

**Universidade de Brasília**  
**Faculdade de Ciências da Saúde**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO GQ-16 NO ESTADO REDOX DE  
FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS**

**Palloma Soares Santos 13/0034932**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fatima Borin**

**Co-orientadora: Dra. Laíza Magalhães de Araújo**

**BRASILIA**

**2019**

PALLOMA SOARES SANTOS

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO GQ-16 NO ESTADO REDOX DE  
FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia, da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Farmacêutica.

Orientador: Profa. Dra. Maria de Fatima Borin

Co-orientadora: Dra. Laíza Magalhães de Araújo

BRASILIA, 2019

## Resumo

Estudos recentes indicam que o receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR $\gamma$ ) é capaz de modular o estado redox na pele. O tratamento com ativadores de PPAR $\gamma$  reduz a resposta inflamatória sistêmica e cutânea, e seus possíveis efeitos na modulação da resposta inflamatória, remodelação do tecido e redistribuição de gordura, além da sua possível ligação cruzada com os receptores de estrogênio os tornam interessantes do ponto de vista do tratamento antienvhecimento. Isto despertou o interesse em investigar o potencial de ligantes de PPAR $\gamma$  como agentes na proteção contra envelhecimento da pele, via manutenção do estado redox. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do composto GQ-16, um agonista parcial do PPAR $\gamma$ , no estado redox de fibroblastos dérmicos humanos. Para os ensaios foram utilizados fibroblastos humanos (CCD-1059SK). Foram realizados ensaios de avaliação de citotoxicidade do GQ-16 pelo método de MTT, avaliação de atividade da catalase e superóxido dismutase, avaliação da peroxidação lipídica e quantificação intracelular de espécies reativas de oxigênio nas células tratadas com o GQ-16. A avaliação da citotoxicidade do GQ-16 feita pelo ensaio de MTT demonstrou que na concentração mais baixa testada,  $10^{-7}$  M, o composto GQ-16 foi capaz de aumentar a proliferação celular dos fibroblastos dérmicos humanos, mas a partir de  $10^{-4}$  M o composto foi tóxico às células. O composto foi capaz de diminuir a quantidade de espécies de oxigênio em fibroblastos dérmicos humanos e apresentou uma tendência em reduzir o nível de produção de produtos da peroxidação lipídica. Apesar dos resultados prévios publicados na literatura sobre a capacidade de agonistas de PPAR $\gamma$  aumentarem a expressão de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e a catalase, não foram observados aumentos na atividade destas enzimas nas células tratadas com  $10^{-6}$  M de GQ-16, nas condições avaliadas.

**Palavras-chave: GQ-16, PPAR, pele, fibroblastos, estado redox.**

## Abstract

Recent studies demonstrate that the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) is able to modulate the redox state in the skin. Treatment with PPAR $\gamma$  activators reduces the systemic and cutaneous inflammatory response, and their possible effects on the modulation of the inflammatory response, tissue remodeling, fat redistribution as well as their possible cross-linking with the estrogen receptors make them interesting compounds to be used in the antiaging treatment through the skin redox status maintenance. Thus, the objective of this work was to investigate the effect of GQ-16, an PPAR $\gamma$  partial agonist, on the redox state of human dermal fibroblasts. Human fibroblasts (CCD-1059SK) was used for the assays. The evaluation of cytotoxicity of GQ-16 was performed by the MTT method, and the cells treated with GQ-16 were evaluated for catalase and superoxide dismutase activities, lipid peroxidation and intracellular quantification of reactive oxygen species. Evaluation of GQ-16 cytotoxicity demonstrated that at the lowest concentration tested,  $10^{-7}$  M, GQ-16 compound was able to increase cell proliferation of human dermal fibroblasts, but at  $10^{-4}$  M the compound was toxic to cells. The compound was able to decrease the amount of oxygen species in human dermal fibroblasts and showed a tendency to reduce the levels of lipid peroxidation. Although previous results published in the literature showed the capability of PPAR $\gamma$  agonists to increase the expression of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and catalase, no increase in the activity of these enzymes was observed in cells treated with  $10^{-6}$  M GQ-16 on the tested conditions.

**Key words: GQ-16, partial agonist, PPAR, skin, fibroblasts, redox state.**

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. A pele .....	1
1.2. Sistema Antioxidante .....	2
1.3. Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais .....	3
1.4. Tiazolidinadionas e o GQ-16 .....	5
2. OBJETIVO.....	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
3.1. Linhagem celular e cultivo.....	8
3.2. Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade do GQ-16 em cultura de fibroblastos.....	8
3.3. Avaliação da atividade da enzima catalase.....	9
3.4. Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase.....	9
3.5. Avaliação da peroxidação lipídica .....	10
3.6. Quantificação dos níveis intracelulares de espécies reativas do oxigênio .....	11
3.7. Análise estatística.....	11
4. RESULTADOS .....	12
4.1. Avaliação da citotoxicidade do GQ-16 aos fibroblastos dérmicos humanos. ....	12
4.2. Avaliação da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase em fibroblastos tratados com GQ-16. ....	13
4.3. Avaliação dos níveis intracelulares de espécies reativas do oxigênio nas células tratadas com GQ-16. ....	14

4.4. Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica das células tratadas com GQ-16.	15
5. DISCUSSÃO .....	17
6. CONCLUSÃO .....	20
7. REFÊRENCIA BIBLIOGRAFICA.....	21

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e atua na proteção dos demais órgãos por ocupar uma localização estratégica entre o ambiente externo, que possui agentes nocivos, e ambiente interno, bioquimicamente ativo. É composta por três camadas, epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é a camada mais externa que entra em contato direto com o ambiente externo e é responsável por prover proteção contra agressões impostas pelo meio ambiente. É composta por queratinócitos, melanócitos que são produtores de melanina, e células de Langerhans. A derme é a camada intermediária, que tem como principal tipo de células os fibroblastos e é composta, principalmente, pela matriz extracelular, que contém fibras de colágeno, elastina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos. Possui um complexo de nervos e receptores sensoriais, vasos e glândulas sudoríparas. A hipoderme é a camada mais profunda é composta primordialmente por adipócitos que estão envolvidos na regulação da temperatura do organismo humano (AL-NUAIMI; SHERRATT; GRIFFITHS, 2014; FINKEL, T.; HOLBROOK, 2000; KIM, 2016; TOBIN, 2017).

