



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE

**Efeito do agonista parcial do PPAR γ , GQ-16, na viabilidade das células de
câncer mamário em cultura**

ANNA PAULA BARROS FERREIRA

BRASÍLIA, 2015

ANNA PAULA BARROS FERREIRA

**Efeito do agonista parcial do PPAR γ , GQ-16, na viabilidade das células de
câncer mamário em cultura**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia como requisito
parcial para obtenção do título de Bacharel
em Farmácia.

Orientadora: Prof(a). Carine Royer

Co-Orientadora: Prof(a). Izabel Cristina Rodrigues da Silva

BRASÍLIA, 2015

ANNA PAULA BARROS FERREIRA

**Efeito do agonista parcial do PPAR γ , GQ-16, na viabilidade das células de
câncer mamário em cultura**

BANCA EXAMINADORA

ORIENTADORA: Dra. Carine Royer

(Faculdade de Ceilândia – Universidade de Brasília)

Convidada: Dra. Djane Braz Duarte

(Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília)

Convidado: Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento

(Faculdade de Ceilândia – Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, 2015

“Que os farmacêuticos descubram o verdadeiro sentido de serem profissionais de saúde: ‘fazer a diferença na vida do outro’.”

Ramalho de Oliveira

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, discernimento, sabedoria, coragem, saúde, maturidade e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais, Eduardo e Bethânia, que apesar da distância física, sempre se fizeram presentes, acreditaram e apoiaram o meu sonho. Aos meus irmãos Marcos e Giovanna, por me ajudarem a amadurecer. Muito obrigada pelo exemplo de honestidade, dignidade e por terem me dado o maior bem, a vontade de aprender. Sem vocês eu não teria conseguido.

As minhas vovós, Lucy e Socorro, pela oração, carinho, preocupação e incentivo. Aos tios e primos que foram como pais e irmãos nestes 5 anos. Especialmente Tio Roge, Cléia e Tia Aparecida.

Um imenso obrigada à minha orientadora, Dra. Profa Carine Royer, por ter acreditado e abraçado a ideia deste trabalho, por ter sido sempre presente, paciente, amiga, incentivadora e pelo tratamento maternal. Obrigada por ter escolhido esta profissão.

A minha co-orientadora Profa Izabel Cristina, por toda a atenção e ensinamentos.

Aos membros da banca por terem gentilmente aceito o convite.

As minhas grandes amigas Anna Luísa, Laene e Wanessa pelas risadas e companheirismo. Aos amigos Henrique e José, pela amizade, ajuda e companhia no laboratório. Especialmente ao Umberto, pelo carinho, atenção e por tudo. Aos meus colegas de curso, que fizeram estes 5 anos serem maravilhosos.

Aos professores Paulo Barboni, Flávia Reis e Wilton Andrade, pelo exemplo de professores que foram para mim.

A profa Djane Braz por ter cedido os fármacos utilizados neste trabalho. A todos os profissionais e colegas do Farmol que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse concretizado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação do PPARγ.....	17
Figura 2. Estrutura química da Rosiglitazona, Pioglitazona e GQ-16.....	21
Figura 3. Conversão do sal tetrazolium MTT em formazan (produto corado) pela ação da enzima mitocondrial succinato desidrogenase.....	26
Figura 4. Viabilidade celular em células tumorais (MCF-7) da mama após tratamento com agonista total de PPARγ. rosiglitazona (ROSI).....	30
Figura 5. Viabilidade celular em células tumorais (MCF-7) da mama após tratamento com agonista parcial de PPARγ. GQ-16.....	31

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Representação esquemática do procedimento experimental para o estudo do efeito citotóxico de agonistas de PPAR γ sobre células de câncer mamário MCF-7.	27
--	----

