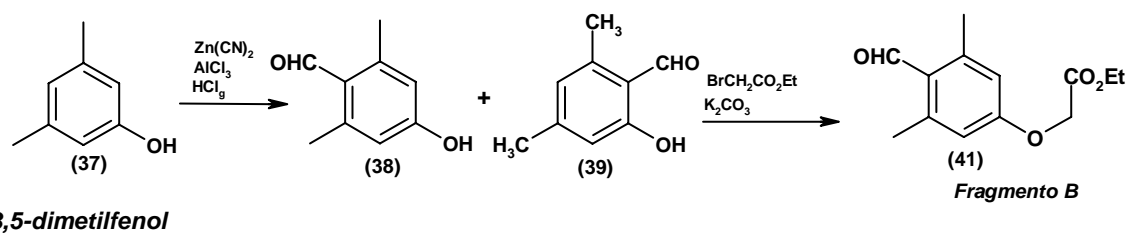
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H do do 3,5-dimetilfenol (**37**).

Na preparação do fragmento A foi planejada uma seqüência de reações envolvendo *o*-metilação e proteção do grupo carbonila. Por outro lado, as reações de formilação e alquilação foram programadas para obtenção do fragmento B (Esquema 2).

Construção do Fragmento A:

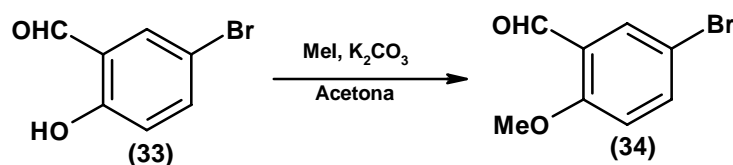


Construção do Fragmento B:



Esquema 2. Rotas sintéticas para a preparação dos fragmentos A e B.

A rota sintética para a preparação do fragmento A teve início com a reação de metilação na hidroxila fenólica do 5-bromosalicilaldeído (**33**), por tratamento deste com iodeto de metila em presença de carbonato de potássio. O 5-bromo-*o*-anisalaldeído (**34**) foi obtido como um sólido amarelo, com 97% de rendimento.



Esquema 3. Preparação do 5-bromo-*o*-anisalaldeído (**34**)

O 5-bromo-*o*-anisalaldeído (**34**) foi caracterizado por espectroscopia de IV (Anexo, p. 91) e RMN ¹H. As bandas de absorção em 2967 e 2876 cm⁻¹ correspondem a estiramento de ligação C-H de grupo metila, indicando a formação do produto desejado. O espectro de RMN de ¹H (Anexo, p. 92) confirma a obtenção do mesmo pela presença de um simpleto em 3,93 ppm característico de hidrogênio do grupo metoxila e o desaparecimento do simpleto em 9,84 ppm correspondente à hidroxila fenólica, conforme observado na **Figura 16**.

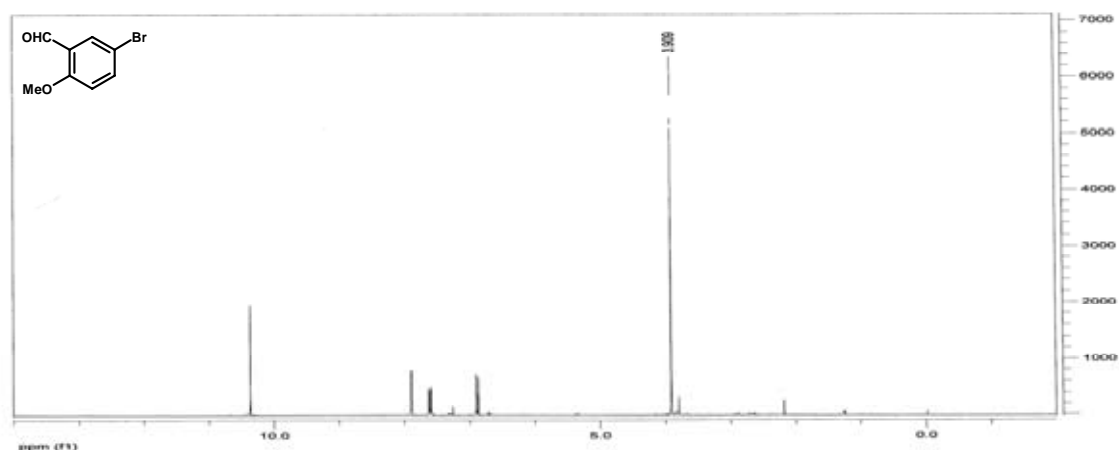
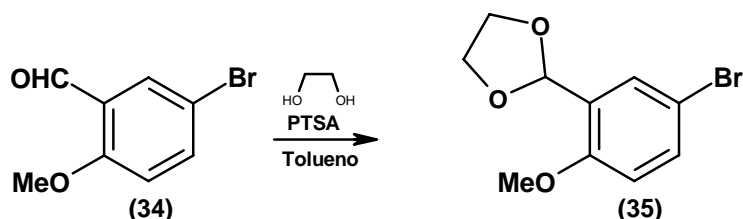


Figura 16. Espectro de RMN ¹H do 5-bromo-*o*-anisalaldeído.

Na etapa seguinte, o 5-bromo-*o*-anisaldeído (**34**) foi tratado com dois equivalentes de etilenoglicol, na presença do ácido *p*-toluenossulfônico em quantidades catalíticas num sistema Dean Stark para obtenção do fragmento A, o 5-bromo-*o*-anisoletilenoacetal (**35**).



Esquema 4. Preparação do 5-bromo-*o*-anisoletilenoacetal (**35**).

Este intermediário apresentou-se como um sólido amarelo e foi caracterizado por espectroscopia de IV e RMN ¹H. O espectro de IV (Anexo, p. 93) do composto (**35**) apresenta bandas de absorção em 2944 cm⁻¹ e 2887 cm⁻¹, correspondentes a estiramento de ligação C-H de grupos metílicos e metilênicos, em 1454 cm⁻¹ indica a presença de grupos metilenos e em 1139 cm⁻¹ e 1088 cm⁻¹, estiramento da ligação C-O-C, do etileno acetal. No espectro de RMN de ¹H (Anexo, p. 94) (**Figura 17**) a ausência do simpleto em 10,20 ppm correspondente ao C-H do aldeído, além da presença de multipletos em 4,11-4,03 ppm correspondentes aos dois grupos metilenos do acetal e um simpleto em 6,17 ppm confirmam a formação do produto.

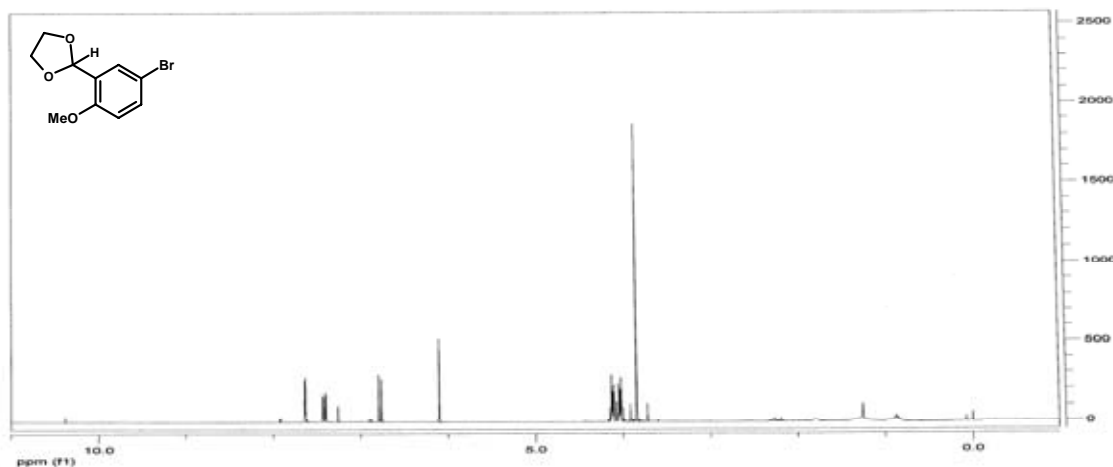
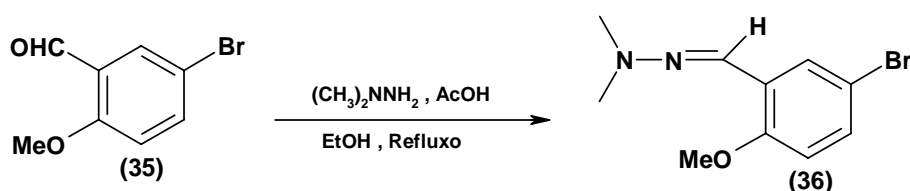


Figura 17. Espectro de RMN ¹H do 5-bromo-*o*-anisoletilenoacetal (**35**).

No entanto, dificuldades em reproduzir a reação e o baixo rendimento (13%), motivaram a alteração da rota sintética. Foi decidida, então, pela proteção do grupo carbonila na forma de N,N–dimetil hidrazona, muito utilizada na química de compostos carbonílicos.

A obtenção da 5-bromo-*o*-anisalaldeído-N,N–dimetil hidrazona (**36**), agora considerada como o fragmento A, ocorreu na presença de EtOH e em presença de quantidades catalíticas de AcOH. A transformação foi realizada em condições amenas e com rendimento de 89%, bem superior ao obtido na reação para a obtenção do 5-bromo-*o*-anisoletilenoacetal (**35**).



Esquema 5. Preparação da 5-bromo-*o*-anisalaldeído-N,N–dimetil hidrazona (**36**).

No espectro do IV (Anexo, p. 95) do composto (**36**) não se observa a banda de absorção na região 1671 cm^{-1} , correspondente ao estiramento da ligação C=O de grupo aldeído da matéria-prima (**35**). No entanto, uma banda em 2361 cm^{-1} é característica de ligação C=N. A formação de (**36**) foi confirmada no espectro de RMN de ^1H (Anexo, p. 96) (**Figura 18**) pela ausência do simpleto em 10,20 ppm correspondente ao aldeído, pela presença de um simpleto em 7,90 correspondente ao hidrogênio ligado à hidrazona e um simpleto em 2,98 ppm correspondente aos hidrogênios dos grupos metila.

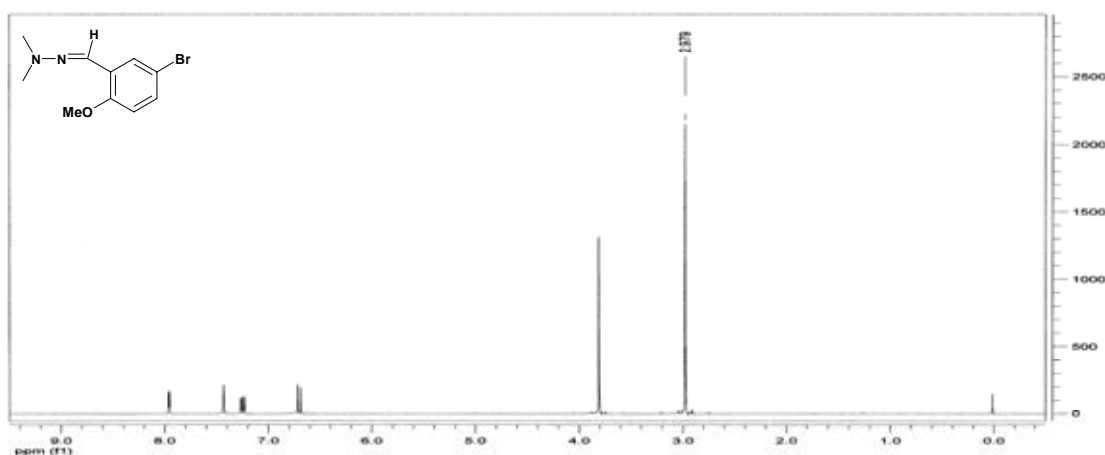
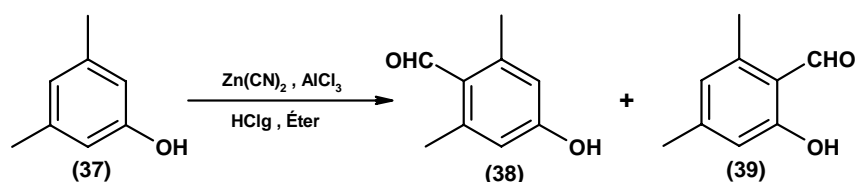


Figura 18. Espectro de RMN ^1H da 5-bromo-o-anisalaldeído-N,N-dimetil hidrazona (**36**)

A etapa inicial para a síntese do fragmento B envolveu a formilação do 3,5-dimetilfenol (**37**) por meio de uma variação da reação de Gattermann, que emprega $\text{Zn}(\text{CN})_2$ e HCl como fontes geradoras *in situ* de ácido cianídrico, além de AlCl_3 como catalisador. Após hidrólise ácida, os dois produtos obtidos: 2,6-dimetil-4-hidroxibenzaldeído (**38**) e 2,4-dimetil-6-hidroxibenzaldeído (**39**), apresentaram-se como sólidos amarelos após separação em coluna *flash*, com rendimento global de 68% (25% e 43%, respectivamente).



Esquema 6. Preparação do 2,6-dimetil-4-hidroxibenzaldeído (**38**) e do 2,4-dimetil-6-hidroxibenzaldeído (**39**).

O 2,6-dimetil-4-hidroxibenzaldeído (**38**) apresentou no espectro do IV (Anexo, p. 97) absorção em 1652 cm^{-1} correspondente ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ do aldeído. No espectro RMN de ^1H (Anexo, p. 98) (**Figura 19-a**) a presença do simpleto em 10,46 ppm correspondente ao aldeído e apenas um simpleto em 6,54 ppm (região aromática) e um simpleto em 2,59 ppm correspondente aos hidrogênios das metilas confirmam a formação e a simetria do produto. A formação do 2,4-dimetil-6-hidroxibenzaldeído (**39**) também foi confirmada no espectro do IV pelo estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ do aldeído em 1651 cm^{-1} . O

espectro de RMN de ^1H (Anexo, p. 99) (**Figura 19-b**) apresenta um simpleto em 11,95 ppm correspondente à hidroxila fenólica e outro simpleto em 10,23 ppm característico do aldeído. Diferentemente do observado no espectro de RMN ^1H do 2,6-dimetil-4-hidroxibenzaldeído (**38**), o espectro de RMN de ^1H (Anexo, p. 100) do 2,4-dimetil-6-hidroxibenzaldeído (**39**) apresenta na região do sistema aromático dois simpletos em 6,62 ppm e 6,53 ppm, e outros dois simpletos em 2,55 e 2,30 ppm correspondentes aos dois grupos metilas, esse deslocamento indica que os referidos hidrogênios encontram-se em ambientes químicos diferentes.

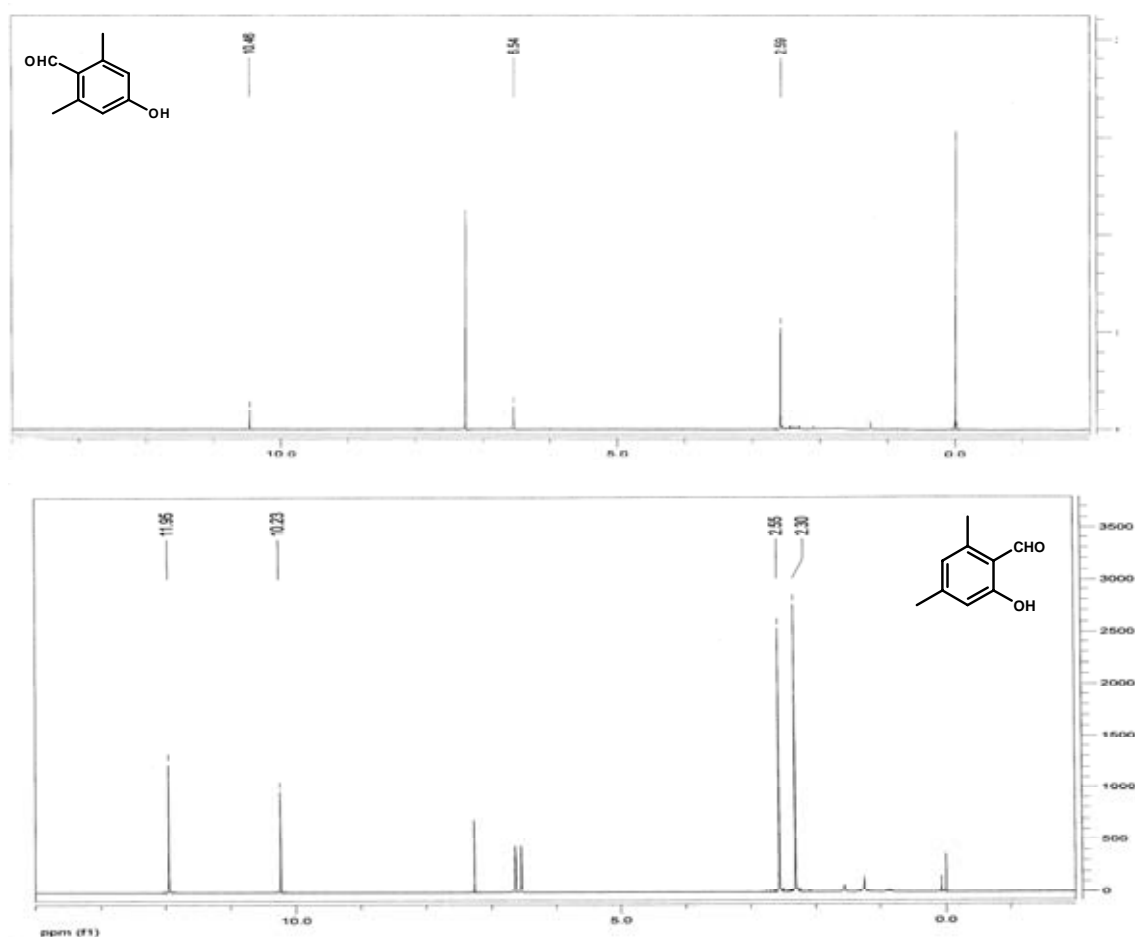
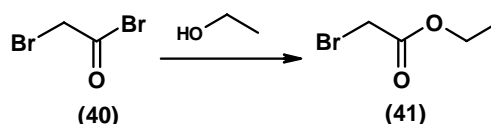


Figura 19. Espectros de RMN ^1H do 2,6-dimetil-4-hidroxibenzaldeído (**38**) (**A**) e do 2,4-dimetil-6-hidroxibenzaldeído (**39**) (**B**).

Na etapa seguinte, a hidroxila fenólica do 3,5-dimetilfenol (**37**) foi protegida na forma acetoacetato de etila, por tratamento com bromoacetato de etila, agente alquilante para a formação da cadeia lateral do fragmento B. Para tanto, o brometo de bromoacetila foi tratado com etanol gerando o bromoacetato de etila (**41**), com 83% de rendimento.



Esquema 7. Preparação do bromoacetato de etila (**41**).

O espectro do IV (Anexo, p. 101) do bromoacetato de etila (**41**) apresentou duas bandas de absorção em 2984 e em 2938 cm^{-1} correspondentes a estiramento de ligação saturada C-H de grupos metílicos e metilênicos. Em 1735 cm^{-1} absorção característica de ligação C=O de ésteres alifáticos. No espectro de RMN de ^1H (Anexo, p. 102) (**Figura 20**), o grupo etila (CH_2CH_3) apresentou-se como um quarteto em 4,20 ppm e um triplete em 1,26 ppm. O simpleto em 3,80 ppm foi atribuído ao grupo metileno (CH_2 ligado ao bromo).

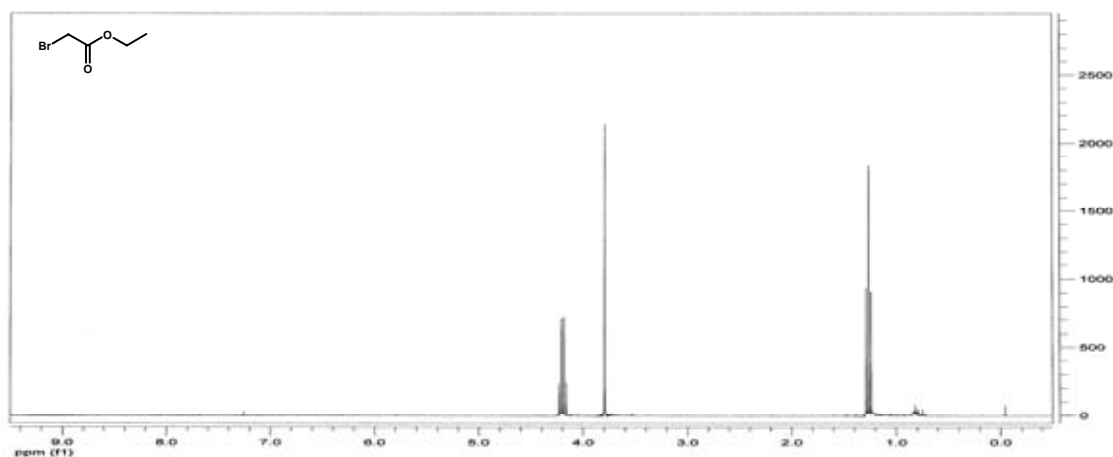
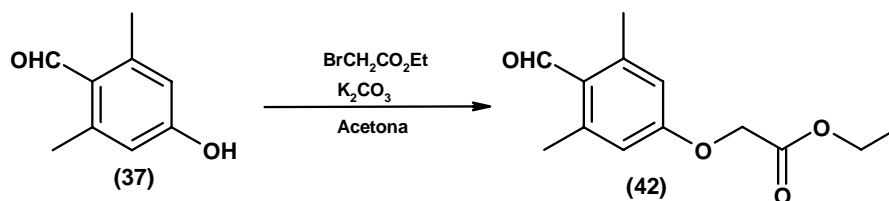


Figura 20. Espectro de RMN ^1H do bromoacetato de etila (**41**).

Para a produção do fragmento B, foram utilizados 2,6-dimetil-4-hidroxibenzaldeído (**38**), bromoacetato de etila (41), K_2CO_3 e acetona. Nessas condições, o (4-formil-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (**42**, **KF01**) foi obtido como um sólido amarelo em rendimento de 98%.



Esquema 8. Preparação do (4-formil-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (**42**).

No espectro do IV (Anexo, p. 103) de KF01 (**42**) observou-se a presença de bandas em 2981 e 2927 cm^{-1} , características do estiramento de ligação C-H de carbonos metílicos e metilênicos, e absorções em 1430 e 1455 cm^{-1} atribuídas a deformações angulares de ligação C-H de grupos metilênicos. Para a cadeia lateral, foram observadas ainda uma banda em 1764 cm^{-1} correspondente ao estiramento da ligação C=O e bandas em 1317 e 1031 cm^{-1} correspondentes a deformação axial de ligação C-O do grupo éster.

Nas análises dos espectros de RMN de 1H (Anexo, p. 104) (**Figura 21-a**) e de ^{13}C (Anexo, p. 105) (**Figura 21-b**) de KF01 (**42**) foi possível inferir que o simpleto em 4,63 ppm corresponde ao CH_2 da subunidade aceto e os sinais em 4,32 ppm (quarteto) e 1,28 ppm (triplete) em correspondem, respectivamente, ao CH_2 e CH_3 do grupo etila. Assinalamentos confirmados pela presença de quatro sinais 167,8 (C=O), 64,4 (OCH_2), 61,1 (OCH_2) e 13,7 (CH_3) no espectro de ^{13}C .

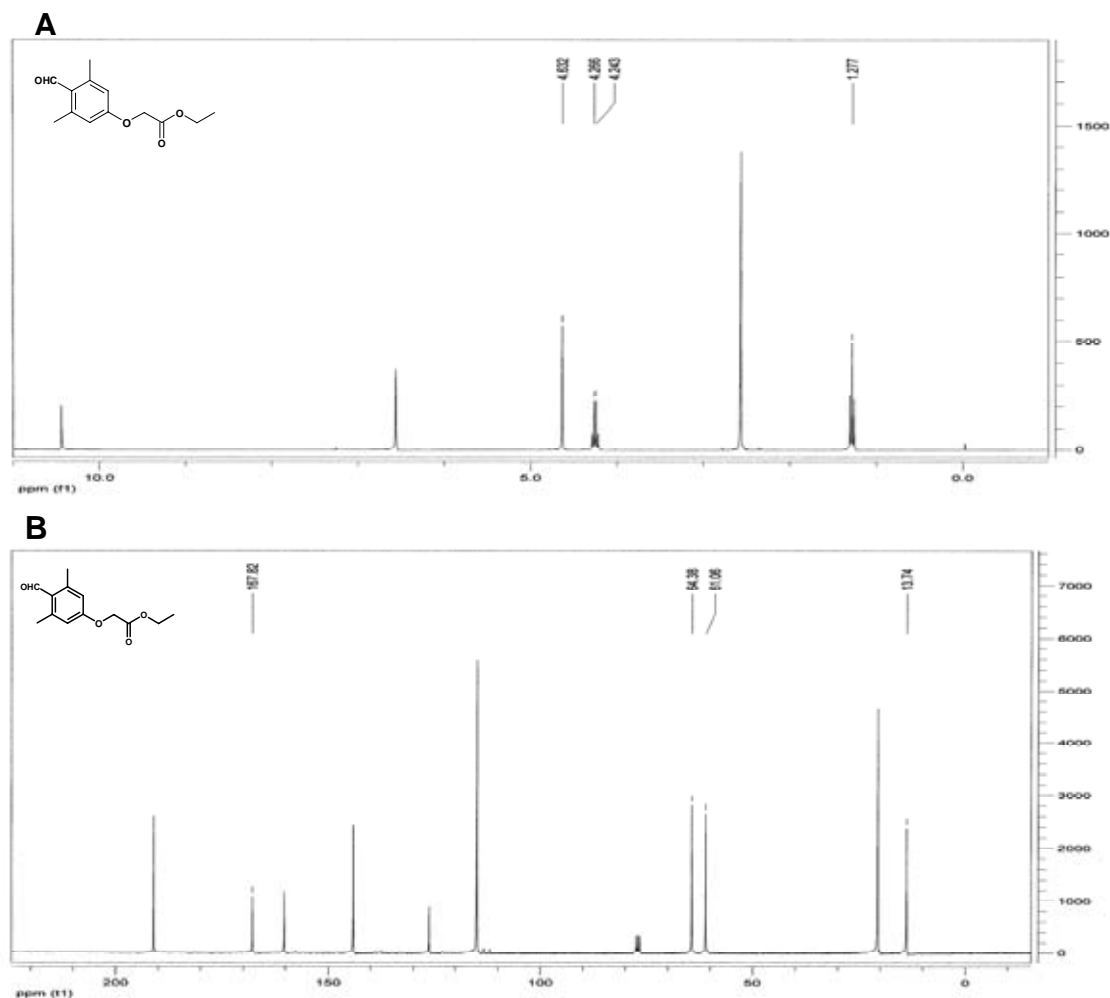
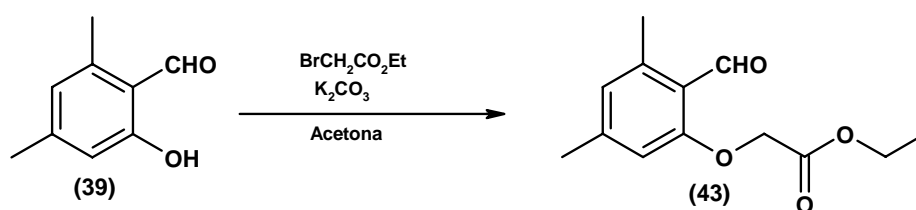


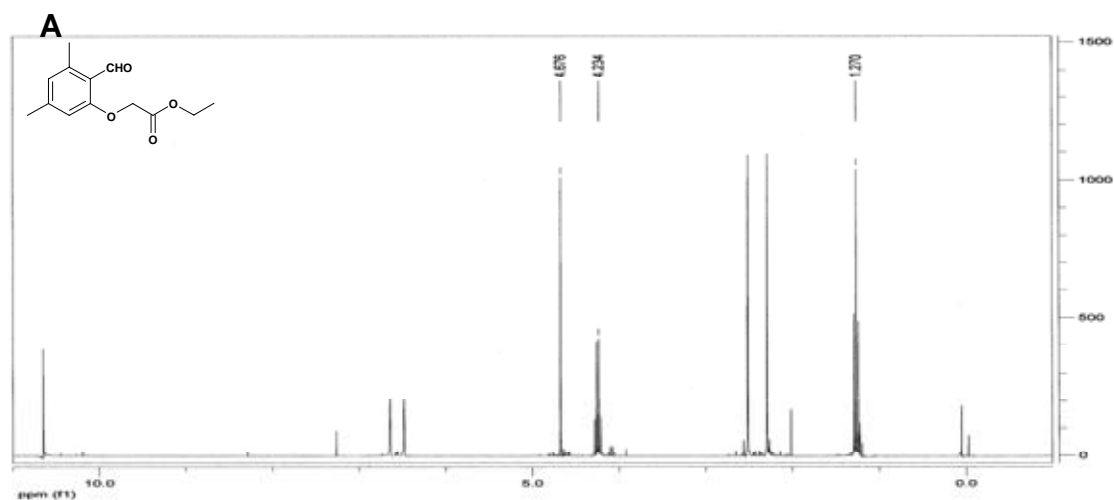
Figura 21. Espectro de RMN de ^1H (A) e de ^{13}C (B) do (4-formil-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (**42**, **KF01**).

O subproduto da reação de formilação, o 2,4-dimetil-6-hidroxibenzaldeído (**39**), também foi submetido à reação de alquilação com o bromoacetato de etila (**41**), formando o (2-formil-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (**43**, **KF02**). Um óleo amarelo obtido com 95% de rendimento.



Esquema 9. Preparação do (2-formil-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (**43**, **KF02**).

A análise dos espectros do IV (Anexo, p. 106) (Filme, cm^{-1}), de RMN de ^1H (Anexo, p. 107) (**Figura 22-a**) e de ^{13}C (Anexo, p. 108) (**Figura 22-b**) de KF02 (**43**) evidenciou as mesmas observações feitas para KF01 (**42**): a presença de bandas em 2927 e 2875 cm^{-1} características do estiramento de ligação C-H de carbonos metílicos e metilênicos, absorções em 1409 e 1444 cm^{-1} de deformações angulares de ligação C-H de grupos metilênicos. A cadeia lateral caracterizou-se pela presença de uma banda em 1758 cm^{-1} correspondente ao estiramento da ligação C=O e as bandas 1307 e 1034 cm^{-1} , correspondem ao estiramento da ligação C-O do grupo éster. O espectro de RMN ^1H de KF02 (**43**, **Figura 22**) apresentou em 4,67 ppm um simpleto correspondente a subunidade aceto (OCH_2), um quarteto em 4,32 ppm e um tripleto em 1,30 ppm representam, respectivamente os grupos CH_2 e CH_3 do grupo etila. Assinalamentos confirmados no espectro de RMN ^{13}C pela presença de quatro simpletos em 168,4 (C=O), em 65,8 (OCH_2), em 61,6 (OCH_2) e em 14,2 (CH_3).



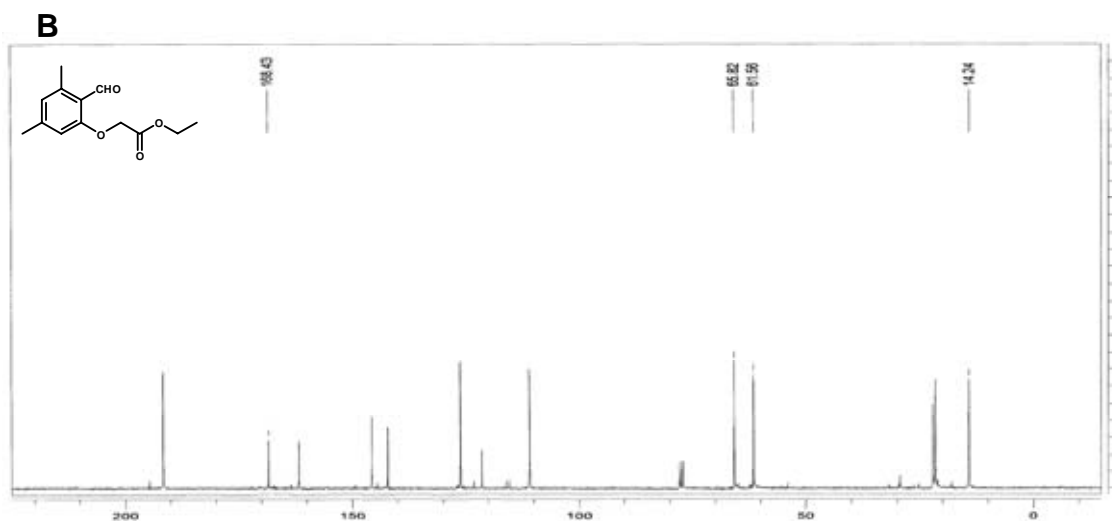
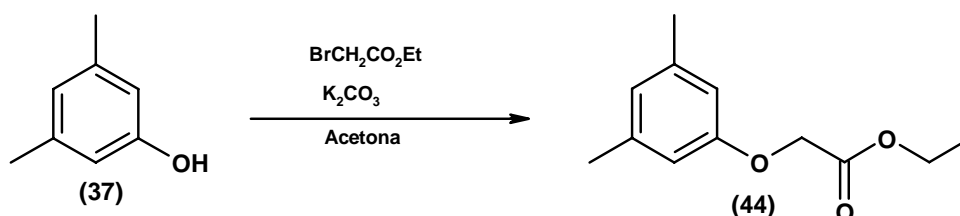


Figura 22. Espectro de RMN ¹H (A) e ¹³C (B) (2-formil-3,5-dimetilfenóxi)-aceto acetato de etila (43, KF02).

