



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE

MATHEUS TAVARES DA SILVA

Ação do agonista parcial do PPAR γ , GQ-16, na viabilidade de macrófagos em cultura

BRASÍLIA, 2016

MATHEUS TAVARES DA SILVA

Ação do agonista parcial do PPAR γ , GQ-16, na viabilidade de macrófagos em cultura

Trabalho de Conclusão de Curso
Apresentado à Universidade de Brasília
Faculdade de Ceilândia como requisito
parcial para a obtenção de título de Bacharel
em Farmácia.

Orientadora: Professor (a) Dr^a. Carine Royer

BRASÍLIA 2016

MATHEUS TAVARES DA SILVA

Ação do agonista parcial do PPAR γ , GQ-16, na viabilidade de macrófagos em cultura

BANCA EXAMINADORA

ORIENTADORA: Dr^a Carine Royer

(UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - FACULDADE DE CEILÂNDIA)

CONVIDADO: Dr^a Tatiana Ramos Lavich

(UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - FACULDADE DE CEILÂNDIA)

CONVIDADO: Dr. Eduardo Antonio Ferreira

(UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - FACULDADE DE CEILÂNDIA)

BRASÍLIA, 2016

“Um passo à frente e você não está mais no mesmo lugar”.

Chico Science

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe Francisca, que nunca deixou faltar nada, mesmo nos tempos mais difíceis, me incentivando aos estudos desde muito novo e que esse é o melhor caminho para uma boa educação e um futuro. Meu padrasto Eurico sinônimo de garra e perseverança.

Minhas irmãs Raiane e Juliana que me ajudam sempre nas horas difíceis.

Meus cunhados Andre e Diego.

À minha esposa Kenia Flor que me trouxe paz e companheirismo, me dividindo com a faculdade por todos estes anos, em favor da ciência e um futuro melhor.

Meu sogro e sogra, que são exemplo de humildade.

À minha orientadora Dr^a Prof^a Carine Royer, que iluminou meus passos nas minhas atividades acadêmicas desde os primeiros semestres com paciência e dedicação, me mostrando que devemos sempre fazer o melhor.

Aos professores da banca Eduardo Ferreira e Tatiana Lavich que foram fontes de inspiração para a fisiologia e bioquímica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Interação tecido adiposo e sistema imune.	16
Figura 2. Terapia medicamentosa de acordo com a progressão da doença..	19
Figura 3. Representação do receptor ativado por proliferador peroxissomal PPAR γ	22
Figura 4. Representação da regulação da transcrição pelo PPAR γ	23
Figura 5. Estrutura molecular do GQ-16.....	28
Figura 6. Efeito da rosiglitazona sobre a viabilidade de macrófagos RAW 264.7	35
Figura 7. Efeito do LPS na resposta da rosiglitazona sobre a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 em cultura	36
Figura 8. Efeito do GQ-16 sobre a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 em cultura.....	36
Figura 9. Efeito do LPS na resposta do GQ-16 sobre a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 em cultura.....	38
Figura 10. Comparação dos efeitos dos agonistas de PPAR γ sobre a viabilidade de macrófagos em cultura com e sem LPS.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Meta do controle glicêmico recomendado pela SBD.	18
Tabela 2: Reação geral das TZD's no organismo.....	24

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Representação esquemática do tratamento das células RAW 264.7 com os agonistas de PPAR γ	33
--	----

LISTA DE ABREVIACÕES

ADO's	Antidiabéticos orais
AG	Ácido Graxo
AP-1	Proteína ativadora 1
DDP-4	Dipeptidyl peptidase 4
DM1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GIP	Polipeptídeo inibitório gástrico
GLP-1	Peptídio 1 semelhante ao glucagon
GQ-16 2,4-dione	(5-(5-bromo-2-methoxy-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-
HbA1c	Hemoglobina glicada
IFN-γ	Interferona gama
IKKβ	Inibidor do fator nuclear kappa B cinase subunidade beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-19	Interleucina 19
IMC	Índice Médio Corpóreo
IRS-1	Substrato 1 do receptor de insulina

IRS-2	Substrato 2 do receptor de insulina
JNK	Cinase c-Jun N-terminal
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Macrófago do tipo 1
M2	Macrófago do tipo 2
MODY	Maturity-Onset Diabetes of the Young
NFKβ	Fator nuclear kappa subunidade beta
OMS	Organização Mundial de Saúde
PPAR	Receptor ativado por proliferadores peroxissomais
PPRE	Elemento responsivo ao PPAR
PPARα	Receptor alfa ativado por proliferadores peroxissomais
PPARβ	Receptor beta ativado por proliferadores peroxissomais
PPARγ	Receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais
RE	Receptor estrogênico
RI	Resistência à insulina
RN	Receptores nuclear
STAT-6	Transdutores de sinal e ativadores da transcrição 6
TNF-2	Fator de Necrose Tumoral 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TLR	Receptores semelhantes a <i>Toll</i>
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
TZDs	Tiazolidinedionas

RESUMO

A obesidade acarreta o aumento da incidência de comorbidades como o *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2). O tecido adiposo produz vários mediadores inflamatórios implicados na fisiopatologia da obesidade. A inflamação associada à obesidade é caracterizada pela produção anormal de mediadores inflamatórios, assim como pelo aumento de infiltração de macrófagos. Acredita-se que sua presença no tecido adiposo contribua para o surgimento e manutenção da resposta inflamatória associada à obesidade. As tiazolidinedionas (TZDs), utilizadas no tratamento do DM2, tem efeito anti-hiperglicemiante bem estabelecido na prática clínica. No entanto, sua utilização está associada a diversos efeitos adversos a exemplo do ganho de peso. Estudo anterior mostrou que o (5-(5-bromo-2-methoxy-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (GQ-16), agonista do Receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR γ), manteve os efeitos benéficos das TZDs, mas não induziu ganho de peso em animais. Portanto, é possível que os efeitos benéficos do GQ-16 possam ser ampliados na diminuição da viabilidade de macrófagos e assim contribuir para o efeito anti-inflamatório de agonistas de PPAR γ ? Para isso foi realizado o ensaio MTT (brometo de 3(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio) em linhagem de macrófagos RAW 264.7 com rosiglitazona e GQ-16, em diferentes concentrações (10^{-6} – 10^{-4} M) por 24 horas, com e sem o estímulo inflamatório (LPS). Foi observado que a rosiglitazona com e sem LPS, não alterou a viabilidade de macrófagos em cultura. O GQ-16, não afetou a viabilidade de macrófagos em nenhuma das concentrações estudadas, embora que com estímulo inflamatório LPS tenha diminuído a viabilidade celular em torno de 50%, na maior concentração. Nossos resultados indicam que o GQ-16 é um alvo promissor para o estudo da ação anti-inflamatória de agonistas de PPAR γ e são importantes para direcionar experimentos futuros sobre a resposta anti-inflamatória de agonistas de PPAR.

Palavras chave: receptores ativadores por proliferadores peroxissomais γ , GQ-16, macrófagos, inflamação.

ABSTRACT

Obesity leads to an increase in comorbidities such as diabetes mellitus (DM2). The adipose tissue produces a variety of inflammatory mediators related to the physiopathology of obesity. Obesity-related inflammation is characterized by abnormal production of inflammatory mediators and by the macrophages infiltration in the tissue. It is believed that the presence of these compounds in the adipose tissue contributes to the appearance and maintenance of the inflammatory process related to obesity. Thiazolidinediones (TZDs), used in the treatment of DM2, has an antihyperglycaemic effect well established in the clinical practice. However, its use is related to a variety of adverse effects. Previous studies showed that the use of GQ-16, a PPAR γ agonist, results in the same effects of TZDs but without inducing a weight gain in animals. Would it be possible that the effects of GQ-16 may be amplified by the decrease of macrophage variability and so contribute to the inflammatory effect of PPAR γ agonists? A MTT (brometo de 3(4,5dimetiltiazol-2il)- 2,5-difenil- tetrazólio) study was conducted in a RAW 264.7 macrophage line with rosiglitazone and GQ-16, in three different concentrations (10^{-6} – 10^{-4} M), and for 24 hours, with and without an inflammatory stimulus (LPS). Rosiglitazone, with and without LPS, did not affect the viability of macrophages and the GQ-16 did not affect the viability of macrophages in any of the concentrations tested. However, under inflammatory stimulus LPS, GQ-16 in the highest concentration has decreased cellular viability by 50%. Our results indicate that GQ-16 is a promissory target for the research of anti-inflammatory effect of PPAR γ agonists, and they may be important to future experiments in this area.

Key words: peroxisome proliferator activated receptors γ , GQ-16, macrophages, inflammation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Obesidade	13
1.1.1 Obesidade e inflamação.....	14
1.1.2 Mudança do fenótipo de macrófagos no tecido adiposo	15
1.2 DIABETES	16
1.2.1 Tratamento	18
1.3 Receptor ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR).....	21
1.3.1 PPAR γ e a inflamação.....	24
1.3.2 Agonistas totais do PPAR γ	25
1.3.3 Agonistas parciais do PPAR γ	26
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Células	31
4.2 Cultivo Celular	31
4.3 Tratamentos	31
4.4. Ensaio de citotoxicidade.....	32
4.5 . Análise estatística	34
5. RESULTADOS	35
6. DISCUSSÃO	40
7.CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

A Organização Mundial de Saúde (OMS) aponta a obesidade entre os maiores problemas de saúde pública. Estima-se que em 2025, 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso e outros 700 milhões obesos. De acordo com a pesquisa de orçamentos familiares realizada pelo IBGE em 2013, cerca de 82 milhões de pessoas apresentaram o IMC igual ou maior de 25, com a prevalência de excesso de peso maior no sexo feminino (58,2 %) que no sexo masculino (55,6%) (ABESO, 2008-2009)

O sobrepeso e a obesidade estão associados a maior frequência de desenvolvimento de comorbidades (GUH et al., 2009). Entre as doenças associadas ao sobrepeso e à obesidade, estão *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), hipertensão arterial, dislipidemia, doença coronariana, acidente vascular cerebral isquêmico e vários tipos de câncer (TATEYA et al., 2013). As estratégias de tratamento da obesidade são ainda limitadas e tem havido um grande esforço, nas últimas décadas, no sentido de se compreender melhor os mecanismos envolvidos na associação entre o excesso de peso e estas condições, como forma de identificar potenciais alvos terapêuticos mais específicos e efetivos para a doença.

A medida da circunferência abdominal, feita no ponto médio entre o rebordo costal inferior e a crista íliaca, é um dos parâmetros que reflete de forma indireta o conteúdo de gordura visceral, ajudando no diagnóstico da obesidade. O valor da cintura abdominal pode estar relacionado ao risco cardiometabólico, com valor acima de 102 cm para homens e 88 cm para as mulheres (PISCHON et al., 2008).

A OMS classifica a obesidade de acordo com o índice de massa corporal (IMC) sendo o cálculo do peso corporal, em quilogramas, dividido pelo quadrado da altura, em metros quadrados ($IMC = kg/h^2(m)$), e também relacionando o risco de mortalidade com a patologia. A obesidade é caracterizada quando o IMC está acima de 30 kg/m². A gravidade da obesidade é definida em (WHO; ARONOFF et al., 2000; LEBOVITZ et al., 2001):

- Obesidade de grau I, moderado excesso de peso, quando o IMC é situado em 30 e 34,9 kg/m²;
- Obesidade de grau II, obesidade leve ou moderada, com o IMC em 35 e 39,9 kg/m²;
- Obesidade de grau III, considerado obesidade mórbida, quando o IMC ultrapassa 40 kg/m² (ABESO, 2009/2010).

Tratando-se de uma doença multifatorial, existem causas que provocam o surgimento desse quadro, como a susceptibilidade genética à obesidade que é somado aos fatores ambientais onde o indivíduo convive. A relação entre o aumento da obesidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento no que se refere à redução de atividades físicas, e resultando em um número maior de sedentários e também a obesidade resultante de uma desnutrição-energética-proteica, devido ao aumento do consumo de alimentos calóricos e pouca ingestão proteica (BRAGA et al., 2010; CORTEZ, 1997).