LISTA DE ABREVIações

AG	Ácidos Graxos
ATM	mutante de ataxia telangiectasia
BRCA	<i>Breast Cancer susceptibility gene</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer susceptibility gene-1</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer susceptibility gene-2</i>
CDK	Ciclina dependente de quinase
DM2	Diabete mellitus tipo 2
FABP	<i>Fatty-acid-binding proteins</i>
FAC	Fuorouracil, doxorrubicina e ciclofosfamida
FEC	Fluorouracil, epirrubicina e ciclofosfamida
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
IC	Insuficiência cardíaca
IL-6	Interleucina 6
INCT	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
LBD	<i>ligand-binding domain</i>
MCF-10A	<i>Michigan cancer foundation-10A</i>
MCF-7	<i>Michigan cancer foundation-7</i>
MDA-MB-231	Célula de adenocarcinoma mamário com receptor de estrógeno-negativo.
MRP	Proteína associada a resistência a multidrogas
MTT	Brometo de 3(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio
NF-κB	Factor nuclear κB
PAX8	<i>Paired box 8</i>
PPAR	Receptor ativado por proliferador peroxissomal
PPARE	Elemento responsivo do receptor ativado por proliferadores peroxissomais
PPARα	Receptor alfa ativado por proliferador peroxissomal
PPARβ/δ	Receptor beta-delta ativado por proliferador peroxissomal
PPARγ	Receptor gama ativado por proliferador peroxissomal
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RE	Receptor de estrogênio

RE -	Receptor de estrogênio negativo
RE +	Receptor de estrogênio positivo
RN	Receptor nuclear
RP	Receptor de progesterona
RXR	Receptor do ácido 9-cis retinóico
SFB	Soro Fetal Bovino
SRC-1	<i>steroid receptor coactivator-1</i>
TNF α	<i>Tumor necrosis fator α</i>
TZD	Tiazolidineidionas
VDR	Receptor de vitamina D

SUMÁRIO

1	Introdução	12
1.1	Câncer de mama	12
1.1.1	Patologia	12
1.1.2	Tratamento.....	14
1.1.3	Limitações do tratamento	15
1.2	Receptor ativado por proliferador peroxissomal (PPAR)	16
1.2.1	PPAR γ e o câncer	18
1.2.2	Agonistas totais do PPAR γ	19
1.2.3	Agonistas Parciais do PPAR γ	20
2	Justificativa.....	23
3	Objetivos gerais e específicos	24
3.1	Objetivo geral	24
3.2	Objetivos Específicos	24
4	Materiais e Métodos	25
4.1	Células	25
4.2	Cultivo Celular	25
4.3	Tratamento das células	25
4.4	Ensaio de citotoxicidade	26
4.5	Análise estatística.....	28
5	Resultados	29
6	Discussão.....	32
7	Conclusões finais	38
8	Referências bibliográficas	39

RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo. As células tumorais dispõem de vários mecanismos de resistência ao tratamento quimioterápico, por isso torna-se pertinente a busca de novos fármacos para serem utilizados no tratamento dessa patologia. Estudos tem mostrado que os agonistas dos receptores ativados por proliferadores peroxissomais γ (PPAR γ) são um alvo promissor no desenvolvimento de fármacos usados para o tratamento de diversos tipos de câncer, inclusive câncer mamário. Fármacos dessa classe incluem as tiazolidineidionas (TZDs), agonistas totais do PPAR γ , porém esta classe está associada a efeitos adversos graves. Os efeitos adversos dos agonistas totais de PPAR γ poderiam ser contornados pelo uso de agonistas parciais. Diante disso, estudos anteriores mostraram que GQ-16 apresentou atividade agonista parcial e específica em PPAR γ , e efeitos semelhantes às TZDs e com menor efeito adipogênico. Assim, poderia este composto ter o efeito antitumoral observado aos agonistas totais sem os efeitos adversos? Para isso foi realizado o ensaio de MTT (brometo de 3(4,5dimetiliazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio) em linhagem celular tumoral da mama humana MCF-7 com rosiglitazona e GQ-16 (10^{-8} – 10^{-4} M) por 24 e 48 horas (h). Foi observado que a rosiglitazona (10^{-4} M) diminuiu a viabilidade celular apenas em 48h de tratamento (49%). O GQ-16 foi capaz de diminuir a viabilidade celular nas concentrações 10^{-6} – 10^{-4} M em 48h de tratamento em até 75,81% na maior concentração. Nossos resultados sugerem que o GQ-16 é um alvo promissor para o estudo de fármacos com potencial atividade antitumoral.

Palavras Chave: Receptor ativado por proliferadores peroxissomal, GQ-16, câncer de mama, MCF-7.