Devido a sua localização estratégica no corpo, a pele é submetida a dois tipos de envelhecimento, o envelhecimento intrínseco que está relacionado a fatores genéticos e hormonais e o envelhecimento extrínseco causado por fatores externos como radiação ultravioleta (UV), tabagismo, produtos químicos e dieta (TOBIN, 2017). A pele que sofre o envelhecimento intrínseco possui característica fina, seca e finamente enrugada, e a que sofre o envelhecimento extrínseco possui característica flácida, com rugas grosseiras e pigmentação desigual (AL-NUAIMI; SHERRATT; GRIFFITHS, 2014; COLE et al., 2018; TOBIN, 2017).

A matriz extracelular dérmica (MEC), com seus componentes em quantidades ideais, confere resistência e resiliência à pele (COLE et al., 2018). Os fibroblastos são

responsáveis por sintetizar os componentes da MEC. Um dos principais mecanismos que está envolvido no processo de envelhecimento cutâneo é a degradação da matriz extracelular dérmica, sendo que as principais enzimas responsáveis por essa degradação são as metaloproteinases de matriz (MMP).

As metaloproteinases são uma família de enzimas zinco-dependentes que degradam a matriz extracelular, e são consideradas como importantes facilitadoras da invasão e disseminação tumoral. As MMP são classificadas de acordo com seu substrato específico como colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas e MMP associadas à membrana (GILL; PARKS, 2008). A expressão e atividade das MMP podem ser reguladas de diversos modos. Estudos mostram que os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPAR) são capazes de influenciar a expressão das MMP e a modulação da atividade desses receptores está relacionada com a redução da resposta inflamatória sistêmica e cutânea, o que os torna alvos interessantes para o tratamento antienvhecimento (KATSUYAMA et al., 2016; KIM et al., 2007; TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007).

## 1.2. Sistema Antioxidante

Um dos fatores que influencia no envelhecimento da pele é a geração de espécies reativas do oxigênio (ERO) que são produzidas normalmente pelas células durante processos metabólicos, como a respiração celular, ou por meio da exposição do organismo a fatores ambientais, como poluição, radiação ionizante, radiação ultravioleta, tabagismo e alcoolismo. O radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ), o ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), o óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) são promotores dos processos de degeneração na derme causando a diminuição da capacidade biossintética de fibroblastos dérmicos. Pequenas quantidades de ERO são geradas em resposta a estímulos internos e externos, porém

o aumento da produção associada a uma remoção inadequada de ERO resultam no estresse oxidativo (ARUOMA, 1998; RITTIÉ E FISHER, 2002; TIGGES et al., 2014).

Para prevenir a ocorrência de danos oxidativos que podem ser gerados pelas ERO, a pele possui um sistema de defesa antioxidante composto por moléculas enzimáticas e não-enzimáticas. O sistema antioxidante não-enzimático é formado por antioxidantes de baixo peso molecular como o ascorbato e a glutathione (GSH), e o sistema de defesa antioxidante enzimático é constituído pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR), e glutathione peroxidase (GPx) (BRIGANTI, S; PICARDO, 2003; BRIGANTI et al., 2014; FINKEL, T.; HOLBROOK, 2000).

Os sistemas antioxidantes da pele são responsáveis por manter a homeostase das células e do tecido através da remoção das espécies reativas de oxigênio geradas nos fibroblastos. A superóxido dismutase (SOD) é a enzima responsável por converter o radical ânion superóxido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ). A catalase é responsável por converter o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água e oxigênio molecular. Outra enzima responsável pela eliminação do  $H_2O_2$  é a glutathione peroxidase (ARUOMA, 1998; FINKEL, T.; HOLBROOK, 2000; MATÉS, J. M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, 1999; TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007).

### 1.3. Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais

Os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPAR) atuam alterando a expressão de enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante, como a SOD e a CAT. Os PPAR são fatores de transcrição ligante-dependente que regulam a expressão de genes alvo através da ligação a elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma localizados em sítios regulatórios de determinados genes. Existem três isoformas descritas deste receptor que são expressas na pele,

PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$  (EVANS; MANGELSDORF, 2014; POULSEN; SIERSBÆK; MANDRUP, 2012; TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007).

Na pele, as três isoformas do PPAR são expressas em células como queratinócitos e fibroblastos. Assim como outros receptores nucleares já tiveram sua importância reconhecida na manutenção da homeostase da pele, como receptores de hormônios tireoidianos, retinoides e vitamina D, estudos mostraram o papel do PPAR na diferenciação e homeostase da pele e revelaram o papel destes receptores como reguladores das MMP e do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), tendo assim influência na inflamação relacionada à idade e ao envelhecimento da pele (BRIGANTI, S; PICARDO, 2003; DI-POÏ et al., 2004; JEON et al., 2015).

Os PPAR são receptores ligantes dependentes que regulam a expressão de genes-alvos situados em sítios regulatórios de cada gene através da ligação aos elementos responsivos aos proliferadores de peroxissomas (PPRE). Ao ser ativado por um ligante, o PPAR $\gamma$  forma um heterodímero com outro receptor, o RXR (receptor do ácido 9-cis retinóico). O complexo formado liga-se ao PPRE e recruta co-ativadores com atividade acetiltransferase e essa ligação possibilita a transcrição gênica devido a uma mudança na estrutura da cromatina (GROMMES; LANDRETH; HENEKA, 2004; TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007).