1.1.1 Obesidade e inflamação

Estudos em animais têm demonstrado que o tecido adiposo de obesos adultos tem como característica a hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, que excedem seu limite de difusão do oxigênio resultando na morte celular. Isso contribui para redução da eficiência do tecido adiposo como sítio para armazenamento de lipídeos. Com isso, aumentam os ácidos graxos livres circulantes, que passam a depositar-se, na forma de triglicerídeos, em sítios ectópicos. A combinação de hipóxia e sobrecarga lipídica nos adipócitos hiperplásicos e hipertróficos desencadeia recrutamento de células imunes, tais como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, linfócitos T, linfócitos B (TATEYA et al., 2013). Estes adipócitos infiltrados por células imunológicas, secretam grande quantidade de mediadores inflamatórios promovendo um estado pró-inflamatório por ativação de inibidor do fator nuclear kappa B cinase subunidade beta – fator nuclear kappa subunidade beta (IKK β -NFK β) e das vias de sinalização cinase c-Jun N-terminal – proteína ativadora 1 (JNK-AP-1). A ativação da JNK leva à fosforilação de resíduos de serina no substrato 1 e 2 do receptor de insulina (IRS-1 e 2), moléculas cruciais na sinalização da insulina e, conseqüentemente, inibe a ação da insulina. Estes eventos

exacerbam o estado inflamatório e a resistência sistêmica à insulina (SERRA. et al., 2013).

1.1.2 Mudança do fenótipo de macrófagos no tecido adiposo

Estudos recentes vêm mostrando a heterogeneidade de macrófagos recrutados para o tecido adiposo, isto é, estas células seguem no mínimo dois estados de polarização diferentes: M1, macrófagos ativados classicamente (pró-inflamatórios) induzidos por mediadores pró-inflamatórios, e M2 macrófagos ativados alternativamente (anti-inflamatórios) (LUMENG et al., 2007B; 2008). Macrófagos são células plásticas uma vez que podem mudar de M1 para M2 e vice-versa, através de sinais específicos (PORCHERAY et al., 2005).

Vários trabalhos demonstram que ocorre mudança fenotípica da polarização de M2 para M1 no tecido adiposo de obesos, acelerando deste modo a inflamação do tecido adiposo (LUMENG et al., 2007A; 2008; KANG et al., 2008). Entre os fatores envolvidos nesta mudança fenotípica estão envolvidos o LPS, ácidos graxos saturados e ligante endógeno para o complexo *toll-like receptor 4* (TLR4) (SUGANAMI; OGAWA, 2010). No contexto da ação da insulina, macrófagos M2 sustentem a sensibilidade à insulina por secretar interleucina 10 (IL-10) anti-inflamatória (CINTRA et al., 2008), enquanto que macrófagos M1 induzem resistência à insulina através da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina 6 (IL-6), proteína quimiotática para monócitos-1 (MCP-1). O TNF α , produzido principalmente pelos macrófagos recrutados para o tecido adiposo, inibe a sinalização do receptor de insulina tornado-se um dos principais elos entre vias inflamatórias e resistência insulínica, que levam ao desenvolvimento de DM2 (figura 1) (WEISBERG et al., 2003; XU et al., 2003; TATEYA et al. 2013).

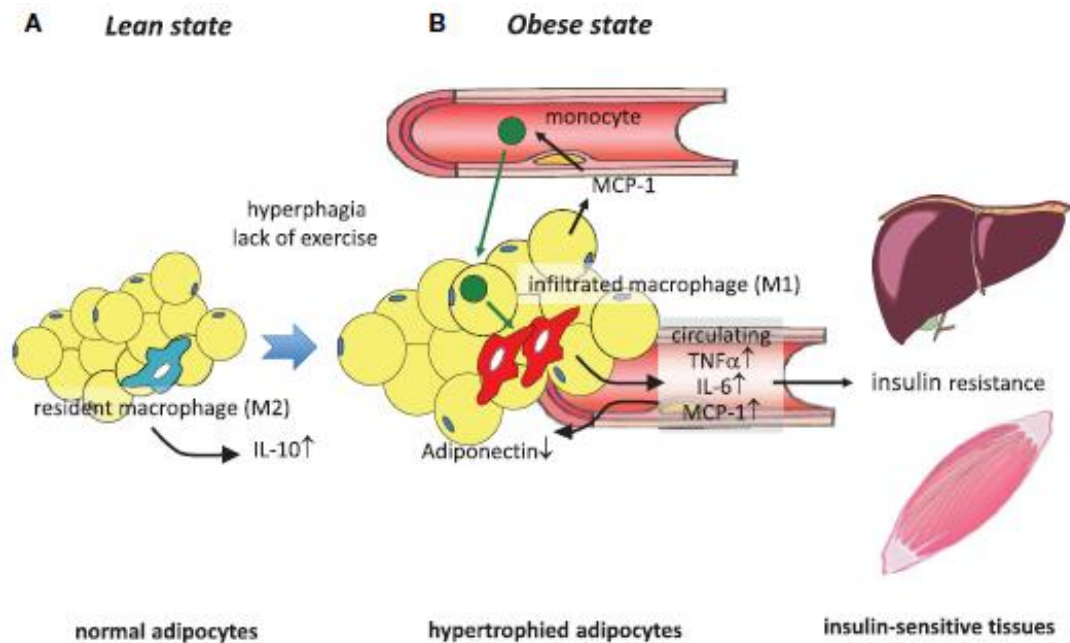


Figura 1: Interação tecido adiposo e sistema imune. No tecido adiposo de indivíduos magros, a maioria dos macrófagos é do fenótipo M2, que contribuem para a sensibilidade à insulina devido ao aumento de IL-10 (A). Nos indivíduos obesos, a falta de exercícios e o consumo excessivo de alimentos provoca a hipertrofia dos adipócitos, que induzem o aumento de MCP-1 no sangue, levando ao recrutamento de monócitos para este tecido. Essa infiltração provoca a polarização de macrófagos para o fenótipo M1, com liberação de TNF α , IL-6 e MCP-1, levando à resistência à insulina (B) (Extraído de: TATEYA et al., 2013).

1.2 DIABETES

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a prevalência de diabetes entre adultos com 18 anos ou mais foi de 9%. Em 2012, o diabetes foi a causa direta de 1,5 milhão de mortes. Mais de 80% das mortes por diabetes ocorrem em países de baixa e média renda. Para as pessoas que vivem com diabetes, o acesso ao tratamento a custos acessíveis, é fundamental para sua sobrevivência (WHO, 2015)

O *diabetes mellitus* está inserido em um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por um quadro de hiperglicemia, resultante de defeito na secreção de insulina e/ou sua ação. Sua manifestação relaciona-se com sintomas de poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia, visão turva e outras complicações que colocam a

vida em risco (UKPDS, 1998; THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS 1997).

Com o aumento da pesquisa científica sobre os mecanismos fisiopatológicos do diabetes, aumentam-se os critérios de distinção dos diferentes tipos de diabetes (GROSS et al., 2001).

No *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) o sistema imunológico produz anticorpos de forma equivocada para as células β pancreáticas. Logo, a liberação de insulina não será secretada ou pouco secretada para a corrente sanguínea. Como consequência, a glicose sanguínea se mantém em altos níveis ao invés de ser utilizada. Essa patologia acomete cerca de 5% à 10% do total de pessoas com a doença, surgindo geralmente na infância e na adolescência, mas podendo ser diagnosticada em adultos também (SBD, 2015).

O DM2 é a forma mais comum que afeta cerca de 90% a 95% dos casos diagnosticados. É caracterizada pela redução da secreção da insulina e resistência à ação da insulina. Em um contexto geral, a maioria dos pacientes com esse tipo de DM apresenta sobrepeso ou obesidade. O DM2 surge em qualquer idade, mas o diagnóstico mais comum é a partir dos 40 anos. Os pacientes não dependem de insulina exógena, no entanto, podem necessitar de tratamento com insulina para evitar descontrole metabólico (SBD, 2015).

Existem outros tipos de diabetes como, por exemplo, a diabetes gestacional que é caracterizada pelo aumento expressivo de glicose sanguínea em jejum a partir da 24ª semana de gestação, podendo ser diagnosticada pelo teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Esse quadro pode trazer sérios riscos ao bebê, provocando hipoglicemia neonatal, macrosomia fetal e dificuldades no parto (SBD, 2015).

O tipo *Maturity-Onset Diabetes of the Young* (MODY) é um subtipo da diabetes que tem como característica uma manifestação precoce atingindo de 1 – 5% dos diabéticos. Possui uma transmissão autossômica dominante, que corresponde a um defeito na secreção de insulina ligada à uma diminuição na atividade das células β -pancreáticas (SPD, 2015).

1.2.1 Tratamento

Quando o paciente recebe o diagnóstico de DM2 junto com as condições de orientação e mudança de estilo de vida como educação em saúde, alimentação e atividades físicas, o médico em geral prescreve um agente antidiabético oral. Para o uso de medicamentos orais, os mecanismos de resistência à insulina (RI), falência de células beta, transtornos metabólicos e as alterações vasculares que acometidas pela DM2 são levados em consideração (LERARIO et. al., 2010). Desse modo, o tratamento tem como desafio manter os níveis glicêmicos próximo da normalidade, devendo dispor de estratégias de manutenção ao decorrer dos anos (tabela1) (GAEDE et al., 2008).

	Glicemia em jejum	Glicemia pré-prandial	Glicemia pós prandial
*ADA/EASD	< 100 mg	< 130 mg	<180 mg
SBD <100 mg	< 100 mg	<130 mg	Limite de 160 mg

Tabela 1: Meta do controle glicêmico recomendado pela SBD. *ADA = American Diabetes Association. *EASD = European Association for the Study of Diabetes. SBD: Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes SBD 2011.4 ADA/EASD. Extraído de: SBD, 2014-2015(com adaptações).

O tratamento com medicamentos para DM2 deve ser iniciado quando outras medidas não forem eficazes em manter os níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) inferiores a 7,0 mesmo em pacientes sem queixas e com boa qualidade de vida (SBEM, 2004). No entanto, para manter os níveis glicêmicos estáveis, em alguns casos, não se utiliza um único agente terapêutico, sendo indicada a combinação de duas ou mais drogas antidiabéticas ou a introdução da insulino terapia para que se alcance melhor adequação no controle glicêmico (figura 2) (UKPDS, 1998).

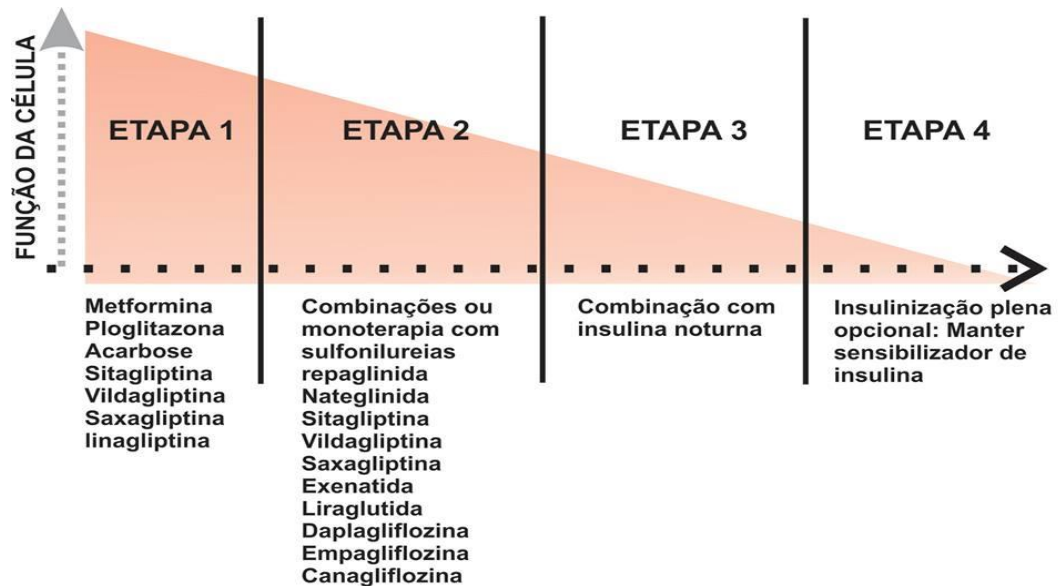


Figura 2: Terapia medicamentosa de acordo com a progressão da doença. Exemplo de escolha da terapia medicamentosa de acordo com a progressão da diabetes. Extraído de: SBD, 2014- 2015 (com adaptações).