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent cancer in women around the world. The tumor cells have several mechanisms of resistance to chemotherapy treatment, therefore, it is relevant the searching for new drugs for the treatment of this pathology. Studies have shown that agonists of peroxisome proliferator-activated receptors γ (PPAR γ) are a promising target in the development of drugs for treatment of various cancers, including breast cancer. Drugs in this class includes thiazolidineidiones (TZDs), total PPAR γ agonists, however, with serious side-effects. Recently, was proposed that adverse effects of totals PPAR γ agonists could be avoided using partial agonists. Previous studies showed that GQ-16 presents partial agonist activity and specificity to PPAR γ and showed performance similar to TZDs but with decreased adipogenic effect. Therefore, could this drug show antitumor effects similar to those reported in total agonist studies? MTT (3 bromide (4, 5dimetiltiazol-2il)-diphenyl tetrazolium- -2.5) assay was used in human breast tumor cell lines (MCF-7) with different doses of rosiglitazone and GQ-16 (10^{-8} - 10^{-4} M) for 24 and 48 hours. Results show that rosiglitazone decreased cell viability only after 48 h of treatment (49%) on concentration of 10^{-4} M. On the other hand, GQ-16 was able to decrease cell viability on concentrations of 10^{-6} - 10^{-4} M in 48h of treatment, with a 75,81%-inhibition effect at its highest concentration. Our results indicate that GQ-16 is a promising target for antitumor activity research.

Keywords: Peroxisome proliferator-activated receptor, GQ-16, breast cancer, MCF-7.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Na população mundial, a sobrevida após cinco anos da doença permanece com valores entre 50% e 60% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

Para o Brasil, em 2014, eram esperados 57.120 novos casos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres. Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer é o mais frequente nas mulheres das regiões Sudeste (71,18/ 100 mil), Sul (70,98/ 100 mil), Centro-Oeste (51,30/ 100 mil) e Nordeste (36,74/ 100 mil). Na região Norte, é o segundo tumor de maior incidência (21,29/ 100 mil) (BRASIL, 2013).

Devido à crescente incidência, mortalidade e ao elevado custo no tratamento desta doença, o câncer de mama representa um grave problema de saúde pública em todo o mundo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011).

1.1.1 Patologia

O câncer de mama decorre da proliferação maligna de células epiteliais que revestem os ductos ou lóbulos da mama e recentemente foi subdividido em pelo menos cinco subtipos, baseado no seu perfil de expressão gênica (LONGO et al., 2013):

- i) Luminal A: este tipo de câncer apresenta os mais altos níveis de expressão do receptor de estrogênio e apresentam maior probabilidade de responder à terapia endócrina, porém respondem menos à quimioterapia;
- ii) Luminal B: semelhantes à mama normal: as células tumorais também se originam do epitélio luminal, mas com expressão gênica diferente do luminal A e com prognóstico pior;
- iii) Semelhantes à mama normal: apresentam expressão gênica semelhante às células não tumorais da mama. Tem prognóstico semelhante ao grupo B;

- iv) HER2 amplificado: apresentam amplificação no gene HER2, no cromossomo 17q e tem prognóstico ruim se não tratados com trastuzumabe, um anticorpo monoclonal inibidor do HER2/neu;
- v) Basal: são tumores negativos para os receptores de estrogênio, progesterona e HER2, também conhecidos como triplo-negativos. Apresentam características de células progenitoras. Pacientes com mutações em BRCA também se encaixam nessa classificação.

Alguns fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama são bem conhecidos. Histórico familiar de câncer de mama aumenta em cerca de 2 a 3 vezes o risco de desenvolver essa neoplasia quando comparado a mulheres que não têm casos de câncer de mama na família (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011). A idade é um dos principais fatores de risco. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos. Após essa idade o aumento é mais lento, reforçando o papel dos hormônios femininos na etiologia da doença. Outros fatores também devem ser considerados, como: uso de anticoncepcionais, amamentação, número de gestações, consumo de álcool, excesso de peso, sedentarismo, exposição à radiação ionizante e alta densidade do tecido mamário, entendido como a razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011; BRASIL, 2013; LONGO et al., 2013).

Alterações nos mecanismos que regulam a proliferação e diferenciação celular podem modificar a fisiologia da célula normal e contribuir para o surgimento de um tumor (AMENDOLA & VIEIRA, 2005). A carcinogênese é um processo em que as células se tornam malignas por meio de mutações progressivas e cumulativas, que ocorrem por estímulo físico, químico ou biológico ao material genético. As células dispõem de mecanismos de reparos que conseguem reverter estas lesões, porém algumas não são reparadas ou são reparadas de maneira incorreta, surgindo assim as mutações. Quando essas mutações alteram o funcionamento de proto-oncogenes e genes supressores de tumor, que regulam a proliferação e sobrevivência das células, inicia-se o processo de transformação neoplásica. (MACLEOD, 2000)

As mutações em proto-oncogenes são geralmente dominantes, e basta que um dos alelos esteja alterado para que o fenótipo neoplásico seja manifestado. A mutação neste gene confere uma proliferação celular contínua e independente de estímulos externos. Entre os proto-oncogenes, está o c-erbB-2 (HER2) (MACLEOD, 2000).