De modo análogo, o (3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (41, KF03) foi obtido a partir da alquilação do 3,5-dimetilfenol (34). O KF03 se apresentou como um óleo amarelo claro, em rendimento de 97%.



Esquema 10. Preparação do (3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (44, KF03).

No espectro do IV (Anexo, p. 109) (Filme, cm^{-1}) de KF03 (44) a presença de bandas em 2981 e 2921 cm^{-1} características do estiramento da ligação C-H dos grupos metílicos e metilênicos, em 1378 e 1443 cm^{-1} correspondentes à deformações angulares de ligação C-H de grupos CH_2 , além de bandas em 1760 cm^{-1} e em 1299 e 1034 cm^{-1} , correspondentes, respectivamente ao estiramento e deformação axial das ligação C=O e C-O do grupo éster, indicam a formação do produto desejado.

Adicionalmente, a análise do espectro de RMN ¹H (Anexo, p. 110) de KF03 (41) (Figura 23-a) confirmou a formação do produto pela presença de um

simpleto em 4,59 ppm correspondente à subunidade aceto. Em 4,26 ppm e em 1,26 ppm os multipletos representam, respectivamente, o CH₂CH₃ do grupo etila. Corroborando com os resultados acima descritos, o espectro de RMN de ¹³C (Anexo, p. 111) (**Figura 23-b**) apresenta quatro simpletos correspondentes aos C da cadeia lateral: 169,3 (C=O), 65,5 (OCH₂), 61,8 (OCH₂) e 14,4 (CH₃) no espectro de RMN de ¹³C.

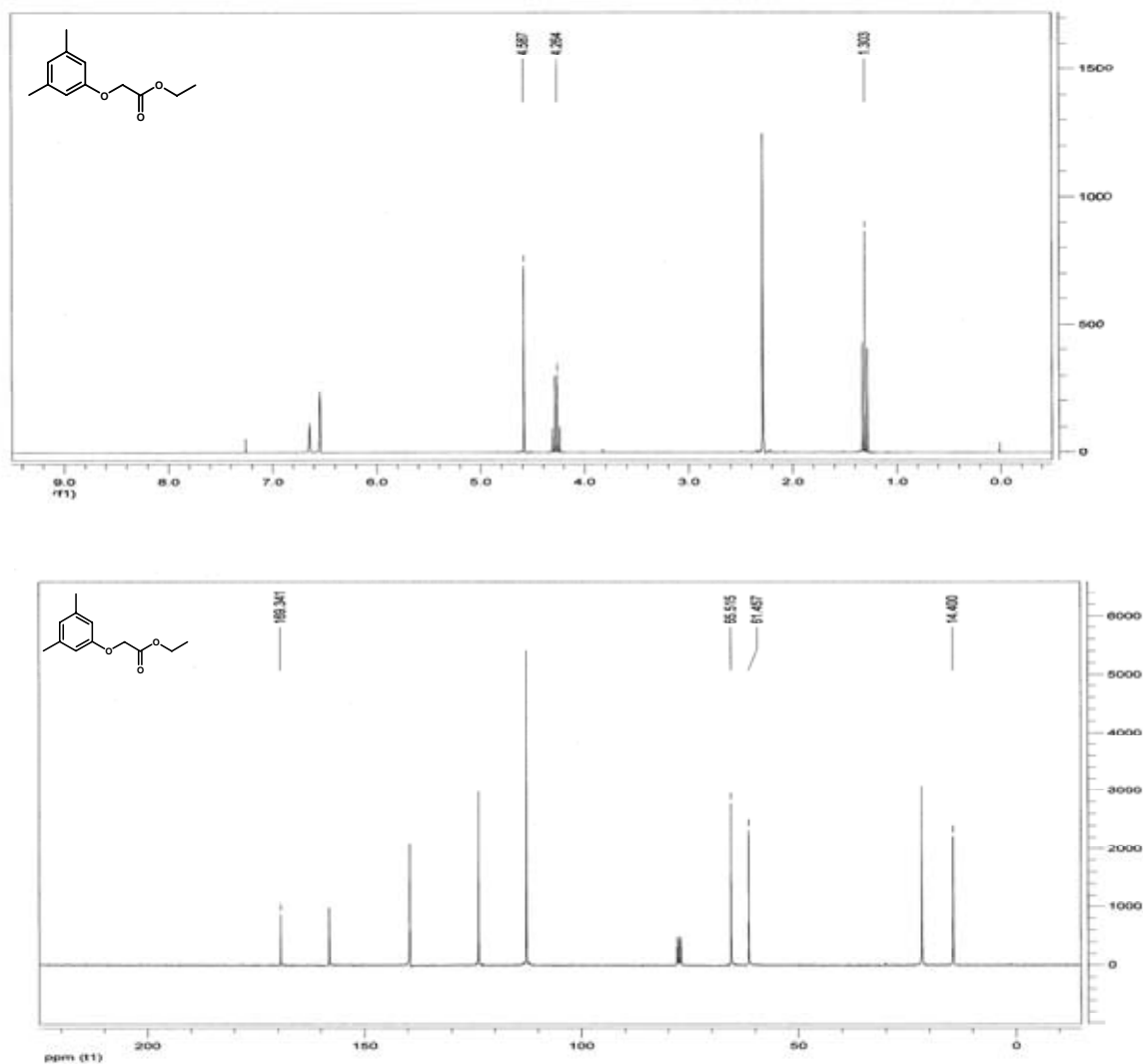
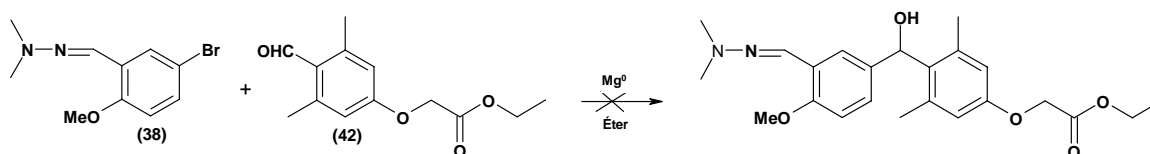


Figura 23. Espectro de RMN ¹H e ¹³C do (3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (KF03, 44).

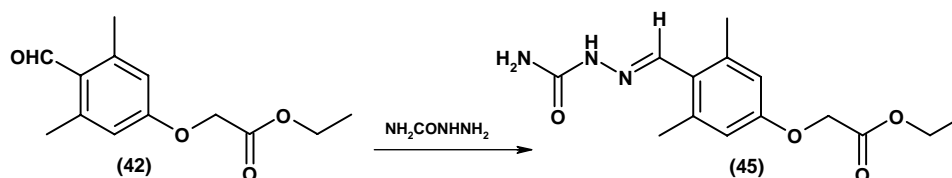
Para nossa surpresa, algumas tentativas de acoplamento do fragmento A (**36**) com o fragmento B (**42**, **KF01**), usando procedimentos clássicos, a exemplo da reação de Grignard, não lograram êxitos, ocorrendo apenas a recuperação da matéria-prima (**Esquema 11**).

Paralelamente, com as moléculas KF01 (**42**), KF02 (**43**) e KF03 (**44**) caracterizadas, foram iniciados os testes para avaliar a ação biológica.



Esquema 11. Tentativa de acoplamento dos fragmentos A e B.

Foram preparados ainda dois derivados de semicarbazona: KF04 (**45**) e KF05 (**46**) utilizando como material de partida, respectivamente, KF01 (**42**) e KF02 (**43**).



Esquema 12. Preparação da (4-semicarbazona-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (KF04).

O espectro de RMN de 1H de KF04 (Anexo, p. 113) (**Figura 24**) apresentou simpletos adicionais em 10,12 ppm, 8,17 ppm e um simpleto largo em 6,21 comparado ao espectro de RMN de 1H de KF01 correspondentes aos hidrogênios da semicarbazona.

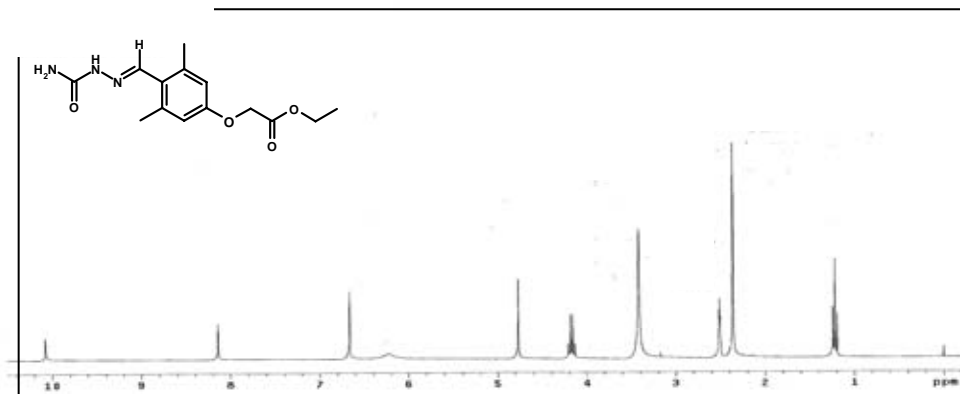
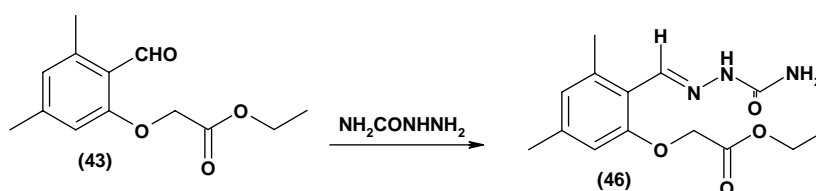


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H do (4-semicarbazona-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (KF04)



Esquema 13. Preparação do (2-semicarbazona-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (KF05).

Adicionalmente, o espectro de RMN de ^1H de KF05 (Anexo, p. 115) (**Figura 25**) quando comparado ao espectro de RMN de ^1H também apresentou simpletos em 10,62 ppm, em 8,74 ppm e em 8,34 ppm correspondentes aos sinais dos hidrogênios da semicarbazona.

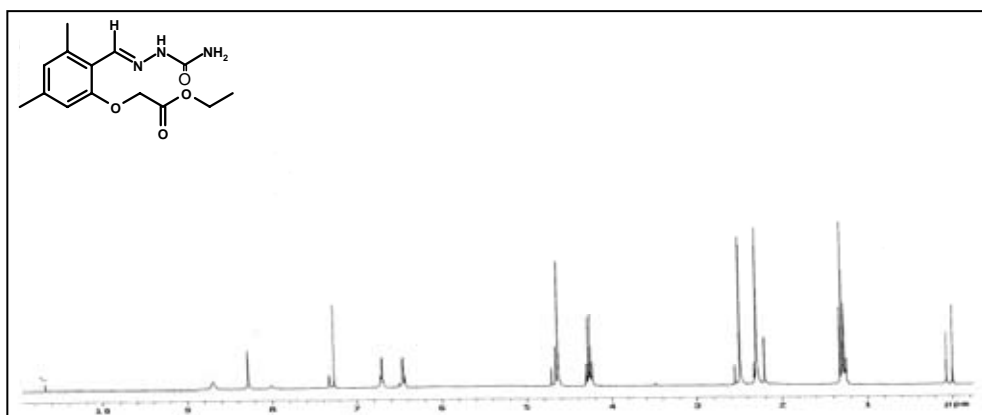


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H do (2-semicarbazona-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (KF05)

4.2 – Testes Biológicos

4.2.1 Avaliação da atividade citotóxica

Os primeiros testes a serem realizados foram os de citotoxicidade para a determinação da concentração ideal de uso para os ensaios nos receptores nucleares. Desta forma, os compostos obtidos foram submetidos aos testes de citotoxicidade seguintes:

a) utilizando como modelo a toxicidade em larvas de *Artemia salina* (MEYER *et al.*, 1982)

Neste trabalho foi utilizado o método de Meyer que possui correlação com os ensaios de citotoxicidade frente a células cancerígenas P338 (leucemia linfocítica) (MEYER *et al.*, 1982). Este ensaio tem sido utilizado na avaliação preliminar de toxicidade de extrato de plantas, metais pesados e material (CARBALLO, 2002; MOLINA-SALINAS, 2006). Além disso, é utilizado como teste preliminar na busca de compostos com atividade antioxidante (MATHEWS, 1995). O ensaio de letalidade a larvas de *Artemia salina* Leach é rápido, de baixo custo e requer pequena quantidade de amostra.

Os resultados apresentados na **Tabela 1** mostram que todos os compostos avaliados apresentaram atividade. A atividade de KF01 e KF02 foi equivalente à atividade do padrão positivo. Quanto ao composto KF03, a toxicidade apresentada foi 5,75 vezes maior que o padrão positivo.

Tabela 1. Citotoxicidade do KF01 (42), KF02 (43) e KF03 (44) em teste de *Artemia salina*.

Composto	DL ₅₀ (ppm)	IC 95% (ppm)	Atividade
KF01	134,7	105,90 < DL ₅₀ < 163,60	Ativo
KF02	132,9	117,30 < DL ₅₀ < 148,60	Ativo
KF03	31,9	26,20 < DL ₅₀ < 37,70	Ativo
K ₂ Cr ₂ O ₇	183,7	72,18 < DL ₅₀ < 295,30	Ativo

DL₅₀: dose letal para 50% dos indivíduos

IC: Intervalo de confiança

b) Utilizando como modelo o ensaio com o gene-repórter dirigido pelo promotor do citomegalovírus (CMV)

Inicialmente, foi realizado o ensaio de citotoxicidade utilizando o gene-repórter dirigido pelo promotor do citomegalovírus (CMV-Luc), um promotor ativo constitutivamente e sem ação mediada por RNs, a fim de se verificar o efeito tóxico observado pela redução acentuada na taxa de ativação ou reações inespecíficas caracterizadas pelo aumento na taxa de ativação.

A **Figura 26** mostra que não houve modificação na atividade transcricional do promotor CMV em nenhuma das concentrações dos composto testados (10^{-8} M a 10^{-4} M). Esses resultados sugerem que os compostos não interferem no mecanismo de transcrição basal das células U937 pela concentrações testadas.

Podendo assim, a concentração máxima possível de ser preparada experimentalmente (10^{-4} M) ser usada sem conseqüências para a maquinaria de transcrição basal das células.

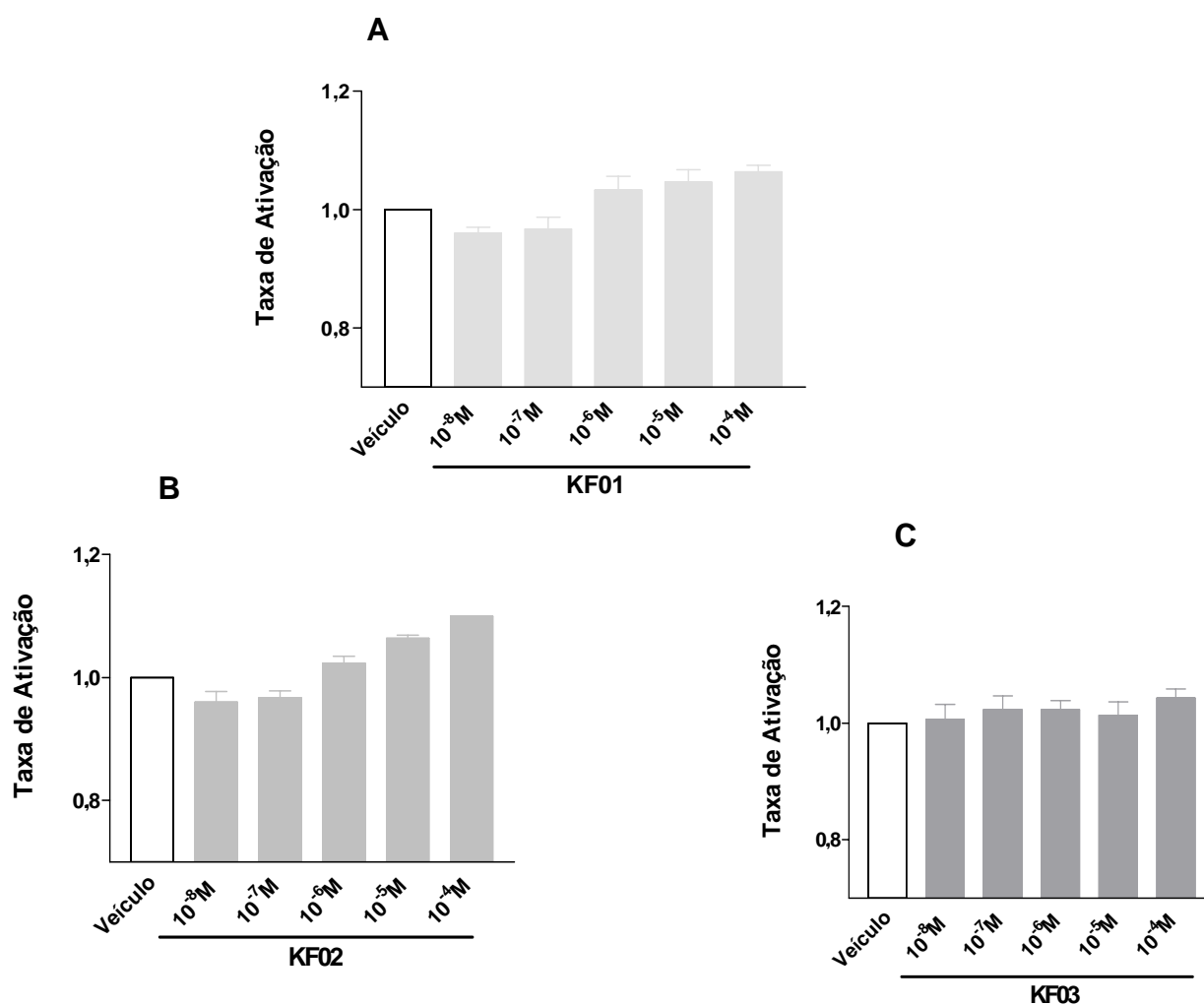


Figura 26. Ausência do efeito tóxico de KF01 (A), KF02 (B) e KF03 (C) em células U937. Células U937 foram co-transfectadas com $1\mu\text{g}$ do plasmídeo repórter CMV-Luc e tratadas com concentrações crescentes (10^{-8}M a 10^{-4}M) dos compostos e incubadas por 24 horas. A atividade da luciferase foi mensurada. As barras apresentam a média \pm erro padrão de, no mínimo, três experimentos diferentes em triplicata.

4.2.2 – Atividade agonista e antagonista em Receptores Nucleares

a) Avaliação da ação agonista e antagonista de KF01, KF02 e KF03 nos receptores TR α e TR β .

Inicialmente, foram construídas curvas dose-resposta com o ligante natural (controle positivo) para os TRs – T₃. Este teste inicial indica a concentração que será usada como controle positivo. A **Figura 27** mostra que o T₃ apresentou um EC₅₀ de 6,45x 10⁻⁸M para TR α e de 2,08x 10⁻⁷M para TR β .

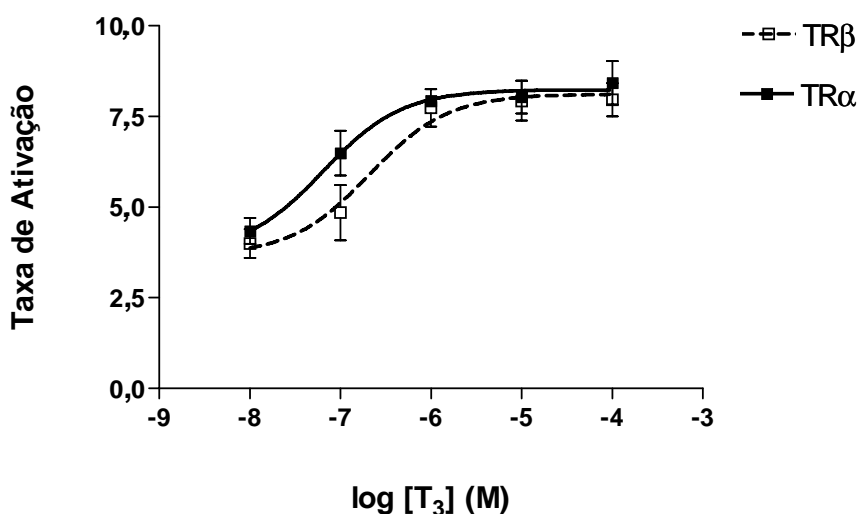


Figura 27. Curva dose-resposta de T₃ nos receptores TR α e TR β . Células U937 foram co-transfectadas com 4 μ g do plasmídeo-repórter DR4-tk-Luc e 1 μ g do plasmídeo de expressão para TR α e TR β , tratadas com concentrações crescentes de T₃ e incubadas por 24h. A atividade da luciferase foi mensurada. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de, no, mínimo, de três experimentos diferentes realizados em triplicata.

A partir da análise das curvas foi determinado que o T₃ seria utilizado nos ensaios na concentração 10⁻⁶M que é máxima para TR α e TR β . Essa foi a concentração do ligante utilizada nos experimentos subsequentes.

Uma vez que não houve toxicidade para a maquinaria de transcrição basal ds células U937, usadas para os ensaios de gene-repórter, curvas dose-resposta foram construídas com concentrações dos compostos a serem testados (10⁻⁸M a 10⁻⁴M) em TR α e TR β . As curvas estão mostradas na **Figura 28** (TR α) e **Figura 29** (TR β)

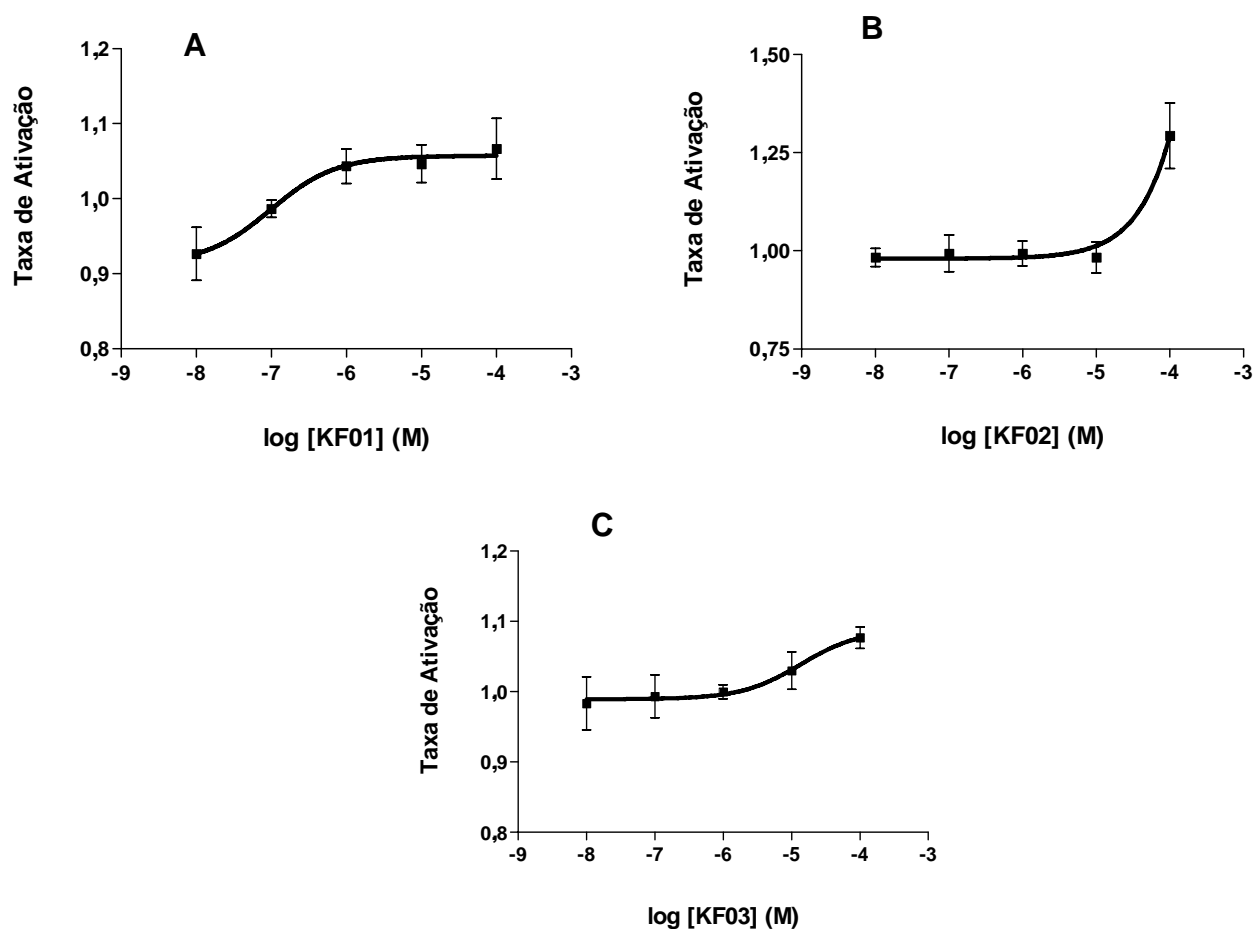


Figura 28. Curvas dose-respostas de KF01 (A), KF02 (B) e KF03 (C) no receptor TR α . Células U937 foram co-transfectadas com 4 μ g do plasmídeo repórter DR4-tk-Luc e 1 μ g do plasmídeo de expressão para TR α e TR β . As células U937 foram tratadas com concentrações crescentes de KF01, KF02 e KF03 e incubadas por 24h. A atividade da luciferase foi mensurada. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de, no mínimo, de três experimentos diferentes realizados em triplicata.

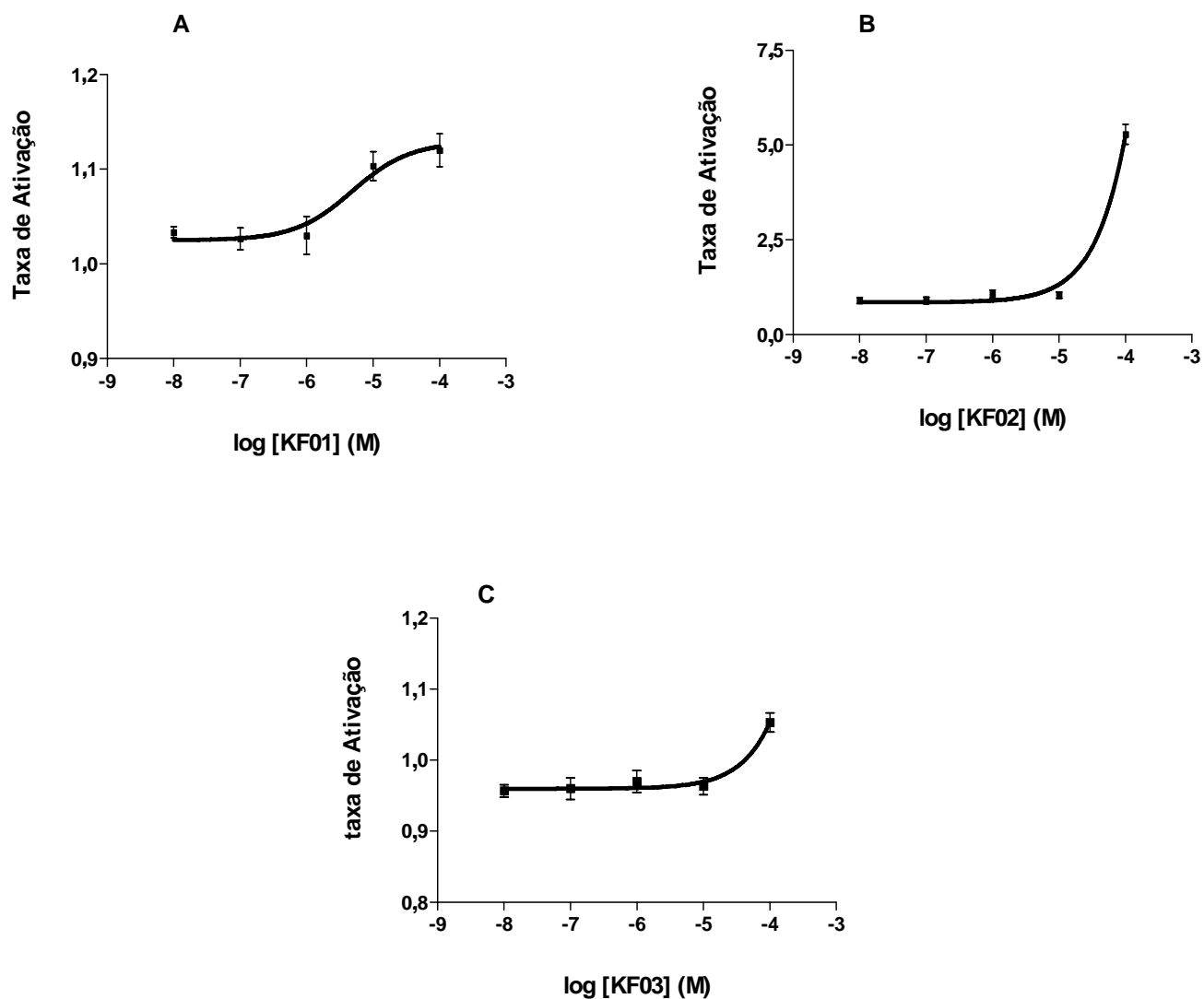


Figura 29. Curvas dose-respostas de KF01 (A), KF02 (B) e KF03 (C) no receptor TR β . Células U937 foram co-transfectadas com 4 μ g do plasmídeo repórter DR4-tk-Luc e 1 μ g do plasmídeo de expressão para TR β , tratadas com concentrações crescentes de KF01, KF02 e KF03 e incubadas por 24h. A atividade da luciferase foi mensurada. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de, no mínimo, três experimentos diferentes realizados em triplicata.

Para os ensaios de gene-repórter para a avaliação da ação agonista ou antagonista dos compostos no TR α , as células U937 foram tratadas com os compostos na concentração de 10⁻⁴M na presença ou ausência de T₃ (10⁻⁶M).

A **Figura 30** mostra que os compostos não apresentaram ação agonista ou antagonista mediada por TR α . Foi verificado, entretanto, um efeito sinérgico na ativação do receptor na presença do ligante T₃. Os resultados da taxa de ativação dos compostos KF01, KF02 e KF03 (9,60±0,70; 14,86±0,69 e 11,73±0,12, respectivamente) em presença de T₃ foram estatisticamente diferentes da taxa de ativação obtida apenas com o ligante (7,57±0,7).

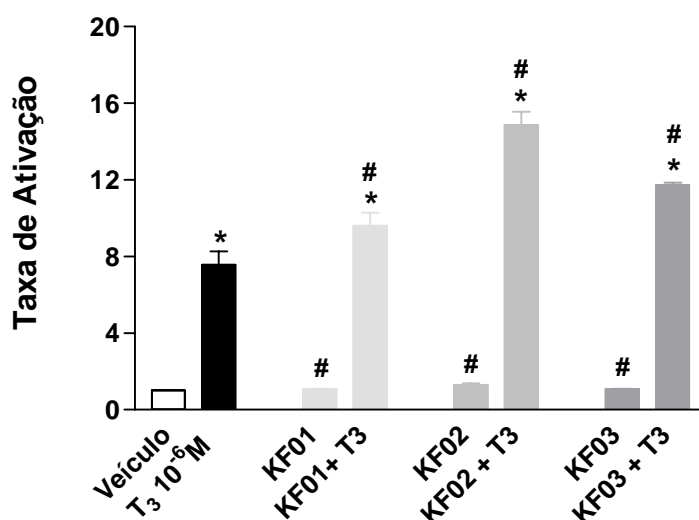


Figura 30. Avaliação da atividade de KF01, KF02 e KF03 na presença e ausência de T₃ mediada por TR α . Células U937 foram co-transfectadas com 4 μ g do plasmídeo repórter DR4-tk-Luc e 1 μ g do plasmídeo de expressão TR α . As células foram tratadas por 24 horas com veículo (EtOH:DMSO, 3:2), T₃ 10⁻⁶M (controle positivo) e com KF01, KF02 e KF03 na concentração 10⁻⁴M. A atividade da luciferase foi mensurada. As barras apresentam a média \pm erro padrão de, no mínimo, três experimentos diferentes em triplicata. * $p < 0,05$ vs.veículo e # $p < 0,05$ vs. T₃.