A escolha da terapia medicamentosa deve levar em consideração alguns elementos que ajudam na escolha do medicamento como (SBD, 2015):

- O estado geral do paciente e as comorbidades presentes (complicações provocadas pela diabetes);
- Valor da glicemia em jejum, pós-prandial e HbA1c;
- Peso e idade do paciente;
- Interação medicamentosa com outros medicamentos e suas reações adversas;
- Progresso da doença.

Os medicamentos antidiabéticos orais (ADO's) são classificados de acordo com o mecanismo de ação (SBD, 2015):

- Os que aumentam a secreção pancreática de insulina. (sulfonilureias e glinidas);

- Os que retardam a absorção de glicídios no intestino (inibidores das alfa-glicosidades);
- Os que reduzem a produção hepática de glicose e aumentam a sensibilidade insulínica (biguanidas);
- Os que aumentam a absorção periférica de glicose (glitazonas ou TZDs).

Outros hipoglicemiantes orais foram acrescentados no combate a diabetes, como os que atuam no sistema incretínico, e os que atuam na inibição da reabsorção de glicose renal. Duas estratégias de tratamento utilizadas para melhorar o efeito incretínico de pacientes com DM2, incluem a ativação do receptor de peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1) por análogos do GLP-1 e o aumento da meia-vida do GLP-1 endógeno por inibidores da dipeptidil peptidase 4 (DPP-4) (TASYUREK et al., 2014). Entre agonistas do GLP-1R estão a exenatida, liraglutida, albiglutida e lixisenatida. A exenatida compartilha 53% de homologia com o GLP-1 nativo e é resistente à degradação pela DPP-4. Este último aspecto, em conjunto com sua menor excreção renal, estende sua meia-vida circulante. A liraglutida é um análogo do GLP-1 humano com 97% de homologia com o GLP-1 nativo e sua meia-vida no plasma é de 13 horas, devido à ligação com a albumina (MADSBAD et al., 2011). A lixisenatida é um análogo sintético da exendina-4 (peptídeo encontrado na saliva do monstro Gila e com propriedades biológicas semelhantes à do GLP-1 e com ação prolongada. A albiglutida corresponde a uma proteína de fusão do GLP-1 e a albumina humana e, assim, meia-vida longa (IEPSEN et al., 2014).

Os inibidores da DPP-4, designados também de "gliptinas", têm como primeiro representante a sitagliptina, disponível para o tratamento do DM a partir de 2006. Ela eleva em duas a três vezes as concentrações plasmáticas de GLP-1 e Polipeptídeo inibitório gástrico (GIP) (DEACON, 2007). Inibidores de DPP-4 que se tornaram disponíveis subsequentemente incluem a saxagliptina, vildagliptina, alogliptina, e linagliptina, que têm pouco ou nenhum efeito sobre o peso corporal (DEACON et al., 2012).

A segunda classe compreende os inibidores do contratransporte sódio glicose 2 nos túbulos proximais dos rins, conhecida como inibidor SGLT2. Essa classe reduz a

receptação de glicose nos rins, aumentando a glicosúria. Portanto, pode controlar a glicemia independente da liberação de insulina e com menor risco de hipoglicemia e promovendo a perda de peso (RAHMOUNE et al., 2008; ABDUL-GHANI, DE FRONZO, 2008).

Entre os diversos conhecimentos originados do estudo da relação entre tecido adiposo, metabolismo energético e inflamação está a identificação dos PPARs como determinantes críticos de integração metabólica dos diversos tecidos (EVANS et al., 2004).

1.3 Receptor ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR)

Os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPAR) são fatores de transcrição que pertencem a uma superfamília de receptores nucleares (RNs), dentre os membros desta família estão os receptores do ácido retinóico (RXRs), do estrogênio, da tireoide, da vitamina D e dos glicocorticoides.

A família PPAR é representada pelas isoformas PPAR α , PPAR- β/γ e PPAR γ , onde cada um desempenha um papel diferente no metabolismo energético. O PPAR γ regula o armazenamento de energia, sendo expresso majoritariamente no fígado, no músculo, coração e ossos, o PPAR β/γ é expresso em todo o corpo regulando o gasto energético (EVANS et al., 2004).

A região amino-terminal do PPAR contém um domínio de ativação independente do ligante, denominado função de ativação 1 (AF-1). A região central, ou DBD, é a mais conservada e apresenta dois segmentos estruturais conhecidos como “dedos de zinco”. O DBD determina a ligação do RN a regiões específicas de DNA que contêm a sequência hexanucleotídica AGGTCA, denominadas elementos responsivos ao hormônio (HRE). O domínio D, entre o DBD e o LBD, é uma região menos conservada, que se comporta como uma dobradiça e confere flexibilidade estrutural ao receptor, o que permite que sua dimerização com outro RN e ligação ao DNA ocorram simultaneamente. A região carboxi-terminal ou domínio E contém o LBD, que reconhece ligantes hormonais e não hormonais específicos e determina, assim, a especificidade da resposta aos ligantes. Essa região é responsável por diversas

funções dos RN, a maioria delas induzida por ligantes, como a função de ativação 2 (AF-2), dimerização e interação com cofatores da transcrição (figura 3) (SONODA et al., 2008).

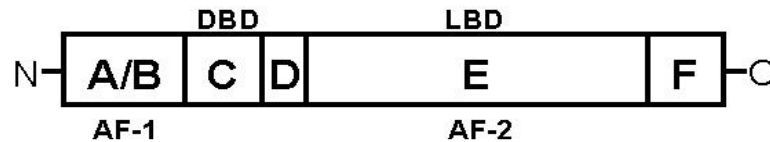


Figura 3. Representação do receptor ativado por proliferador peroxissomal PPAR γ (Extraído de: EHARA et al., 2004).

Os PPARs se ligam aos elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma (PPREs) localizados em pontos específicos da região promotora dos genes alvos. O receptor se liga no HRE como um heterodímero, junto com um fator proteico adicional, o receptor do ácido retinóico (RXR). Na atuação de agonistas, o PPAR sofre uma alteração na sua conformação estrutural formando um sítio de ligação, que em seguida recruta coativadores transcripcionais, e conseqüentemente aumentando o processo de transcrição gênica (figura 4) (BERGER, MOLLER, 2002).

PPAR γ tem como principal ligante endógeno a 15-deoxi- Δ^{12-14} -prostaglandina-J₂ (15d-PGJ₂) (FORMAN et al., 1995; ROSEN; SPIEGELMAN, 2001; SZÉLES et al., 2007; SZANTO; NAGY, 2008). Entre os ligantes sintéticos estão os sensibilizadores insulínicos tiazolidinedionas (TZDs) como a pioglitazona, rosiglitazona e troglitazona (LEHMANN et al., 1995; HEIKKINEN et al., 2007; SZÉLES et al., 2007).

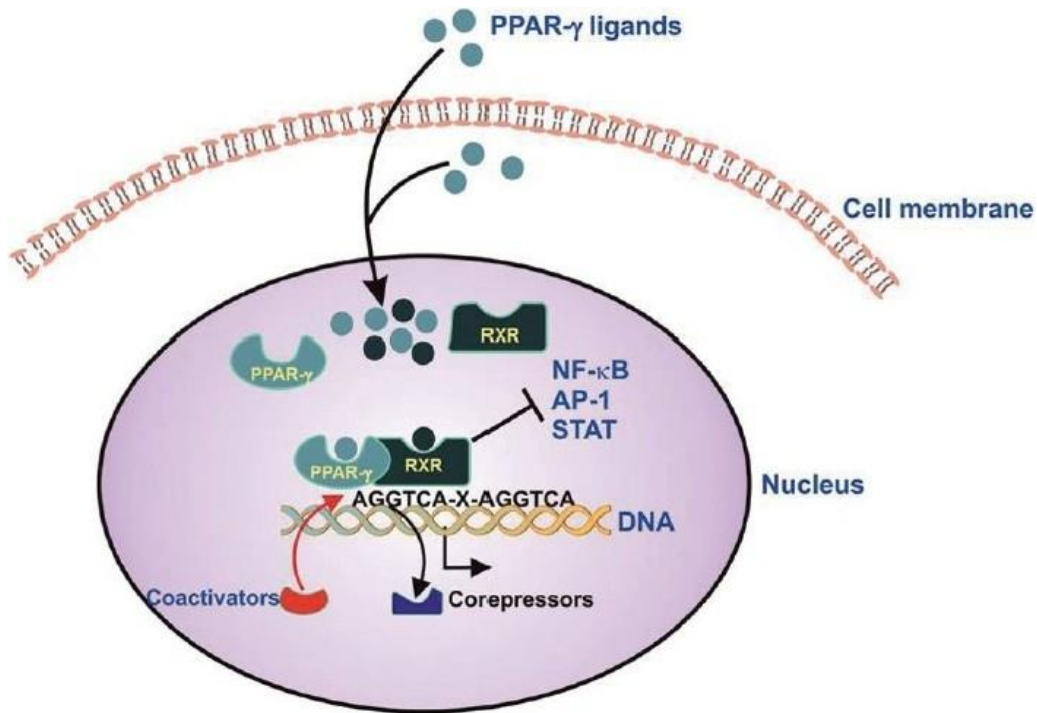


Figura 4: Representação da regulação da transcrição pelo PPAR γ . A regulação do PPAR γ mediada por ligantes de PPAR originários do exterior ou do interior da célula, formando um heterodímero com o receptor retinóide RXR. O Heterodímero RXR-PPAR γ liga-se a sequência específica de elementos responsivos (PPRE), que ativa o recrutamento de co-ativadores ou co-repressores. Podendo inibir a expressão de genes regulados por fatores de transição específicos pró-inflamatórios como o NF- κ B, AP-1 e STAT. Extraído de: GREEN, et al., 2011.

A ativação do PPAR γ pelas TZDs melhora a sensibilidade insulínica principalmente no tecido adiposo, e também no músculo esquelético e fígado (tabela 2). Esse efeito não é completamente compreendido, mas parece ser mediado: (i) pelo aumento da captação e armazenamento de ácidos graxos (AG) livres pelo tecido adiposo (OAKES et al., 2001); (ii) pela inibição da secreção de citocinas inflamatórias que induzem resistência insulínica no fígado e músculo esquelético (MILES et al., 1997); e (iii) pelo aumento da produção de adiponectina, um produto secretório do adipócito com atividade sensibilizadora de insulina (COMBS et al., 2002).

Tecido adiposo	Musculo esquelético	Fígado
↑ Captação de glicose	↑ Captação de glicose	↓ Gliconeogenese
↑ Captação de ácido graxo	↑ Glicolise	↓ Glicogenólise
↑ Lipogenese	↑ Oxidação da glicose	↑ Captação de glicose
↑ Oxidação da glicose	↑ Glicogenese	↑ Lipogenese

Tabela 2: Reação geral das TZDs no organismo – Extraído de: DIABETES METAB.RES.VER. 2002;18: S10-S15 (com adaptações).