Os genes supressores de tumor regulam positivamente a apoptose e negativamente a proliferação celular. Mutações nestes genes, como por exemplo, BRCA1 e BRCA2, aumentam o risco de desenvolver câncer de mama (BRASIL, 2013; LONGO et al., 2013), embora essas mutações sejam raras e contribuam para uma parcela mínima (10-15%) de casos de câncer de mama (NEWMAN et al., 1998). Mutações em outros genes como o PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), p53 e ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), correspondem a 1% e o restante são genes ainda não descritos (PONDER, 2001).

1.1.2 Tratamento

Um importante parâmetro utilizado para escolha do melhor tipo de tratamento para o câncer de mama é o nível de estadiamento. Essa avaliação tem como objetivo proporcionar um bom prognóstico às pacientes de câncer de mama. O estadiamento clínico do câncer de mama envolve o cálculo aproximado do tamanho do tumor e a estimativa do envolvimento dos linfonodos axilares, pelo exame físico e a mamografia. Os tumores invasivos podem ser classificados em: estágio I (tumores primários, confinados à mama e operáveis), estágio II (tumores com envolvimento ou não dos linfonodos axilares móveis e operáveis), estágio IIIa (tumores localmente avançados acompanhados ou não por envolvimento de linfonodos axilares), estágio IIIb (lesões mais avançadas) e estágio IV (todos os tumores metastáticos) (SINGLETERY & CONNOLLY, 2006)

O câncer de mama deve ser abordado por uma equipe multidisciplinar visando o tratamento integral do paciente. As modalidades terapêuticas principais disponíveis atualmente são a cirúrgica e a radioterápica para tratamento loco-regional e terapia hormonal e quimioterápica para o tratamento sistêmico (BRASIL., 2004; LONGO et al., 2013).

As mulheres com indicação de mastectomia como tratamento primário podem ser submetidas à quimioterapia neoadjuvante, seguida de tratamento cirúrgico conservador, complementado por radioterapia. Para aquelas que apresentarem receptores hormonais positivos, também é recomendado o tratamento hormonal (LONGO et al., 2013; SWEETMAN, 2014).

O tratamento hormonal pode ser feito com altas doses de estrogênio, o que confere efeitos colaterais graves, como tromboembolia. Carcinomas RE-negativos

(Receptores de Estrogênio-negativo) e RP-negativos (Receptor de Progesterona-negativo) não respondem à terapia hormonal (BRUNTON et al., 2012).

A abordagem antiestrogênica pode ser adotada em pacientes com risco baixo (LONGO et al., 2013; SWEETMAN, 2014) e em carcinomas com receptores hormonais positivos, com o principal representante da classe o tamoxifeno, que é um modulador seletivo de receptor de estrogênio (BRUNTON et al., 2012). Já naquelas com risco elevado, o tratamento será condicionado à avaliação dos seguintes fatores: responsividade aos hormônios, presença de menopausa e comprometimento nodal (LONGO et al., 2013; SWEETMAN, 2014).

Esquemas de tratamento quimioterápico como o FAC (fluorouracil, doxorrubicina e ciclofosfamida) ou FEC (fluorouracil, epirrubicina e ciclofosfamida), ou cinco anos de tratamento com tamoxifeno, são os mais antigos e mais utilizados (SWEETMAN, 2014). Essas combinações podem reduzir pela metade, aproximadamente, a taxa de mortalidade por câncer-RE positivo (com receptor de estrógeno). Contudo, ainda existem riscos significativos de recorrência e morte (CLARKE et al., 2005).