Estudos vêm investigando o papel de agonistas de PPAR $\gamma$  na modulação da homeostase da pele, demonstrando que os agonistas totais de PPAR $\gamma$  são capazes de aumentar expressão e atividade das enzimas antioxidantes da pele e diminuir a expressão e atividade de metaloproteinases de matriz responsáveis pela degradação do colágeno (BRIGANTI et al., 2014; JEON et al., 2015; KIM; CHOI; KIM, 2014).

#### 1.4. Tiazolidinadionas e o GQ-16

A classe de fármacos antidiabéticos tiazolidinadionas (TZD) são compostos agonistas de PPAR $\gamma$  considerados potentes sensibilizadores à insulina, dentre eles estão a rosiglitazona, pioglitazona e ciglitazona. São medicamentos que foram introduzidos no mercado na década de 90 e utilizados no tratamento da diabetes tipo 2. Os fármacos desta classe têm como característica um anel diona em sua estrutura química e o restante da molécula difere entre as substâncias levando a uma especificidade farmacodinâmica e cinética. As TZD promovem a inibição da lipólise em adipócitos, redução dos níveis de ácidos graxos livres e geram maior sensibilidade à insulina e redução da produção hepática de glicose (KAHN et al., 2006).

Nos estudos realizados pelo grupo de pesquisa em inovação terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) foram desenvolvidos novos ligantes do PPAR $\gamma$  denominados GQ. Dentre eles foi sintetizado o GQ-16 [5-(5-bromo-2-metoxibenzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona], um composto não comercial que mostrou atividade agonista parcial do PPAR $\gamma$  (AMATO et al., 2012; COELHO et al., 2016).

O composto sintético GQ-16 demonstrou semelhanças com as TZD quanto ao aumento da sensibilidade à insulina endógena, mas apresenta atividade diferente das outras TZD pois compete pela ligação LBD do PPAR, induzindo à interação com o coativador do receptor de esteroide (SRC-1) e gerando uma mudança conformacional do receptor de forma diferente da rosiglitazona, um agonista total de PPAR $\gamma$  (AMATO et al., 2012; COELHO et al., 2016).

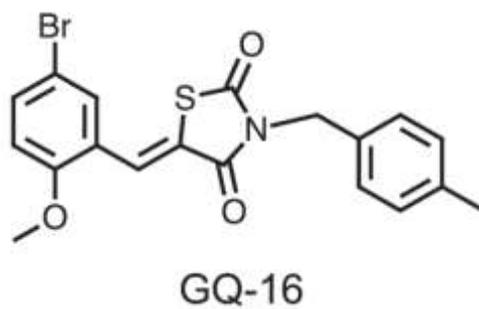


Figura 1. Estrutura química do GQ-16 (AMATO et al., 2012).

Por apresentar a capacidade de modular a atividade do PPAR $\gamma$ , este composto pode ser um candidato no que se refere ao combate ao envelhecimento precoce da pele.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do composto GQ-16 no estado redox de fibroblastos dérmicos humanos.

### 2.1. Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral deste estudo, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Avaliar a citotoxicidade do GQ-16 em fibroblastos dérmicos humanos.
- Avaliar a atividade da catalase em fibroblastos dérmicos humanos tratados com GQ-16.
- Avaliar a atividade da superóxido dismutase em fibroblastos dérmicos humanos tratados com GQ-16.
- Avaliar os níveis de espécies reativas de oxigênio intracelulares em fibroblastos dérmicos humanos tratados com GQ-16.
- Avaliar o efeito do GQ-16 nos níveis de peroxidação lipídica em fibroblastos dérmicos humanos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagem celular e cultivo.

Foi utilizada a linhagem de fibroblastos humanos CCD-1059SK. Para o cultivo das células, o meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) foi utilizado, acrescentado de 10% de soro fetal bovino e dos antibióticos penicilina e estreptomicina nas concentrações finais de 100 U/mL e 100 µg/mL, respectivamente. As culturas foram mantidas em placas Corning® de 148 cm<sup>2</sup> em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.2. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade do GQ-16 em cultura de fibroblastos.

A viabilidade celular dos fibroblastos tratados com o composto GQ-16 foi avaliada por meio do método 3-(4,5 dimetiliazol-2-il)2,5-difenil-tetrazólio (MTT), descrito por Mosmann (MOSMANN, 1983). Os fibroblastos foram incubados em uma placa de 96 poços, tendo em cada poço  $1 \times 10^4$  células. O tratamento dos fibroblastos foi realizado com o composto GQ-16 nas concentrações de  $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M e  $10^{-7}$  M. Após incubação por 24 h ou 48 h em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, umidade de 95% e temperatura de 37°C, o meio com tratamento foi removido e foram adicionados 100 µL de DMEM e 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL) em cada poço. A placa foi incubada por 4 horas. Para dissolução do sal de formazan, o meio de cultura foi retirado dos poços e 100 µL de solução reveladora (HCl 0,04 M em isopropanol) foram adicionados.

As placas foram deixadas sob agitação por 15 minutos à temperatura ambiente e a absorbância foi medida a 570 nm com auxílio de um leitor de placas Beckman Coulter DTX 800. A interpretação dos resultados foi feita por comparação entre os valores da absorbância obtidos nos poços tratados com o GQ-16 e os obtidos para o controle (células tratadas somente com o veículo utilizado no preparo da solução de GQ-16).