1.3.1 PPAR γ e a inflamação

O PPAR γ está presente em macrófagos e sua expressão é induzida rapidamente após a diferenciação de monócitos em macrófagos (CHINETTI et al., 1998; VON KNETHEN et al., 2007). PPAR γ possui propriedades anti-inflamatórias por modular negativamente os fatores de transcrição NF κ B, transdutores de sinal e ativadores da transcrição (STAT) e AP-1 (CHINETTI et al., 2000). A transrepressão do PPAR γ ocorre pela sumoilação do receptor estimulado pelo agonista mantendo o complexo correpressor no elemento de resposta ao NF κ B de genes inflamatórios (PASCUAL et al., 2005). Além disso, o PPAR γ pode exercer atividade anti-inflamatória em macrófagos por aumentar macrófagos com fenótipo M2 (BOUHLEL et al., 2007). Consistente com esses efeitos, Hevener 2003 e colaboradores demonstraram que camundongos *knockout* para PPAR γ específico em macrófagos possuíam intolerância à glicose com resistência insulínica hepática e muscular em camundongos magros tratados com dieta normal.

A ativação da via inflamatória pode aumentar o nível de marcadores trombóticos que desempenham um papel fundamental para o início e a progressão de lesões ateroscleróticas (ROSENFELD, 2013), e também o aumento do nível de marcadores pró-inflamatórios que é uma das principais causas da lesão vascular na diabetes (VAN DEN OEVER et al. 2010). O alto nível de glicose sanguínea é capaz de elevar a

expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas em monócitos. Portanto, a inflamação pode ser considerada um objeto de pesquisa para o tratamento de pacientes com DM2.

Estudos em modelos de animais demonstram que as TZDs rosiglitazona e pioglitazona apresentam atividades anti-inflamatórias (HALVORSEN et al. 2010). Levando em conta os processos inflamatórios na patogênese da resistência à insulina e lesão vascular, estes estudos propõem que a terapia com TZD pode melhorar a RI e a lesão vascular pela supressão de citocinas plasmáticas. Porém, o efeito do tratamento com TZD sobre estas moléculas ainda permanece sob pesquisa.

1.3.2 Agonistas totais do PPAR γ

Agonistas totais do PPAR γ , rosiglitazona e pioglitazona, foram estudadas em modelos animais e em alguns humanos sugerindo sua atuação não só na regulação metabólica, mas também na limitação das respostas dos processos inflamatórios (IALENTI et al., 2005). Devido à alta expressão do PPAR γ no tecido adiposo, a atuação das TZD's mostra capacidade de reduzir marcadores inflamatórios no tecido adiposo visceral, esteatose hepática e na aterosclerose. Além disso, resultados de pesquisas *in vitro*, mostraram a capacidade dos agonistas totais do PPAR γ de, pelo menos em parte, ativar a translocação nuclear de glicocorticoides independente do PPAR γ (IALENTI et al., 2005).

Apesar dos efeitos positivos sobre o metabolismo, existe alguns estudos que abordam seus efeitos adversos. Efeitos de classe, comuns a todas as TZDs, incluem ganho ponderal por aumento da adiposidade, edema, hemodiluição e expansão do volume plasmático (SEMPLE et al., 2006; RUBENSTRUNK et al., 2007), com insuficiência cardíaca (IC) em até 15% dos pacientes (MUDALIAR et al., 2003). Outros efeitos adversos possíveis da utilização das TZDs para o tratamento de doenças crônicas não são conhecidos, e recentemente esses fármacos foram associados a aumento do risco de eventos cardiovasculares e perda de massa óssea (DA SILVA; LAZARETTI, 2010).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2010 houve cancelamento dos registros dos medicamentos com o princípio ativo rosiglitazona, que tinham indicação no controle glicêmico em pacientes com DM2. O cancelamento foi com base em estudos que relacionavam ao aumento de 5 vezes de toxicidade cardiovascular comparado à pioglitazona, decidindo por tanto cancelar o seu registro no Brasil. (ANVISA, 2010).

A troglitazona foi retirada do mercado a partir dos anos 2000, por provocar efeitos hepatotóxicos nos pacientes (NISSEN, WOLSKI, 2007; KAUL, BOLGER, 2010).

O Muraglitazar, que atua tanto no PPAR α e PPAR γ , teve seu registro cancelado pela FDA devido ao aumento dos riscos de efeitos adversos cardiovasculares, após a confirmação desse efeito adverso, o desenvolvimento do medicamento foi interrompido pelo fabricante (NISSEN et al., 2005).

1.3.3 Agonistas parciais do PPAR γ

Uma estratégia para reduzir os efeitos adversos associados à ampla ativação do PPAR γ é o desenvolvimento de ligantes capazes de regular diferentemente os efeitos benéficos do receptor sobre a homeostase energética e os efeitos relacionados aos efeitos adversos, ou seja, ligantes que mantêm atividade sensibilizadora de insulina, porém sem os efeitos adversos observados com a utilização de agonistas completos do receptor (RUBENSTRUNK et al., 2007). Estudos recentes contribuíram para compreender melhor o mecanismo de ação de agonistas parciais (CHOI et al., 2010; AMATO et al., 2012). Zapata-Sudo e colaboradores descreveu o 3'-[(E)-[2-[(6-metil-1,3-benzodioxol-5-yl)sulfonil] hidrazinildieno] metil]-ácido-benzóico ou LASSBio-1471, como um agente que possui afinidade pelo PPAR γ . A aplicação de 20 mg durante 7 dias, em ratos *wistar*, foi capaz de melhorar a tolerância à glicose, reduziu os níveis de glicose sanguínea, analgesia neuropática em modelos *in vivo* de diabetes induzida por estreptozocina, sugerindo um novo agente hipoglicêmico para alívio da dor neuropática. (ZAPATA-SUDO, 2012).

Outras pesquisas com agonistas parciais do PPAR γ como 3-terc-butoxicarbonil metil-5-[4-[2-[N-metil-N-(2-piridil)amino] etoxi] benzil] tiazolidina-2, 4-diona ou

CMHX008 em cultura de células 3T3-L1 demonstrou uma menor capacidade adipogênica comparado à rosiglitazona, diminuiu o teor de gordura em modelos *in vivo*, a resistência à insulina induzida por dieta específica em ratos (YUE MING., XIANGNAN HU., YING SONG et al. 2014). Além da menor atividade adipogênica, o CMX008 apresentou atividade na redução da transcrição de genes inflamatórios. Os animais foram submetidos a uma dieta específica durante 16 semanas e tratados com 3 mg/kg a 10mg/kg de CMX008 e rosiglitazona 3 mg/kg. A partir da quantificação de TNF- α , IL-6 e IL-10, nas células sanguíneas dos ratos, houve uma redução significativa das citocinas pró-inflamatórias, indicando uma associação da atividade antidiabética e anti-inflamatória (MING et al. 2014).

A busca por moduladores seletivos do PPAR γ levou ao desenvolvimento de vários compostos sintéticos benzilideno e acridinilideno-tiazolidinedionas ligantes de PPAR (INCT para Inovação Farmacêutica). Estudos realizados no Laboratório de Farmacologia Molecular mostraram a atividade agonista do GQ-16 (figura 5) (benzilideno-tiazolidinediona) em PPAR γ de pró-monócitos humanos U-937. Esse composto, diferentemente das TZDs clássicas, apresentou atividade agonista parcial em PPAR γ , competiu pela ligação ao LBD (*ligand-binding domain*) do PPAR γ , e induziu a interação entre o PPAR γ e o coativador SRC-1 (*steroid receptor coactivator-1*). Ainda, a interação do GQ-16 com o PPAR γ produziu uma modificação conformacional do receptor de forma diferente da rosiglitazona (AMATO et al., 2012).

O GQ-16 também apresentou potencial efeito adipogênico em cultura de células, ao aumentar a expressão da proteína ligadora de AG (FABdP) adipocitária, um marcador específico de adipócitos diferenciados. No entanto esse efeito foi inferior ao observado com o tratamento da rosiglitazona. Estudos *in vivo* evidenciaram também melhora da tolerância à glicose e da sensibilidade insulínica em modelo murino de obesidade, resistência insulínica (AMATO et al., 2012). Esse novo composto sintético, QG-16, mostrou resultados promissores nos estudos realizados até o momento. Suas características de agonismo parcial/modulador seletivo e específico do PPAR γ , menor poder adipogênico que a rosiglitazona e seus efeitos *in vivo* sugerem seu potencial terapêutico nas doenças metabólicas relacionadas à obesidade, DM2 e inflamação crônica.

Contudo, algumas questões ainda necessitam melhor esclarecimento. Qual o mecanismo pelo qual o GQ-16 melhora a sensibilidade à insulina sem promover alguns dos efeitos colaterais como ganho de peso? Será que os efeitos benéficos do GQ-16 se estenderiam também aos efeitos anti-inflamatórios dos agonistas totais de PPAR γ ? O GQ-16 poderia alterar a viabilidade ou polarização de macrófagos que são recrutados para o tecido adiposo e desse modo regular a resistência à insulina?

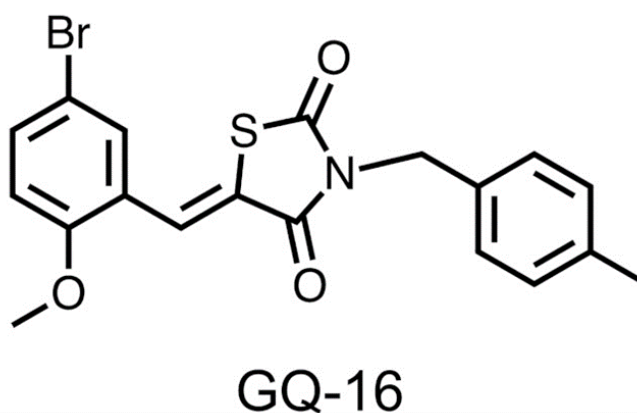


Figura 5. Estrutura molecular do GQ-16. Extraído de: AMATO et. Al., 2012

2. JUSTIFICATIVA

Há um crescimento significativo da obesidade e doenças a ela associadas, como DM2, no mundo. A obesidade está relacionada a um estado de inflamação crônica subclínica, com recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo, o que contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina. O PPAR γ apresenta um alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos que apresentam os efeitos benéficos das TZDs clássicas na glicemia e diminuição da inflamação, mas sem apresentar os efeitos colaterais advindos do seu uso, como ganho de peso, edema, hemodiluição, falência cardíaca e retenção hídrica.

Ensaios *in vivo* mostraram que o GQ-16, agonista parcial de PPAR γ , possui os efeitos benéficos das TZDs clássicas, mas sem os seus efeitos adversos. Partindo desse ponto, ainda não foi estudado se esse agonista parcial de PPAR γ tem algum efeito anti-inflamatório, assim como os agonistas totais. Ao modular a quantidade e/ou polarização de macrófagos recrutados para o tecido adiposo se está contribuindo para melhorar a resistência insulínica e desse modo diminuir da glicemia.

3. OBJETIVOS

- Objetivo geral

Avaliar o efeito de agonistas do PPAR γ sobre a viabilidade de macrófagos em cultura.

- Objetivos específicos

Investigar o efeito de várias concentrações do agonista total do PPAR γ , rosiglitazona, sobre a viabilidade de macrófagos em cultura com e sem estímulo inflamatório;

Estudar o efeito de várias concentrações do agonista parcial do PPAR γ , GQ-16, sobre a viabilidade de macrófagos em cultura com e sem estímulo inflamatório.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Células

Neste estudo foi utilizada a cultura imortalizada de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC® TIB71™). Estas células foram isoladas de camundongos BALB/c, adultos, machos, e sua cultura foi estabelecida a partir de tumor ascítico induzido pelo vírus da leucemia murina. Estas células também expressam o PPAR γ (JIANG C, TING AT, SEED B, 1998).

4.2 Cultivo Celular

A linhagem celular foi mantida em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina e estreptomicina. A cultura foi mantida a 37 °C com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. Ao atingirem uma confluência de 70-80%, as células foram plaqueadas em uma placa de 96 poços. Inicialmente foi feito um experimento com 5x10⁴ ou 10x10⁴ e 30x10⁴ células por poço para verificar qual a quantidade ideal para a cultura de células RAW 264.7. Após o experimento teste, ficou acordado de que nos experimentos posteriores fossem utilizadas 30x10⁴ células por poço.