1.1.3 Limitações do tratamento

Tratamentos quimioterápicos convencionais com apenas um fármaco inclui a acessibilidade limitada do fármaco ao tecido tumoral, levando a elevação da dose, que pode levar a citotoxicidade intolerável e não específica (CLARKE et al., 2005; DAS et al., 2009). Além disso, muitos fármacos utilizados atualmente para o tratamento de câncer de mama não se acumulam seletivamente no tecido tumoral, assim como a maioria dos agentes farmacológicos administrados pela via intravenosa. Esses são uniformemente distribuídos para todos os órgãos e tecidos do corpo, o que, somando-se à alta pressão intersticial no ambiente tumoral, desfavorece o acúmulo de agentes citotóxicos nas lesões neoplásicas (BOSSLET et al., 1998; JAIN et al., 1998).

As células neoplásicas dispõem de uma série de mecanismos potenciais para impedir a ação de antineoplásicos podendo levar a 2 tipos de resistência ao tratamento quimioterápico: i) primária, que independe de exposição prévia, ou ii) secundária causada pelo tratamento inadequado de células sensíveis, levando ao surgimento de clones resistentes. À medida que o tumor começa a crescer novamente, a quimioterapia pode falhar porque as células tumorais remanescentes são agora resistentes (PERSIDIS, 1999).

A presença de duas bombas moleculares na membrana das células tumorais tem sido relacionada a resistência à terapia antineoplásica. Essas bombas são a glicoproteína P e a proteína associada a resistência a multidrogas (MRP). Ambas agem expulsando as drogas quimioterápicas do interior das células, que é o mecanismo pelo qual a célula tenta se proteger dos efeitos tóxicos da droga e processos moleculares no interior do núcleo e do citoplasma (PERSIDIS, 1999).

Jing e colaboradores (2001) descreveram que a β -arrestin 2, uma proteína envolvida em muitos aspectos do desenvolvimento tumoral, também está associada ao mecanismo de resistência aos quimioterápicos. O aumento da expressão dessa proteína desencadeava na resistência às drogas e o silenciamento desta traz o aumento da sensibilidade celular ao tratamento.

Conhecer os mecanismos de resistência aos antineoplásicos pode ser uma ferramenta essencial para o desenvolvimento de fármacos e planejamento da terapia oncológica (FUCHS & WANNMACHER, 2010).

1.2 Receptor ativado por proliferador peroxissomal (PPAR)

Os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs) pertencem à superfamília de receptores nucleares (RN), que inclui receptores de estrógeno (REs), receptor do ácido 9-cis retinóico, (RXRs), e receptores de vitamina D (VDR), os quais são ativados por ligantes e atuam na regulação da transcrição (DONG, 2013). Existem três isoformas de PPAR, PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ , cada um codificado por um gene diferente e também apresentam distribuição tecidual distinta (ABDULJABBAR et al., 2015).

Os PPARs ativam a expressão gênica como heterodímeros com outro RN, o RXR. O heterodímero PPAR-RXR se liga a sequências específicas de DNA localizadas na região regulatória ou promotora de genes-alvo, conhecidas como elementos responsivos ao PPAR (PPREs), e, quando ativado por agonistas, regula a transcrição gênica (figura 1) (GROMMES, CHRISTIAN et al., 2004; YOUSSEF & BADR, 2011).