Como pode se depreender da **Figura 31**, o composto KF02 teve uma pequena ativação na isoforma β do TR. A sua taxa de ativação (5,29±0,26) foi inferior e estatisticamente diferente da taxa de ativação do T₃ (8,83±0,27). Os compostos KF01 e KF03 não apresentaram atividade no TR β . Entretanto, o

mesmo efeito sinérgico que ocorreu em TR α também foi observado em TR β quando os compostos foram adicionados juntos com o controle positivo. As taxas de ativação de KF01, KF02 e KF03 foram, respectivamente, 16,32 \pm 0,83; 20,83 \pm 0,72; 15,79 \pm 0,31 em comparação com a taxa do controle positivo T₃ que foi 8,83 \pm 0,27.

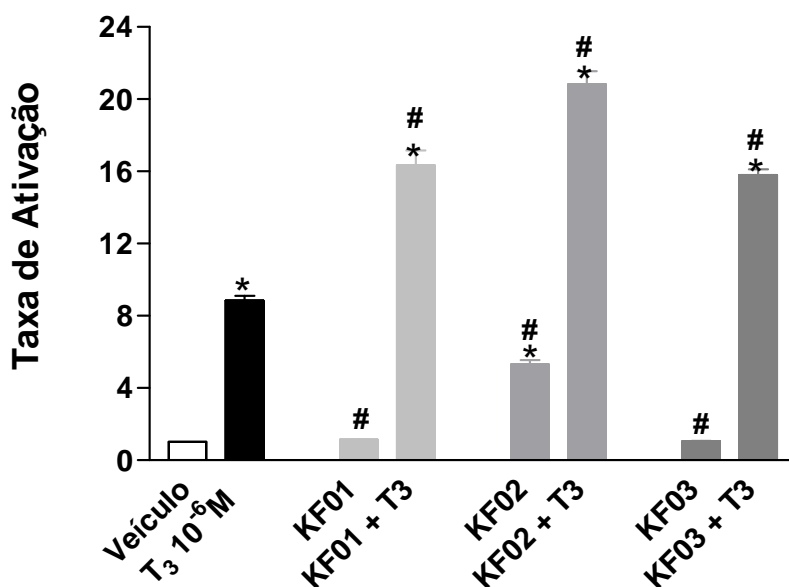


Figura 31. Avaliação da atividade de KF01, KF02 e KF03 na presença e ausência de T₃ mediada por TR β . Células U937 foram co-transfectadas com 4 μ g do plasmídeo repórter DR4-tk-Luc e 1 μ g do plasmídeo de expressão TR β . As células foram tratadas por 24 horas com veículo (EtOH:DMSO, 3:2), T₃ (controle positivo) na concentração de 10⁻⁶M e com KF01, KF02 e KF03 na concentração 10⁻⁴M. A atividade da luciferase foi mensurada. As barras apresentam a média \pm erro padrão de, no mínimo, três experimentos diferentes em triplicata. * $p < 0,05$ vs.veículo e # $p < 0,05$ vs.T₃.

Os resultados sugerem que KF02 tenha uma ação agonista seletiva para TR β .

b) Avaliação da ação agonista e antagonista de KF01, KF02 e KF03 nos receptores PPARs.

Foram realizados ensaios de gene-repórter com o intuito de avaliar a ação dos compostos KF01, KF02 e KF03 nos receptores PPAR α , β/δ e γ . Para tanto foram construídas, primeiramente, curvas dose-resposta dos ligantes sintéticos para esses receptores, a saber: rosiglitazona (Rosi) para PPAR γ e o bezafibrato (Beza) para PPAR α e β/δ . As curvas dose-resposta estão mostradas na **Figura 32**. Beza ativou o PPAR α com EC_{50} $5,53 \times 10^{-5}$ e o PPAR β/δ com EC_{50} $9,24 \times 10^{-5}$, a Rosi ativou o PPAR γ com EC_{50} $5,93 \times 10^{-7}$. Sendo que a ativação máxima ocorreu quando as células foram incubadas com o Beza $10^{-4}M$ e a Rosi $10^{-5}M$. Essas foram as concentrações para os experimentos subsequentes.

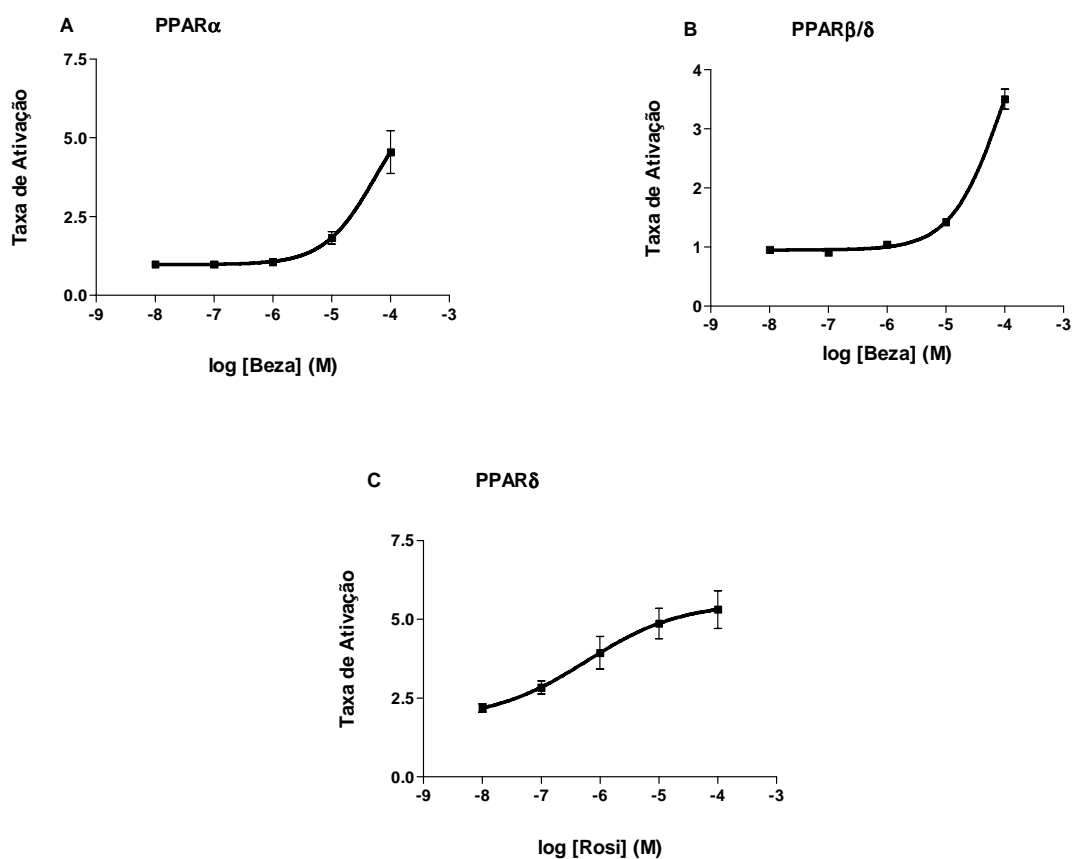


Figura 32. Curvas dose-respostas de Bezafibrato nos receptores PPAR α (A), β/δ (B) e de Rosiglitazona em PPAR γ (C). Células U937 foram co-transfectadas com $1,5\mu g$ do plasmídeo de expressão para PPAR (α , β/δ e γ) e com $3\mu g$ do gene repórter da luciferase dirigido pelo PPRE-tk-Luc. Incubadas por 24 horas com concentrações crescentes ($10^{-8}M$ a $10^{-4}M$) dos controles positivos (Beza e Rosi). Dados apresentados como média \pm erro padrão de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

Os compostos foram inicialmente testados em PPAR γ , pelo fato deste ser o mais estudado dentre as isoformas de PPAR. Os ligantes sintéticos deste receptor, as TZDs, apresentam ação hipoglicemiante (EPPLÉ, *et. al.*, 2006), regulação de macrófagos e ação antiinflamatória (SPINELLI, *et. al.*, 2008). O ganho de peso, formação de edemas e riscos cardiovasculares estão entre os efeitos adversos desses compostos (ROBINSON, *et. al.*, 2008).

A **Figura 33** mostra as curvas dose-resposta dos compostos KF01, KF02 e KF03 no PPAR γ . Pelas curvas dose-respostas foi decidido usar a concentração de 10^{-4} M para todos os compostos. KF01 não teve ação dose-dependente, diferentemente de KF02 e KF03 que promoveram um aumento transicional dose-dependente em PPAR γ .

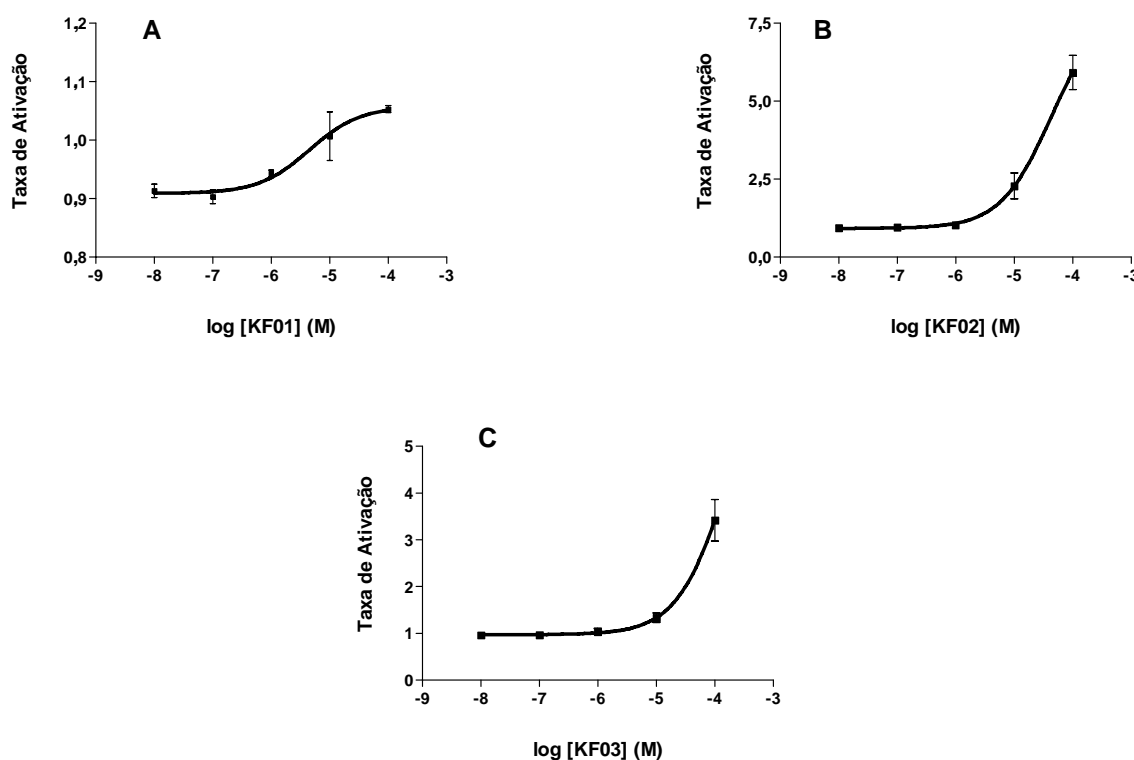


Figura 33. Curva dose-resposta de KF01 (A), KF02 (B) e KF03 (C) no receptor PPAR γ . Células U937 foram co-transfectadas com $3,0\mu\text{g}$ do plasmídeo repórter PPRE-tk-Luc e $1,5\mu\text{g}$ do plasmídeo de expressão PPAR γ , e incubadas por 24 horas com concentrações crescentes (10^{-8} M a 10^{-4} M) de KF01, KF02 e KF03. Dados apresentados como média \pm erro padrão de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

A **Figura 34** mostra que KF01 não apresentou ação agonista mediada por PPAR γ . Já KF02 e KF03 apresentaram, respectivamente, taxa de ativação $5,92\pm 0,55$ e $3,42\pm 0,45$ em comparação com o controle positivo Rosi (10^{-5} M) $6,33\pm 0,27$. Estes dados sugerem que o composto KF02 teve uma ativação semelhante a ativação do controle positivo.

Na presença do controle positivo Rosi (10^{-5} M) KF01 não teve ação antagonista, entretanto os compostos KF02 e KF03 produziram ação agonista ($5,91\pm 0,31$ e $3,41\pm 0,25$, respectivamente) além de apresentarem efeitos aditivo e sinérgico, respectivamente. As taxas de ativação foram: $12,65\pm 0,71$ e $13,12\pm 0,58$ para KF02 e KF03, respectivamente, em comparação com a taxa de ativação da Rosi $6,33\pm 0,15$ (**Figura 34**).

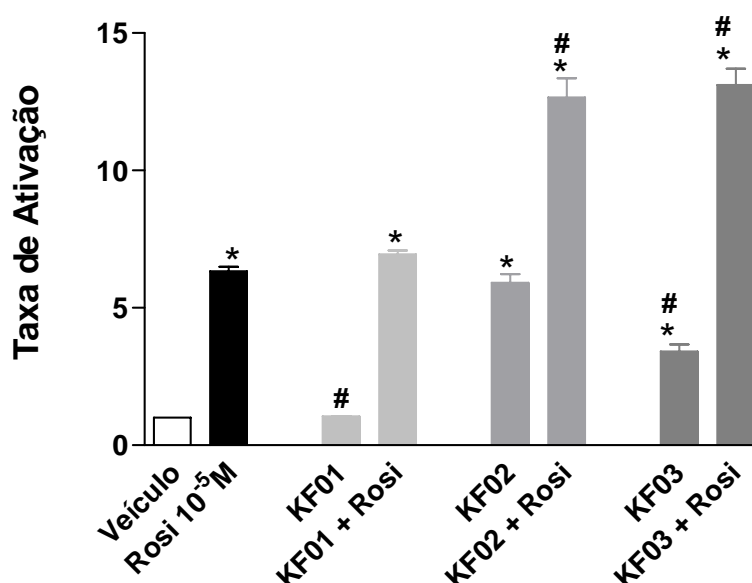


Figura 34. Avaliação da atividade de KF01, KF02 e KF03 na presença e ausência de rosiglitazona mediada por PPAR γ . Células U937 foram co-transfectadas com $1,5\mu\text{g}$ do plasmídeo de expressão para PPAR γ e com $3\mu\text{g}$ do plasmídeo repórter PPRE-tk-Luc. As células foram tratadas por 24 horas com veículo (EtOH:DMSO, 3:2), Rosi 10^{-5} M (controle positivo) e com os compostos KF01, KF02 e KF03 na concentração de 10^{-4} M. A atividade da luciferase foi mensurada. As barras apresentam a média \pm erro padrão de, no mínimo, três experimentos diferentes em triplicata. * $p < 0,05$ vs.veículo e # $p < 0,05$ vs. rosiglitazona .

Novos fármacos com ação de duplo agonista, como o muraglitazar **(45)**, tesaglitazar **(46)** (KUHN, *et. al.*, 2006) e o ragaglitazar **(47)** (ANDERSEN, *et. al.*, 2003) foram desenvolvidos com o objetivo de controlar os níveis de glicose associados à redução dos níveis de colesterol, aterosclerose e processos inflamatórios por ações mediadas via PPAR α e PPAR γ (CALKIN, *et. al.*, 2008). O muraglitazar **(45)** apresentou como efeitos deletérios cardíacos: infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC), insuficiência cardíaca e, com isso, teve o uso suspenso em 2006 (BALAKUMAR, *et. al.*, 2007). O tesaglitazar **(46)** testado em fase clínica apresentou aumento dos níveis de creatinina, desenvolvimento de edemas, além de efeitos tóxicos e carcinogênicos (CALKIN, *et. al.*, 2008), o uso foi suspenso em 2006. Já o ragaglitazar **(47)** teve o seu uso descontinuado em 2004 devido a efeitos como: aumento de peso, edemas e câncer urotelial (BALAKUMAR, *et. al.*, 2007).

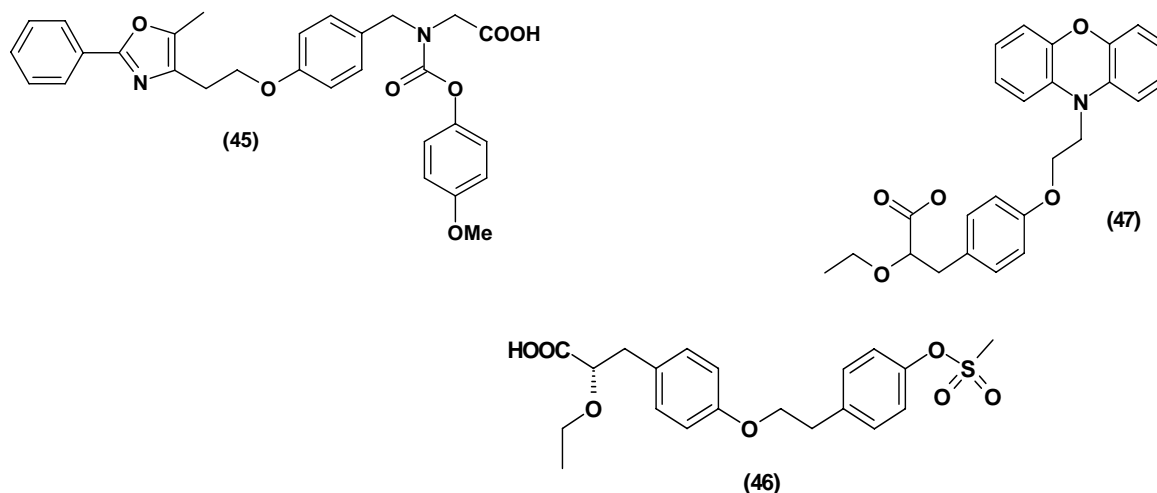


Figura 35. Estruturas químicas de duplo agonistas

Verificada a ativação do receptor PPAR γ e com o objetivo de verificar a presença de ação dupla ou pan-agonista de KF01, KF02 e KF03 foram realizados ensaios de gene-repórter nos receptores PPAR α e PPAR β/δ , que possuem os fibratos como agonistas sintéticos usados no tratamento contra dislipidemia e aterosclerose, regulação dos níveis de HDL, sem, contudo, provocar aumento de peso ou edemas, efeitos observados na ativação de PPAR γ (SPINELLI, *et al.*, 2008).

A **Figura 36** mostra que KF02 e KF03 promoveram aumento dose-dependente na transcrição mediada por PPAR α , atuando como duplo agonistas, pois conforme mostrado nas **Figuras 33** e **34** ambos também elevaram a transcrição do PPAR γ .

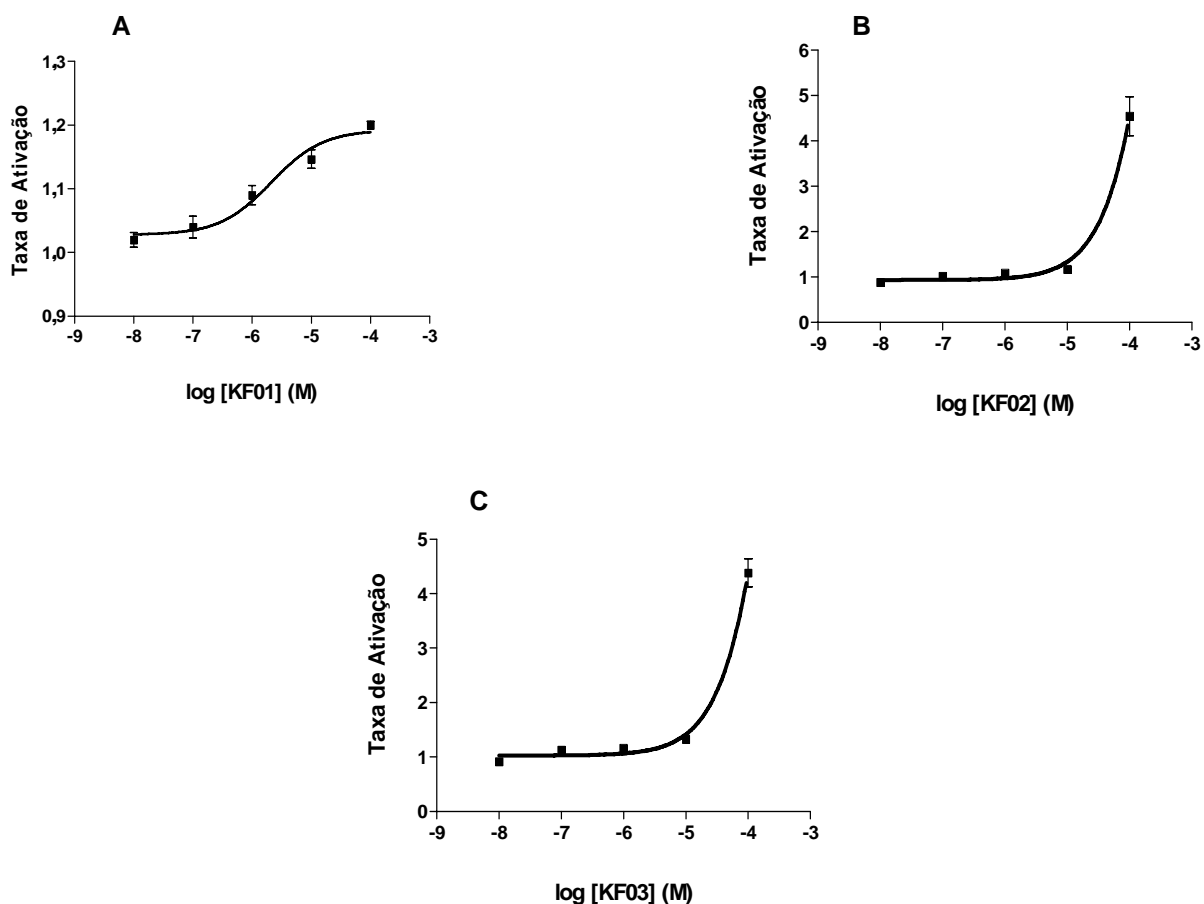


Figura 36. Curva dose-resposta de KF01 (A), KF02 (B) e KF03 (C) no receptor PPAR α .

Células U937 foram co-transfectadas com 3,0 μ g do plasmídeo repórter PPRE-tk-Luc e 1,5 μ g do plasmídeo de expressão PPAR α e incubadas por 24 horas com concentrações crescentes (10^{-8} M a 10^{-4} M) de KF01, KF02 e KF03. Dados apresentados como média \pm erro padrão de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

Apenas KF02 e KF03 na concentração 10^{-4} M, corroborando com os resultados das curvas dose-resposta, apresentaram dupla ação agonista ao ativar o receptor PPAR α . A **Figura 37** mostra que KF01 não ativou e nem inibiu a transcrição mediada por PPAR α e que KF02 e KF03 apresentaram ação semelhante ($4,54 \pm 0,24$ e $4,38 \pm 0,15$, respectivamente) ao bezafibrato ($4,69 \pm 0,17$, respectivamente). Como pode ser observado, ainda, ambos apresentam um efeito sinérgico na transcrição mediada por PPAR α quando associados ao bezafibrato ($7,91 \pm 0,5$ para KF02 e $5,78 \pm 0,2$ para KF03) no tratamento das células.

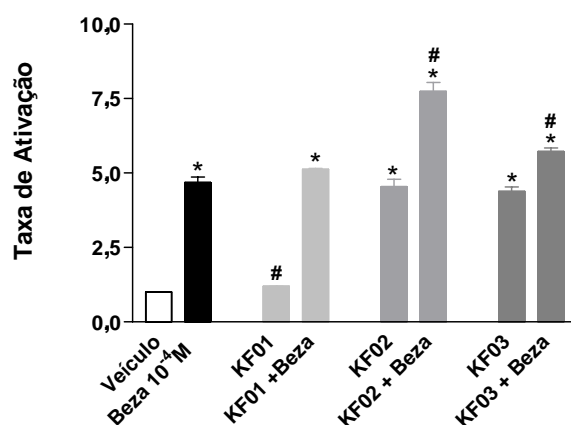


Figura 37. Avaliação da atividade de KF01, KF02 e KF03 na presença e ausência de bezafibrato mediada por PPAR α . Células U937 foram co-transfectadas com $1,5\mu\text{g}$ do plasmídeo de expressão para PPAR α e com $3\mu\text{g}$ do plasmídeo repórter PPRE-tk-Luc (DR-1). As células foram tratadas por 24 horas com veículo (EtOH:DMSO, 3:2), Beza (controle positivo) a 10^{-4} M e com os compostos KF01, KF02 E KF03 na concentração 10^{-4} M. A atividade luciferase foi mensurada. As barras apresentam a média \pm erro padrão de, no mínimo, de três experimentos diferentes em triplicata. * $p < 0,05$ vs.veículo e # $p < 0,05$ vs bezafibrato.

Há ainda grande interesse no desenvolvimento de fármacos com ação mediada pelas três isoformas de PPAR (α , β/δ e γ), os pan-agonistas. Capazes de atuar no controle glicêmico e lipídico, tratamento da aterosclerose e diabetes, sem afetar funções cardiovasculares. O GW625019, o PXL204 e a netoglitazona

(MCC-555) são exemplos de pan-agonistas em fase de testes clínicos (CALKIN, *et. al.*, 2008).

A mesma avaliação feita em PPAR γ e em PPAR α foi repetida, agora, no receptor PPAR β/δ , que atua em resposta a processos inflamatórios e metabolismo de lipídios (CALKIN, *et. al.*, 2008). Os resultados apresentados na **Figura 38** mostram que apenas KF02 promoveu o aumento da transcrição.

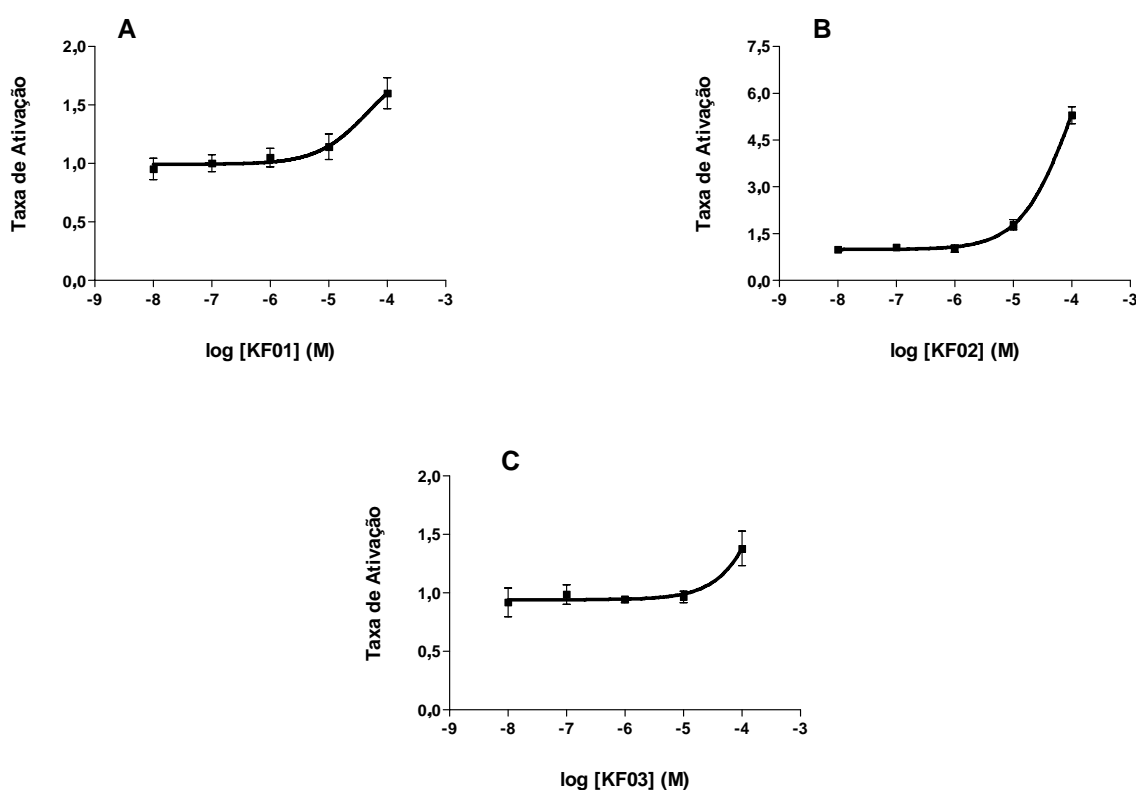


Figura 38. Curva dose-resposta de KF01 (A), KF02 (B) e KF03 (C) no receptor PPAR β/δ .

Células U937 foram co-transfectadas com 3,0 μ g do plasmídeo repórter PPRE-tk-Luc e 1,5 μ g do plasmídeo de expressão PPAR β/δ e incubadas por 24 horas com concentrações crescentes (10^{-8} M a 10^{-4} M) de KF01, KF02 e KF03. Dados apresentados como média \pm erro padrão de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

A avaliação da atividade antagonista dos compostos em PPAR β/δ está apresentada na **Figura 39**, que mostra que não houve ação antagonista, porém confirma a ação agonista ($5,29 \pm 0,15$) e sinérgica ($14,36 \pm 0,28$) de KF02 na comparação feita com a ativação do bezafibrato ($5,39 \pm 0,12$).

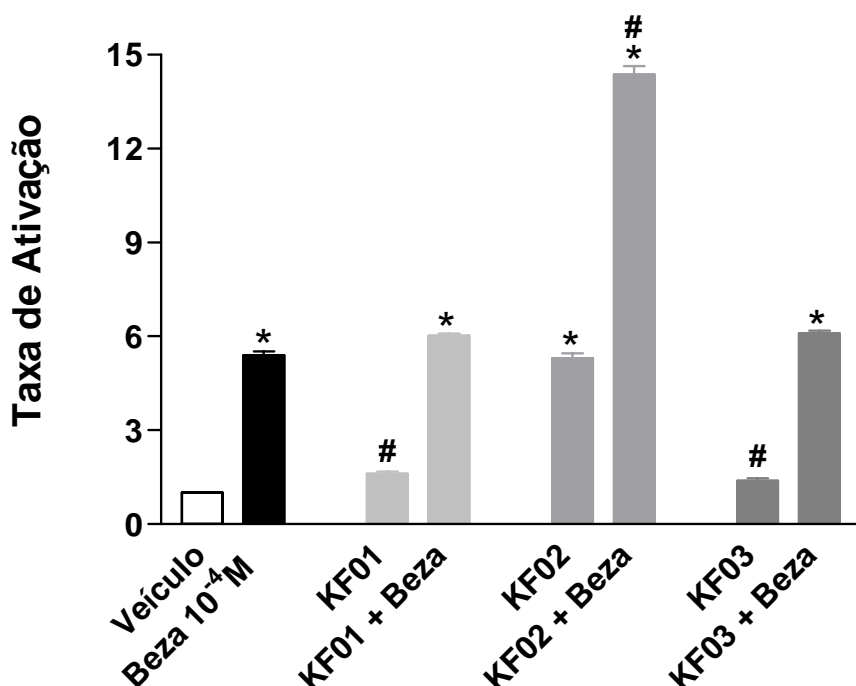


Figura 39. Avaliação da atividade de KF01, KF02 e KF03 na presença e ausência de bezafibrato mediada por PPAR β/δ . Células U937 foram co-transfectadas com 1,5 μ g do plasmídeo de expressão para PPAR β/δ e com 3 μ g do plasmídeo repórter PPRE-tk-Luc (DR-1). As células foram tratadas por 24 horas com veículo (EtOH:DMSO, 3:2), Beza (controle positivo) a 10^{-4} M e com os compostos KF01, KF02 E KF03 na concentração 10^{-4} M. A atividade luciferase foi mensurada. As barras apresentam a média \pm erro padrão de um mínimo de três experimentos diferentes em triplicata. * $p < 0,05$ vs. veículo e # $p < 0,05$ vs. controle positivo.

Com o objetivo de avaliar se a ação pan-agonista de KF02 e a dupla ação de KF03 em PPAR α e PPAR γ era decorrente de reações inespecíficas do promotor PPRE-tk-Luc, foram realizados ensaios na ausência do receptor. A **Figura 40** mostra que a transcrição gênica não foi aumentada na ausência do PPAR o que reforça a indicação da ativação ser mediada pelos PPARs, já que na ausência destes não foi verificado nenhum aumento trascricional.