### 3.3. Avaliação da atividade da enzima catalase.

A atividade da enzima catalase foi avaliada de acordo com o método descrito por Aebi (AEBI, 1984), onde a atividade da CAT foi acompanhada através da diminuição da absorvância de  $H_2O_2$  no comprimento de onda de 240 nm.

Os fibroblastos dérmicos humanos foram incubados em uma placa de 6 poços na concentração de  $3 \times 10^5$  células por poço. As células foram tratadas por 48 horas com o veículo e a concentração de  $10^{-6}$  M. Após o tratamento, as células foram recolhidas e submetidas à lise celular através de ciclos de congelamento a  $-80^\circ C$  e descongelamento. Foi preparado o meio reacional com 650  $\mu L$  de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7, 300  $\mu L$  da solução de  $H_2O_2$  a 30 mM e imediatamente antes da leitura foram adicionados 50  $\mu L$  do lisado celular. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em modo cinético, no comprimento de onda de 240 nm durante 2 minutos. Uma unidade de CAT foi definida como a quantidade de CAT necessária para decompor 1  $\mu M$  de  $H_2O_2$  por minuto em pH 7 e temperatura de  $25^\circ C$ , e os resultados foram apresentados como unidade de CAT por miligrama de proteína (WEYDERT; CULLEN, 2010).

### 3.4. Avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase.

A avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase foi realizada através do método descrito por Briganti e Picardo (BRIGANTI e PICARDO, 2003), usando o sistema xantina/xantina oxidase como fonte doadora de ânion radical superóxido. O *nitro blue tetrazolium* (NBT) foi usado como indicador da reação. A SOD compete com o NBT pelo  $O_2^{\cdot -}$  e a quantidade de SOD presente é medida pela porcentagem de inibição da redução do NBT.

Os fibroblastos dérmicos humanos foram inoculados em uma placa de 6 poços na concentração de  $3 \times 10^5$  células por poço e submetidos a tratamento com o

composto GQ-16 na concentração de  $10^{-6}$  M por um período de 48 horas. Após o tratamento, as células foram recolhidas e foi realizada a lise celular através de ciclos de congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  e descongelamento.

Foi preparada uma solução de xantina na concentração de  $100\ \mu\text{M}$  e NBT  $60\ \mu\text{M}$  em tampão fosfato de potássio  $50\ \text{mM}$ , pH 7,8, contendo  $0,1\ \text{mM}$  de EDTA. Foram adicionadas  $50\ \mu\text{L}$  de lisado celular a  $900\ \mu\text{L}$  da solução de NBT  $60\ \mu\text{M}$  e de xantina  $100\ \mu\text{M}$ . Logo após, foi adicionada a enzima xantina oxidase às amostras e a leitura da absorbância foi realizada imediatamente no espectrofotômetro em modo cinético, por 5 minutos, no comprimento de onda de  $560\ \text{nm}$ . Os resultados foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (WEYDERT; CULLEN, 2010).

### 3.5. Avaliação da peroxidação lipídica

Para analisar o efeito do composto GQ-16 via PPAR $\gamma$ , os fibroblastos,  $3 \times 10^5$  células por poço em uma placa de 6 poços, foram tratados por 30 minutos com o antagonista do PPAR $\gamma$  T0070907 e, logo após, foram adicionados os tratamentos com GQ-16 ou rosiglitazona  $20\ \mu\text{M}$ , agonista de PPAR $\gamma$ , por 48 h. Após 12 h do tratamento o antagonista foi reaplicado. Posteriormente, o tratamento foi removido, as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline* – PBS) e então foi realizado o tratamento com  $300\ \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no poço controle por 1h e foi adicionado DMEM sem SFB nos demais poços. Ao término do período de tratamento o meio de cultura foi removido e adicionado DMEM em todos os poços durante 48h. A seguir, as células foram lavadas com PBS e  $1\ \text{mL}$  de KCL 1,15% foi adicionado em cada poço. As células foram recolhidas e submetidas a ciclos de congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  e descongelamento para obtenção do lisado celular. Para quantificação dos produtos da peroxidação lipídica, em uma placa de 96 poços foram adicionados  $10\ \mu\text{L}$  do lisado celular a  $5\ \mu\text{L}$  de dodecil sulfato de sódio (SDS)  $8,1\%$ ,  $37,5\ \mu\text{L}$  de ácido acético  $20\%$ ,  $37,5\ \mu\text{L}$  de ácido tiobarbitúrico (TBA)  $0,8\%$  e o volume da reação foi completado para  $200\ \mu\text{L}$  com água deionizada. O ácido tiobarbitúrico forma complexo

com o MDA, um produto da peroxidação lipídica, que pode ser medido por leitura de absorvância ou fluorescência. O meio reacional foi incubado por 30 min em estufa a 90°C e, após este período, a reação foi resfriada em banho de gelo. A fluorescência foi medida em espectrofluorímetro nos comprimentos de onda de excitação de 520 nm e emissão de 550 nm.

### 3.6. Quantificação dos níveis intracelulares de espécies reativas do oxigênio

A quantificação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio foi realizada utilizando o reagente 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA). Os fibroblastos dérmicos humanos foram incubados em placas de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^4$  células por poço e as células foram tratadas por 48 horas com as concentrações de  $10^{-7}$  M e  $10^{-6}$  M do composto GQ-16. Após o tratamento, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS, foram adicionados 100  $\mu$ L de solução de 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (20  $\mu$ M) e a placa foi incubada por 30 minutos (37°C/ 5% CO<sub>2</sub>/ 95% UR). Posteriormente, a solução de 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína foi removida, as células foram lavadas com PBS, 50  $\mu$ L de PBS foram adicionados a cada poço e a fluorescência produzida foi detectada em leitor de microplacas no comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 530 nm.