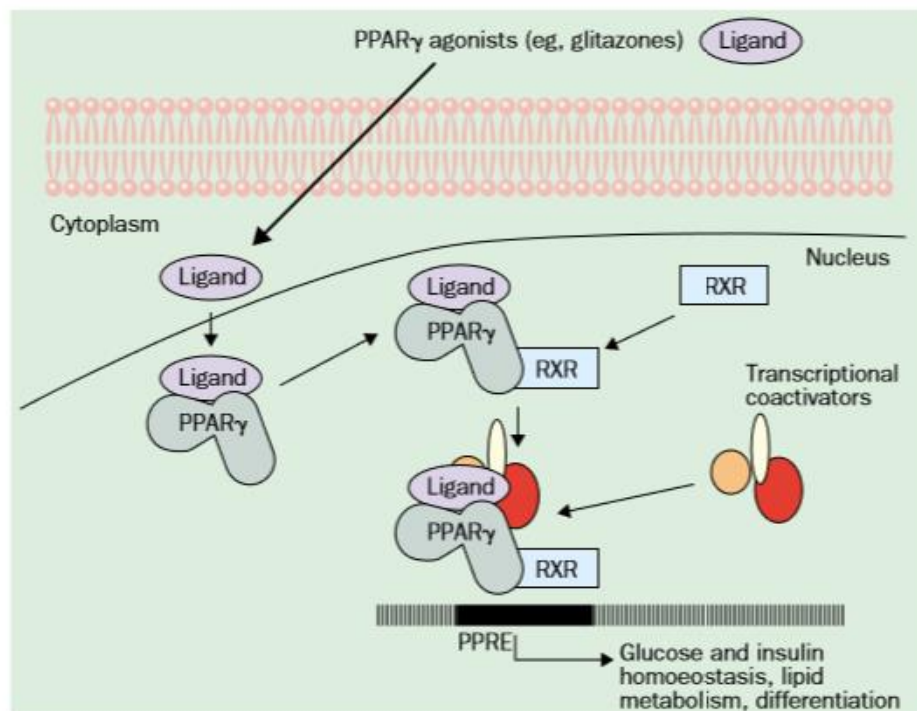


Figura 1. Ativação do PPAR γ . Depois de se ligar ao seu ligante, PPAR γ forma heterodímeros com RXR no núcleo, onde ligam-se a sequência específica de elementos responsivos (PPER) do PPAR para regular a transcrição dos genes alvo, responsáveis por controlar a homeostase de insulina e glicose, metabolismo de lipídeos e diferenciação celular (GROMMES, CHRISTIAN et al., 2004).

Uma variedade de compostos lipídicos endógenos, como ácidos graxos não saturados, eicosanóides e prostaglandinas ativam os PPARs, com baixa afinidade de ligação, na faixa micromolar. Dentre eles, o principal ligante endógeno é o metabólito da prostaglandina 15-deoxi Δ 12-14-prostaglandina-J2 (15d-PGJ2) (BRUNTON et al., 2012; FORMAN et al., 1995; ROSEN & SPIEGELMAN, 2001; SZANTO & NAGY, 2008; SZELES et al., 2007).

O gene que codifica o PPAR γ origina três RNAs mensageiros, PPAR γ 1, PPAR γ 2 e PPAR γ 3. O PPAR γ 1 e γ 3 codificam a mesma proteína, o PPAR γ 1, e o PPAR γ 2 codifica a isoforma PPAR γ 2, que se distingue pela presença de 28 aminoácidos adicionais na extremidade amino-terminal (HEIKKINEN et al., 2007). Diversos tipos celulares expressam baixos níveis de PPAR γ 1, entre eles adipócitos, pneumócitos, células epiteliais do cólon, bexiga, mama e próstata, células musculares cardíacas e esqueléticas, células vasculares e macrófagos. O PPAR γ 2, em contraste, é expresso seletivamente e em altos níveis no tecido adiposo (MICHALIK et al., 2006; ROSEN & SPIEGELMAN, 2001).

Vários estudos demonstram que o PPAR γ está envolvido em processos fisiológicos que incluem adipogênese, metabolismo da glicose e inflamação. Além disso, em estudos prévios este receptor também apresentou importante função na regulação do ciclo celular por inibir o crescimento e induzir a diferenciação de adipócitos, monócitos macrófagos e células de câncer (ELSTNER et al., 1998; TONTONZOZ et al., 1994; TONTONZOZ et al., 1997). A maioria dos estudos *in vitro* revelaram que os ligantes do PPAR γ têm uma potente atividade anti-proliferativa contra uma ampla variedade de células (KOEFFLER, 2003) por exemplo, de células humanas de câncer de mama (ELSTNER et al., 1998; MUELLER et al., 1998). Portanto, foi sugerido que esses ligantes podem ser de uso benéfico como um novo adjuvante na quimioterapia de muitos cânceres como cólon, próstata e câncer de mama (KOEFFLER, 2003).

1.2.1 PPAR γ e o câncer

O efeito de agonistas de PPAR sobre a carcinogênese é ainda bastante controverso. PPAR γ é o subtipo de PPAR mais abundante nas glândulas mamárias, bem como no câncer de mama (ABDULJABBAR et al., 2015). Em tecidos humanos, o gene PPAR γ é expresso em células normais e pode sofrer mutações em alguns tipos de câncer. Uma mutação do PPAR γ foi detectada em câncer do cólon em que ocorre uma translocação cromossômica que produz uma fusão oncogênica de proteínas envolvendo PPAR γ . Como exemplo, no carcinoma folicular da tireoide, ocorre a fusão PAX8-PPAR γ (LUI et al., 2005), sugerindo que o PPAR γ pode ser oncogênico. É expresso tanto nos tecidos mamários malignos, quanto nos normais, contudo o seu nível de expressão é frequentemente superior em tecidos cancerosos (DITSCH et al., 2012). Porém, não se pode afirmar que um aumento da expressão em células de câncer significa necessariamente um papel oncogênico no desenvolvimento do tumor (DONG, 2013).