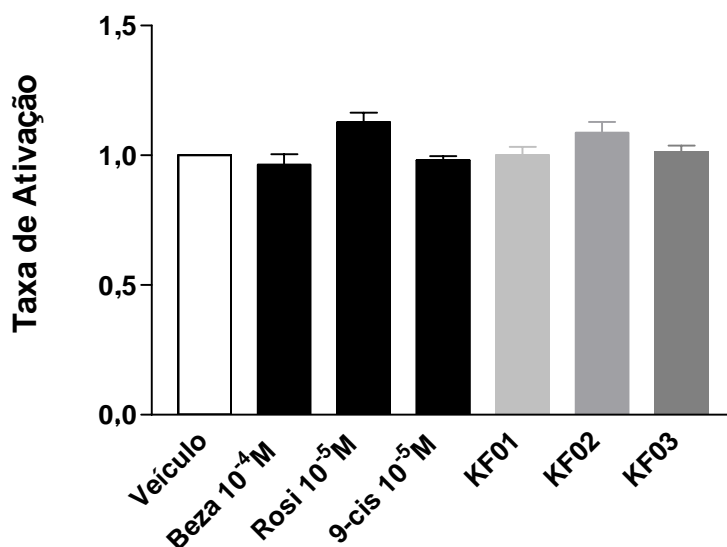


Figura 40. Avaliação da atividade de KF01, KF02 E KF03 na ausência das isoformas do receptor PPAR. Células U937 foram co-transfectadas com 3µg do plasmídeo repórter PPRE-tk-Luc (DR-1). As células foram incubadas por 24 horas com veículo (EtOH:DMSO, 3:2), Beza 10⁻⁴M, Rosi e 9-cis a 10⁻⁵M (controles positivos) e com os compostos KF01, KF02 E KF03 na concentração 10⁻⁴M. A atividade luciferase foi mensurada. Os experimentos foram realizados, no mínimo, por três vezes e em triplicata.

Com o intuito de excluir uma possível associação do RXR com as ativações observadas, uma vez que a ativação do PPAR envolve a heterodimerização com o RXR, as células foram co-transfectadas com o vetor de expressão da proteína GAL-RXR (constituída pelo DBD do fator de transcrição de levedura GAL4 e o LBD do PPAR γ e o elemento responsivo ao GAL5 dirigindo o promotor da luciferase). A **Figura 41** mostra que não houve ativação, confirmando que KF02 e KF03 atuam como agonistas de PPAR e não de RXR.

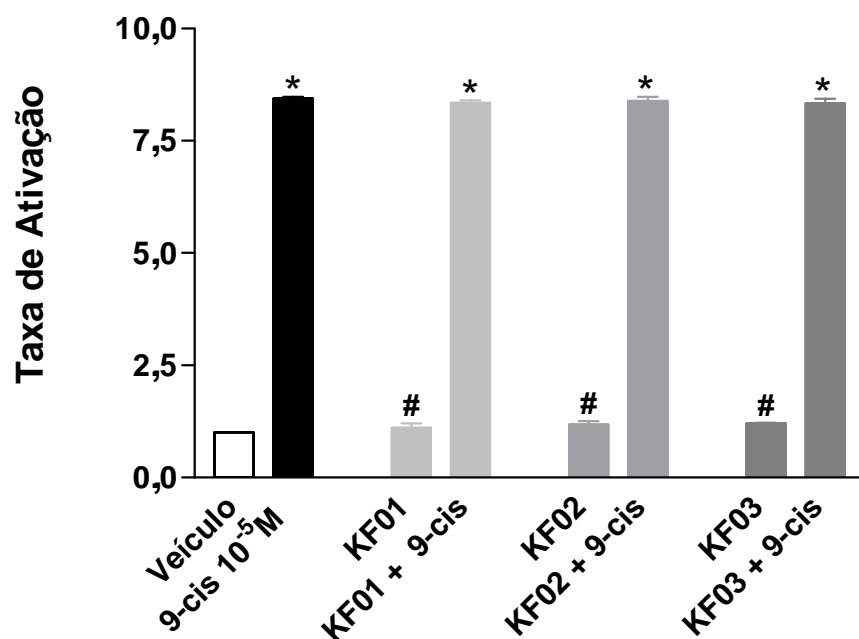


Figura 41. Avaliação da atividade de KF01, KF02 e KF03 na presença e ausência de bezafibrato mediada por gal-RXR. Células U937 foram co-transfectadas com 1,5 μ g do plasmídeo de expressão para gal-RXR e com 3 μ g do plasmídeo repórter gal-RXR-Luc. As células foram tratadas por 24 horas com veículo (EtOH:DMSO, 3:2), 9-cis a 10⁻⁵M (controle positivo) e com os compostos KF01, KF02 E KF03 na concentração 10⁻⁴M. A atividade luciferase foi mensurada. As barras apresentam a média \pm erro padrão de, no mínimo, três experimentos diferentes em triplicata. * $p < 0,05$ vs.veículo e # $p < 0,05$ vs. controle positivo.

Por fim, os compostos tiveram suas ações testadas receptor de glicocorticóide (GR). A **Figura 42** mostra que não houve ação agonista ou antagonista de KF01, KF02 e KF03 na concentração de 10^{-4} M mediada por esse receptor.

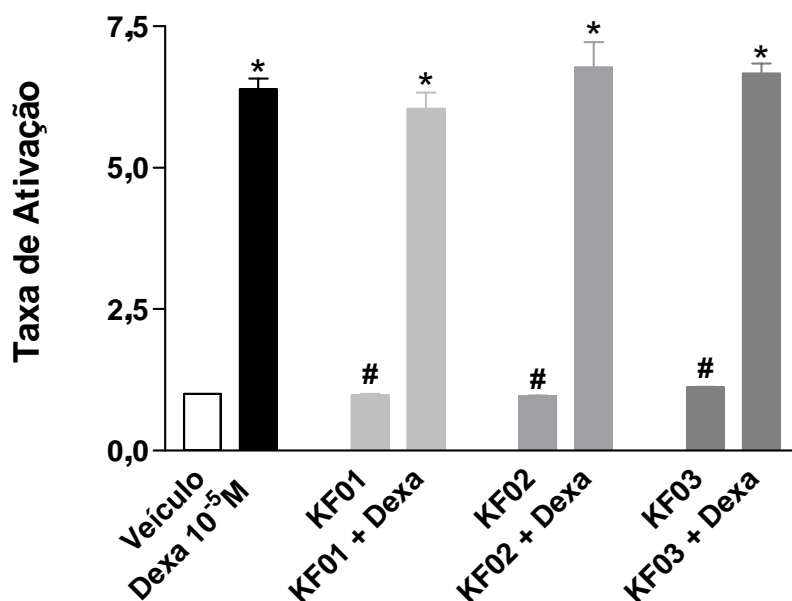


Figura 42. Avaliação da atividade de KF01, KF02 e KF03 na presença e ausência de dexametasona mediada por GR. Células U937 foram co-transfectadas com $1,5\mu\text{g}$ do plasmídeo de expressão para GR e com $3\mu\text{g}$ do plasmídeo repórter GRE-Luc. As células foram tratadas por 24 horas com veículo (EtOH:DMSO, 3:2), Dexa (controle positivo) a 10^{-5} M e com os compostos KF01, KF02 E KF03 na concentração 10^{-4} M. A atividade luciferase foi mensurada. As barras apresentam a média \pm erro padrão de um mínimo de três experimentos diferentes. * $p < 0,05$ vs.veículo e # $p < 0,05$ vs. controle positivo.

5. Conclusão

Os compostos sintetizados (KF01, KF02 e KF03) apresentaram como diferencial a posição do grupo aldeído, posição esta que influenciou diretamente a ação dos compostos. Estes foram submetidos a testes biológicos de citotoxicidade e ensaios de ação agonista em receptores de hormônios tireoideanos (TRs) e em receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs).

No ensaio usando como modelo a toxicidade a larvas de *Artemia salina*, os compostos avaliados apresentaram atividade. Esse resultado indica que KF01, KF02 e KF03 possuem ação citotóxica contra larvas de *Artemia salina*.

Apenas o composto KF02 apresentou uma pequena atividade agonista em TR β . Entretanto, todos os compostos tiveram ação sinérgica na presença do ligante T₃.

Os compostos KF02 e KF03 apresentaram ação agonista em PPAR γ , a ativação do receptor por KF02 foi na mesma intensidade do que o controle positivo rosiglitazona na concentração 10⁻⁵M. Estes compostos também apresentaram uma ação sinérgica/aditiva na presença deste controle.

Os compostos KF02 e KF03 atuaram como duplo agonistas pois também ativaram o PPAR α . Estes compostos também apresentaram uma ação sinérgica na presença do controle positivo.

Apenas o composto KF02 apresentou atividade agonista para PPAR β/δ , além de uma ação sinérgica na presença do controle positivo bezafibrato.

Não se observou ação dos compostos sintetizados no receptor GR e RXR.

A simplificação molecular tem sido uma ferramenta útil para a descoberta e modificação molecular de ligantes ou compostos com interesse farmacêutico, compreende a redução do peso molecular, diminuição de grupos funcionais e centros estereogênicos, mas preservando os grupos farmacofóricos.

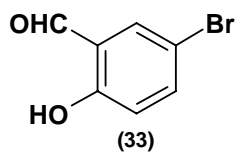
6. Perspectivas

As ações agonistas e sinérgicas dos compostos KF01, KF02 e KF03 nos receptores TR e PPAR motivam estudos futuros nas seguintes vertentes:

- A realização de estudos de Relação Estrutura-Atividade Quantitativa (QSAR) poderá propor o desenho de modificações estruturais a fim de aumentar a eficácia e seletividade dos compostos frente a respostas transcricionais e investigar a importância da posição do grupo aldeído na ação do composto;
- Ensaios de interação proteína-proteína em solução (*GST Pull Down Assay*) a fim de verificar a interação entre as isoformas do receptor PPAR e o co-ativador SCR1 promovida por KF01, KF02 e KF03.
- Estudos cristalográficos do complexo protéico KF01, KF02 e KF03 e as isoformas dos TRs e PPARs para a explicação do efeito sinérgico que pode ser a ligação dos compostos em um sítio secundário nos receptores;
- Realizar ensaios biológicos em KF04 e KF05.

7. DADOS FÍSICO-QUÍMICOS

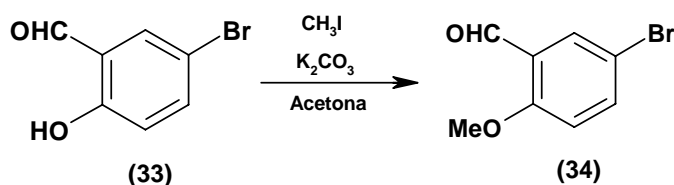
5-bromosalicilaldeído



IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3439; 2842; 2763; 1674; 1591; 1460.

RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (multiplicidade, Hz)]: 10,93 (s, CHO); 9,84 (s, OH); 7,68 (d, ArH); 7,62 (m, ArH); 6,93 (d, ArH).

Preparação do 5-bromo-*o*-anisaldeído (**34**)

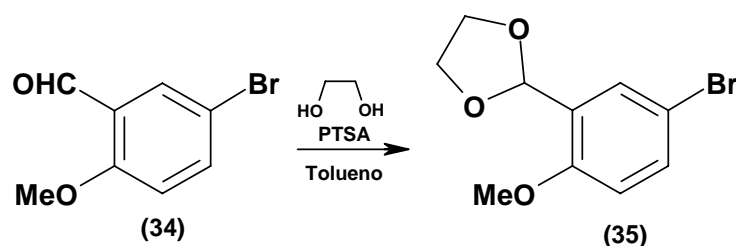


Em um balão de fundo redondo de 50 mL, adaptado a um condensador de refluxo, 5-bromosalicilaldeído (**33**) (1,00 g; 4,90 mmol) foi dissolvido em acetona (25mL), em seguida foram adicionados K_2CO_3 (2,60 g; 11,10 mmol) e CH_3I (1,34 g; 0,59 mL; 9,50 mmol). A mistura de reação foi mantida sob agitação e refluxo até que todo o material de partida fosse consumido (tempo de reação 3 h). Para a elaboração da reação, o solvente foi evaporado, o resíduo foi dissolvido em AcOEt e lavado seqüencialmente com água destilada e solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada para fornecer, após recristalização em hexano o 5-bromo-*o*-anisaldeído (**34**) (1,03 g, 4,79 mmol, 97%).

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 2937; 2842; 1671; 1439; 1590; 1459.

RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (multiplicidade, Hz)]: 10,20 (s, OH); 7,90 (d, ArH); 7,62 (m, ArH); 6,90 (d, ArH); 3,93 (s, CH_3)

Preparação do 5-bromo-*o*-anisaldeído etileno acetal (35)

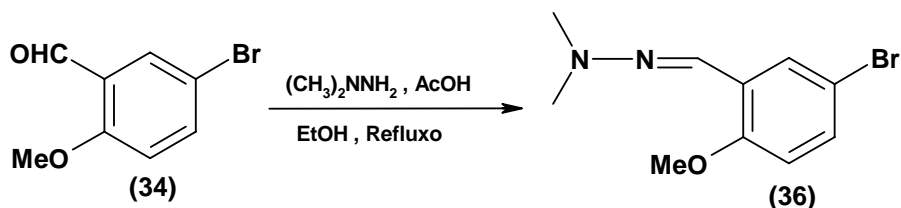


Em um balão de fundo redondo de 50 mL, adaptado a um Dean Stark com um condensador de refluxo, 5-bromo-*o*-anisaldeído (**34**) (1,00 g; 6,50 mmol) foi dissolvido em 20 mL de tolueno. Em seguida foram adicionados PTSA (0,17 g; 0,91 mmol) e etilenoglicol (d 1,11 g/mL; 0,60 mL; 11,16 mmol). A mistura de reação foi mantida sob refluxo à temperatura de 110°C. Após 24 h, a mistura de reação foi resfriada à temperatura ambiente, tratada com Na₂CO₃ até pH neutro sob agitação por 1 h. A seguir, foi lavada seqüencialmente com água destilada e solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com K₂CO₃ anidro, concentrada e separada em coluna flash utilizando um gradiente Hex:AcOEt nas proporções 95:5; 90:10; 85:15; 80:20 e 50:50 fornecendo um sólido amarelo com 13% de rendimento (0,16 g, 0,61 mmol).

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 2943; 2886; 1593; 1545; 1139; 1088.

RMN ¹H [300 MHz, CDCl₃, δ (multiplicidade, Hz)]: 7,63 (d, ArH); 7,41 (dd, $J = 2,7$, 1H); 6,77 (d, $J = 8,77$ Hz, 1H); 6,10 (s, 1H); 4,13 -4,10 (m, 4H); 3,84 (s, 3H).

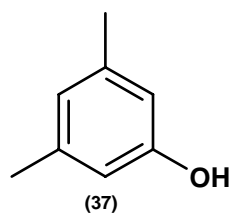
Preparação do 5-bromo-*o*-anisaldeído N,N-dimetil hidrazona (36)



Em um balão de fundo redondo, uma mistura contendo 5-bromo-*o*-anisaldeído (34) (1,00 g, 4,65 mmol), N,N-dimetil hidrazina (1,06 mL, 13,95 mmol) e AcOH (0,10 mL, 1,74 mmol) dissolvida em EtOH, foi refluxada por 24 h. Durante esse período, a mistura apresentou coloração amarelo-claro. Após 24 h, os reagentes voláteis foram removidos por destilação simples. Em seguida, o resíduo foi dissolvido em AcOEt e lavado seqüencialmente com água destilada e solução de NaCl. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro, concentrada e fornecendo após recristalização com hexano um sólido amarelo, caracterizado como a 5-bromo-*o*-anisaldeído N,N-dimetil hidrazona (36) (1,07 g, 4,13 mmol, 87%).

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 2936; 2581; 1440; 1359; 1578; 1460.

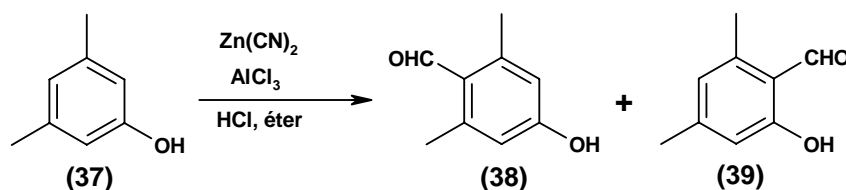
RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (multiplicidade, Hz)]: 7,96 (d, $J = 2,52$ Hz, ArCH); 7,43 (s, ArH); 7,25 (dd, $J = 8,73$ Hz, ArH); 6,71 (d, $J = 8,75$ Hz, ArH); 3,82 (d, $J = 2,76$ Hz, OCH_3); 2,98 (s, (CH_3)); 2,97 (s, CH_3)

3,5-dimetilfenol

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3286; 2917; 2850; 1591; 1460.

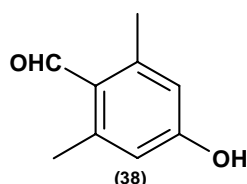
RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (multiplicidade, Hz)]: 6,61 (s, ArH); 6,49 (s, ArH); 4,84 (s, OH); 2,28 (s, $(\text{CH}_3)_2$).

Preparação do 2,6-dimetil-4-hidroxibenzaldeído (38) e do 2,4-dimetil-6-hidroxibenzaldeído (39)



A um balão tritubulado equipado com um condensador de refluxo, adaptado a um sistema gerador de HCl e um sistema de captura de gases foi adicionado 3,5-dimetilfenol (**37**) (1,50 g, 12,00 mmol) dissolvido em 30 mL de éter etílico e Zn(CN)_2 (2,80 g, 24,50 mmol). A mistura foi mantida sob forte agitação, enquanto o HCl era borbulhado durante 30 minutos, à temperatura ambiente até dissolver todo o Zn(CN)_2 . A mistura de reação foi resfriada em banho de gelo, e então, foi adicionado o AlCl_3 (2,50 g, 18,00 mmol). Após remoção do banho de gelo, o HCl foi borbulhado até que toda o material de partida houvesse sido consumido (cerca de 4 horas a 45°C). A mistura de reação foi diluída, cuidadosamente, com gelo picado, acidificada com HCl a 10% e, posteriormente, deixada sob refluxo por 2 horas. A fase aquosa foi extraída com AcOEt. Os extratos orgânicos foram reunidos, lavados com solução saturada de NaCl, secado em Na_2SO_4 e concentrado e após purificação em coluna flash eluindo com Hex:AcOEt nas proporções 95:5; 90:10; 85:15; 80:20 e 50:50 forneceu dois sólidos amarelos com rendimento global de 68%. A formilação em *orto* ocorreu com 43% (**38**, 0,79 g, 5,23 mmol) de rendimento e a formilação em *para* com rendimento de 25% (**39**, 0,46 g, 3,04 mmol).

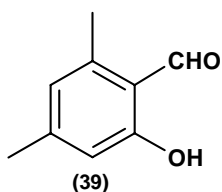
2,6-dimetil-4-hidróxi benzaldeído



IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3153; 2964; 2931; 1652; 1473; 1376.

RMN ¹H [300 MHz, CDCl_3 , δ (multiplicidade, Hz)]: 10,46 (s, CHO); 6,54 (s, ArH); 2,59 (s, $(\text{CH}_3)_2$)

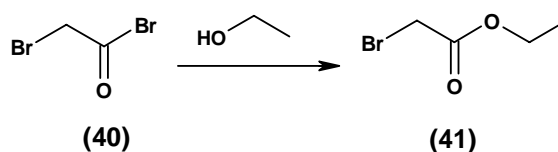
2,4-dimetil-6-hidróxi benzaldeído



IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3133; 2961; 2927; 1651; 1603; 1473.

RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (multiplicidade, Hz)]: 11,95 (s, OH); 10,23 (s, CHO); 6,62 (s, ArH); 6,53 (s, ArH); 2,55 (s, CH_3); 2,30 (s, CH_3).

Preparação do bromoacetato de etila (41)

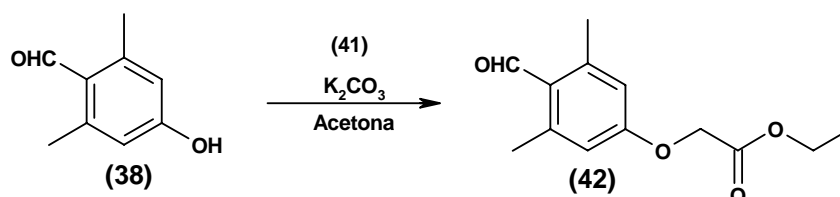


Em um balão de fundo redondo adaptado a um condensador de refluxo, a mistura de reação de brometo de bromoacetila **(40)** (10,2 g, 51,66 mmol) com EtOH (3,60 g, 77,49 mmol) foi mantida sob agitação por 4 horas em banho de gelo, com liberação de HBr. Após esse período, o excesso de etanol foi evaporado e o bromoacetato de etila **(41)** foi obtido com pureza satisfatória (7,00 g, 41,91 mmol, 83%).

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 2984; 2938; 1735; 1446.

RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (multiplicidade, Hz)]: 4,20 (q, $J = 7,14$ Hz, CH_2); 3,80 (s, CH_2); 1,26 (t, $J = 7,14$ Hz, CH_3)

Preparação (4-formil-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (42, KF01)



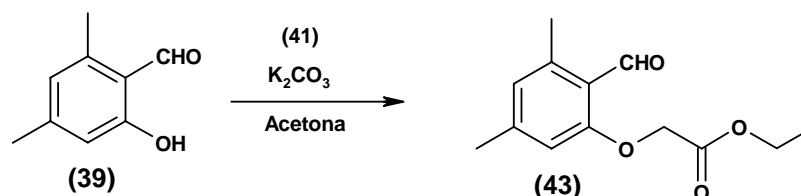
Em um balão de fundo redondo de 50 mL adaptado a um condensador de refluxo, 2,6-dimetil-4-hidroxibenzaldeído **(38)** (0,50 g, 3,33 mmol) foi dissolvido em acetona (20 mL). Em seguida, foram adicionados K₂CO₃ (1,25 g; 8,32 mmol) e bromoacetato de etila **(41)** (0,7 mL, 1,06 g, 6,34 mmol) e a mistura reacional foi mantida sob agitação e refluxo até que todo o material de partida fosse consumido (tempo de reação 3 h). Para a elaboração da reação, o solvente foi evaporado, o resíduo dissolvido em AcOEt e lavado seqüencialmente com água destilada e solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, concentrada e purificada por recristalização em hexano para fornecer um sólido amarelo, caracterizado como (4-formil-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila **(42, KF01)** (0,76 g, 3,22 mmol, 98%).

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹) 2980; 2926; 1764; 1455; 1430; 1317; 1031.

RMN de ¹H [300 MHz, CDCl₃, δ (multiplicidade, Hz)]: 10,44 (s, CHO); 6,56 (s, ArH); 4,63 (s, OCH₂); 4,25 (q, $J = 7.14$ Hz, CH₂); 2,57 (s, Ar(CH₃)₂); 1,28 (t, $J = 7.14$ Hz, CH₃).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 192,3; 167,8; 161,3; 144,5; 116,9; 64,4; 61,1; 22,0; 13,7.

Preparação do (2-formil-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (43, KF02)



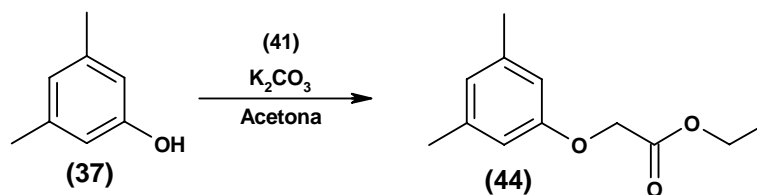
Em um balão de fundo redondo de 50 mL adaptado a um condensador de refluxo, o 2,4-dimetil-6-hidroxibenzaldeído **(39)** (1,00 g; 6,67 mmol) foi dissolvido em acetona (25 mL). Em seguida, foram adicionados K_2CO_3 (2,50 g; 16,64 mmol) e bromoacetato de etila (1,40 mL, 2,12 g, 12,66 mmol) e a mistura de reação foi mantida sob agitação e refluxo até que todo o material de partida fosse consumido (tempo de reação 3 h). Para a elaboração da reação, o solvente foi evaporado, o resíduo dissolvido em AcOEt e lavado seqüencialmente com água destilada e solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro, concentrada e purificada por recristalização em hexano para fornecer um óleo amarelo caracterizado como (2-formil-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila **(43, KF02)** (1,47 g, 6,22 mmol, 94%).

IV (Filme, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}) 2927; 2875; 1409; 1444; 1758; 1307; 1034; 1681; 1610.

RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (multiplicidade, Hz)]: 10,68 (s, CHO); 6,62 (s, ArH); 6,58 (s, ArH); 4,68 (s, CH_2); 4,32 (q, $J = 7.14$ Hz, CH_2); 2,59 (s, ArCH_3); 2,28 (s, ArCH_3); 1,30 (t, $J = 7,12$ Hz, CH_3).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): 191,2; 168,0; 161,3; 145,2; 141,7; 125,7; 121,0; 110,4; 65,3; 61,1; 21,6; 21,1; 13,7.

Preparação do (3,5-dimetil-fenóxi)-acetoacetato de etila (44, KF03)



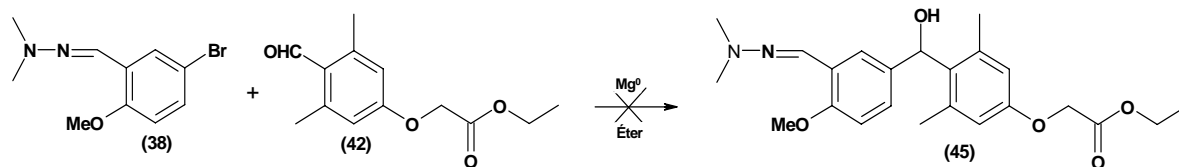
Em um balão de fundo redondo de 50 mL adaptado a um condensador de refluxo, o 3,5-dimetilfenol **(37)** (1,00 g; 4,81 mmol) foi dissolvido em acetona (25 mL). Em seguida, foram adicionados K_2CO_3 (1,56 g, 11,30 mmol) e bromoacetato de etila (1,35 mL, 2,04 g, 12,25 mmol) e a mistura de reação foi mantida sob agitação e refluxo até que todo o material de partida fosse consumido (tempo de reação 3 h). Para a elaboração da reação, o solvente foi evaporado, o resíduo dissolvido em AcOEt e lavado seqüencialmente com água destilada e solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro, concentrada e purificada por recristalização em hexano para fornecer um óleo amarelo caracterizado como o (3,5-dimetil-fenóxi)-acetoacetato de etila **(44, KF03)** (1,65 g, 7,93 mmol, 94%).

IV (Filme, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}) 2981; 2921; 1760; 1443; 1378; 1299; 1034.

RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (multiplicidade, Hz)]: 6,64 (s, ArH); 6,55 (s, ArH); 4,59 (s, CH_2); 4,26 (q, $J = 7.13$ Hz, CH_2); 2,26 (s, $(\text{CH}_3)_2$); 1,26 (t, ArCH_3)

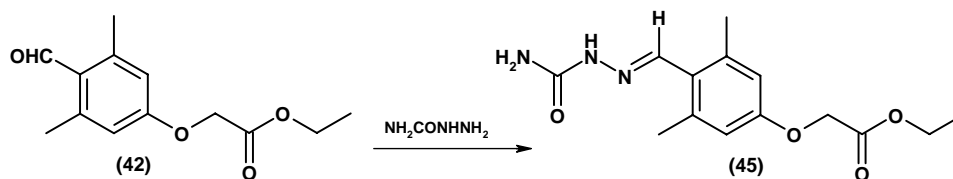
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): 167,3; 157,8; 139,3; 122,7; 113,4; 65,5; 61,4; 20,6; 14,4.

Tentativa de acoplamento dos fragmentos A e B



À 5-bromo-*o*-anisaldeído N,N-dimetil hidrazona (36) (0,38 g; 1,50 mmol) dissolvida em 5 mL de éter etílico seco, foi adicionado o Mg (0,04 g; 1,5 mmol). A mistura ficou sob agitação e refluxo até que todo o Mg fosse consumido (aproximadamente 30 minutos). Em seguida, foi misturada, gota a gota, ao (4-formil-3,5-dimetilfenóxi)-aceto acetato de etila (42, KF01) (0,35 g; 1,48 mmol). A mistura de reação foi mantida sob agitação e refluxo por 2 h. Após diluição com 10 mL de éter, o alcóxido foi hidrolisado com HCl a 10%. A mistura foi transferida para um funil de separação, a camada aquosa foi separada e extraída com éter. O extrato orgânico foi lavado seqüencialmente com solução diluída de NaHSO₃, NaHCO₃, e por fim, com solução saturada de NaCl. Após secagem com Na₂SO₄ anidro, a fase orgânica foi concentrada. Obtendo-se somente recuperação da matéria prima ((4-formil-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato, **42**).

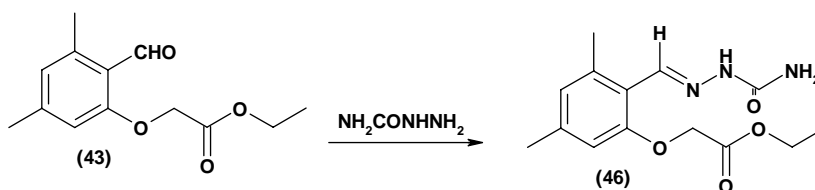
**Preparação do (4-semicarbazona-3,5-dimetil-fenóxi)-acetoacetato de etila
(45, KF04)**



Ao (4-formil-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (0,1 g; 0,42 mmol) foi adicionado 0,5 mL de solução 2 M de cloreto de semicarbazida. Foram adicionadas 20 gotas de MeOH para completa solubilização da amostra. A seguir, foram adicionadas 10 gotas de piridina. A mistura foi aquecida por 5 minutos em banho-maria. Observou-se a formação de precipitado, que foi então filtrado para fornecer a (4-semicarbazona-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (**45, KF04**) (0,11 g; 0,37 mmol; 92%).

RMN ¹H [300 MHz, CDCl₃, δ (multiplicidade, Hz)]: 10,12 (s, NH) 8,17 (s, NH); 6,65 (s, ArH); 6,21 (s, NH₂); 4,78 (s, CH₂); 4,20 (q, *J* = 7.13 Hz, CH₂); 2,26 (s, (CH₃)₂); 1,18 (t, ArCH₃).

**Preparação do (2-semicarbazona-3,5-dimetil-fenóxi)-acetoacetato de etila
(46, KF05)**



Ao (2-formil-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (0,1 g; 0,42 mmol) foi adicionado 0,5 mL de solução 2 M de cloreto de semicarbazida. Foram adicionadas 20 gotas de MeOH para completa solubilização da amostra. A seguir, foram adicionadas 10 gotas de piridina. A mistura foi aquecida por 5 minutos em banho-maria. Observou-se a formação de precipitado, que foi então filtrado para fornecer a (4-semicarbazona-3,5-dimetilfenóxi)-acetoacetato de etila (**46, KF05**) (0,10 g; 0,34 mmol; 84%).

RMN ¹H [300 MHz, CDCl₃, δ (multiplicidade, Hz)]: 10,62 (s, NH); 8,74 (s, NH); 8,34 (s, NH); 6,60 (s, ArH); 6,42 (s, ArH); 4,66 (s, CH₂); 4,28 (q, *J* = 7.14 Hz, CH₂); 2,53 (s, ArCH₃); 2,33 (s, ArCH₃); 1,30 (t, *J* = 7,12 Hz, CH₃).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, M. P.; NIELSEN, K. K. Determination of Ragaglitazar, a Novel Dual Acting Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) α and - γ Agonist, in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography Coupled With Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Chromatography B**. v. 788, p. 45–55, 2003.

BALAKUMAR, P.; ROSE, M.; GANTI, S.S.; KRISHAN, P.; SIGNH, M. PPAR dual agonists: Are they opening Pandora's Box?. **Pharmacological Research**. v. 56, p. 91–98, 2007.

BARRA, B.B.; VELASCO, L. F. R.; PESSANHA, R. P.; CAMPOS, A. M.; MOURA, F. N.; DIAS, S. M. G.; POLIKARPOR, I.; RIBEIRO, R. C. J.; SIMEONI, L. A. ; NEVES, F. A. R. Mecanismo Molecular do Hormônio Tireoideano. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 48, p. 25-37, 2004.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BASSÉNE, C, E.; SUZENET, F.; HENNUYER, N.; STAELS, B.; CAIGNARD, D. H.; DACQUET, C.; RENARD, P.; GUILLAUMET, G. Studies towards the conception of new selective PPAR β /d ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 16, p. 4528-4532, 2006.

BAXTER, J. D.; DILLMANN, W. H.; WEST, B. L.; HUBER, R.; FURLOW, J. D.; FLETTERICK, R. J.; WEBB, P.; APRILETTI, J. W.; SCALAN, T. S. Selective Modulation of Thyroid Hormone Receptor Action. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. v. 76, p. 31– 42, 2001.

BERGER, J.; MOLER, D. E. The Mechanisms of action if PPARs. **Annu. Rev. Med.** v. 53, p. 409-435, 2002.