### 3.7. Análise estatística

Os resultados obtidos nos ensaios foram avaliados estatisticamente no programa *GraphPad Prism* (*GraphPad Prism Software*, versão 5.01). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro-padrão da média e o nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Avaliação da citotoxicidade do GQ-16 aos fibroblastos dérmicos humanos.

A viabilidade celular das CCD1059SK tratadas com o GQ-16 foi determinada pela quantidade de cristais de formazan formados e expressa em porcentagem, sendo a viabilidade do controle considerada 100%. As células foram consideradas viáveis quando apresentaram viabilidade celular  $\geq 70\%$ , conforme parâmetros estabelecidos na ISO 10993-5:2009(E).

Foi analisada a influência do DMSO, veículo utilizado para diluir o GQ-16, na viabilidade celular. O tratamento com o DMSO no período de 24 h apresentou toxicidade para o DMSO 5% e no tratamento de 48 h o DMSO apresentou-se tóxico nas duas concentrações testadas (Figura 2). Por apresentar menor toxicidade, os estudos tiveram continuidade com a diluição do GQ-16 em DMSO na concentração de 0,5% (1  $\mu\text{L}$ ) por poço.

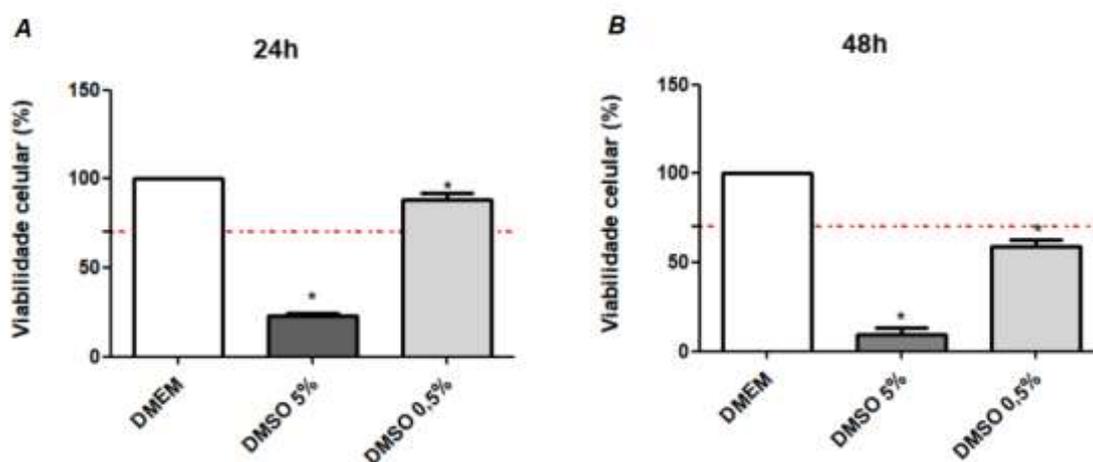


Figura 2. Viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos tratados com DMSO. A viabilidade celular de fibroblastos foi avaliada pelo ensaio de MTT após 24 h e 48 h de tratamento com diferentes concentrações do veículo utilizado. Os resultados apresentados representam a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de células viáveis. A) Tratamento de 24 h com diferentes concentrações do veículo; B) tratamento de 48 h com diferentes concentrações do veículo. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett (\*,  $p < 0,05$  vs controle).

O tratamento dos fibroblastos com o composto GQ-16 mostrou que o composto foi capaz de proteger as células dos danos gerados pelo DMSO, apresentando diferença estatística para os tratamentos de 48 h nas concentrações de  $10^{-7}$  M e  $10^{-6}$  M. O tratamento de  $10^{-6}$  M apresentou uma viabilidade celular superior a 70% no tratamento de 24 h e 48 h, não sendo, portanto, considerado tóxico para as células (Figura 3). Essa concentração foi escolhida para a realização dos demais ensaios.

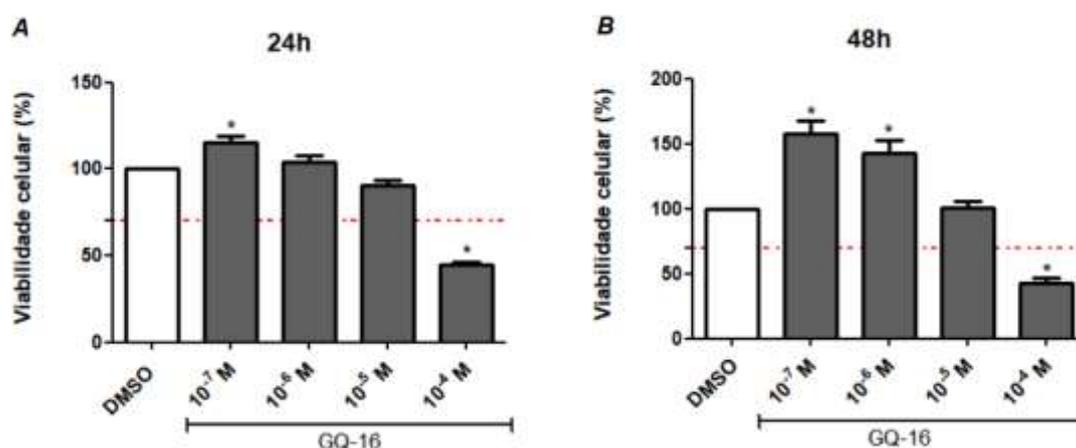


Figura 3. Viabilidade celular de fibroblastos dérmicos humanos tratados com o composto GQ-16. A viabilidade celular de fibroblastos foi avaliada pelo ensaio de MTT após 24 h e 48 h de tratamento com diferentes concentrações do GQ-16. Os resultados apresentados representam a média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de células viáveis. A) Tratamento de 24 h com diferentes concentrações do composto GQ-16; B) Tratamento de 48 h com diferentes concentrações do composto GQ-16. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett (\*,  $p < 0,05$  vs controle).