4.3 Tratamentos

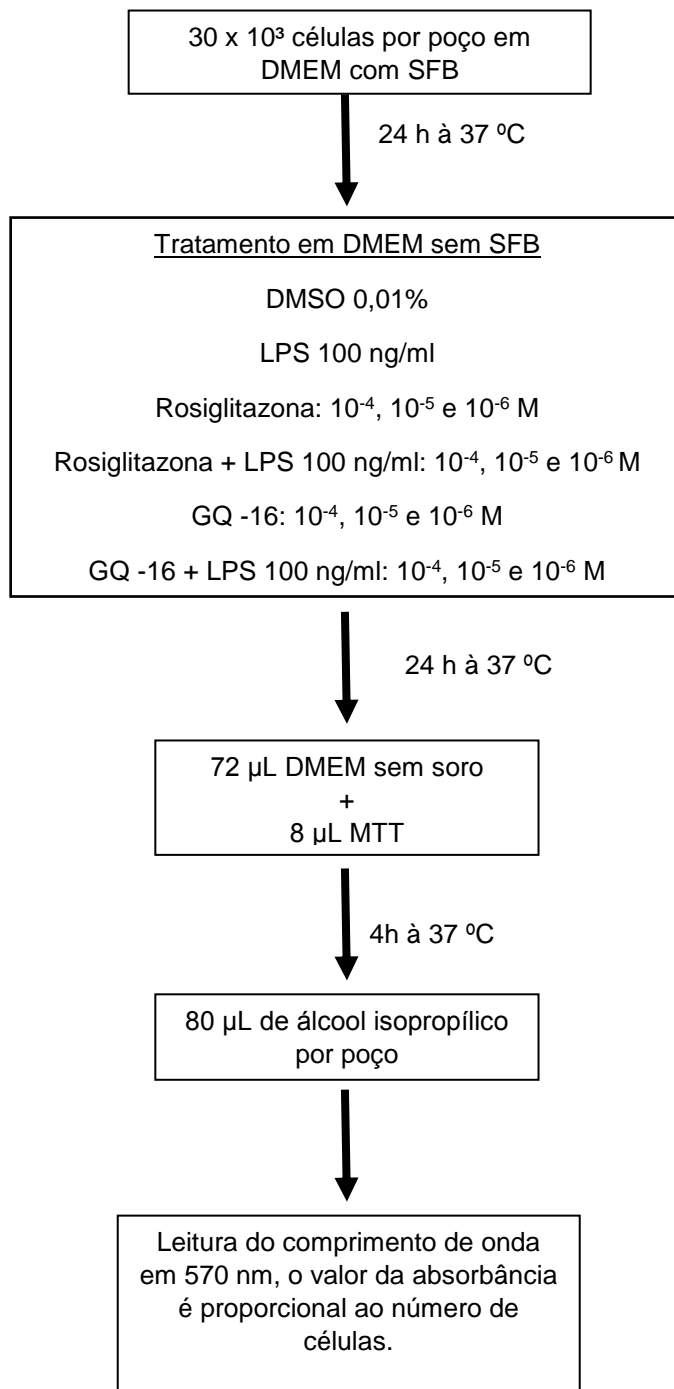
Após 24 horas do plaqueamento na placa de 96 poços, as células foram tratadas com DMSO 0,01% (controle), agonista total do PPAR γ , (rosiglitazona 10⁻⁶M, 10⁻⁵M e 10⁻⁴M) ou agonista parcial do PPAR γ (GQ-16 10⁻⁶M, 10⁻⁵M e 10⁻⁴M) em meio sem SFB por 24 horas. Em outros experimentos, para verificar se o estímulo inflamatório poderia alterar o efeito de agonistas de PPAR γ sobre a viabilidade de macrófagos em cultura, foram feitos experimentos utilizando LPS 100 ng/mL junto com o tratamento dos agonistas de PPAR γ , nas mesmas condições acima citadas. O GQ-16 foi cedido pelo Professor Ivan da Rocha Pitta (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO).

4.4. Ensaio de citotoxicidade

O MTT é um ensaio colorimétrico descrito como um método útil e bastante utilizado para medir a citotoxicidade *in vitro*. A quantidade de células viáveis pode ser estimada por meio da leitura espectrofotométrica. (VAN MEERLOO et al., 2011).

Este ensaio depende do número de células presentes, bem como da atividade mitocondrial celular e baseia-se na redução do sal MTT a cristais de formazan (produto corado de azul), pela enzima mitocondrial succinato-desidrogenase, existente no interior das células viáveis. A quantidade de formazan produzida é proporcional ao número de células viáveis presentes e que apresentam uma respiração celular ativa, ou seja, quanto maior for a absorbância detectada no espectrofotômetro, maior a quantidade de células vivas. O MTT requer algumas precauções no seu manuseio por ser tóxico, perigoso e sensível à luz (VAN MEERLOO et al., 2011; WAN et al., 1997). As placas com os tratamentos foram submetidas ao teste enzimático colorimétrico de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (SIGMA, M5655-1G) para avaliação da viabilidade celular. O MTT foi diluído na concentração de 5 mg/mL em PBS (tampão fosfato salino).

Após 24 horas dos tratamentos, cada poço teve o seu conteúdo líquido aspirado e então adicionado 72 μ L de meio e 8 μ L de MTT e as células foram incubadas por 4 horas protegidas da exposição à iluminação em estufa à 37°C. Em seguida foram adicionados 80 μ L da solução de álcool isopropílico (J.T. Baker cod. 9095-03) e ácido clorídrico (Vertec, cod. 154) para solubilizar os cristais de formazan formados. Esses cristais de formazan foram quantificados em espectrofotômetro (Leitor de Placas Beckman Coulter DTX 800) no comprimento de onda 570 nm. Foram feitos sete experimentos realizados em triplicata nos ensaios sem LPS e cinco experimentos realizados em triplicata nos ensaios com LPS (fluxograma 1).



Fluxograma 1: Representação esquemática do tratamento das células RAW 264.7 com os agonistas de PPAR γ .

4.5 . Análise estatística

A análise estatística buscou comparar o desempenho dos diferentes tratamentos de células: GQ-16 ou rosiglitazona, ajustados para diferentes concentrações e presença ou não de LPS. A normalidade das distribuições dos grupos e a homogeneidade das variâncias entre os diferentes grupos comparados foram atestadas com sucesso, respectivamente, pelo teste de Shapiro-Wilk e pelo teste de Levene ($p > 0,05$ em ambos os casos). A seguir, a comparação foi feita com teste ANOVA 1-via e pós-teste de Dunnet com o software SPSS (versão 20.0, IBM) e os gráficos foram redigidos com GraphPrism versão 5.0. Em todos os casos, foi considerado nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

Para estudar o efeito de agonistas de PPAR γ sobre a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 em cultura foram realizados ensaios de MTT em diferentes concentrações de ligantes, e com e sem estímulo inflamatório com o LPS.

A figura 6 mostra o efeito do agonista total de PPAR γ rosiglitazona (ROSI) em diferentes concentrações (10^{-6} - 10^{-4} M) por 24 horas de tratamento sobre a linhagem de macrófagos RAW 264.7. Pode-se observar que o tratamento com a rosiglitazona não reduziu a viabilidade celular em nenhuma concentração estudada, quando comparado ao controle (0,01% DMSO) (figura 6). O controle DMSO foi utilizado pois os ligantes de PPAR γ foram inicialmente diluídos em DMSO para depois fazer as diluições conforme a curva de concentração.

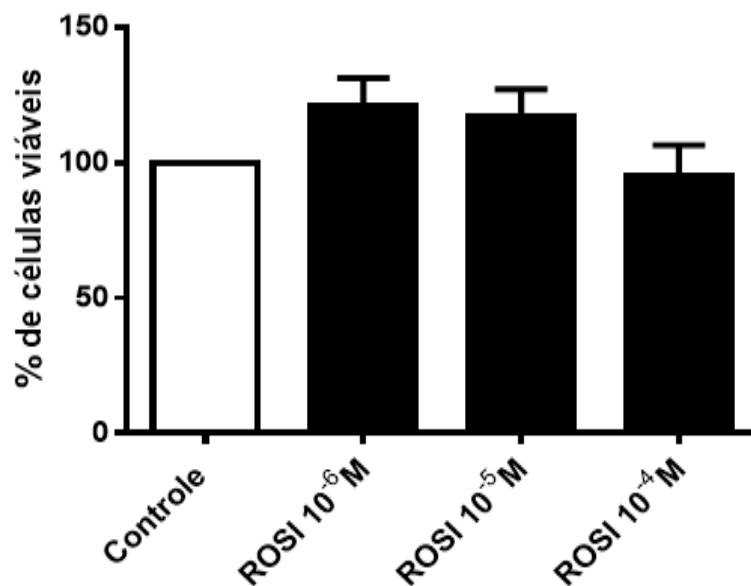


Figura 6. Efeito da rosiglitazona sobre a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 em cultura: As células RAW 264.7 foram tratadas com o controle (DMSO 0,01%) ou rosiglitazona (ROSI) em diferentes concentrações (10^{-6} - 10^{-4} M) por 24 horas. Em seguida foi realizado o ensaio de MTT (n=6).

O estímulo inflamatório com LPS também não alterou a resposta de rosiglitazona sobre a viabilidade celular (figura 7) quando comparado ao efeito do LPS apenas.

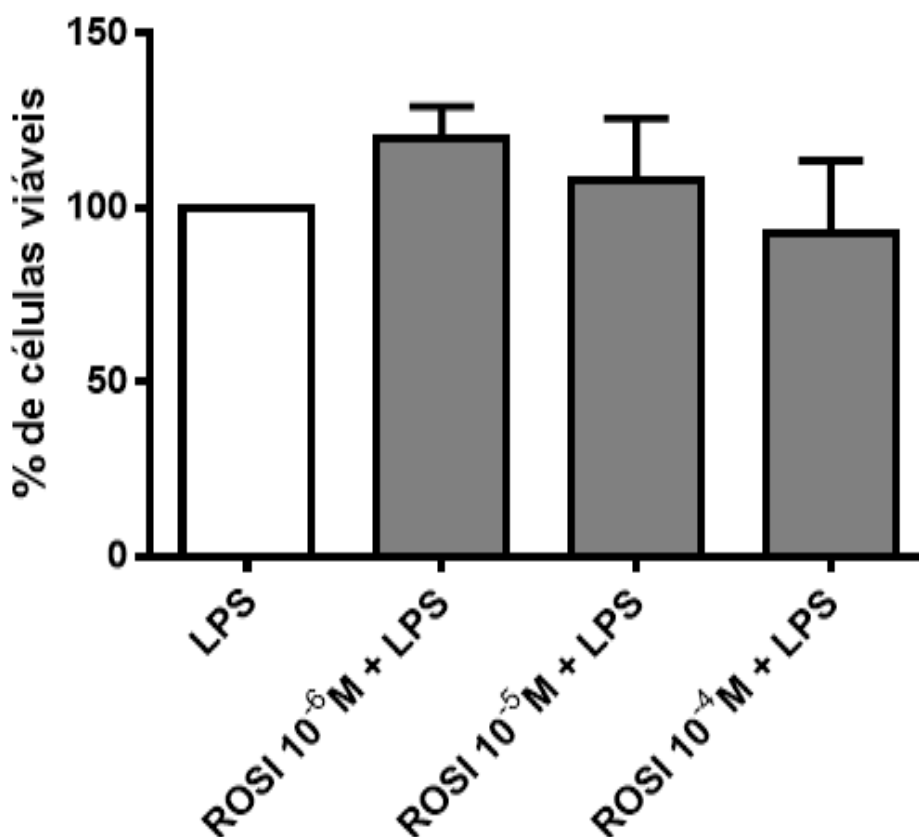


Figura 7. Efeito do LPS na resposta da rosiglitazona sobre a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 em cultura: As células RAW 264.7 foram tratadas com LPS 100 ng/mL ou LPS 100 ng/mL junto com ROSI (rosiglitazona) em diferentes concentrações (10^{-6} - 10^{-4} M) por 24 horas. Em seguida foi realizado o ensaio de MMT (n=5).