BLEICHER, L.; APARÍCIO, R.; NUNES, F.B.; MARTINEZ, L.; DIAS, S. M. G.; FIGUEIRA, A. C. M.; SANTOS, M. A. M.; VENTURELLI, W. H.; SILVA, R.; DONATE, P. M.; NEVES, F. A. R.; SIMEONI, L. A.; BAXTER, J. D.; WEBB, P.; SKAF, M. S.; POLIKARPOV, I. Structural basis of GC-1 selectivity for thyroid hormone receptor Isoforms. **BMC Structural Biology**, v. 8, p. 01-13, 2008.

BOREL, V.; GALLOT, D.; MARCEAU, G.; SAPIN, V.; BLANCHON, L. Placental Implications of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Gestation and Parturition. **PPAR Research**, v. 2008, p. 01-09, 2008.

CALKIN, A. C.; THOMAS, M. C. PPAR Agonists and Cardiovascular Disease in Diabetes. **PPAR Research**, v. 2008, p. 01-12, 2008.

CARBALLO, J. L.; HERNANDEZ-INDA, Z. L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D. A Comparison between brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, p. 01-05, 2002.

CARLIN, K.; CARLIN, S. Possible Etiology for Euthyroid Sick Syndrome. **Medical Hypotheses**, v. 40, p. 38-43, 1993.

CHEATHAM, B. GLUT4 and Company: SNAREing Roles in Insulin-regulated Glucose Uptake. **TEM**, v. 11, p. 356, 2000.

CHIASOON, J. L.; JOSSE, R. G.; HANEFELD, M.; KARASIK, A.; LAAKSO, M. Acarbose for Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus: the STOPNIDDM Randomised Trial. **Lancet**, v. 359, p. 2072–2077, 2002.

CHIELLINI, G.; NGUYEN, N.; APRILETTI, J. W.; BAXTER, J. D.; SCALAN, T. S. Synthesis and Biological Activity of Novel Thyroid Hormone Analogs: 5'-aryl Substituted GC-1 Derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 333-346, 2002.

CHIELLINI, G.; NGUYEN, N. H.; APRILETTI, J. W.; BAXTER, J. D.; SCANLAN, T. S.; RIBEIRO, R. C. A high – affinity subtype – selective ligand for the thyroid hormone receptor. **Chemistry & Biology**, v. 5, p. 299-306, 1998.

CHUNG, Y. S.; LEE, M. D.; LEE, S. K.; KIM, H. M.; FITZPATRICK, L. A. HMG-CoA Reductase Inhibitors Increase BMD in Type 2 Diabetes Mellitus Patients **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 85, p. 1137-1142, 2000.

DANDONA, P.; ALJADA, A. A Rational Approach to Pathogenesis and Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus, Insulin Resistance, Inflammation, and Atherosclerosis **Am J Cardiol**. v. 90, p. 27G–33G, 2002.

DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Med Clin N Am**. v. 88, p. 787–835, 2004.

DESPRÉS, J. P.; LEMIEUX, I.; PRUD'HOMME, D. Treatment of Obesity: need to Focus on High Risk Abdominally Obese Patients **BMJ**. v. 322, p. 716-720, 2001.

DRESSEL, U.; ALLEN, T. L.; PIPPAL, J. B.; ROHDE, P. R.; LAU, P.; MUSCAT, G. E. O. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β/δ Agonist, GW501516, Regulates the Expression of Genes Involved in Lipid Catabolism and Energy Uncoupling in Skeletal Muscle Cells. **Molecular Endocrinology** . v. 17, p. 2477–2493, 2003.

DUAN, S. Z.; IVASHCHENKO, C. Y.; USHER, M. G.; MORTENSEN, R. M. PPAR- γ in the Cardiovascular System. **PPAR Research**. v. 2008, p. 01-10, 2008

DUPONT, J.; CHABROLLE, C.; RAMÉ, C.; TOSCA, L.; CASTEL, S. C. Role of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptors, Adenosine Monophosphate-Activated Kinase, and Adiponectin in the Ovary. **PPAR Research**. v. 2008, p. 01-09, 2008.

EPPLE, R.; AZIMIOARA, M.; RUSSO, R.; XIE, Y.; WANG, X.; COU, C.; WITYAK, J. D. K.; BURSULAVA, B.; KREUSCH, A.; TUNTLAND, T.; GERKEN, A.; ISKANDAR, M.; SAEZ, E.; SEIDEL, H. M.; TIAN, S. S. 3,4,5-Trisubstituted isoxazoles as novel PPAR δ agonists. Part 2. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 16, p. 5488–5492, 2006.

FROMENT, P.; GIZARD, F.; DEFEVER, D.; STAELS, B.; DUPONT, J.; MONGET, P. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Reproductive Tissues: from Gametogenesis to Parturition," **Journal of Endocrinology**. v. 189, p. 199–209, 2006.

GILDE, A. J.; BILSEN, M. V. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): regulators of gene expression in heart and skeletal muscle. **Acta Physiol Scand.** v. 178, p. 425–434, 2003.

GRONEMEYER, H.; GUSTAFSSON, J. A.; LAUDET, V.; Principales for modulation of the nuclear receptor superfamily. **Nature Review Drug Discovery**, v. 3, p. 950-963, 2004.

GROVER, G. J.; MALM, J. Selective Thyroid Hormone Agonists: A Strategy for Treating Metabolic Syndrome. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 2, p. 137-142, 2005.

GROVER, G. J.; MELLSTRÖM, K.; YE, L.; MALM, J.; LI, Y.; BLADH, L. R.; SLEPH, P. G.; SMITH, M. A.; GEORGE, R.; VENNSTRÖM, B.; MOOKHTIAR, K.; HORVATH, R.; SPEELMAN, J.; EGAN, D.; BAXTER, J. D. Selective Thyroid Hormone Receptor- β Activation: A Strategy for Reduction of Weight, Cholesterol, and Lipoprotein (A) with Reduced Cardiovascular Liability. **PNAS**, v. 100, p. 10067–10072, 2003.

HANING, H.; MUELLER, U.; SCHMIDT, G.; SCHMECK, C. V. V.; KRETSCHMER, A.; BISCHOFF, H. Novel Heterocyclic Thyromimetics. Part 2. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2007.

HASHIMOTO, A.; SHI, Y.; DRAKE, K.; KOH, J. T. Design and Synthesis of Complementing Ligands for Mutant Thyroid Hormone Receptor TR β (R320H): a Tailor-Made Approach Toward the Treatment of Resistance to Thyroid Hormone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 3627-3639, 2005.

HAYASHI, M.; OHNOTA, H.; KURODA, T. T. J.; SHIBATA N.; MORIWAKI, M. A. H.; MITSUMORI, N. M. K. Inhibitory Effects of KAT-681, a Liver-Selective Thyromimetic, on Development of Hepatocellular Proliferative Lesions in Rats Induced by 2-Acetylaminofluorene and Partial Hepatectomy after Diethylnitrosamine Initiation. **Arch Toxicol**, v. 78, p. 460–466, 2004.

HELMUT, H.; MICHAEL, W.; ULRICH M.; GUNTER S.; CARSTEN S.; VERENA V.; AXEL K.; JOSEF P. Novel heterocyclic thyromimetics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 1835-1840, 2005.

HERZLINCH, A. A.; TUO, J. CHAN, C.C. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor and Age-Related Macular Degeneration. **PPAR Research**. v. 2008, p. 01-11, 2008.

JAY, M. A.; REN, J. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) in Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes Mellitus **Current Diabetes Reviews**. v. 3, p. 33-39, 2007.

JAY, M. A.; REN, J. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) in Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes Mellitus **Current Diabetes Reviews**. v. 3, p. 33-39, 2007.

JOHANSSON, L.; RUDLING, M.; SCALAN, T. S.; LUNDASEN, T.; WEBB, P.; BAXTER, J.; ANGELIN, B.; PARINI, P. Selective thyroid receptor modulation by GC-1 reduces serum lipids and stimulates steps of reverse cholesterol transport in euthyroid mice. **PNAS**. v. 102, P. 10297–10302, 2005.

JORGE, P. A. R.; ALMEIDA, E. A. OZAKI, M. R.; JORGE, M.; CARNEIRO, A. Efeitos da Atorvastatina, Fluvastatina, Pravastatina e Simvastatina Sobre a Função Endotelial, a Peroxidação Lipídica e a Aterosclerose Aórtica em Coelhos Hipercolesterolêmicos. **Arq. Bras. Card**. v. 84, p. 314-319, 2005.

KANESHIGE, M.; KANESHIGE, K.; ZHU, X.; DACE, A.; GARRET, L.; CARTER, T. A.; KAZLAUSKAITE, R.; PANKRATZ, D. G.; BORIS, A. W.; REFETOFF, S.; WEINTRAUB, B.; WILLINGHAM, M. C.; BARLOW, C.; CHENG, S. Mice with a targeted mutation in the thyroid hormone b receptor gene exhibit impaired growth and resistance to thyroid hormone. **PNAS**. p. 01-06, 2000.

KUHN, B.; HILPERT, H.; BENZ, J.; BINGGELI, A.; GREETHER, U.; HUMM, R.; MÄRKI, H. P.; MEYER, M.; MOHR, P. Structure-Based Design of Indole Propionic Acids as Novel PPAR α/γ Co-Agonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 16, p. 4016–4020, 2006.

LATINI, G.; SCODITTI, E.; VERROTI, A.; FELICE, C.; MASSARO, M. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors as Mediators of Phthalate-Induced Effects in the Male and Female Reproductive Tract: Epidemiological and Experimental Evidence. **PPAR Research**. v. 2008, p. 01-13, 2008.

LEE, S. K.; KIM, H. J.; KIM, J. W.; LEE, J. W. Steroid Receptor Coactivator-1 and Its Family Members Differentially Regulate Transactivation by the Tumor Suppressor Protein p53. **Mol. Endoc.** v. 13, p. 1924 – 1933, 1999.

LEIBIGER, I. B.; LEIBIGER, B.; BERGGREN, P. O. Insulin Feedback Action on Pancreatic β -cell Function. **FEBS Letters**. v. 532, p. 01-06, 2002.

LIAO, J. K.; LAUFS, U. Pleiotropic Effects of Statins. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 45, p. 89-118, 2005.

LIN, H., ABRAHAM, D. J. Identification of a lead Pharmacophore for the Development of Potent Nuclear Receptor Modulators as Anticancer and X Syndrome disease therapeutic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 4178 – 4183, 2006.

MINGE, C.D.; BORKER, R. L.; NORMAN, R. J. PPAR Gamma: Coordinating Metabolic and Immune Contributions to Female Fertility. **PPAR Research**. v. 2008, p. 01-19, 2008.

LEIBIGER, I. B.; LEIBIGER, B.; BERGGREN, P. O. Insulin Feedback Action on Pancreatic β -cell Function. **FEBS Letters**. v. 532, p. 01-06, 2002.

LIAO, J. K.; LAUFS, U. Pleiotropic Effects of Statins. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 45, p. 89-118, 2005.

LIN, H., ABRAHAM, D. J. Identification of a lead Pharmacophore for the Development of Potent Nuclear Receptor Modulators as Anticancer and X Syndrome disease therapeutic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 4178 – 4183, 2006.

LUQUET, S.; SORIANO, J. L.; HOLST, D.; GAUDEL, C.; PIETRI, C, J.; FREDENRICH, A.; GRIMALDI, P. A. Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor delta (PPAR δ) in the Control of Fatty Acid Catabolism. A New Target for the Treatment of Metabolic Syndrome. **Biochimie**. v. 86, p. 833–837, 2004.

McLAUGHLIN, T.; ABBASI, F.; LAMENDOLA, C.; REAVEN, G. Heterogeneity in the Prevalence of Risk Factors for Cardiovascular Disease and Type 2 Diabetes Mellitus in Obese Individuals. **Arch Intern Med.** v. 167, p. 642-648, 2007.

MATTHEWS, R.S. *Artemia salina* as a test organism for measuring superoxide-mediated toxicity. **Free Radic Biol Med.** v. 18, p. 919-22, 1995.

Messier, N. L.; Laflamme, G. H.; Langlois M. F. In Vitro Effect of Triac on Resistance to Thyroid Hormone Receptor Mutants: Potential Basis for Therapy. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 174, p. 59–69, 2001.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTMAN, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E.; MCLAUGHEIN, J. L.; Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents, **Planta Médica.** v. 45, p. 31 – 34, 1982.

MOLINA-SALINAS, G. M.; SAID-FERNANDES, S. A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 633-638, 2006.

NATALI, A.; BALDEWEG, S.; TOSCHI, E.; CALPADO, B.; BARBADO, D.; GASTALDELLI, A.; YUDKIN, J. S.; FERRANNINI, E. Vascular effects of improving metabolic control with metformin or rosiglitazone in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, p. 1349-1357, 2004.

NESS, G. N.; LOPEZ, D.; CHAMBERS, C. M.; NEWSOME, W. P.; CORNELIUS, P.; LONG, C. A.; HARWOD, H. J. Effects of L-Triiodothyronine and the Thyromimetic L-94901 on Serum Lipoprotein Levels and Hepatic Low-Density Lipoprotein Receptor, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase, and Apo A-I Gene Expression. **Biochem. Pharm.** v. 56, p. 121–129, 1998.

POULAIN, M.; DOUCET, M.; MAJOR, G. C.; DRAPEAU, V.; SÉRIÈS, F.; BOULET, L. P.; TREMBLAY, A.; MALTAIS, F. The Effect of Obesity on Chronic Respiratory Diseases: Pathophysiology and Therapeutic Strategies. **CMAJ.** v. 25, p. 1293-1299, 2006.

REAVEN, G. M. Pathophysiology and Pharmacological Treatment of Insulin Resistance. **Physiol Rev**, v. 75, p. 473-486, 1995.

REUTRAKUL, S.; SADOW, P. M.; PANNAIN, S.; POHLENZ, J.; CARVALHO, G.A.; MACCHIA, P. E.; WEISS, R. E.; REFETTOFF, S. Search for Abnormalities of Nuclear Corepressors, Coactivators, and a Coregulator in Families with Resistance to Thyroid Hormone without Mutations in Thyroid Hormone Receptor β or α Genes. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 85, p. 3609-3617, 2000.

ROBINSON, J. G. Should We Use PPAR Agonists to Reduce Cardiovascular Risk?. **PPAR Research**. v. 2008, p. 01-13, 2008.

ROBERT, L. D.; STEVEN, R. S.; ERNEST, S. P.; RICHARD, F. H.; PHOEBE, C.; PETER, C.; EUNSUN, L.; WILLIAM, P. N.; ANDREW, G. S.; JOSEPHINE, S.; DIANE, M. H.; TERRELL, A. P.; JAYVARDHAN, P.; BORIS, A. C.; PETER, K. L.; DENNIS, E. D.; MICHELE, H. R.; MARK, J. A.; SAMUEL, P. S.; GAYLE, K. S.; BONNIE, F. T.; PAUL, D. J. Discovery of a Novel Series of 6-Azauracil-Based Thyroid Hormone Receptor Ligands: Potent, TR β Subtype-Selective Thyromimetics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 379-382, 2003.

SCALAN, T. S.; YOSHIHARA, H. A.; NGUYEN, N.; CHIELLINI, G. Selective Thyromimetics: Tissue-Selective Thyroid Hormone Analogs. **Drug Discovery & Development**, v. 5, p. 614-622, 2001.

SPINELLI, S. L.; O'BRIEN, J. J.; BANCOS, S.; LEHMANN, G. M.; SPRINGER, D. L.; BLUMBERG, N.; FRANCIS, C. W.; TAUBMAN, M. B.; PHIPPS, R. P. The PPAR-Platelet Connection: Modulators of Inflammation and Potential Cardiovascular Effects. **PPAR Research**. v. 2008, p. 01-16, 2008.

STEPHAN, Z. F.; YURACHEK, E. C.; SHARIF, R.; WASVARY, J. M.; LEONARDS, K. S.; HU, C. W.; HINTZAB, T. H.; STEELE, R. E. Demonstration of Potent Lipid-Lowering Activity by a Thyromimetic Agent Devoid of Cardiovascular and Thermogenic Effects. **Atherosclerosis**. v. 126, p. 53-63, 1996.

SUN, Y.; BENNETT, A. Cannabinoids: A New Group of Agonists of PPARs. **PPAR Research**. v. 2007, p. 01-07, 2007.

TAVARES, L. C. QSAR: A abordagem de Hansch. **Química Nova**, v. 27, p. 631– 639, 2004.

TAYLOR, A. H.; STEPHAN, Z. F.; STEELE, R. E.; WONG, N. C. W. Beneficial Effects of a Novel Thyromimetic on Lipoprotein Metabolism. **MOLECULAR PHARMACOLOGY**, v. 52, p. 542–547, 1997.

TOMANEK, R. J.; ZIMMERMAN, M. B; SUVARNA, P. R.; MORKIN. E.; PENNOCK, G. D.; GOLDMAN, S. A Thyroid Hormone Analog Stimulates Angiogenesis in the Post-infarcted Rat Heart. **J Mol Cell Cardiol**, v. 30, p. 923–932, 1998.

WAUGH, N.; SCOTLAND, G.; McNAMEE, P.; GILLETT, M.; BRENNAN, A.; GOYDER, E.; WILLIAMS, R.; JOHN, A. Screening for Type 2 Diabetes: Literature Review and Economic Modeling. **Health Technology Assessment**. v. 11, p. 01-146, 2007.

WEN, W.; LIU, F. Autoantibodies Highly in Patients with Thyroid Dysfunction. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 4, p. 233-236, 2007.

WILBORN, C.; BECKHAM, J.; CAMPBELL, B.; HARVEY T.; GALBREATH, M.; BOUNTY, P. L.; NASSAR, E.; WISMANN, J.; KREIDER, R. Obesity: Prevalence, Theories, Medical Consequences, Management, and Research Directions. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**. v. 2, p. 4-31, 2005.

WIESER, F.; WAITE, L.; DEPOIX, C.; TAYLOR, R. N. PPAR Action in Human Placental Development and Pregnancy and Its Complications. **PPAR Research**. v. 2008, p. 01-14, 2008.

WILLSON, T. M.; BROWN, P. J.; STERNBACH, D. D.; HENKE, B. R. The PPARs: From Orphan Receptors to Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 43, p. 527-550, 2000.

YAN, F.; LIN, C. W.; WEISIGER, E.; CARTIER, E. A.; TASCHEBERGER, G.; SHYNG, S. L. Sulfonylureas Correct Trafficking Defects of ATP-sensitive Potassium Channels Caused by Mutations in the Sulfonylurea Receptor. **J. Biol. Chem.** v. 279, p. 11096–11105, 2004.

_____. Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. **Physiological Reviews**, v. 81, p. 1097 – 1142, 2001.

YEN, P. M. Molecular Basis of Resistance to Thyroid Hormone. **Endocrinology and Metabolism**. v. 14, p. 327-333, 2003.

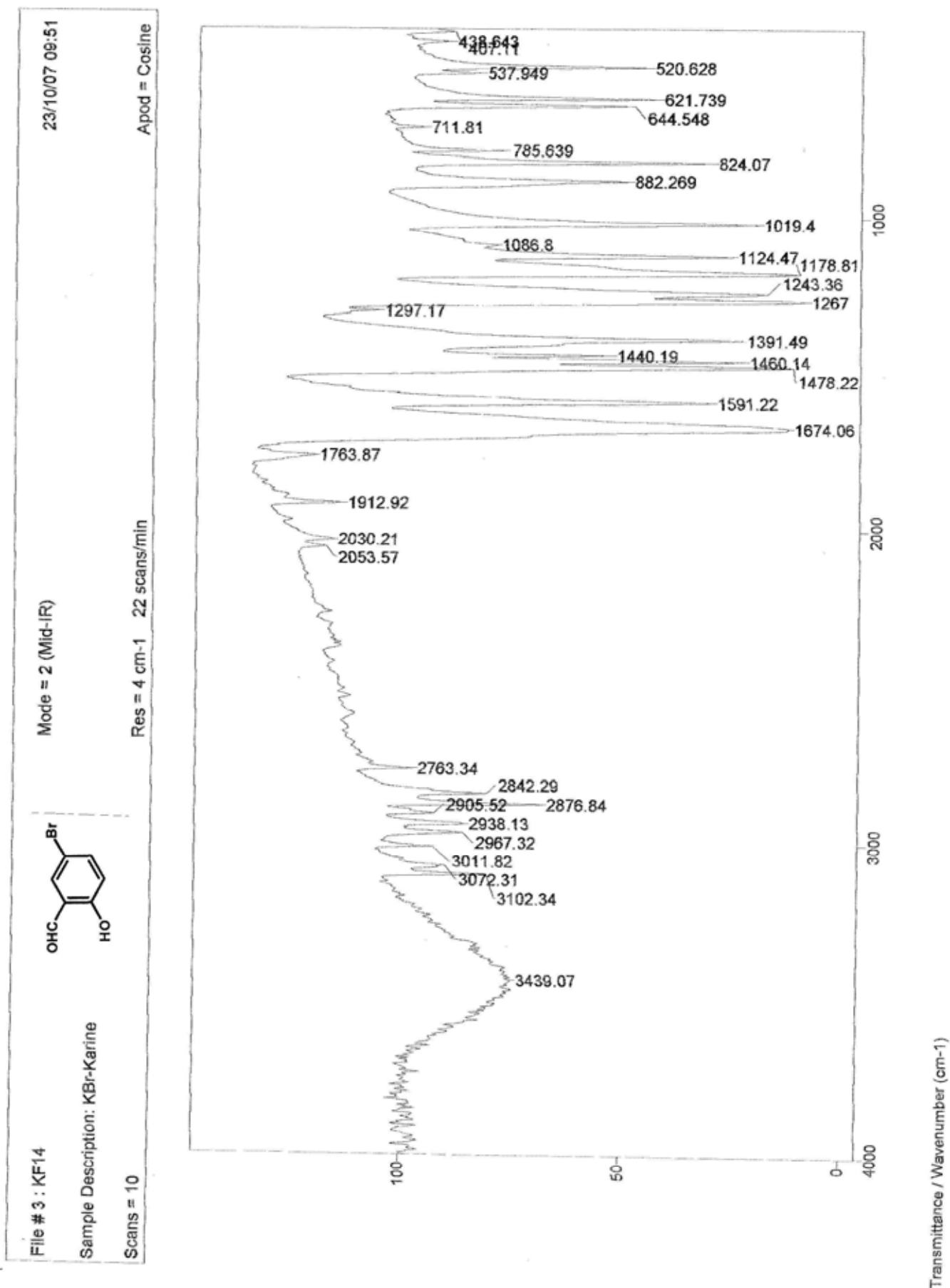
YOSHIHARA, H. A. I.; APRILETTI, J. W.; BAXTER, J. D.; SCALAN, T. S. A Design Antagonist of the Thyroid Hormone Receptor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, p. 2821-2825, 2001.

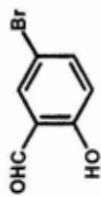
YOSHIHARA, H. A. I.; APRILETTI, J. W.; BAXTER, J. D.; SCANLAN, T. S. Structural Determinants of Selective Thyromimetics. **J. Med. Chem.**, v 46, p. 3152-3161, 2003.

_____. Structural Determinants of Selective Thyromimetics. **J. Med. Chem.**, v 46, p. 3152-3161, 2003.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G. M. M.; SHAW, J. Global and Societal Implications of the Diabetes Epidemic. **Nature**. v. 414, p. 782-787, 2001.

9. ANEXOS



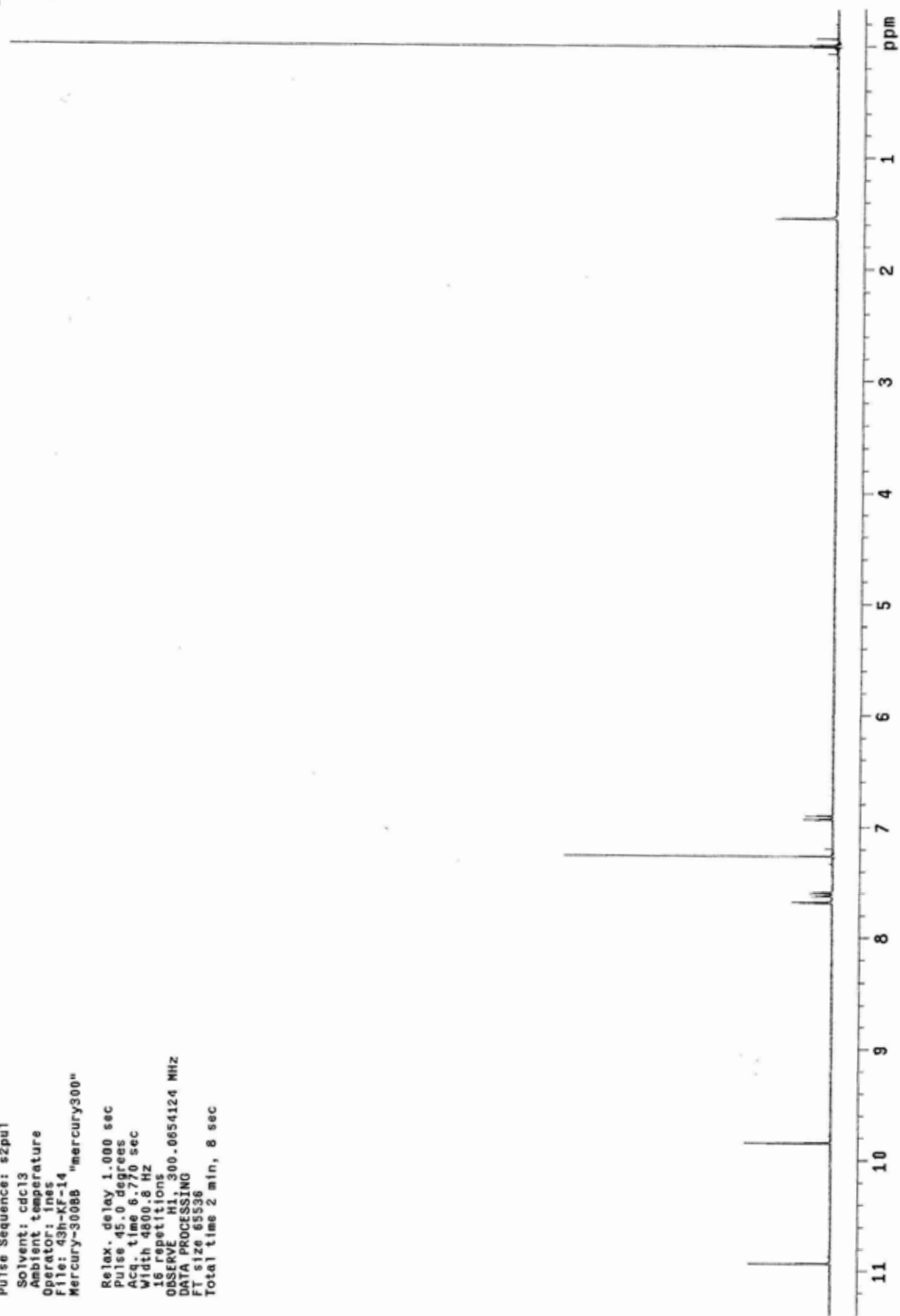


43h-KF-14
Karine

Automation directory:

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: cdcl3
Ambient temperature
Operator: ines
File: 43h-KF-14
Mercury-30088 "mercury300"

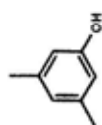
Relax. delay 1.000 sec
pulse 45.0 degrees
Acq. time 6.770 sec
Width 4800.8 Hz
15 repetitions
OBSERVED: 300.0654124 MHz
DATA PROCESSING
F1 size 65536
Total time 2 min, 8 sec



File # 3 : KF16

Mode = 2 (Mid-IR)