#### 4.2. Avaliação da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase em fibroblastos tratados com GQ-16.

A atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase nas células tratadas com o composto GQ-16 foram avaliadas e os resultados estão apresentados nas figuras 4 e 5.

Como observado pelos resultados obtidos, o tratamento com o GQ-16 não alterou a atividade da SOD e da catalase nas células, quando comparado ao controle (DMSO).

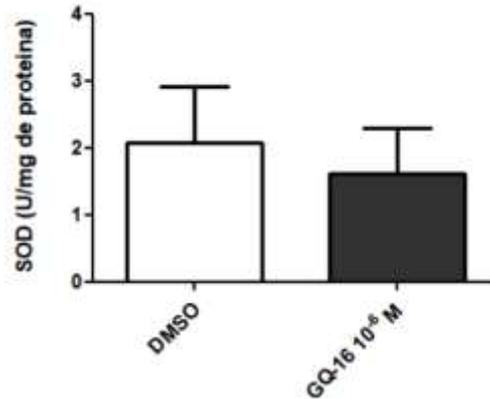


Figura 4. Avaliação da atividade de superóxido dismutase em fibroblastos tratados com o composto GQ-16 na concentração de 10<sup>-6</sup> M no período de 48 h. Os resultados apresentados representam a média ± desvio padrão e foram avaliados estatisticamente pelo Teste t, não pareado.

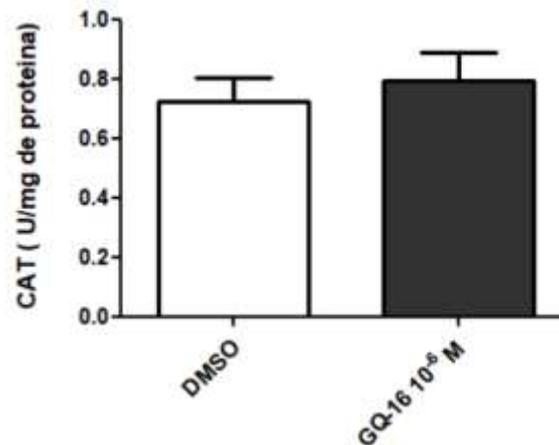


Figura 5. Ensaio de avaliação da atividade da enzima catalase em fibroblastos tratados com o composto GQ-16 na concentração de 10<sup>-6</sup> M no período de 48 h. Resultados expressos como média ± desvio padrão e avaliados estatisticamente pelo Teste t, não pareado.

#### 4.3. Avaliação dos níveis intracelulares de espécies reativas do oxigênio nas células tratadas com GQ-16.

O tratamento prévio dos fibroblastos com o composto GQ-16 nas concentrações de 10<sup>-7</sup> M e 10<sup>-6</sup> M diminuiu a intensidade da fluorescência do DCFH-DA internalizado pelas células, indicando uma diminuição da concentração de espécies reativas de oxigênio intracelular (Figura 6).

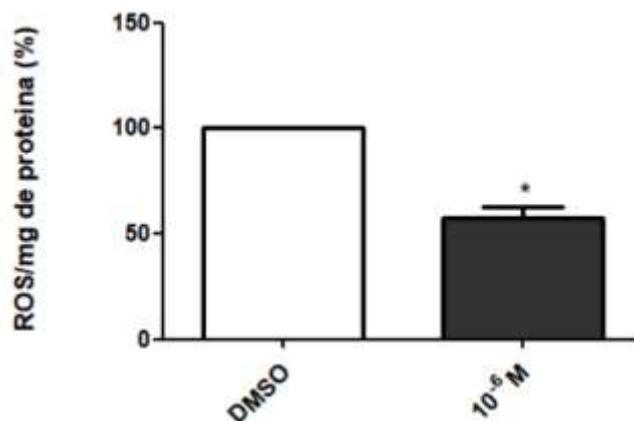


Figura 6. Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio por fluorescência. Os fibroblastos foram tratados com diferentes concentrações do composto GQ-16 e após 48 h foram tratados com DCFH-DA. A fluorescência do composto formado (DCFoxi) pela oxidação do DCFH pelas espécies reativas de oxigênio foi detectada no comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 530 nm. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão e avaliados estatisticamente pelo Teste t, não pareado.

#### 4.4. Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica das células tratadas com GQ-16.

Para avaliar o efeito do GQ-16 nos níveis de oxidação dos lipídeos nas células, o principal produto da peroxidação lipídica das células, o malondialdeído (MDA) das células foi quantificado por complexação com o ácido tiobarbitúrico.

Os resultados obtidos (Figura 7) mostraram que o veículo, DMSO, aumentou a peroxidação lipídica nas células e o composto GQ-16 e a rosiglitazona apresentaram uma tendência em inibir a peroxidação lipídica. A presença do antagonista não alterou a ação do composto GQ-16, mas reverteu a da rosiglitazona.