O agonista parcial de $PPAR_{\gamma}$, GQ-16, também não alterou a viabilidade de macrófagos em cultura em nenhuma concentração estudada (figura 8).

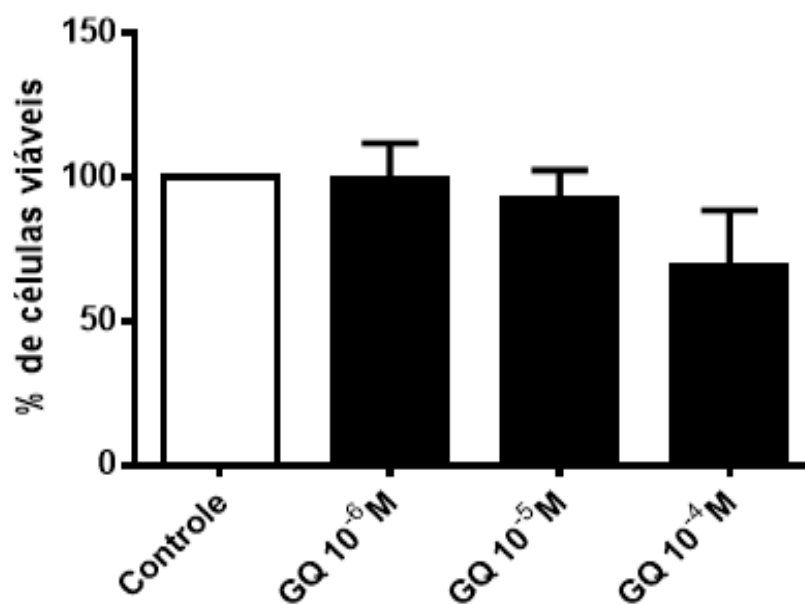


Figura 8: Efeito do GQ-16 sobre a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 em cultura: As células RAW 264.7 foram tratadas com o controle (DMSO 0,01%) ou GQ-16 em diferentes concentrações (10^{-6} - 10^{-4} M) por 24 horas. Em seguida foi realizado o ensaio de MMT (n=6).

Na presença do estímulo inflamatório LPS, o GQ-16 diminuiu a viabilidade celular em torno de 50 % (figura 9). Vale lembrar que as concentrações dos agonistas de PPAR γ utilizadas nesse estudo foram as mesmas previamente utilizados em estudos anteriores no Laboratório de Farmacologia Molecular.

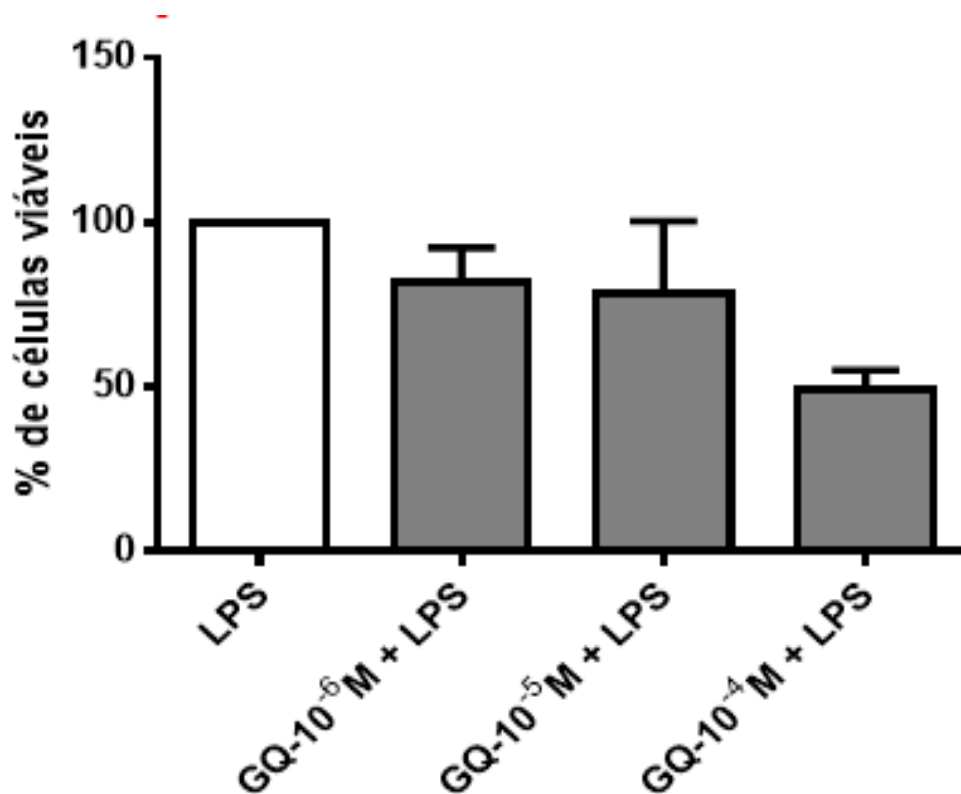


Figura 91. Efeito do LPS na resposta do GQ-16 sobre a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 em cultura: As células RAW 264.7 foram tratadas com LPS 100 ng/mL ou LPS 100 ng/mL junto com GQ-16 em diferentes concentrações (10^{-6} - 10^{-4} M) por 24 horas. Em seguida foi realizado o ensaio dew MMT (n=5).

Quando comparado os efeitos dos agonistas de $\text{PPAR}\gamma$ com e sem o estímulo inflamatório LPS também não foram observadas alterações na viabilidade dos macrófagos em cultura (figura 10).

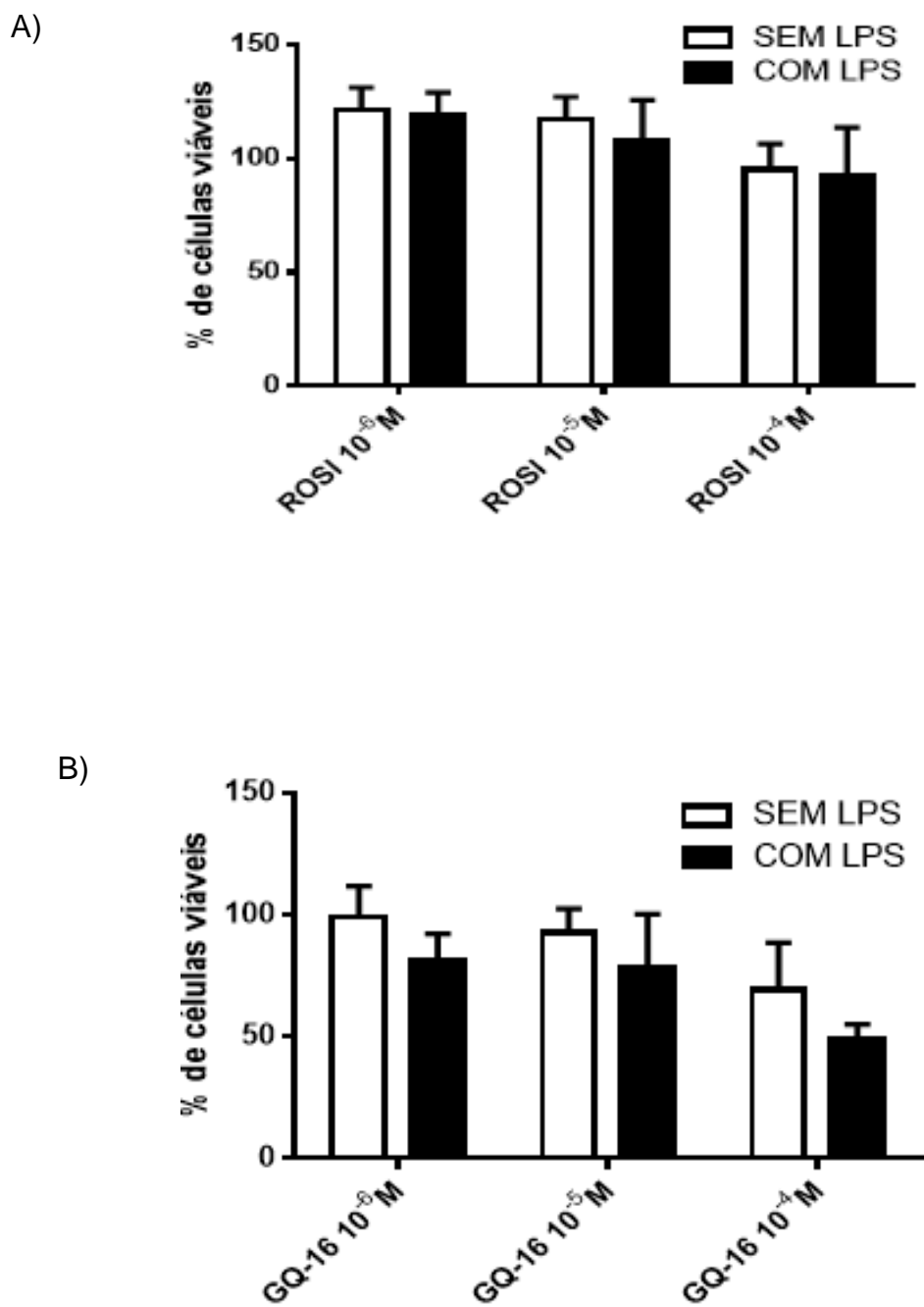


Figura 10. Comparação dos efeitos dos agonistas de PPAR γ sobre a viabilidade de macrófagos em cultura com e sem LPS.

A) Comparação do efeito da rosiglitazona sobre a viabilidade de macrófagos com e sem LPS;

B) Comparação do efeito do GQ-16 sobre a viabilidade de macrófagos com e sem LPS.

6. DISCUSSÃO

Os efeitos benéficos de agonistas de PPAR γ , como as TZDs, sobre a sensibilidade insulínica e homeostase da glicose são bem documentados em modelos de obesidade e resistência insulínica (EVANS et al., 2004). No entanto, os efeitos benéficos dos agonistas do PPAR γ são acompanhados de uma série de efeitos desfavoráveis como retenção hídrica, ganho ponderal e adipogênese, entre outros (NISSEN & WOLSKI, 2007). Esses efeitos adversos são associados ao agonismo total do PPAR (CHOI et al., 2010).

Estudos recentes evidenciam que a ativação parcial e específica do PPAR γ (HALL & MCDONNELL, 2007; KNOUFF & AUWERX, 2004) e sua modulação diferencial em tecidos distintos (SHEARER & BILLIN, 2007) pode ser mais efetiva e segura do que a ação de agonistas completos e não seletivos como as TZDs (HALL & MCDONNELL, 2007). Desse modo, vários estudos têm sido feitos para desenvolver agonistas parciais de PPAR γ que apresentem os efeitos benéficos das TZDs sem apresentar os efeitos adversos (AMATO et al., 2012; MING et al., 2014; PAL et al., 2014).

Estudos anteriores do laboratório de Farmacologia Molecular mostraram que o GQ-16 possui atividade agonista parcial e específica em PPAR γ por meio de ensaios de gene repórter em pró-monócitos humanos U-937. Para investigar a base molecular da atividade agonista do GQ-16 observada nos ensaios de transativação, foi avaliada a interação entre o coativador SRC-1 e o PPAR γ induzida pelo GQ-16, por ensaio de interação proteína-proteína. O GQ-16 também foi capaz de induzir essa interação, em concordância com seu efeito agonista sobre a atividade transcricional do receptor. O GQ-16 induziu acúmulo lipídico, embora de forma menos pronunciada que a rosiglitazona em pré-adipócitos 3T3-L1 induzidos a se diferenciar (AMATO, 2008).