23/10/07 09:47

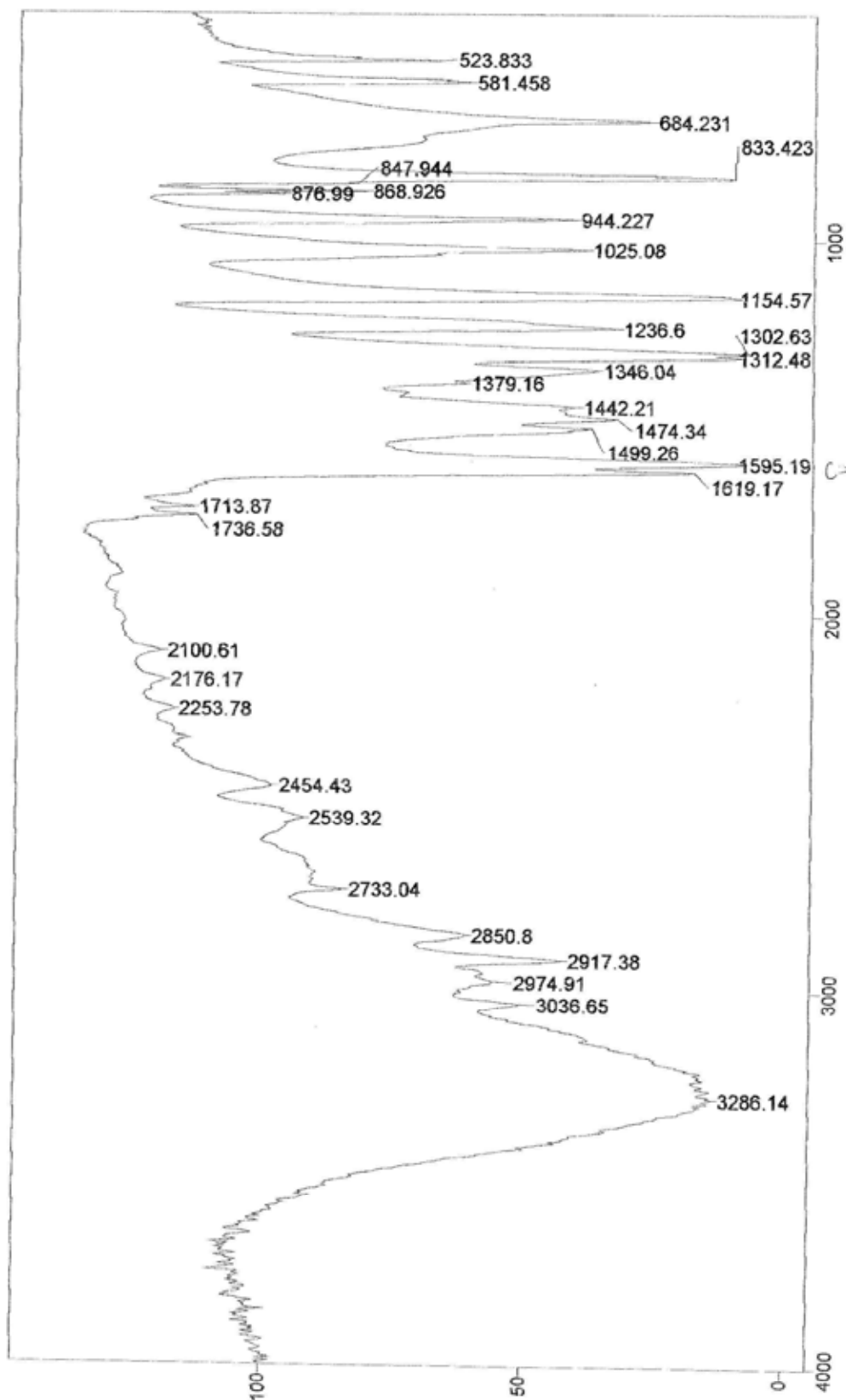


Sample Description: KBr-Karime

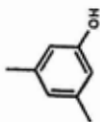
Scans = 10

Res = 4 cm-1 22 scans/min

Apod = Cosine



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

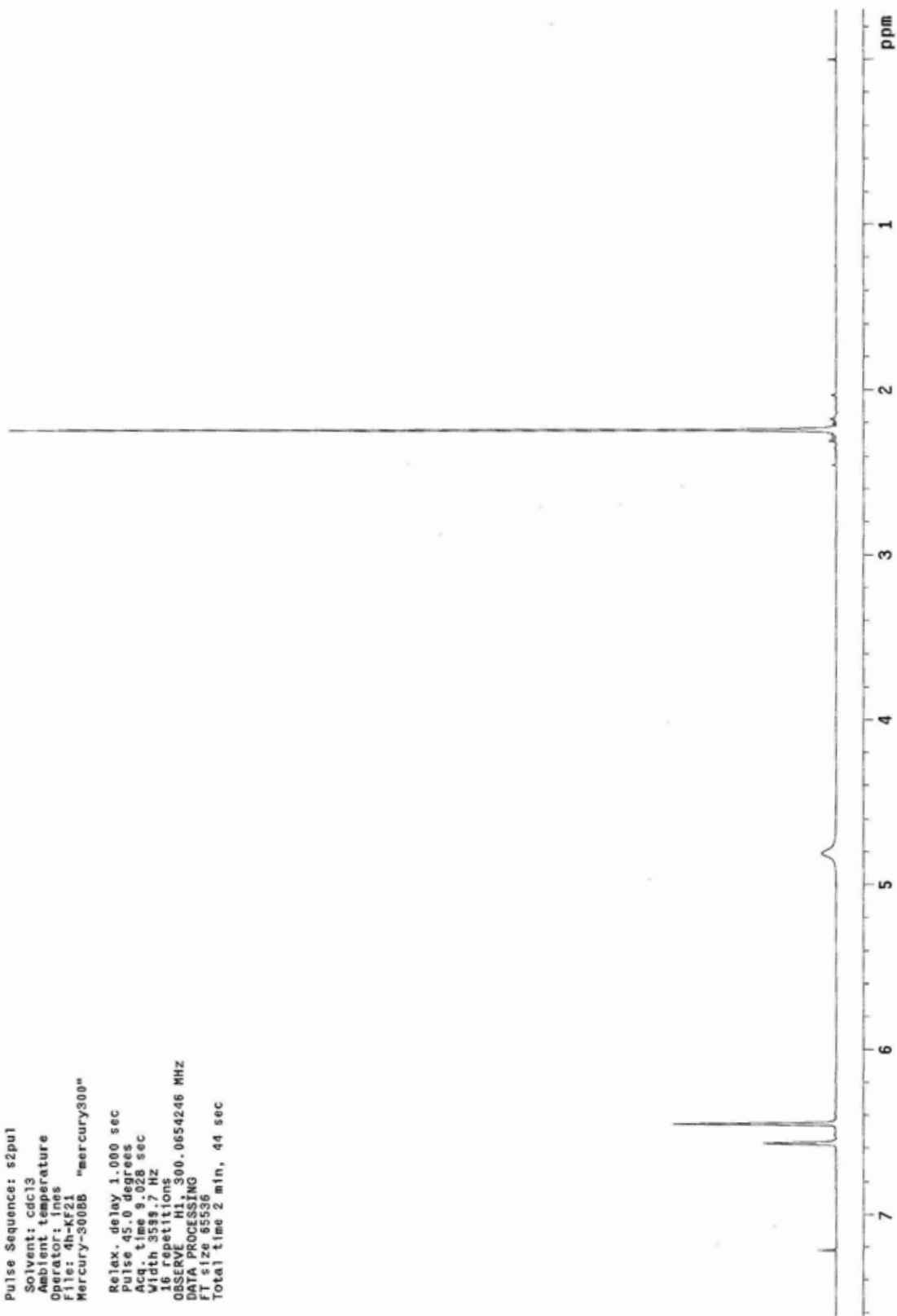


4h-KF21
Karline

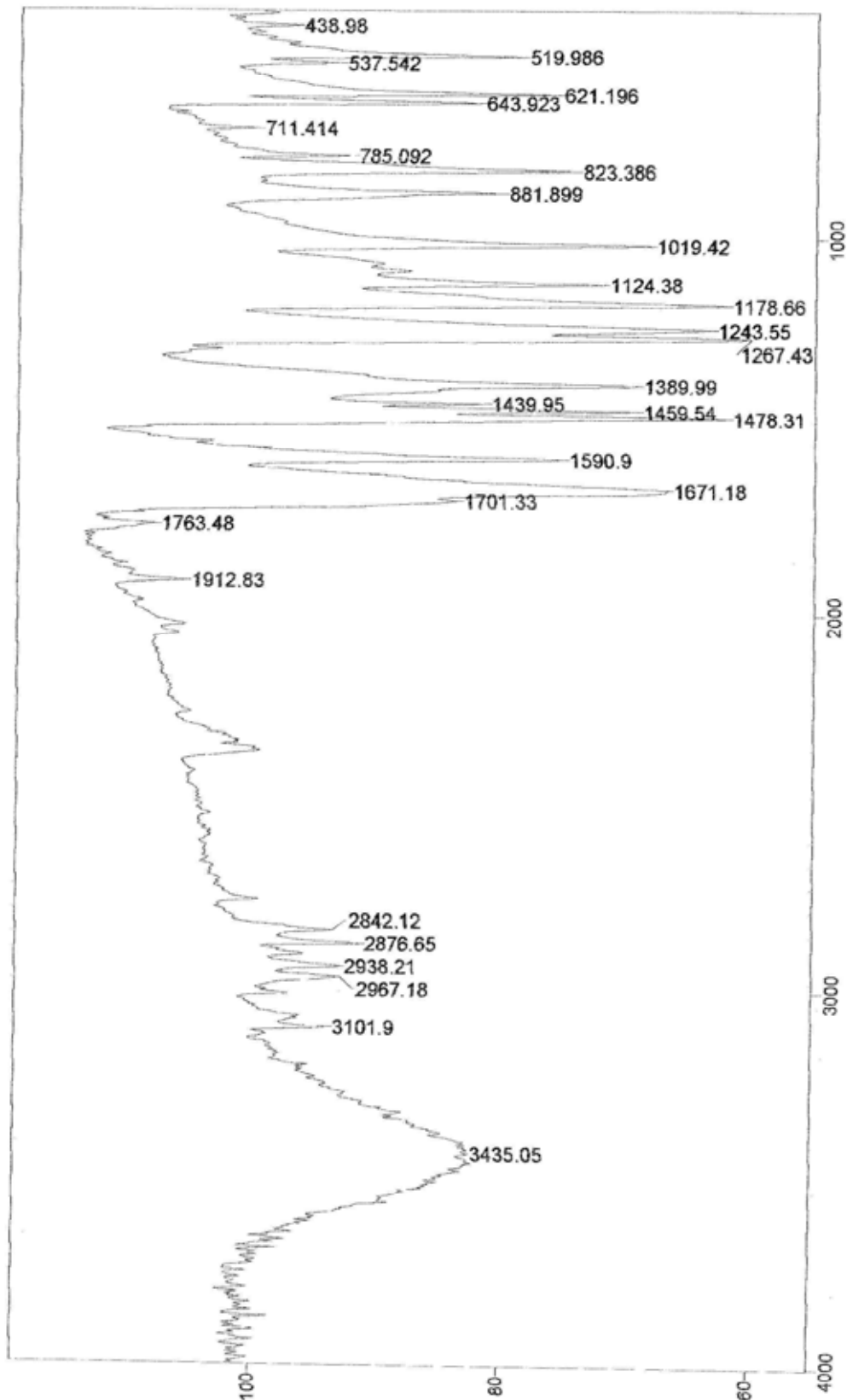
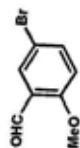
Automation directory:

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: cdcl3
Ambient temperature
Operator: ines
File: 4h-KF21
Mercury-300BB "mercury300"

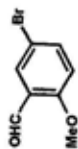
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 9.028 sec
Width 3588.7 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1 300.0654248 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 2 min, 44 sec



File # 3 : KF15
 Sample Description: KBr-Karine
 Scans = 10
 Mode = 2 (Mid-IR)
 Res = 4 cm-1 21 scans/min
 Apod = Cosine
 23/10/07 09:55



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

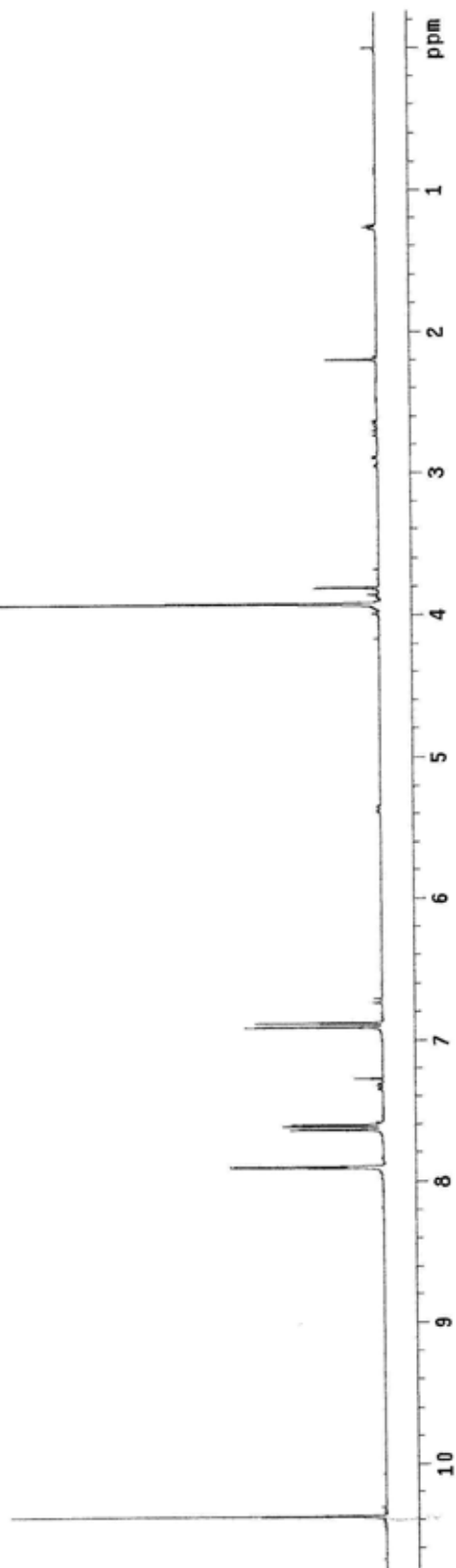


43h-KF-15
Karine

Automation directory:

Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: ccd13
Ambient temperature
Operator: ines
File: 43h-KF-15
Mercury-30088 "mercury300"

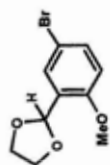
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acc. time 6.770 sec
Width 4800.8 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 300.0654086 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 2 min, 8 sec



File # 1 : LUCILIA

Sample Description: Filme

Scans= 10 Slow



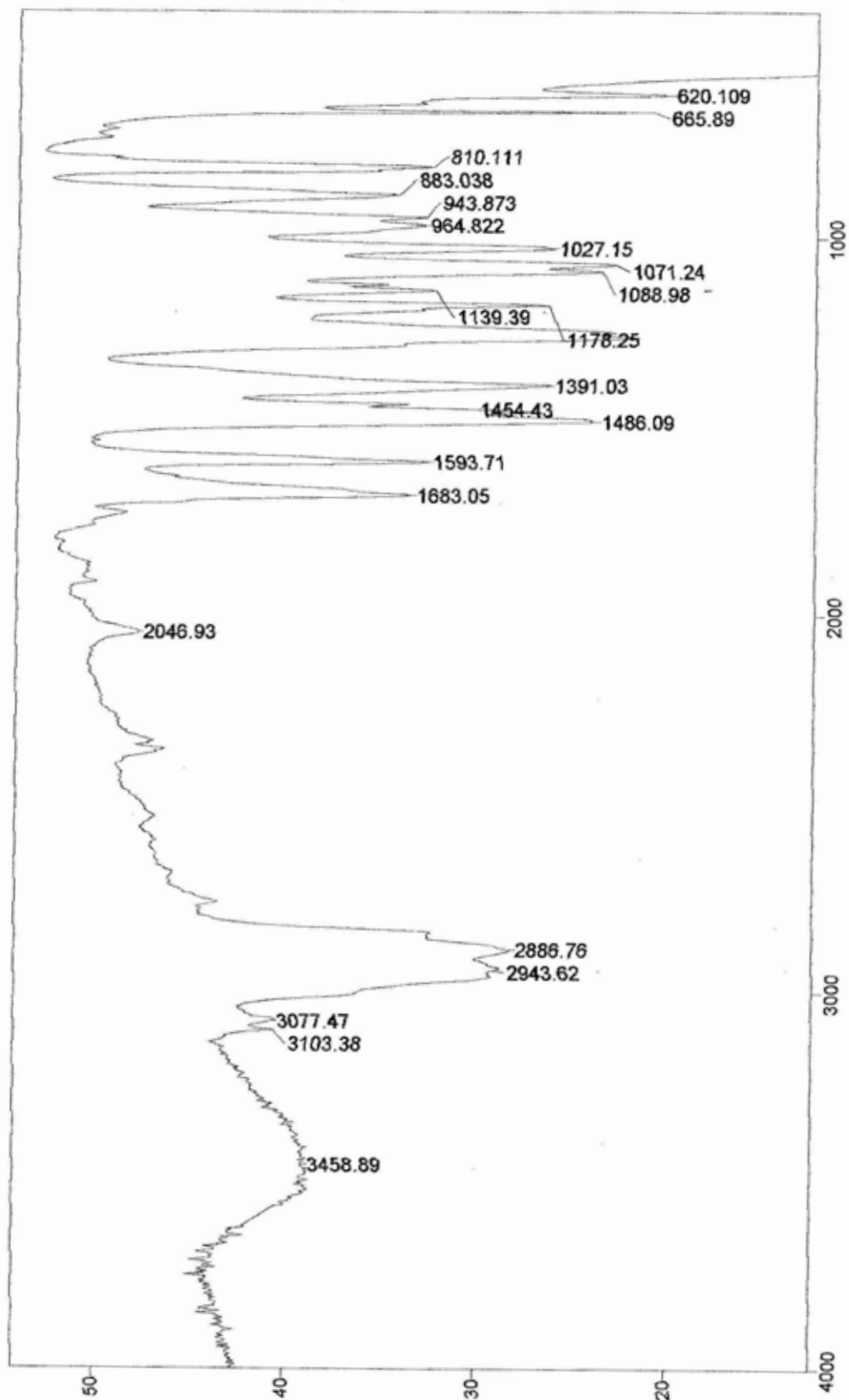
Mode= 2 (Mid-IR)

01/02/07 11:31

Res=4 cm-1

Apod= Cosine

Zero Filling= 1 x



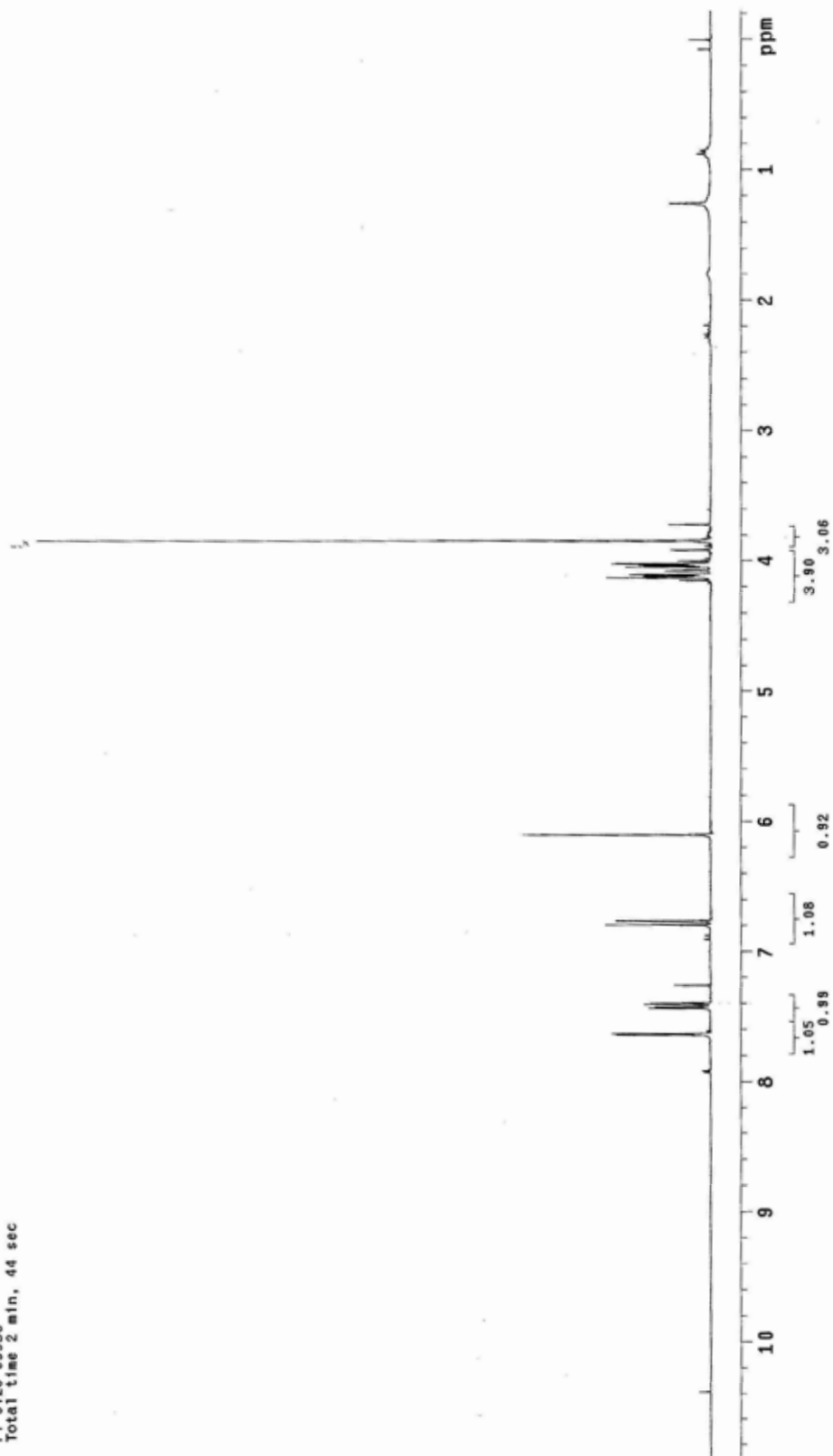
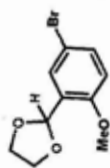
Transmittance / Wavenumber (cm-1)

5h-KF-04

Automation directory:

Pulse Sequence: e2pul
 Solvent: CDC13
 Temp. 27.0 C / 300.1 K
 Operator: ines
 Mercury-30085 "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 9.028 sec
 Width 3598.7 Hz
 16 repetitions
 OBSERVE W1, 300.0654121 MHz
 DATA PROCESSING 0.2 Hz
 FT size 65536
 Total time 2 min, 44 sec

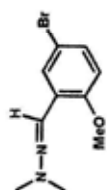


File # 1 : KARINE

Mode = 2 (Mid-IR)

09/10/07 10:01

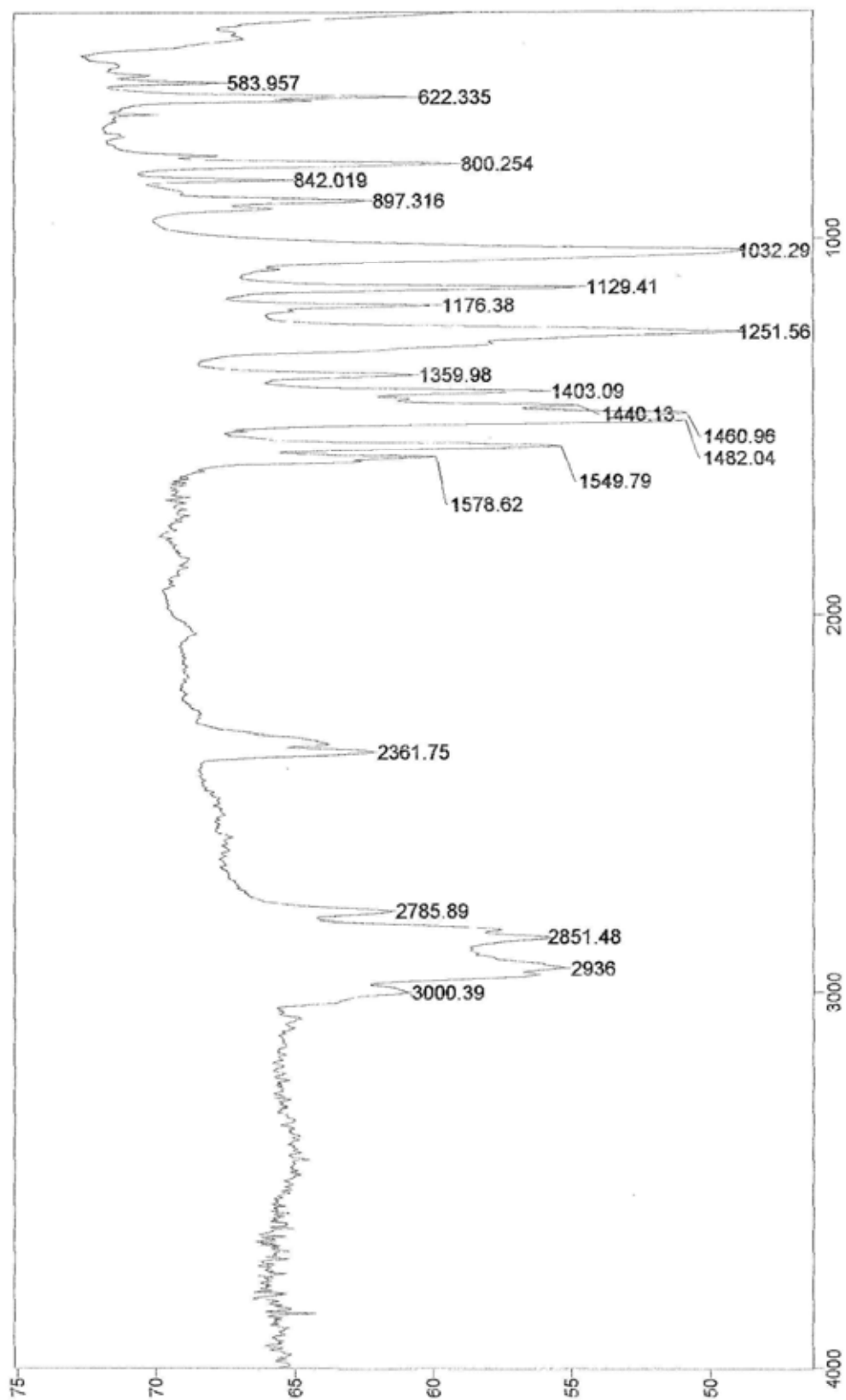
Sample Description: Filme



Scans = 10

Res = 4 cm-1 20 scans/min

Apod = Cosine



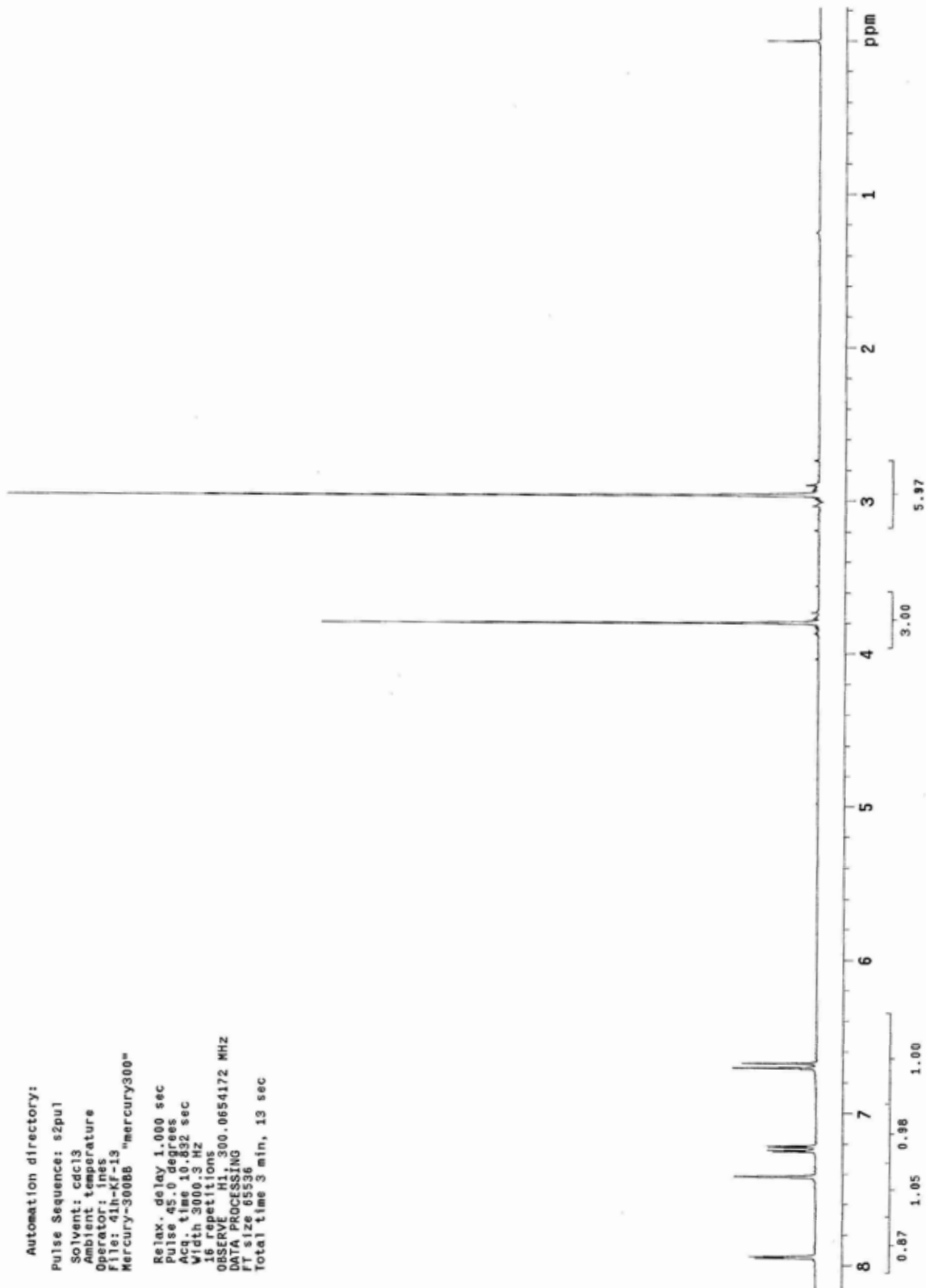
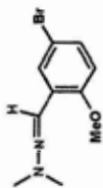
Transmittance / Wavenumber (cm-1)

41h-KF-13
Karine

Automation directory:

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: cdcl3
Ambient temperature
Operator: ines
File: 41h-KF-13
Mercury-300BB "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 10.832 sec
Width 3000.3 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1 300.0654172 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 3 min, 13 sec



File # 1 : KFA1

Sample Description: KBr

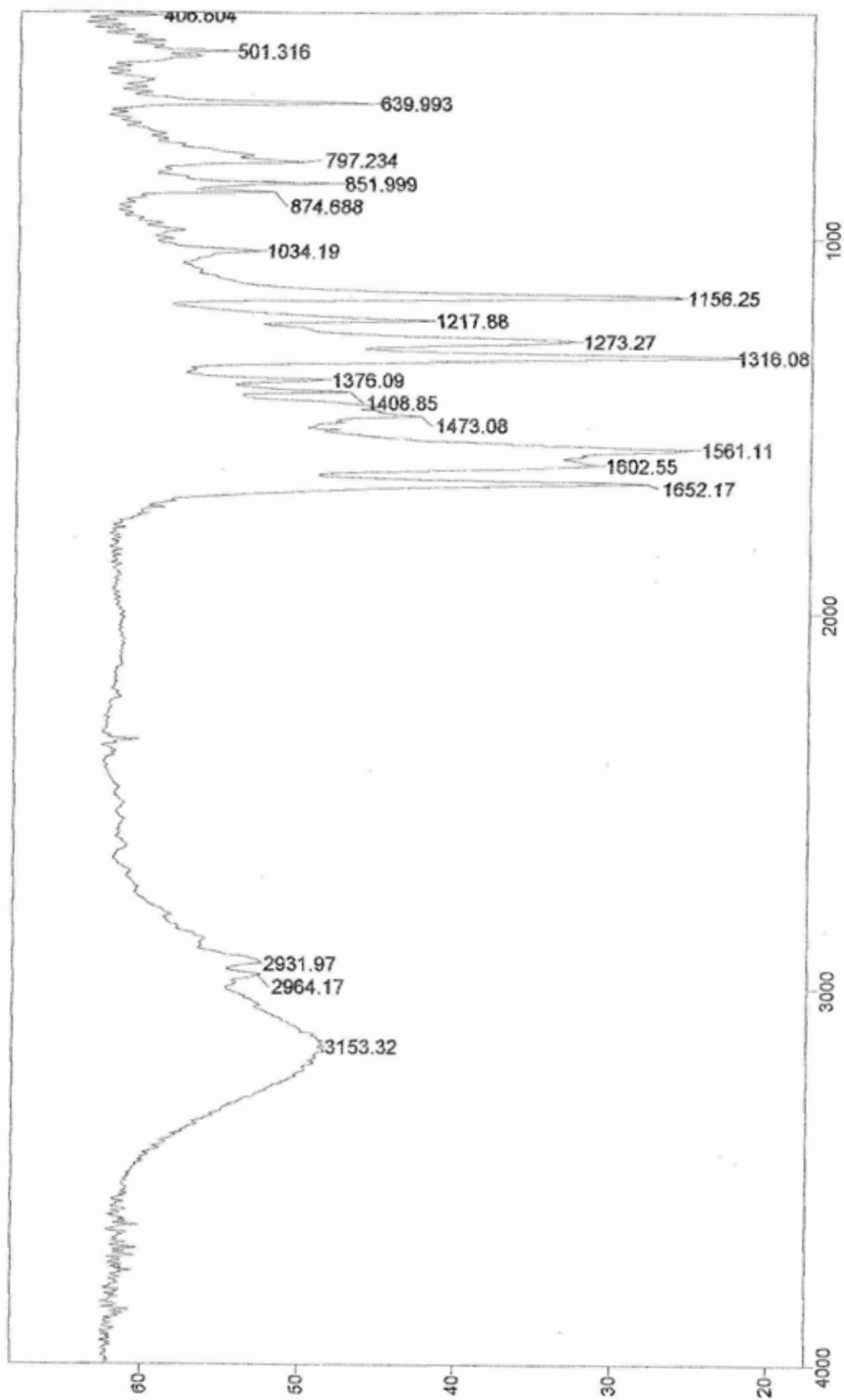
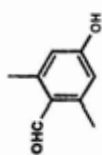
Scans = 10

Mode = 2 (Mid-IR)