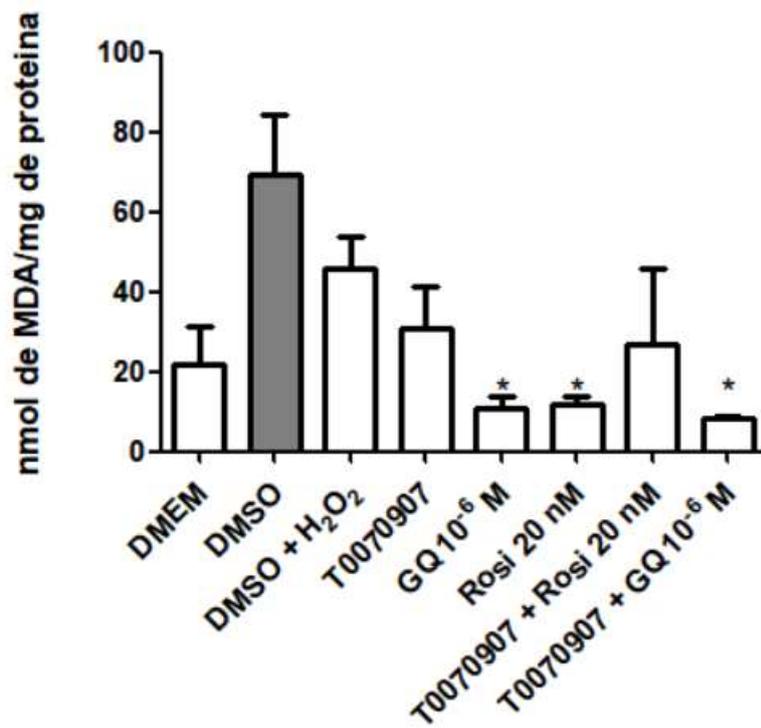


Figura 7. Concentração de MDA nas células tratadas com GQ-16, AT0070907 e rosiglitazona. Os fibroblastos foram tratados e, após a reação do lisado celular com o ácido tiobarbitúrico, a leitura da fluorescência foi feita a 520 nm para excitação e 550 nm para emissão. Os resultados apresentados representam média  $\pm$  erro médio, o n=1. Resultados avaliados pela análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett (\*,  $p < 0,05$  vs controle).

## 5. DISCUSSÃO

Uma das vias para diminuir os efeitos das ERO baseia-se na utilização de substâncias que combatam o estresse oxidativo e, assim, restabeleçam o equilíbrio do estado redox das células (MARIA et al., 2014; SINGH; AGARWAL, 2009). Os agonistas de PPAR vêm sendo estudados quanto ao seu efeito no estado redox das células, principalmente pelo envolvimento destes receptores na expressão de enzimas antioxidantes.

Inicialmente, foi realizada uma análise de citotoxicidade para verificar a concentração de GQ-16 que poderia ser utilizada para tratamento dos fibroblastos. Como já descrito na literatura, o veículo utilizado, DMSO demonstrou-se tóxico quando utilizado em uma concentração superior a 1% (Figura 2) (L. Hyunjin et al., 2017). O composto GQ-16 demonstrou ser capaz de proteger as células de possíveis danos gerados pelo DMSO, em diferentes concentrações, para o tratamento de 24 h e 48 h (Figura 3). Visando minimizar as interferências em ensaios futuros a concentração de DMSO foi fixada em 0,5% no máximo e a concentração de  $10^{-6}$  M de GQ-16 foi escolhida para continuar os ensaios.

A modulação das enzimas antioxidantes pode minimizar os possíveis danos gerados pelo estresse oxidativo, promovendo uma melhora na homeostase da pele pela diminuição de espécies reativas de oxigênio. A SOD e a catalase são consideradas as mais importantes no sistema de defesa enzimático, trabalhando em conjunto para a eliminação do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio, respectivamente (MATÉS, J. M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, 1999).

A atividade da enzima superóxido dismutase foi avaliada através de um método indireto, usando o sistema xantina/xantina oxidase para gerar o radical ânion superóxido, que reduz o NBT, usado como indicador. A enzima SOD presente nas células sequestra o ânion radical superóxido e, portanto, a quantidade de SOD presente no meio reacional pode ser medida através da porcentagem da inibição da redução do NBT (WEYDERT; CULLEN, 2010).

A catalase é uma enzima antioxidante importante na defesa celular contra o estresse oxidativo, pois decompõe o  $H_2O_2$ , produzido pela dismutação do ânion radical superóxido na reação catalisada pela SOD, em  $H_2O$  e  $O_2$ . A atividade desta enzima foi avaliada através do monitoramento da taxa de decomposição de  $H_2O_2$  por espectrofotometria, no comprimento de 240 nm (Aebi, 1984).

Estudos demonstram que agonistas totais de PPAR $\gamma$  foram capazes de aumentar os níveis de SOD e catalase (BRIGANTI et al., 2014; KATSUYAMA et al., 2016; KHOO et al., 2013). Entretanto, este efeito não foi observado para o agonista parcial de PPAR $\gamma$ , o composto GQ-16 (Figura 4 e 5).

O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) desempenha um papel importante no envelhecimento cutâneo extrínseco e intrínseco, e a geração de ERO estimula a formação de processos inflamatórios na pele. Uma das consequências na inflamação mediada por ERO é a ativação de fatores de transcrição que regulam a degradação proteolítica da matriz extracelular dérmica. A pele fotoenvelhecida mostra um aumento da renovação anormal da MEC, levando a um aumento da degradação das fibras de colágeno e elastinas da derme (COLE et al., 2018; PILLAI; ORESAJO; HAYWARD, 2005). Os compostos antioxidantes ajudam a inibir a geração de ERO, protegendo a pele do processo de envelhecimento.

Para quantificar as ERO intracelulares foi utilizado o método da fluoresceína e os resultados obtidos sugerem que o composto GQ-16 na concentração de  $10^{-6}$  M apresenta atividade quimioprotetora, visto que reduziu a concentração de ERO intracelular (Figura 6).