Esse agonista parcial também demonstrou ter efeito antidiabético similar a rosiglitazona em camundongos sem apresentar efeitos colaterais de ganho de peso e edema. Diante disso, é importante estudar se esse agonista parcial também apresenta outros efeitos de agonistas totais TZDs também sobre a atividade anti-inflamatória.

O tecido adiposo é o tecido com o maior nível de expressão do PPAR γ , porém estudos evidenciaram a expressão do PPAR γ em monócitos e macrófagos, no qual a sua ativação foi capaz de inibir a produção de várias citocinas inflamatórias (RICOTE, et al. 1998; JIANG et al. 1998). Essa observação levantou hipóteses de que o PPAR γ tem de um papel fisiológico fundamental na modulação e na magnitude das respostas inflamatórias mediadas por macrófagos.

As relações entre as quimiocinas, que desempenham um papel fundamental no sistema imune e a infiltração de macrófagos, foi também objeto de estudo para tentar esclarecer o mecanismo da resistência insulínica (BRUSERUD, KITTANG, 2010). Com base no conhecimento da estrutura molecular das quimiocinas, pesquisadores descobriram que o aumento da quantidade de MCP-1 no tecido adiposo pode influenciar diretamente na infiltração de macrófagos para este tecido (KANDA et al., 2006; KAMEI et al., 2006). E ao considerar a interrupção da MCP-1 ou sua ação no receptor CCR2, diminuía a migração de macrófagos para o tecido adiposo, conseqüentemente reduzindo a inflamação e a resistência à insulina (KANDA et al., 2006; TATEYA et al., 2010; WEISBERG et al., 2006; ITO et al., 2008).

No presente estudo, foi verificado se agonistas de PPAR γ poderiam ter algum efeito sobre a viabilidade de macrófagos em cultura e assim esse ser um dos mecanismos da atividade anti-inflamatória dos mesmos. Não foi observado efeito destes agonistas sobre a viabilidade de macrófagos em cultura.

Vários estudos evidenciaram a ação anti-inflamatória de agonistas de PPAR γ . Essa atividade foi verificada através da diminuição da secreção ou expressão de citocinas inflamatórias. Um estudo com o foco na inflamação do colón em ratos, separou por grupos os animais e fizeram os seguintes testes. Utilizou 5–10 mg/kg/dia de rosiglitazona e 50-200 mg/kg/dia de troglitazona, administrou ácido 2,4,6 – trinitrobenzenossulfónico (TNBS) para induzir colite. Após a eutanásia, foi feita a quantificação de citocinas por PCR. Foi observado, que a administração preventiva de rosiglitazona ou troglitazona tem efeitos terapêuticos após 2 dias de aplicação de TNBS. O mRNA do TNF- α do grupo tratado com rosiglitazona foi reduzido 0.58 ± 0.69 , o grupo tratado com troglitazona 0.45 ± 0.74 , comparado ao grupo TNBS 3.91 ± 3.94 .

Os níveis de IL-1 β mRNA também foram reduzidos no grupo tratado com rosi 4 ± 3 , tratados com troglitazona 4 ± 4 , comparado ao grupo TNBS 28.5 ± 31.1 . Estes resultados demonstram que os agonistas do PPAR γ são uma possível estratégia terapêutica para a redução da inflamação do cólon (DESREUMAUX et al., 2001).

Como pode ser observado nos estudos descritos acima, a atividade anti-inflamatória de agonistas de PPAR foi evidenciada ao estudar a expressão ou secreção de citocinas. No presente estudo essa atividade foi vista apenas no âmbito da viabilidade de macrófagos em cultura pois acredita-se que ao diminuir o número de macrófagos também possa se estar contribuindo para o efeito anti-inflamatório, e desse modo diminuir a resistência insulínica.

Grande parte dos estudos que verificaram a ação anti-inflamatória de agonistas de PPAR usou o MTT como uma ferramenta para verificar a citotoxicidade dos compostos estudados. No entanto, nenhum estudo havia feito tal ensaio com o estímulo inflamatório LPS para verificar se haveria alteração da resposta, mimetizando desse modo o que acontece fisiologicamente no desenvolvimento da resistência insulínica e, com efeito, no DM2. No presente estudo, além de verificar a citotoxicidade dos agonistas, se avaliou o efeito dos agonistas com o estímulo LPS, pois a alteração do efeito do agonista na presença do LPS poder-se-ia sugerir o efeito não-citotóxico em macrófagos, e sim na atividade inflamatória. Se os agonistas tivessem apresentado efeito no tratamento com LPS poder-se-ia inferir que um dos mecanismos pelo qual agonistas de PPAR γ diminuem a inflamação, e assim a resistência insulínica, seria por diminuir a viabilidade de macrófagos recrutados para o tecido adiposo.

A não alteração da viabilidade de macrófagos em cultura mostra que os agonistas de PPAR γ não possuem efeito citotóxico nas doses estudadas. Isso irá se tornar útil nos experimentos posteriores quando se tratará os macrófagos com tais agonistas para ver a expressão de citocinas inflamatórias e a polarização de macrófagos.

Embora os tratamentos do presente estudo não tenham dado significância estatística, o GQ-16 na concentração de 10^{-4} M na presença do LPS diminui a

viabilidade de macrófagos em cultura em torno de 50%. Acredita-se que ao aumentar o número de experimentos possa dar significância.

Outro fator a ser considerado também é o tempo de tratamento. No presente estudo o tempo de tratamento foi de 24 horas. Outros estudos que verificaram a atividade anti-inflamatória de agonistas de PPAR foram feitos em 24h e 48 h, em concentrações na faixa de 125 μ M a 0,04 μ M (XIANYONG, LIN HE, YANHUA., 2015).

Não se pode inferir que esses agonistas de PPAR γ não tenham efeito sobre as vias inflamatórias. Os próximos passos seriam verificar se esses agonistas apresentam algum efeito sobre a secreção de citocinas inflamatórias, bem como a alteração da polarização de macrófagos de M1 para M2.

7. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O agonista total de PPAR γ rosiglitazona não apresentou efeito sobre a viabilidade de macrófagos em cultura mesmo após a adição do estímulo inflamatório LPS.

Os resultados do presente estudo foram importantes para demonstrar que as concentrações dos agonistas estudados não possuem efeito citotóxico sobre macrófagos em cultura. Isso será extremamente útil nos ensaios posteriores que utilizarão estas concentrações para verificar se tais agonistas apresentam efeito na expressão de citocinas inflamatórias, bem como alteração da polarização de macrófagos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-GHANI MA, DEFRONZO RA. Inhibitor of renal glucose control in type 2 diabetes. **Endocr Pract**; 6:782-90 2008

AMATO, A. A. **Investigação da atividade farmacológica de benzilideno-e-acridinilideno-tiazolidineidionas e de isoflavonas nos receptores alfa, beta/delta e gama ativados por proliferadores peroxissomais.** 2008. Universidade de Brasília, Brasília.

AMATO AA, RAJAGOPALAN S, LIN JZ, CARVALHO BM, LU J, ET AL. GQ-16, a novel peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligand, promotes insulin sensitization without weight gain. **J Biol Chem.** 2012;287: 28169–79

ANTONIO C LERARIO, ANTONIO R CHACRA, AUGUSTO PIMAZONI-NETTO, DOMINGOS MALERBI, JORGE L GROSS, JOSÉ EP OLIVEIRA, MARILIA B GOMES, RAUL D SANTOS, REINE MC FONSECA, ROBERTO BETTI AND ROBERTO RADUAN; **ALGORITHM for the treatment of type 2 diabetes: a position statement of Brazilian Diabetes Society**; *Diabetology & Metabolic Syndrome* **2:35**; 8 jun 2010

ARONOFF S, ROSENBLATT S, BRAITHWAITE S, EGAN JW, MATHIESEN AL, SCHNEIDER RL. Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: a 6-month randomized placebo-controlled doseresponse study. The Pioglitazone 001 Study Group. **Diabetes Care**; 23: 1605–1611 2000

Avaliação do Controle Glicêmico; **Arq Bras Endocrinol Metab** vol.46 no.1 São Paulo Feb. 2002.

BERGER J, MOLLER DE; Annu The mechanisms of action of PPARs **Rev Med**; 53():409-35 2002

BOUHLEL, M. A., DERUDAS, B., RIGAMONTI, E., DIEVART, R., BROZEK, J., HAULON, S., ZAWADZKI, C., JUDE, B., TORPIER, G., MARX, N., STAELS, B., CHINETTI GBAGUIDI, G. PPAR γ activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. **Cell Metab.** 6, 137–143 2007

BRAGA T. T; MACHADO NUNES S; DE OLIVEIRA SANTOS M. Obesidade e qualidade de vida: revisão da literature; **Revista Médica de Minas Gerais**; Vol 20.3; 18 ago 2010.

BRASIL. **Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e a Síndrome Metabólica.** Diretrizes 2010. Atualização das Diretrizes para o Tratamento Farmacológico da Obesidade e do Sobrepeso. Disponível em: <<http://www.abeso.org.br/>>. Acesso em: 02 março 2016

BRASIL. **Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia**, 2004; Diabetes Mellitus: Tratamento Medicamentoso, 7 de novembro de 2004. Disponível em: <www.projetodiretrizes.org.br> Acesso em: 08/04/2016

BRASIL. **ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA**; Disponível em: <<http://www.portal.anvisa.gov.br>> Acesso em: 11/05/2016

BRASIL. **Sociedade Brasileira de Diabetes**, 2015; Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes; Disponível em: < <https://www.diabetes.org.br>> Acesso em: 20 de março de 2016

BRASIL. **INCT para Inovação Farmacêutica** Disponível em: <<http://www.inct-if.com.br>> Acesso em: 25/04/2016

BRUSERUD Ø, KITTANG A O. The chemokines system in experimental and clinical hematology. **Curr top Microbial Immunol** 341:312 2010

CHINETTI G., GRIGLIO S., ANTONUCCI M., TORRA I.P., DELERIVE P., MAJD Z., FRUCHART J-C., CHAPMAN J., NAJIB J., STAELS B. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor α and γ induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. **J. Biol. Chem.** ; 273:25573–25580 1998

Choi Y.L., Soda M., Yamashita Y., Ueno T., Takashima J., Nakajima T., et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. **N Engl J Med** 363: 1734–1739 2010

COMBS TP, WAGNER JA, BERGER J, DOEBBER T, WANG WJ, ZHANG BB, TANEN M, BERG AH, O'RAHILLY S, SAVAGE DB, CHATTERJEE K, WEISS S, LARSON PJ, GOTTESDIENER KM, GERTZ BJ, CHARRON MJ, SCHERER PE, Moller De: Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPAR γ agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. **Endocrinology** 143: 998-1007, 2002

DAVID E. GREEN, ROY L. SUTLIFF, AND C. MICHEAL HART; Is peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) a therapeutic target for the treatment of pulmonary hypertension? **Pulm Circ.** 2011 Jan-Mar; 1(1): 33–47.

DEACON CF. Dipeptidyl peptidase 4 inhibition with sitagliptin: a new therapy for type 2 diabetes. **Expert opinion on investigational drugs**; 16(4):533-45 2007

DEACON CF, MANNUCCI E, AHREN B. Glycaemic efficacy of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors as add-on therapy to metformin in subjects with type 2 diabetes-a review and meta-analysis. **Diabetes, obesity & metabolism**; 14(8):762-7. 05 april 2012

EVANS RM, BARISH GD, WANG YX. PPARs and the complex journey to obesity. **Nature Medicine** 10(4): 355-361, 2004.