A função do PPAR no desenvolvimento do tumor também é controversa. Alguns estudos mostram que a ativação de PPAR γ previne o câncer em alguns tecidos como o de cólon, mama, próstata. Este efeito se deve a inibição do crescimento de células e aumento da apoptose de linhagens celulares de câncer humano. Em alguns casos, os agonistas PPAR γ têm mostrado modesta eficácia na quimioprevenção em ensaios clínicos (GROMMES, CHRISTIAN et al., 2004; KOEFFLER, 2003).

Não há um consenso quanto ao mecanismo de ação dos PPARs no câncer, algumas hipóteses foram levantadas para explicar os efeitos observados. Foi reportado que a ativação do PPAR γ inibe o crescimento celular (GARCIA-BATES et al., 2008), e promove diferenciação e apoptose em vários tipos de células cancerosas (BONOFIGLIO et al., 2009). A ativação do PPAR γ pela rosiglitazona mostrou uma mudança na permeabilidade da membrana mitocondrial, um importante passo na indução da apoptose celular (BONOFIGLIO et al., 2009). Este efeito foi bloqueado na presença de um antagonista específico do PPAR γ , bem como em células pré-tratadas com um antisenso para o supressor de tumor p53 (BONOFIGLIO et al., 2009). Também foi visto que a ativação do PPAR γ resultou em suprarregulação de mRNA do p53, sugerindo um papel importante do p53 na apoptose mediada por PPAR γ em células MCF-7 (YAMAKAWA-KARAKIDA et al., 2002).

Alguns estudos indicam que ativação do PPAR γ em combinação com agente quimioterápico pode aumentar a eficácia dos efeitos induzidos por monoterapias (DEMETRI et al., 1999; HAMAGUCHI et al., 2010; YOKOYAMA et al., 2011). Demetri e colaboradores, relataram que pacientes com lipossarcoma e que receberam o agonista do PPAR γ troglitazona, tiveram um retardamento do crescimento do tumor e houve a indução da diferenciação das células desse tumor.

Uma interação entre o PPAR α e PPAR γ foi demonstrada por Papi e colaboradores (2013). Estimulada pelo fator nuclear pró-inflamatório κ B (NF- κ B), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF α), o PPAR α desencadeava um mecanismo de sobrevivência das células tronco do câncer de mama. O PPAR γ quando ativado, induzia a inibição do PPAR α , contrabalanceando a maquinaria de sobrevivência das células.

De fato, vários estudos demonstram a implicação do PPAR γ no câncer. No entanto, devido a resultados controversos, a função deste receptor nesta patologia necessita de estudos adicionais.

1.2.2 Agonistas totais do PPAR γ

Entre os ligantes sintéticos do PPAR γ , estão os sensibilizadores insulínicos tiazolidinedionas (TZDs) como a pioglitazona, rosiglitazona e troglitazona

(HEIKKINEN et al., 2007; LEHMANN et al., 1995; SZELES et al., 2007), que funcionam como agonistas totais deste receptor. Agonistas de PPAR γ da classe das TZDs são utilizados como sensibilizadores insulínicos no tratamento do DM2, e foram avaliados como terapia para outras condições associadas à resistência insulínica, incluindo doença hepática gordurosa não alcoólica, síndrome dos ovários policísticos e lipodistrofias, com bons resultados (YKI-JÄRVINEN, 2004). Estudos com modelos animais (LI et al., 2000) e com humanos (PFUTZNER et al., 2005) também indicam seu potencial efeito antiaterogênico.

Embora seu efeito no tratamento do diabetes seja bem estabelecido na prática clínica (YKI-JÄRVINEN, 2004), a utilização das TZDs está associada a diversos efeitos adversos (RUBENSTRUNK et al., 2007). O efeito adverso melhor caracterizado como ligante-específico é a hepatotoxicidade idiosincrática observada com o uso da troglitazona, que motivou a suspensão de sua comercialização. Efeitos de classe, comuns a todas as TZDs, incluem ganho ponderal por aumento da adiposidade, edema, hemodiluição e expansão do volume plasmático (RUBENSTRUNK et al., 2007; SEMPLE et al., 2006), com insuficiência cardíaca (IC) em até 15% dos pacientes (HEIKKINEN et al., 2007). 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 (NISSEN & WOLSKI, 2007).