Produtos da peroxidação lipídica podem ser mutagênicos e cancerígenos, devido a sua reatividade com bases do DNA, criando danos que não podem ser reparados. Os danos gerados também afetam os lipídios da membrana, levando a uma alteração da fluidez da membrana ou disfunção de receptores celulares ligados à membrana (KAMMEYER; LUITEN, 2015). Os resultados iniciais obtidos no ensaio de

peroxidação lipídica mostram uma tendência do composto GQ-16 em diminuir o processo de peroxidação lipídica, medida pela quantidade de MDA nas células (Figura 7), porém, diferentemente do efeito observado para a rosiglitazona, esse efeito não pode ser revertido pela presença de um antagonista de PPAR $\gamma$ . Outros ensaios devem ser conduzidos para o entendimento do mecanismo de proteção que o GQ-16 promove nas células.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho possibilitam concluir que, apesar do composto GQ-16 não ter demonstrado efeito sobre a atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD, apresentou um potencial quimioprotetor em fibroblastos dérmicos humanos devido à sua capacidade de diminuir a quantidade de ERO intracelulares e da tendência em diminuir a concentração de produtos da peroxidação lipídica. Mais estudos precisam ser feitos para avaliar e investigar essa atividade quimioprotetora promissora.

## 7. REFÊRENCIA BIBLIOGRAFICA

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, United States, v. 105, p. 121-126, Feb. 1984. ISSN: 1557-7988.

AL-NUAIMI, Y.; SHERRATT, M. J.; GRIFFITHS, C. E. M. Skin health in older age. **Maturitas**, v. 79, n. 3, p. 256–264, 2014.

AMATO, A. A. et al. GQ-16, a novel peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) ligand, promotes insulin sensitization without weight gain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 33, p. 28169–28179, 2012.

ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 2, p. 199–212, 1998.

BRIGANTI, S; PICARDO, M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. **European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 17, p. 663–669, 2003.

BRIGANTI, S. et al. Modulation of PPAR $\gamma$  provides new insights in a stress induced premature senescence model. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

COELHO, M. S. et al. GQ-16, a TZD-derived partial PPAR $\gamma$  agonist, induces the expression of thermogenesis-related genes in brown fat and visceral white fat and decreases visceral adiposity in obese and hyperglycemic mice. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–20, 2016.

COLE, M. A. et al. Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our. **Journal of Cell Communication and Signaling**, p. 35–43, 2018.

DI-POI, N. et al. Functions of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in

skin homeostasis. **Lipids**, v. 39, n. 11, p. 1093–1099, 2004.

EVANS, R. M.; MANGELSDORF, D. J. Nuclear receptors, RXR, and the big bang. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 255–266, 2014.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **NATURE**, v. 22, n. 10, p. 954–956, 2000.

GILL, S. E.; PARKS, W. C. Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 40, n. 6–7, p. 1334–1347, 2008.

GROMMES, C.; LANDRETH, G. E.; HENEKA, M. T. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonists. **Lancet Oncology**, v. 5, n. 7, p. 419–429, 2004.

JEON, Y. et al. Abietic acid inhibits UVB-induced MMP-1 expression in human dermal fibroblast cells through PPAR $\alpha$ / $\gamma$  dual activation. **Experimental Dermatology**, v. 24, n. 2, p. 140–145, 2015.

KAHN, S. E. et al. Glycemic Durability of Rosiglitazone, Metformin, or Glyburide Monotherapy. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 23, p. 2427–2443, 2006.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R. M. Oxidation events and skin aging. **Ageing Research Reviews**, v. 21, p. 16–29, 2015.

KATSUYAMA, Y. et al. 3-O-Laurylglyceryl ascorbate activates the intracellular antioxidant system through the contribution of PPAR- $\gamma$  and Nrf2. **Journal of Dermatological Science**, v. 82, n. 3, p. 189–196, 2016.

KHOO, N. K. H. et al. Differential activation of catalase expression and activity by PPAR agonists: Implications for astrocyte protection in anti-glioma therapy. **Redox**

**Biology**, v. 1, n. 1, p. 70–79, 2013.

KIM, B.; CHOI, Y. E.; KIM, H. S. Eruca sativa and its flavonoid components, quercetin and isorhamnetin, improves skin barrier function by activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\alpha$  and suppression of inflammatory cytokines. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 9, p. 1359–1366, 2014.

KIM, H. K. Garlic supplementation ameliorates UV-Induced photoaging in hairless mice by regulating antioxidative activity and MMPs expression. **Molecules**, v. 21, n. 1, 2016.

KIM, K. H. et al. Pro-MMP-2 activation by the PPAR $\gamma$  agonist, ciglitazone, induces cell invasion through the generation of ROS and the activation of ERK. **FEBS Letters**, v. 581, n. 17, p. 3303–3310, 2007.

MARIA, A. et al. Exploring the antioxidant potential of Helichrysum stoechas ( L . ) Moench phenolic compounds for cosmetic applications : Chemical characterization , microencapsulation and incorporation into a moisturizer. v. 53, p. 330–336, 2014.

MATÉS, J. M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, I. N. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. **CLINICAL BIOCHEMISTRY**, v. 32, p. 595–603, 1999.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

PILLAI, S.; ORESAJO, C.; HAYWARD, J. Ultraviolet radiation and skin aging: Roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - A review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 27, n. 1, p. 17–34, 2005.

POULSEN, L. LA C.; SIERSBÆK, M.; MANDRUP, S. PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 23, n. 6, p.

631–639, 2012.

SINGH, R. P.; AGARWAL, R. Cosmeceuticals and silibinin. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 5, p. 479–484, 2009.

TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (Ppargama): estudo molecular na homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e abordagem terapêutica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 4, p. 526–533, 2007.

TIGGES, J. et al. The hallmarks of fibroblast ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 138, n. 1, p. 26–44, 2014.

TOBIN, D. J. Introduction to skin aging. **Journal of Tissue Viability**, v. 26, n. 1, p. 37–46, 2017.

WEYDERT, C. J.; CULLEN, J. J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. **Nature Protocols**, v. 5, n. 1, p. 51–66, 2010.