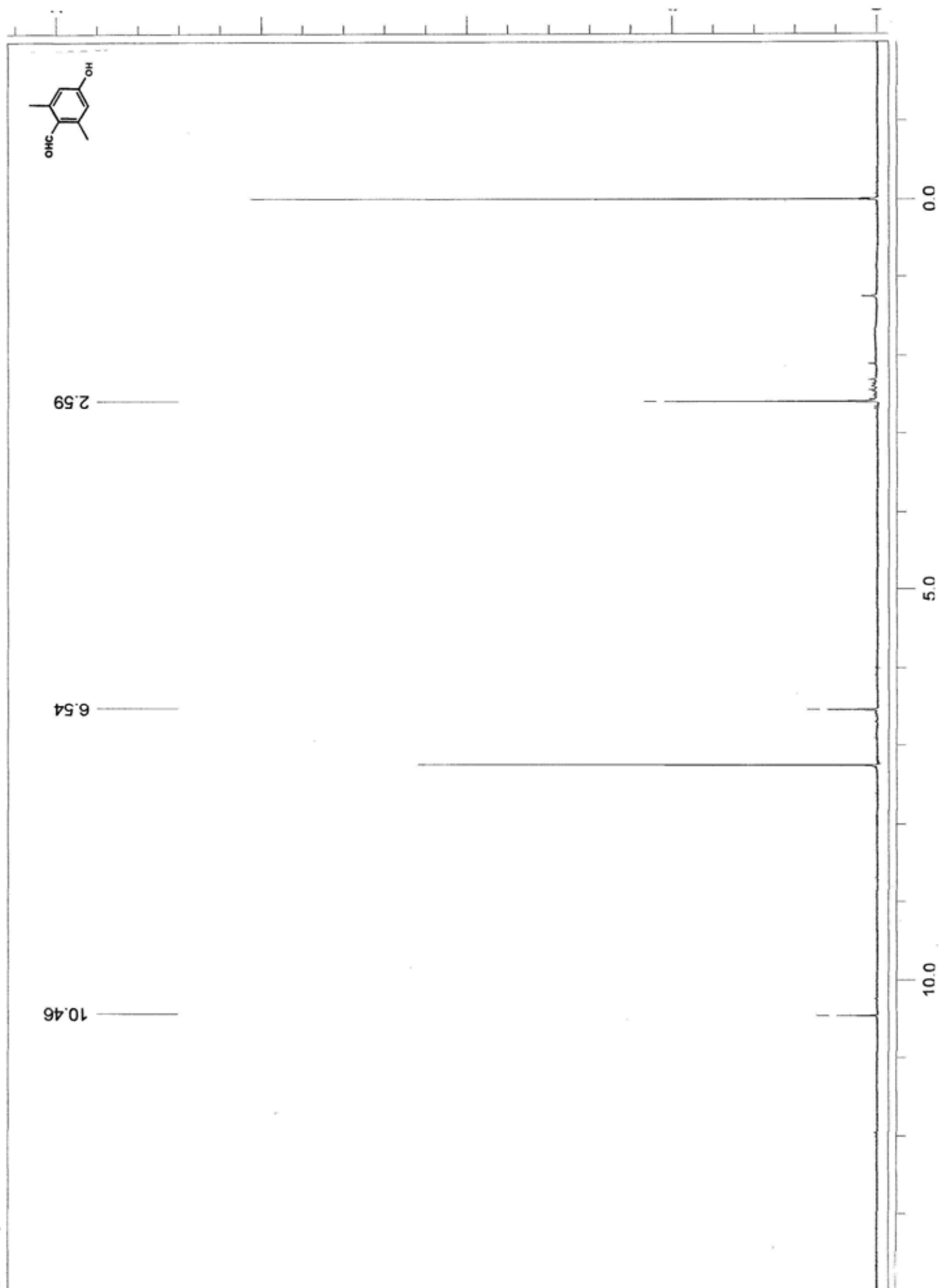
Res = 4 cm-1 21 scans/min

20/05/08 09:06

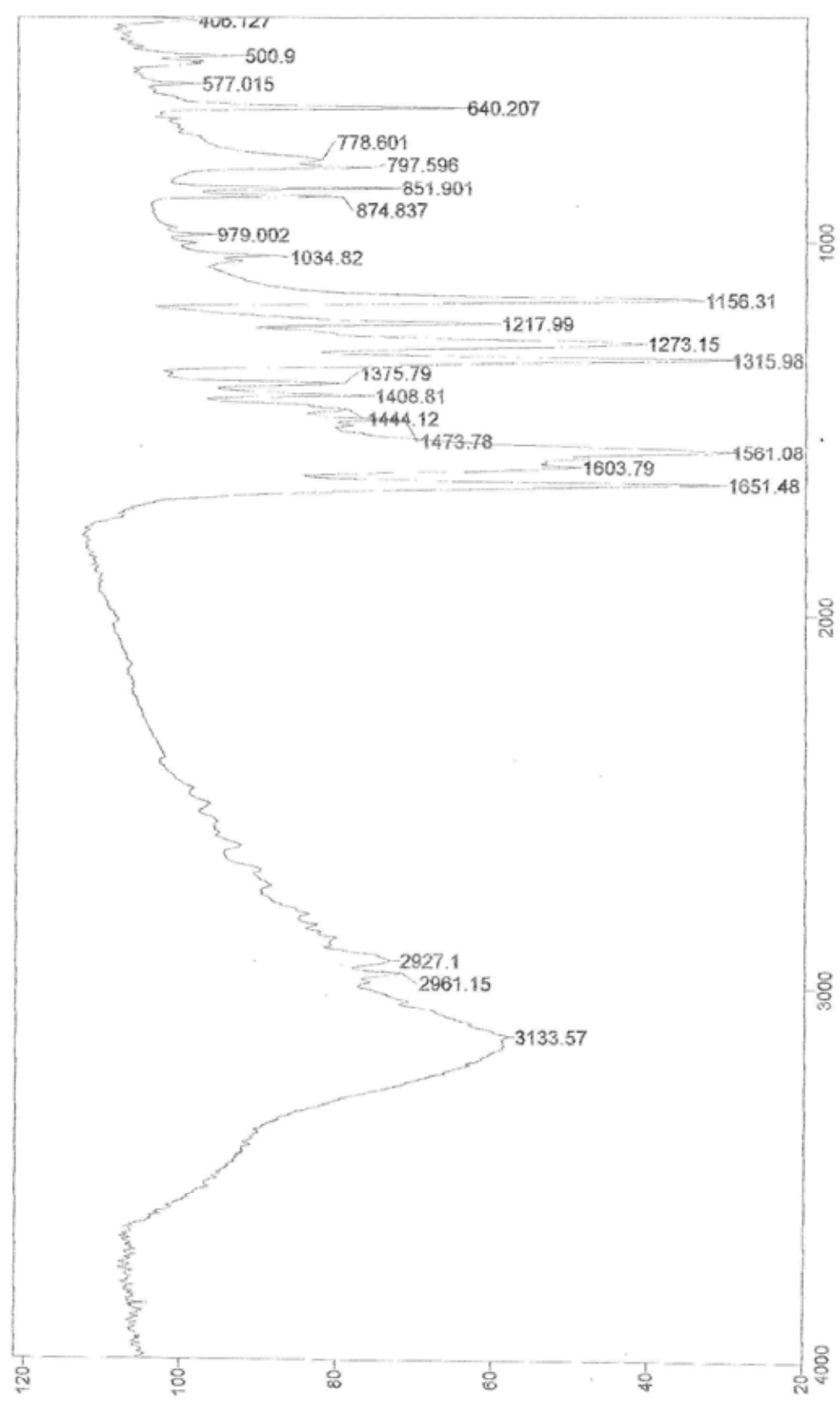
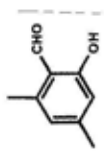
Apod = Cosine



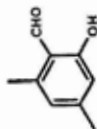
Transmittance / Wavenumber (cm-1)



File # 1 : RF06
 Sample Description: KBr
 Scans= 10 21 scans/min
 Mode= 2 (Mid-IR)
 Res=4 cm-1
 Apod= Cosine
 Zero Filling= 1 x
 08/05/07 11:12



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

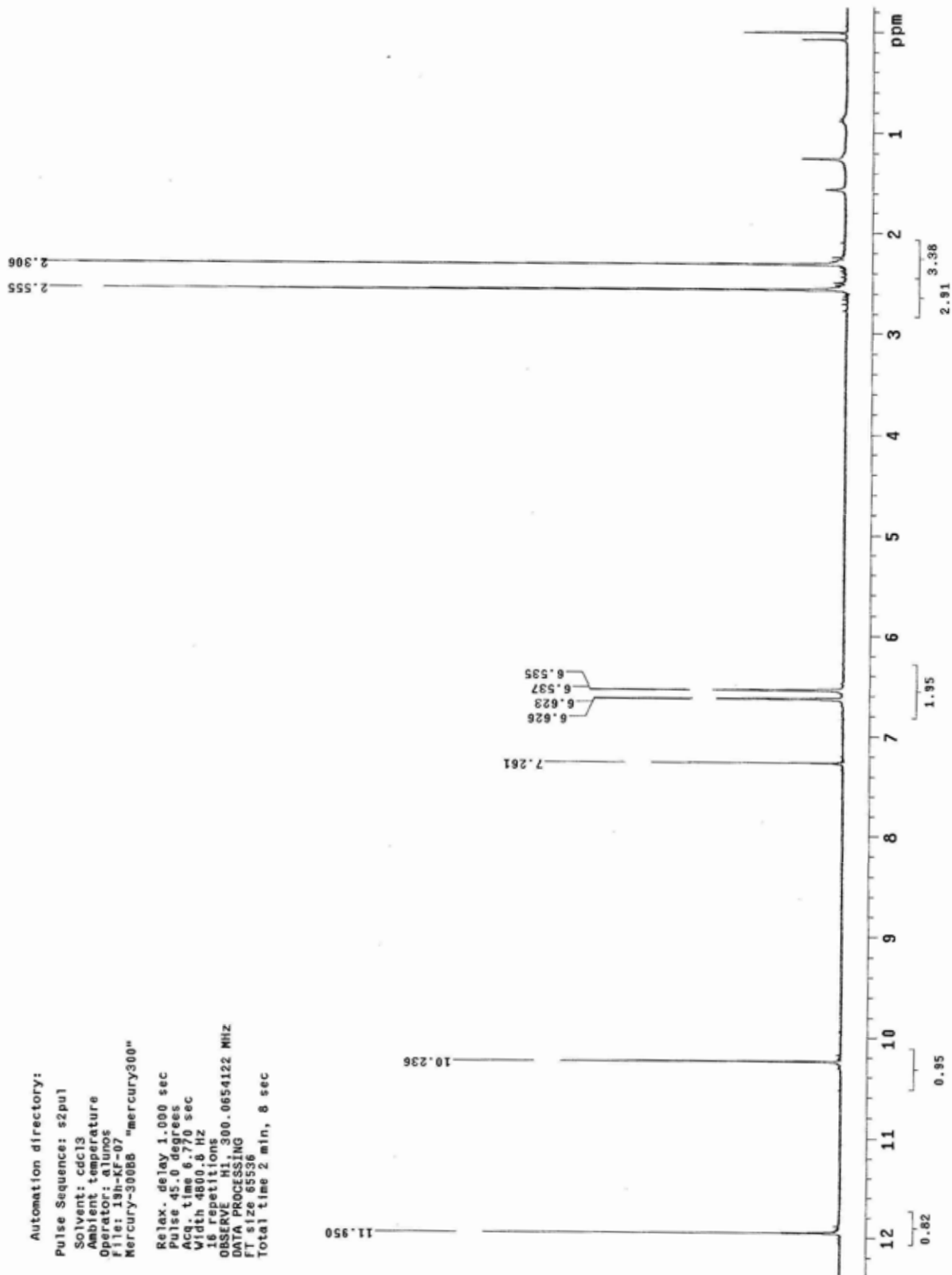


19h-KF-07

Automation directory:

Pulse Sequence: s2pul
 Solvent: cdcl3
 Ambient temperature
 Operator: alunos
 File: 19h-KF-07
 Mercury-30088 "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 6.770 sec
 Width 4800.8 Hz
 16 repetitions
 OBSERVE HI, 300.0654122 MHz
 DATA PROCESSING
 FI size 85536
 Total time 2 min, 8 sec

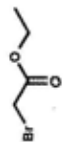


File # 1 : FILME

Mode = 2 (Mid-IR)

13/06/07 10:04

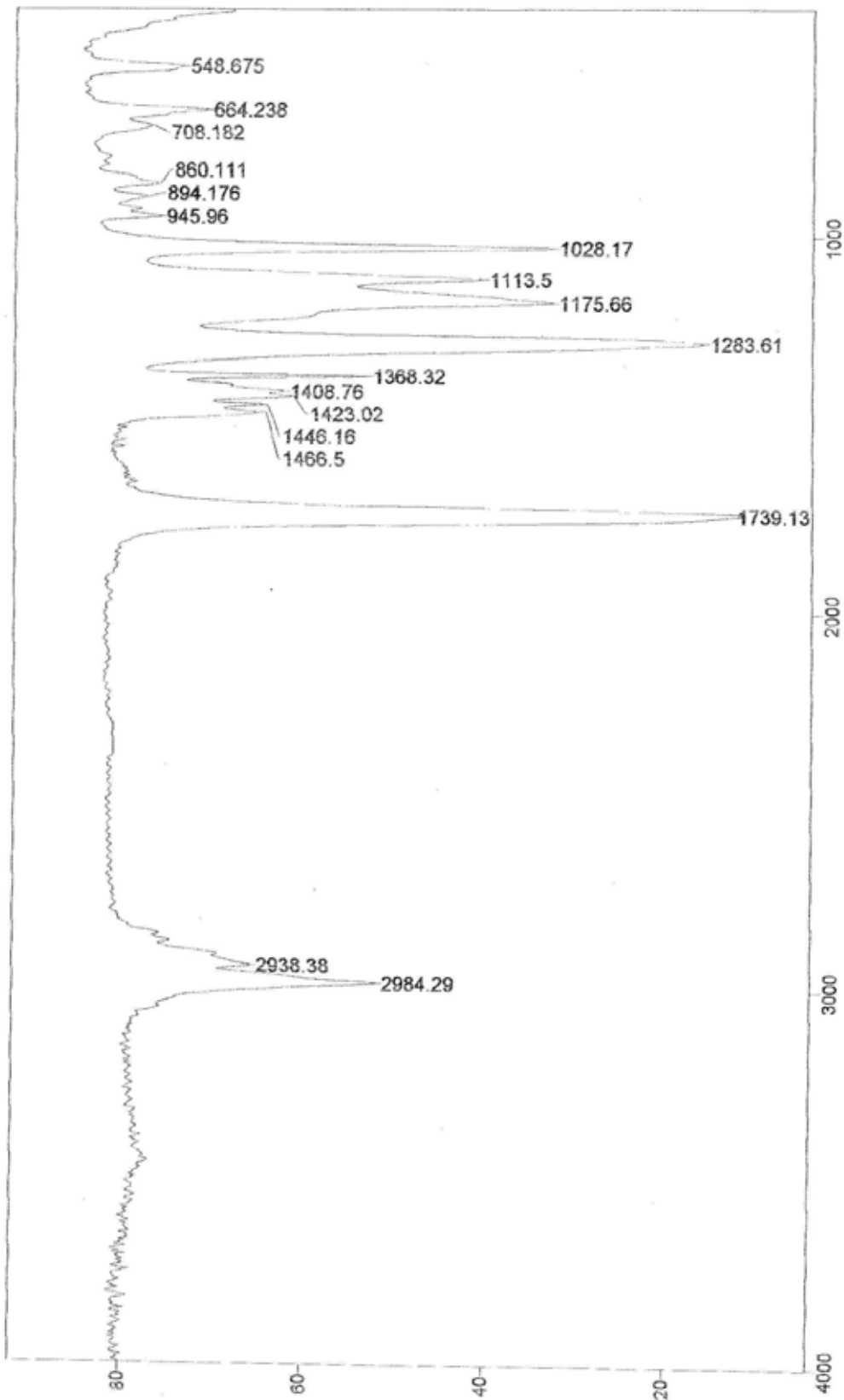
Sample Description: Filme



Scans = 10

Res = 4 cm-1 21 scans/min

Apod = Cosine



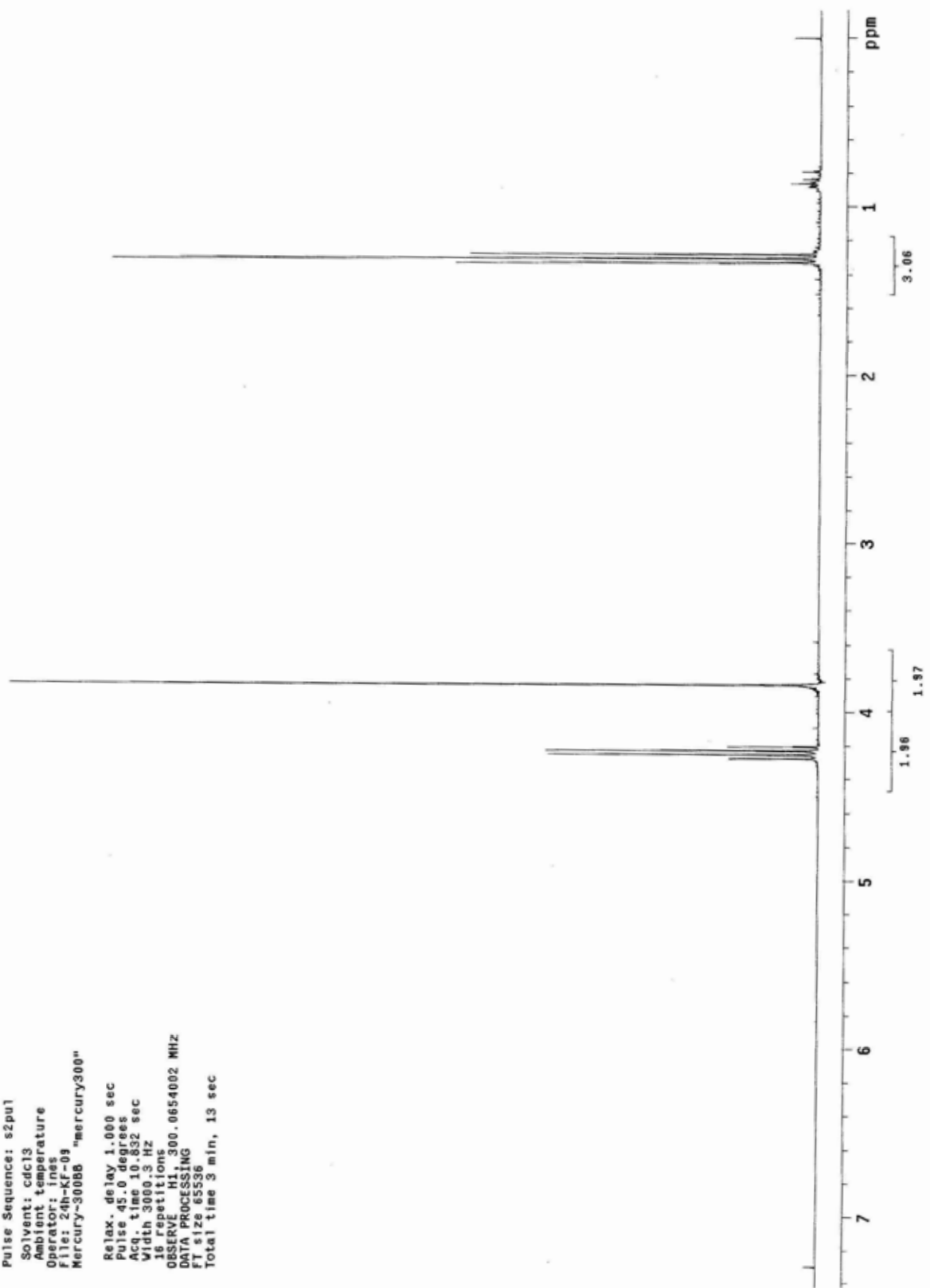
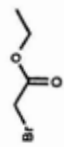
Transmittance / Wavenumber (cm-1)

24h-KF-08

Automation directory:

Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: cdcl3
Ambient temperature
Operator: ins
File: 24h-KF-08
Mercury-300BB "mercury300"

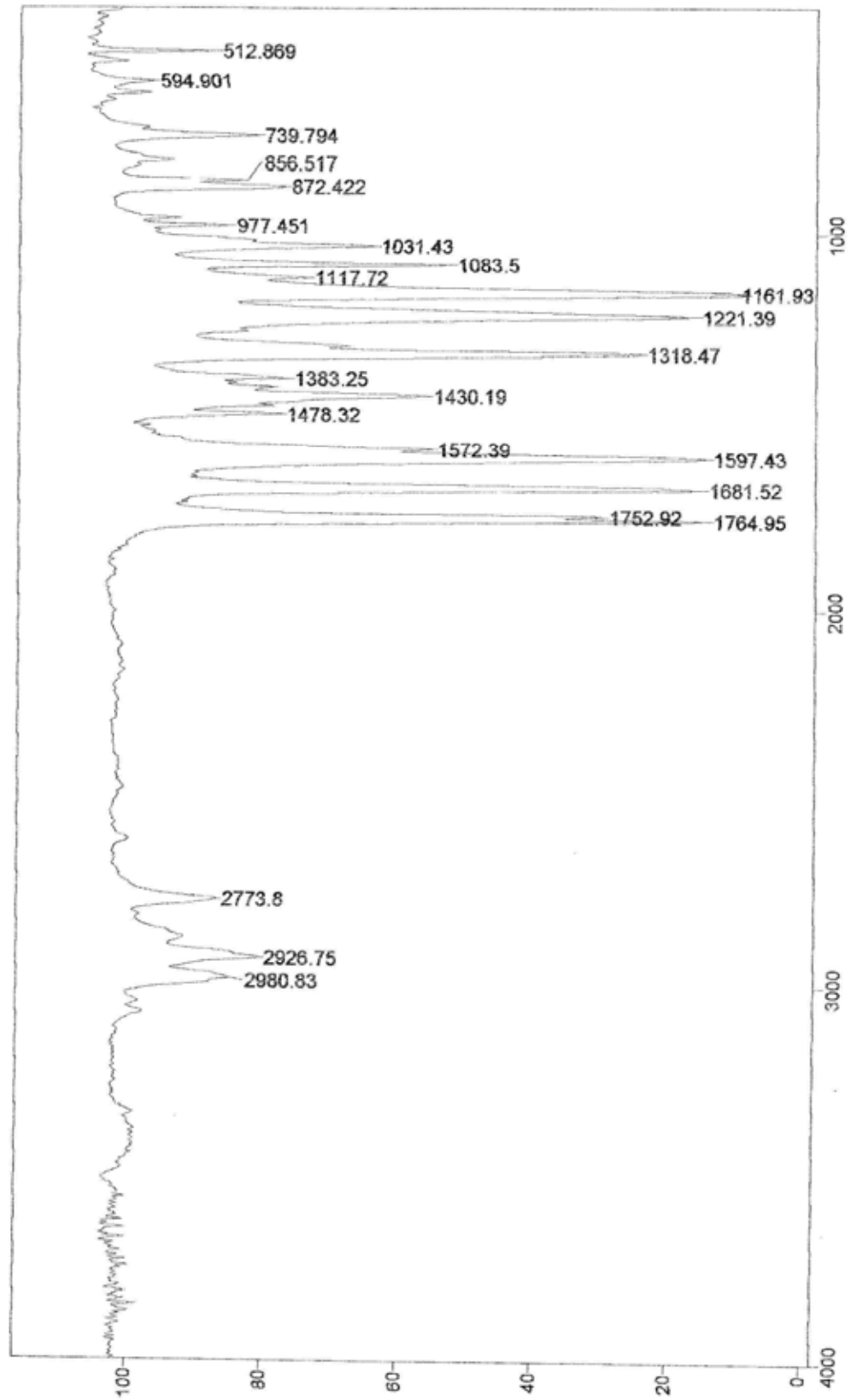
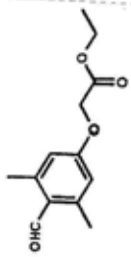
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 10.832 sec
Width 3000.3 Hz
14 repetitions
OBSERVE F1 300.0654002 MHz
DATA PROCESSING
F1 size 65536
Total time 3 min, 13 sec



File # 3 : KFA2
 Sample Description: KBr
 Scans = 10

Mode = 2 (Mid-IR)
 Res = 4 cm-1 21 scans/min
 Apod = Cosine

20/05/08 08:53



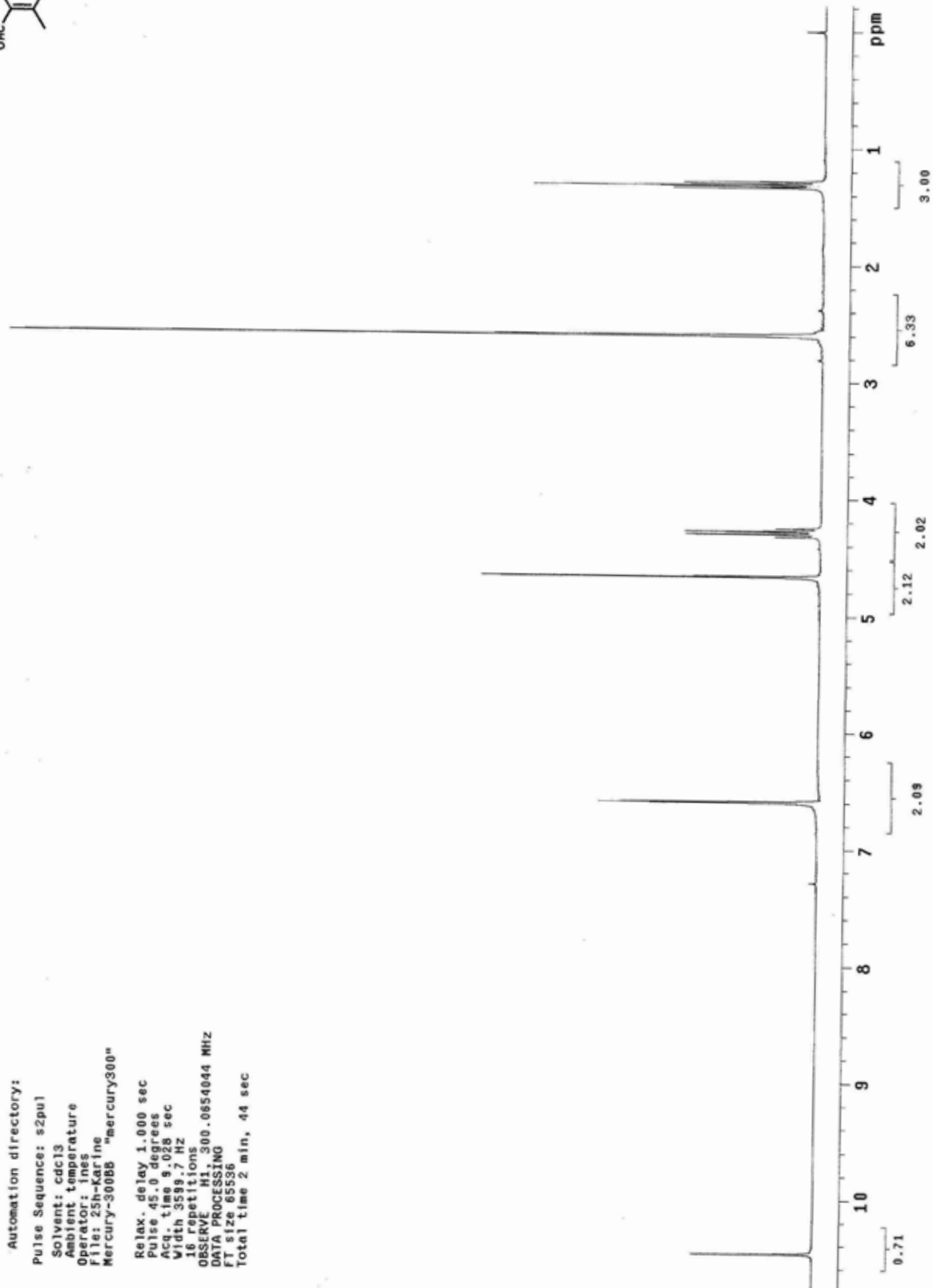
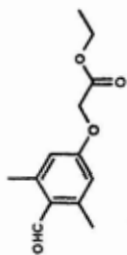
Transmittance / Wavenumber (cm-1)

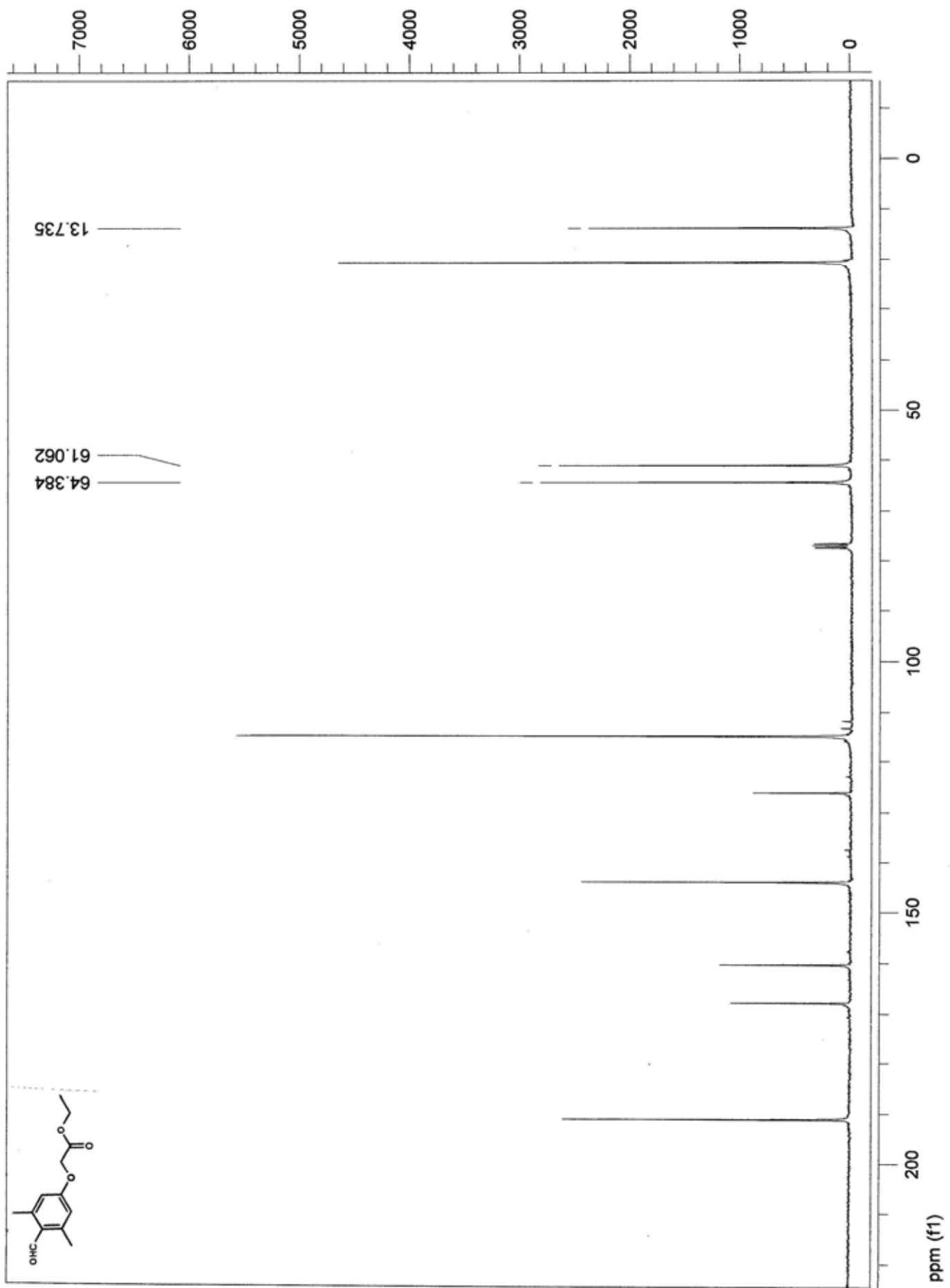
25h-Karine

Automation directory:

Pulse Sequence: s2pu1
 Solvent: cdc13
 Ambient temperature
 Operator: ins
 File: 25h-Karine
 Mercury-300BB "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 9.028 sec
 Width 3539.7 Hz
 16 Repetitions
 OBSERVE H1 300.0654044 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 65536
 Total time 2 min, 44 sec



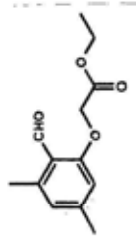


File # 1 : KARINE

Mode = 2 (Mid-IR)