F. PORCHERAY, S VIAUD, A-C RIMANIOL, C LÉONE, B SAMAH, N DEREUDDRE-BOSQUET, D DORMONT, AND G GRAS; Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation; **Clin Exp Immunol.** 142(3): 481–489; Dec 2005

FORMAN B.M., TONTONOZ P., CHEN J., BRUN R.P., SPIEGELMAN B.M., EVANS R.M. 15-Deoxy-delta-12,14-prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPARgamma. **Cell.**;83:803–812 1995

GAEDE P, LUN-ANDERSWN H, PARVING H ET AL. Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. **N England J Med.**; 358:580-91 2008

GONÇALVES DA SILVA, ANDRÉ, LAZARETTI-CASTRO MARISE; Diabetes melito, tiazolidinedionas e fraturas: uma história inacabada; **Arq Bras Endocrinol Metab** vol.54 no.4 São Paulo June 2010

GUH DP, ZHANG W, BANSBACK N, AMARSI Z, BIRMINGHAM CL, ANIS AH. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: **a systematic review and meta-analysis. BMC public health.** 2009; 9:88.march 27 2009

H. XU, G. T. BARNES, Q. YANG ET AL., “Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity related insulin resistance,” **Journal of Clinical Investigation**, vol. 112, no. 12, pp. 1821–1830, 2003

HALL, J. M.; MCDONNELL, D. P. The molecular mechanisms underlying the proinflammatory actions of thiazolidinediones in human macrophages. **Mol Endocrinol**, v. 21, 8, p. 1756-68, Aug 2007

HALVORSEN B, HEGGEN E, UELAND T, SMITH C, SANDBERG WJ, DAMAS JK, ET AL. Treatment with the PPAR gamma agonist rosiglitazone downregulates interleukin-1 receptor antagonist in individuals with metabolic syndrome.**Eur J Endocrinol.**; 162: 267–73 2010

HEIKKINEN, R. K. ET AL. 2007. Biotic interactions improve prediction of boreal bird distributions at macro-scales. **Global Ecol. Biogeogr.** 16: 754-763.

He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, Nelson M, Ong E, Olefsky JM, Evans RM. 2003. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2003 Dec 23;100(26):15712-7

IALENTI A, GRASSIA G, DI MEGLIO P, MAFFIA P, DI ROSA M, IANARO A.; Mechanism of the anti-inflammatory effect of thiazolidinediones: relationship with the glucocorticoid pathway; **Mol Pharmacol**; 67(5):1620-8 May 2005

IEPSEN EW, TOREKOV SS, HOLST JJ. Therapies for inter-relating diabetes and obesity - GLP-1 and obesity. **Expert opinion on pharmacotherapy** ;15(17):2487-500. 28 sept 2014

ITO A, SUGANAMI T, YAMAUCHI A, DEGAWA YAMAUCHI M, TANAKA M, KOUYAMA R, ET AL. Role of CC chemokine receptor 2 in bone marrow cells in the recruitment of macrophages into obese adipose tissue. **J Biol Chem** 283:35715–23 2008

JIANG C, TING AT, SEED B.; PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines; **Nature** 1;391(6662):82-6 Jan 1998

JORGE L. GROSS; SANDRA P. SILVEIRO; JOÍZA L. CAMARGO; ANGELA J. REICHELTE; MIRELA J. DE AZEVEDO; Diabetes Mellito: Diagnóstico, Classificação e

K. Kang, S. M. Reilly, V. Karabacak et al., “Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPAR δ regulate macrophage polarization and insulin sensitivity,” **Cell Metabolism**, vol. 7, no. 6, pp. 485–495, 2008

KAMEI N, TOBEK, SUZUKIR, OHSUGI M, WATANABET, KUBOTAN, ET AL. Over expression of monocyte chemo attractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. **J Biol Chem** 281:26602–14 2006

KANDAH, TATEYAS, TAMORIY, KOTANIK, HIASAK, KITAZAWA R, ET AL. MCP-1 contributes to macrophage infiltration in to adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **J Clin Invest** 116:1494–505 2006

KNOUFF C, AUWERX J.; Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma calls for activation in moderation: lessons from genetics and pharmacology. **Endocr Rev.**;25(6):899-918 Dec 2004

LEHMANN JM, MOORE LB, SMITH-OLIVER TA, WILKISON WO, WILLSON TM, KLIEWER SA.; An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma); **J Biol Chem.** ;270(22):12953-6 2 jun 1995

LUMENG, C. N., DELPROPOSTO, J. B., WESTCOTT, D. J., SALTIEL, A. R. PHENOTYPIC SWITCHING OF adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. **Diabetes** 57, 3239–3246 2008

MADSBAD S, KIELGAST U, ASMAR M, DEACON CF, TOREKOV SS, HOLST JJ. An overview of once-weekly glucagon-like peptide-1 receptor agonists--available efficacy and safety data and perspectives for the future. **Diabetes, obesity & metabolism.** 13(5):394-407. 07 jan 2011.

MUDALIAR S, CHANG AR, HENRY RR. Thiazolidinediones, peripheral edema, and type 2 diabetes: incidence, pathophysiology, and clinical implications. **Endocr Pract** 2003;9:406-16.

NATSUHIKO EHARA, KOH ONO, TATSUYA MORIMOTO, TERUHISA KAWAMURA, MITSURU ABE, AND KOJI HASEGAWA; The possible role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in heart failure; **Experimental Cardiology**; Exp Clin Cardiol. Fall; 9(3): 169–173, 2004.

NISSEN SE, WOLSKI K, TOPOL EJ. Effect of muraglitazar on death and major adverse cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus. **JAMA** ;294:2581-2586 2005.

OAKES ND, THALÉN PG, JACINTO SM, LJUNG B ; Thiazolidinediones increase plasma-adipose tissue FFA exchange capacity and enhance insulin-mediated control of systemic FFA availability. **Diabetes**.; 50(5):1158-65 May 2001

P.D.G. MILES, O.M. ROMEO, K. HIGO, A. COHEN, K. RAFAAT, J. Olefsky **TNF-alpha-induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone** Diabetes, 46, pp. 1678–1683 1997.

PAL M., FEBBRAIO M. A., WHITHAM M. (2014). From cytokine to myokine: the emerging role of interleukin-6 in metabolic regulation. **Immunol. Cell Biol.** 92, 331–339. 10.1038/icb.2014.16

PASCUAL, G. ET AL. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. **Nature** 437, 759-763 sept 2005.

PIERRE DESREUMAUX, LAURENT DUBUQUOY, SOPHIE NUTTEN, MICHEL PEUCHMAUR, WALTER ENGLARO, KRISTINA SCHOONJANS, BENOIT DERIJARD, BEATRICE DESVERGNE, WALTER WAHLI, PIERRE CHAMBON, MARK D. LEIBOWITZ, JEAN-FRÉDÉRIC COLOMBEL. Attenuation of Colon Inflammation through Activators of the Retinoid X Receptor (RXR)/Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) Heterodimer: A Basis for New Therapeutic Strategies and Johan Auwerxi.; **J. Exp Med**; Volume 193, Number 7, 2 april 2001.

PISCHON T, BOEING H, HOFFMANN K. ET AL. General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. **N Engl J Med**; 359:2105, 20 2008.

RAHMOUNE H, THOMPSON PW, WARD JM ET AL. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. **Diabetes** 2005; 54:3427-34.

RICOTE, M., LI, A. C., WILLSON, T. M., KELLY, C. J. & GLASS, C. K.; Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein; **Nature (London)** 391, 79–82 1998

ROSEN ED, WALKEY CJ, PUIGSERVER P, SPIEGELMAN **BM Genes** Dev.; 14(11):1293-307 1 jun 2000

ROSENFELD ME. Inflammation and atherosclerosis: direct versus indirect mechanisms. **Curr Opin Pharmacol.**; 13:154–60 2013

RUBENSTRUNK A, HANF R, HUM DW, FRUCHART JC, STAELS B. Safety issues and prospects for future generations of PPAR modulators. **Biochim Biophys Acta.** 1771(8):1065-81 Aug 2007

S. E. NISSEN AND K.WOLSKI, "Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes," **The New England Journal of Medicine**, vol. 356, no. 24, pp. 2457– 2471, 2007

S. KAUL, A. F. BOLGER, D. HERRINGTON, R. P. GIUGLIANO, AND R. H. ECKEL, "Thiazolidinedione drugs and cardiovascular risks: a science advisory from the American heart association and American college of cardiology foundation," **Circulation**, vol. 121, no. 16, pp. 1868–1877, 2010

SEMPLE RK, CHATTERJEE VK, O'RAHILLY S. PPAR gamma and human metabolic disease. **J Clin Invest.** 116(3):581-9 Mar 2006 SHEARER BG, BILLIN AN.; **The next generation of PPAR drugs: do we have the tools to find them?** **Biochim Biophys Acta.** 1771(8):1082-93. Aug 2007

SERRA D, MERA P, MALANDRINO MI, MIR JF, HERRERO L. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. **Antioxidants & redox signaling.** 2013;19(3):269-84

SOCIEDADE PORTUGUESA DE DIABETOLOGIA, 2015; **Disponível em:** <<http://www.spd.pt/>> **Acesso em:** 25 mar 2016

SONODA J, PEI L, EVANS RM. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. **FEBS Lett.**;582(1):2-9. 9 Jan 2008

SUGANAMI T, OGAWA Y.; Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling; **J Leukoc Biol.** 88 (1):33-9 Jul 2010

SZÉLES L, TÖRÖCSIK D, NAGY L; PPAR gamma in immunity and inflammation: cell types and diseases. **Biochim Biophys Acta.**; 1771(8):1014-30 aug 2007

TASYUREK HM, ALTUNBAS HA, BALCI MK, SANLIOGLU S. Incretins: their physiology and application in the treatment of diabetes mellitus. **Diabetes/metabolism research and reviews.**; 30(5):354-71 06 Jul 2014

TATEYA S, KIM F, TAMORI Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Front Endocrinol (Lausanne)** 8; 4:93, 2013

The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**; 20:1183 1997

Transição: desnutrição energético-protéica e obesidade. In: Sawaya AL, organizador. **Desnutrição urbana no Brasil**. São Paulo: Cortez; p.35-61 1997.

UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). **Lancet**; 352:837-53 1998.

VAN DEN OEVER IA, RATERMAN HG, NURMOHAMED MT, SIMSEK S. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. **Mediators Inflamm**. 2010

VON KNETHEN, A., SOLLER, M., TZIEPLY, N., WEIGERT, A., JOHANN, A. M., JENNEWEIN, C., KOHL, R. AND BRUNE, B. PPARgamma attenuates cytosol to membrane translocation of PKCalpha to desensitize monocytes/macrophages. **J. Cell Biol**. 176, 681-694 2007.

WEISBERG SP, HUNTERD, HUBERR, LEMIEUXJ, SLAYMAKERS, VADDIK, ET AL; CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high fat feeding. **J Clin Invest** 116:115–24 2006

WEISBERG SP, HUNTER D, HUBER R, LEMIEUX J,SLAYMAKER S,VADDI K, ETAL.CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high fat feeding. **J ClinInvest** 116:115–24 2006

World Health Organization. Body mass index classification - report of a WHO consultation on obesity. Geneva: WHO; **Technical Report Series** 854 1995

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015; Disponível em: <<http://www.who.int>> Acesso em: 10 março 2016.

XIANYONG CAO, LIN HE, YANHUA LI; **Effects of PPAR γ agonist siglitazone on human retinoblastoma cell in vitro and in vivo**; *Int J Clin Exp Pathol.*; 8(10): 12549–12556 2015

YUE MING, XIANGNAN HU, YING SONG, ZHIGUO LIU, JIBIN LI, RUFEEI GAO, YUYAO ZHANG, HU MEI, TINGWANG GUO, LING XIAO, BOCHU WANG, CHAODONG WU, AND XIAOQIU XIAO; CMHX008, a Novel Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Partial Agonist, Enhances Insulin Sensitivity *In Vitro* and *In Vivo*; **PLoS One**. 9(7): e102-102 8 jul 2014

ZAPATA-SUDO G, LIMA LM, PEREIRA SL, TRACHEZ MM, DA COSTA FP, ET AL. Docking, synthesis and anti-diabetic activity of novel sulfonylhydrazone derivatives designed as PPAR-gamma agonists. **Curr Top Med Chem** 12: 2037-2048 2012