11/09/07 09:40

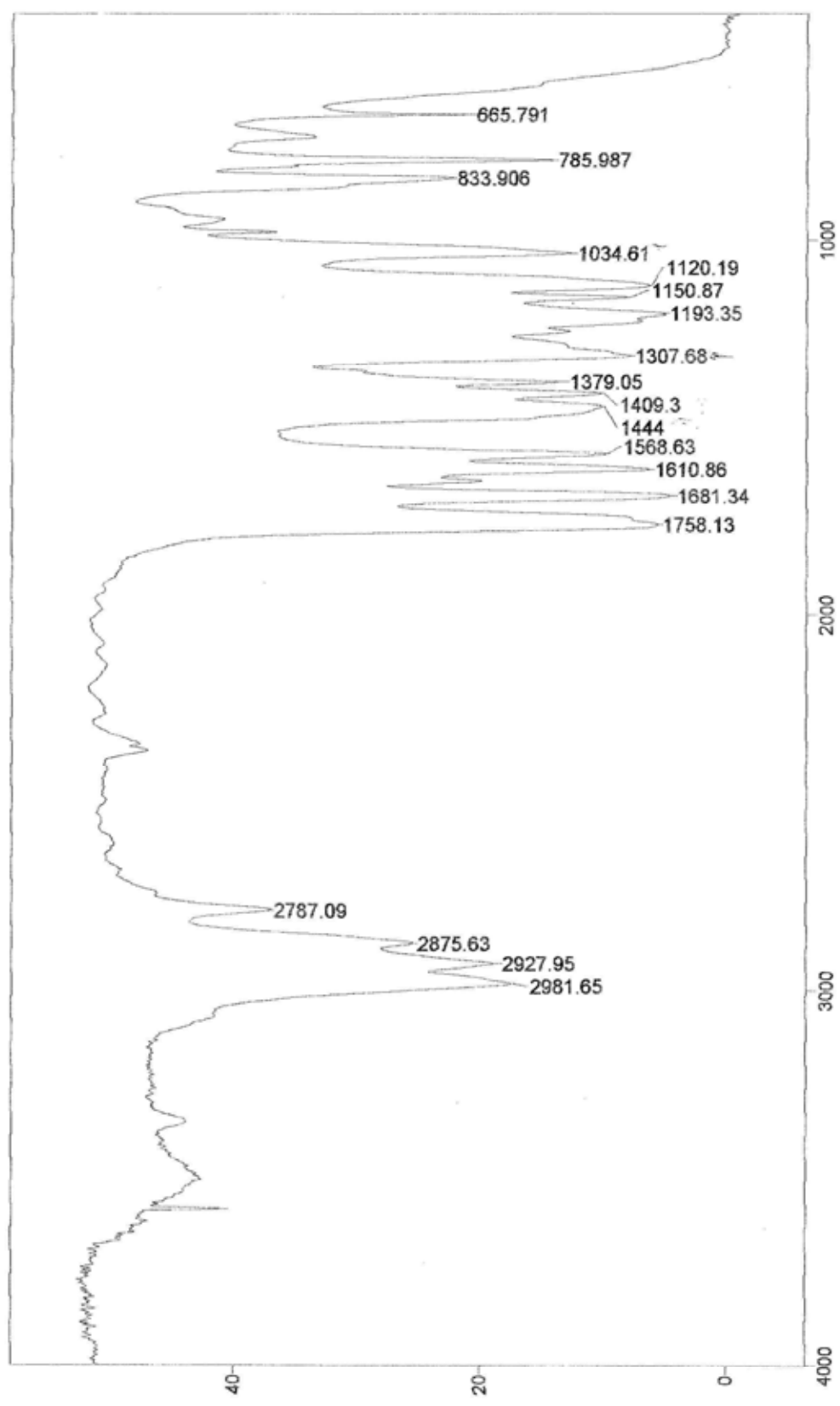
Sample Description: Filme



Scans = 10

Res = 4 cm-1 21 scans/min

Apod = Cosine



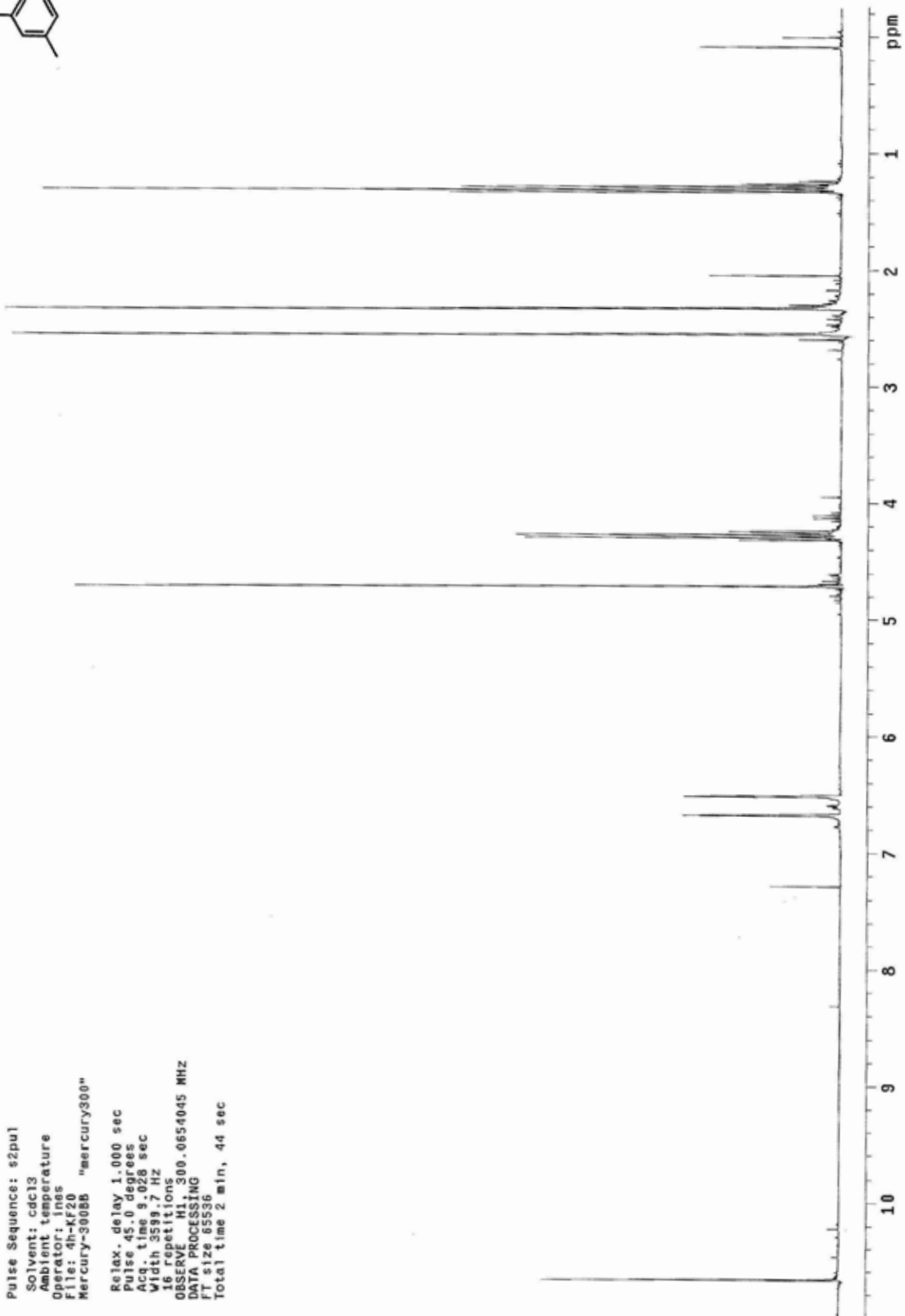
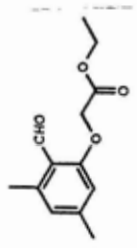
Transmittance / Wavenumber (cm-1)

4h-KF20
Karine

Automation directory:

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: cdcl3
Ambient temperature
Operator: line5
File: 4h-KF20
Mercury-300BB "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 9.028 sec
Width 3599.7 Hz
16 repetitions
OBSERVE HI, 300.0654045 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 2 min, 44 sec

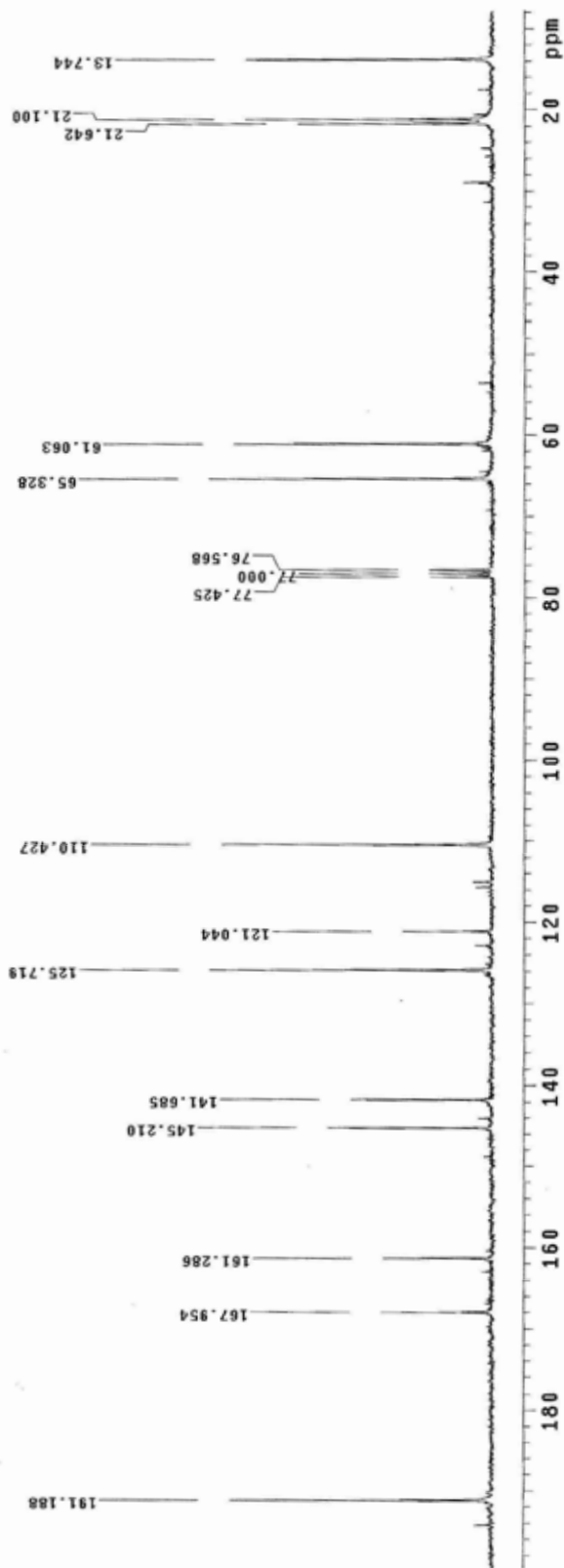
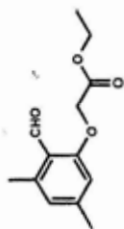


37cKF12
Karim

Automation directory:

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: cdcl3
Ambient temperature
Operator: ines
File: 37c-kf12
Mercury-300BB "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.784 sec
Width 18115.9 Hz
112 repetitions
OBSERVE C13, 75.4515279 MHz
DECUPLE H1, 300.0688697 MHz
Low power 10 dB atten.
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 3.0 Hz
FT size 65536
Total time 26 min, 15 sec

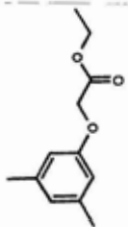


File # 4 : AMOS3

Mode = 2 (Mid-IR)

05/05/08 11:30

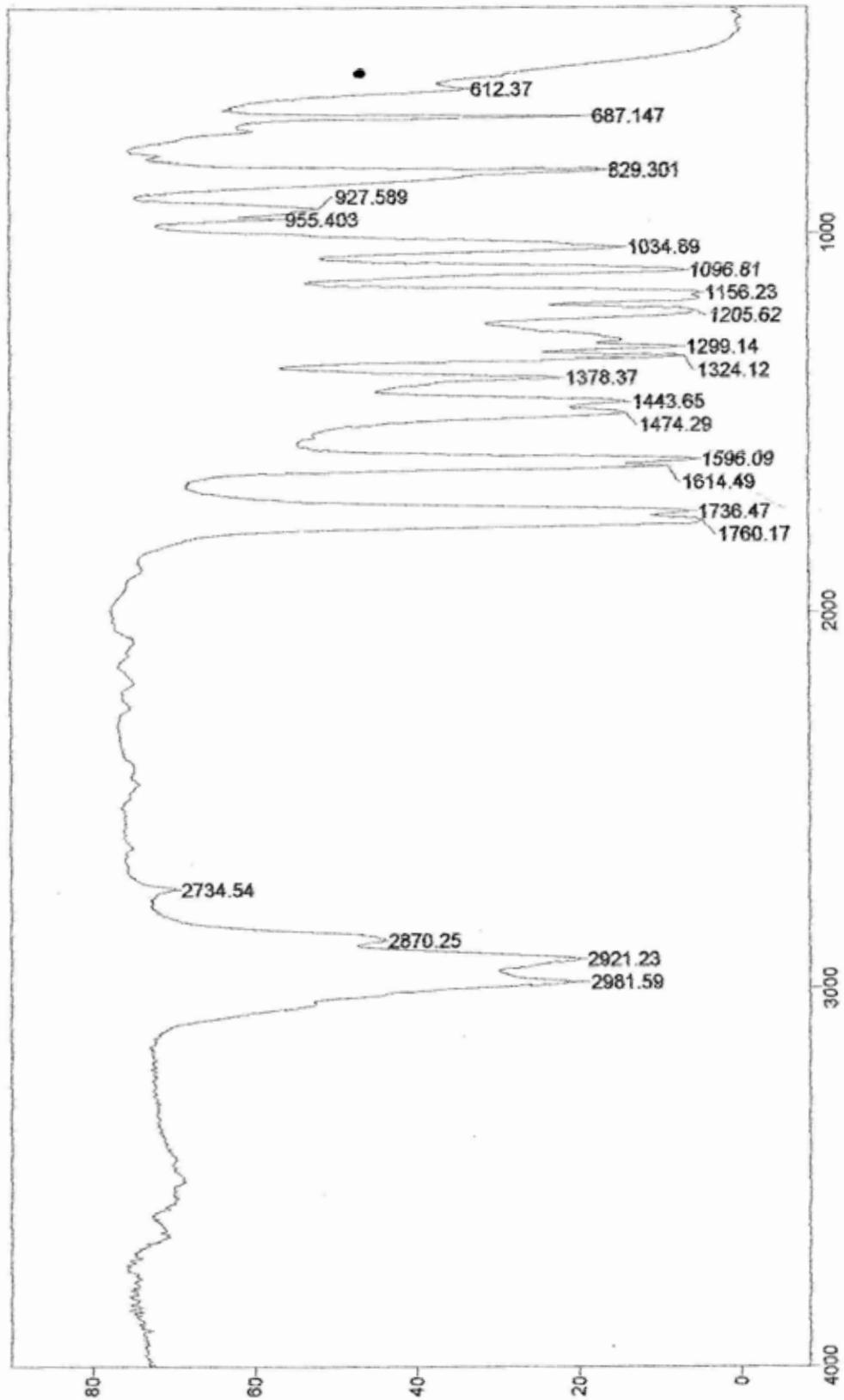
Sample Description: Filme



Scans = 10

Res = 4 cm⁻¹ 21 scans/min

Apod = Cosine

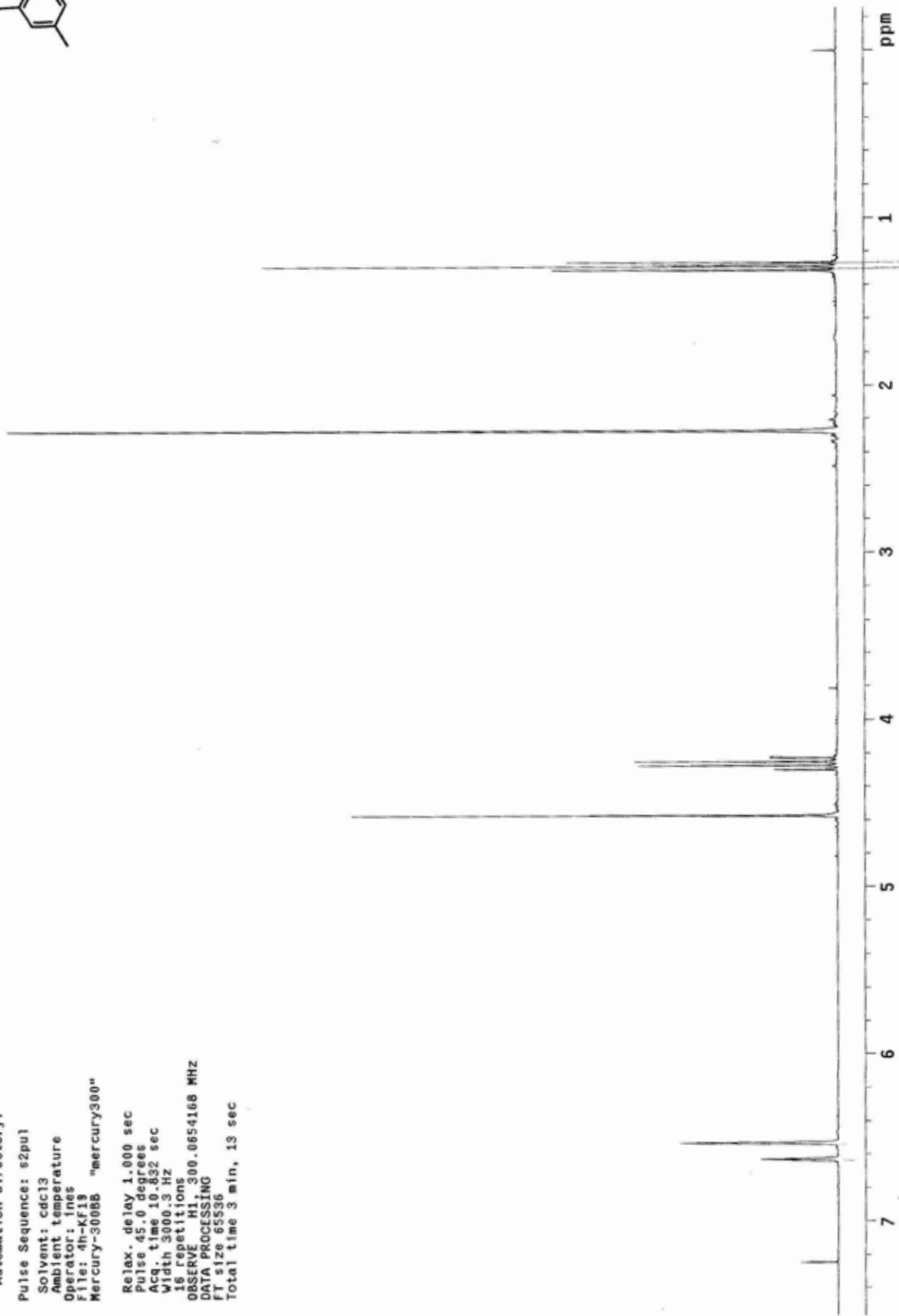
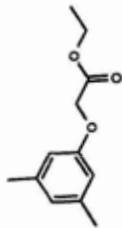
Transmittance / Wavenumber (cm⁻¹)

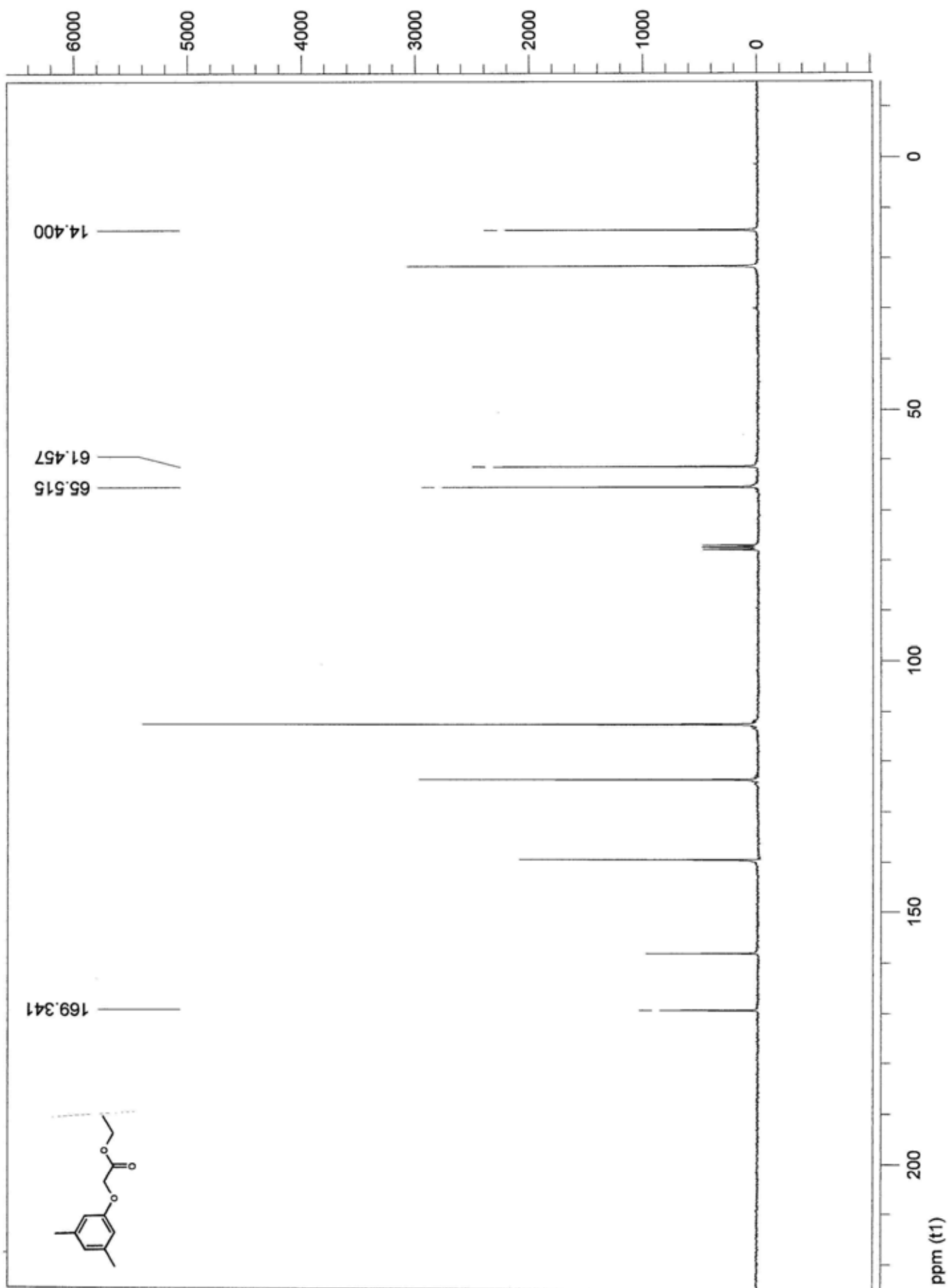
4h-Kf19
Karine

Automation directory:

Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: cdcl3
Ambient temperature
Operator: ines
File: 4h-Kf19
Mercury-30088 "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 10.832 sec
Width 3000.3 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1 300.0654168 MHZ
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 3 min, 13 sec





File # 5 : KFA3

Mode = 2 (Mid-IR)

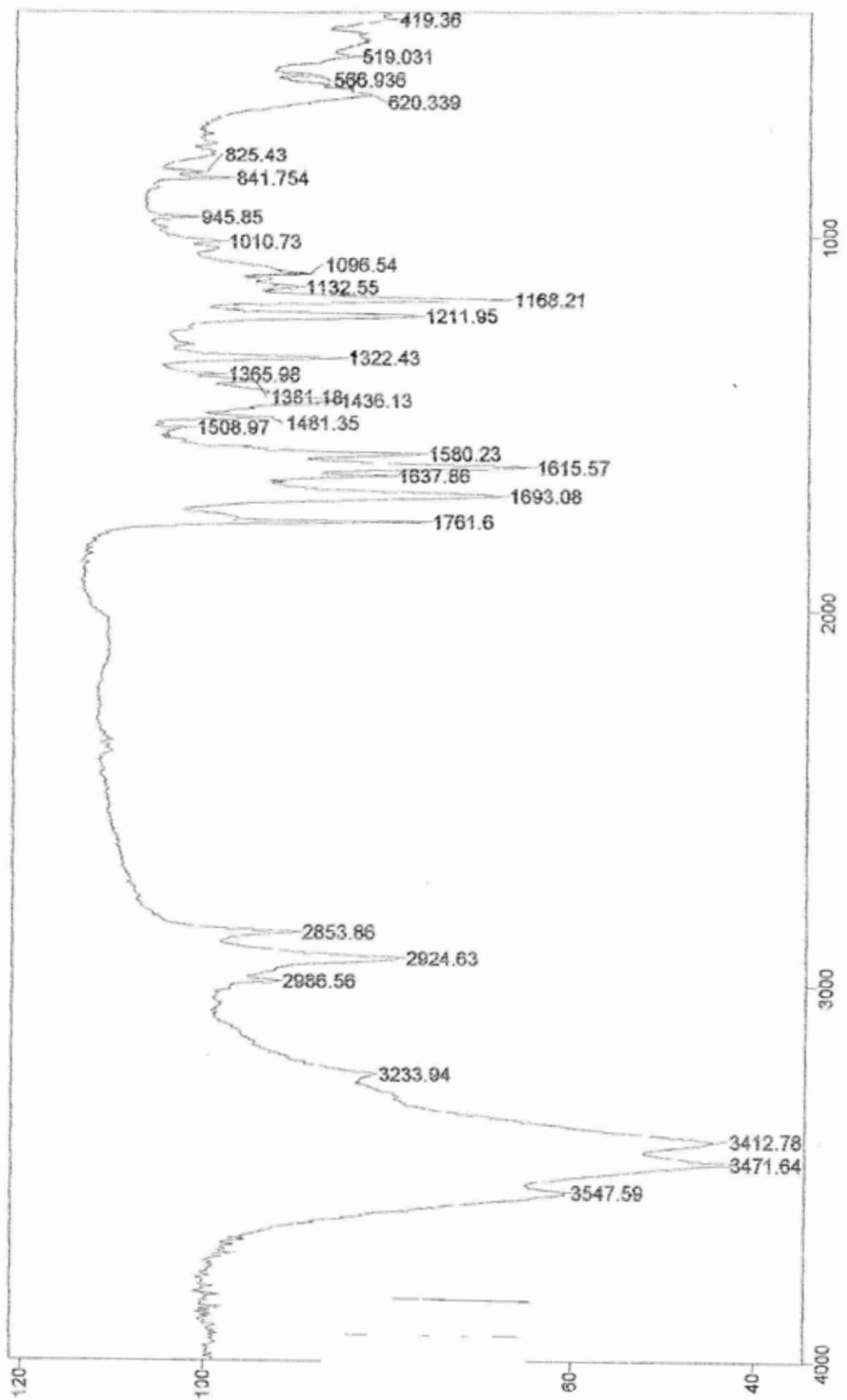
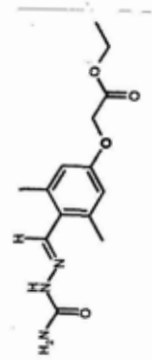
11/06/08 10:26

Sample Description: KBr

Scans = 10

Res = 4 cm-1 21 scans/min

Apod = Cosine



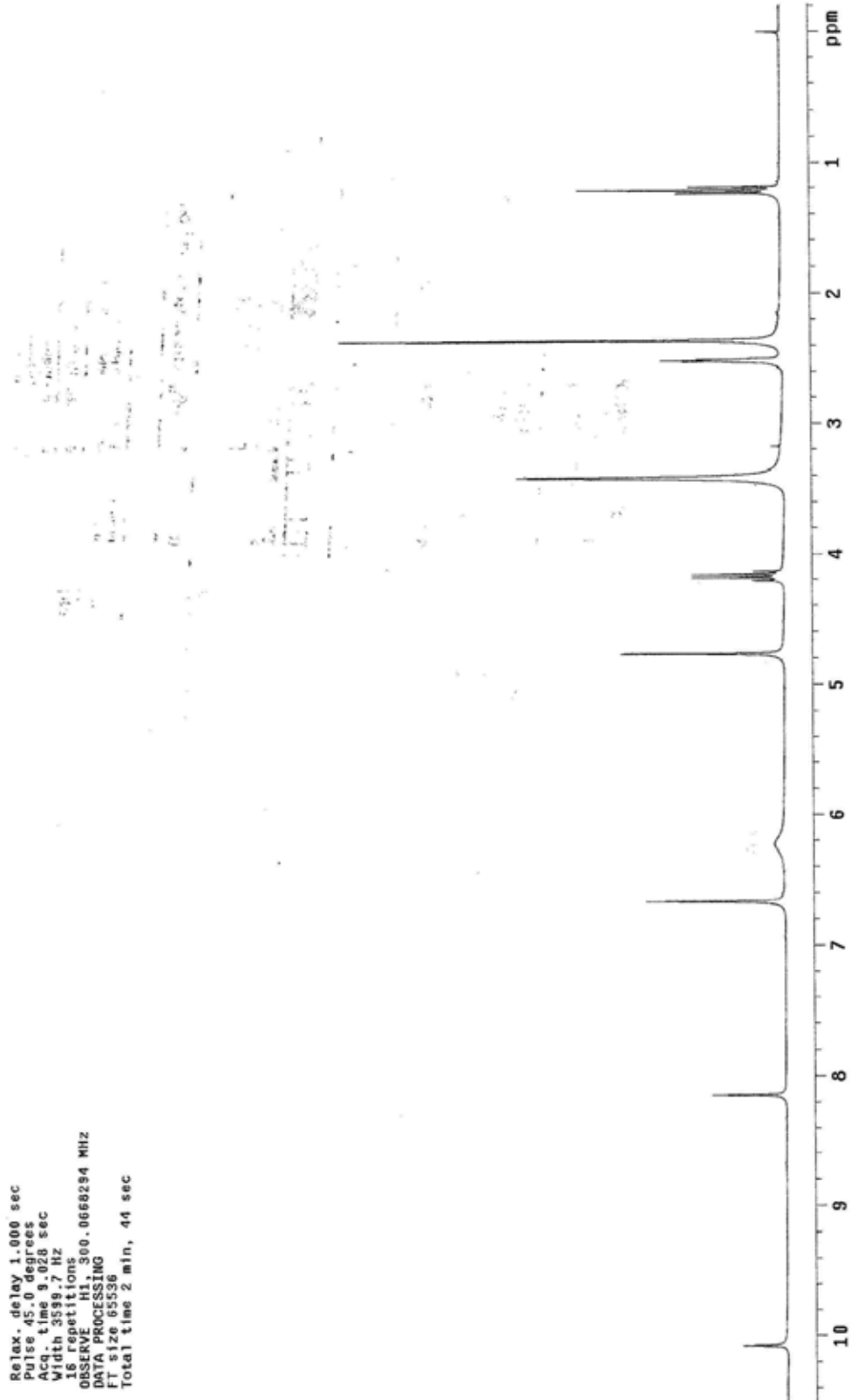
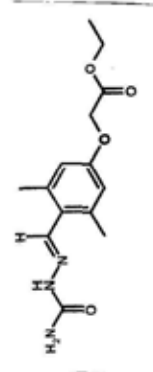
Transmittance / Wavenumber (cm-1)

2008-20h-KF31
Karline

Automation directory:

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: dms0
Ambient temperature
Operator: Ines
File: 2008-20h-KF31
Mercury-300BB "mercury300"

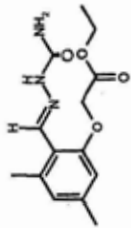
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 9.028 sec
Width 3599.7 Hz
16 repetitions
OBSERVE F1, 300.0668294 MHz
DATA PROCESSING
F1 size 65536
Total time 2 min, 44 sec



File # 5 : KFA4

Mode = 2 (Mid-IR)

11/06/08 10:31

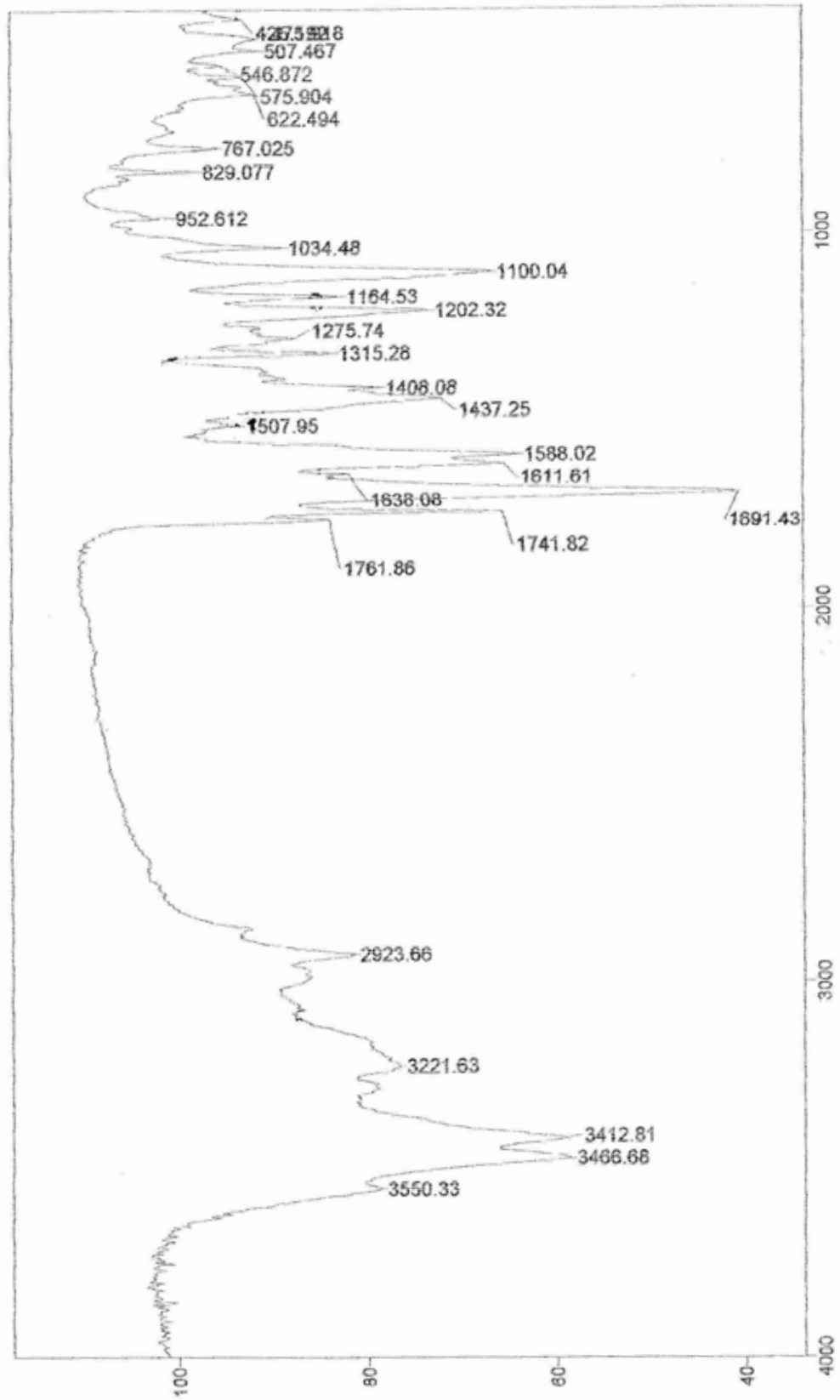


Sample Description: KBr

Scans = 10

Res = 4 cm-1 21 scans/min

Apod = Cosine



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

2008-22h-KF32
Karine

Automation directory:

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: cdcl3
Ambient temperature
Operator: ines
Mercury-30088 "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 9.028 sec
Width 3599.7 Hz
32 repetitions
OBSERVE HI, 300.0654103 MHZ
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 5 min, 29 sec