O aumento de insuficiência cardíaca congestiva é o que mais preocupa no tratamento com as TZDs, o que fez com que a rosiglitazona fosse retirada do mercado em alguns países (BRUNTON et al., 2012; NISSEN & WOLSKI, 2007).

1.2.3 Agonistas Parciais do PPAR γ

O envolvimento do PPAR γ em diversos processos fisiológicos tornou o desenvolvimento de agonistas desse receptor uma estratégia promissora para o tratamento de doenças humanas. Essas mesmas características, em conjunto com o amplo padrão de expressão do PPAR γ , no entanto, também representam desvantagens, uma vez que a ativação suprafisiológica do receptor por agonistas poderia aumentar o risco de efeitos adversos em tecidos ou tipos celulares não envolvidos nessas doenças (GELMAN et al., 2007). De fato, diversos efeitos adversos

são descritos em associação com a utilização das TZDs que são agonistas totais de PPAR γ .

Recentemente foi proposto que os efeitos adversos dos agonistas totais de PPAR γ poderiam ser contornados pelo uso de agonistas parciais (GUASCH et al., 2012). 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 (benzilideno-tiazolidinediona) em PPAR γ de pró-monócitos humanos U-937. Esse composto, diferentemente das TZDs clássicas, apresentou atividade agonista parcial e específica 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).

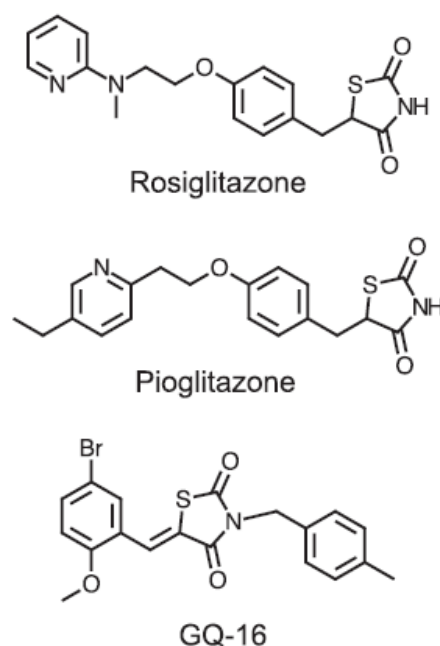


Figura 2. Estrutura química da Rosiglitazona, Pioglitazona e GQ-16 (AMATO et al., 2012).

O GQ-16 também apresentou potencial adipogênico em cultura de células ao aumentar a expressão da proteína ligadora de ácidos graxos (FABP) adipocitária, um marcador específico de adipócitos diferenciados. No entanto esse efeito foi inferior ao observado com o tratamento da rosiglitazona. Ainda, estudos *in vivo* evidenciaram

também melhora da tolerância à glicose e da sensibilidade insulínica em modelo murino de obesidade (AMATO et al., 2012). Esse novo composto sintético, QG-16, mostrou resultados promissores nos estudos realizados até o momento, pois mostrou os mesmos efeitos benéficos das TZDs na sensibilidade insulínica, sem os clássicos efeitos adversos de retenção hídrica e ganho de peso.

Outros estudos também mostraram o efeito benéfico de outros agonistas parciais de PPAR γ na sensibilidade insulínica, sem efeitos colaterais clássicos como ganho de peso ocasionado por agonistas totais deste receptor nuclear (LIU et al., 2015; MING et al., 2014). No entanto, poucos estudos mostram a atividade desses agonistas em células tumorais. Poderiam esses agonistas parciais ter algum efeito sobre células de câncer de mama?

2 JUSTIFICATIVA

Devido ao grande número de casos de câncer de mama e por vezes a não responsividade aos tratamentos atuais, torna-se pertinente a busca de possíveis novos fármacos para serem utilizados no tratamento dessa patologia. Estudos mostraram que as TZDs, agonistas totais de PPAR γ , apresentam atividade antitumoral em células de câncer de mama, porém esta classe de medicamentos está associada a vários efeitos adversos graves.

Uma vez que o GQ-16, agindo como agonista parcial de PPAR γ , mostrou efeitos semelhantes às TZDs na redução da glicemia e com menor efeito adipogênico, poderia este composto ter o efeito antitumoral observado aos agonistas totais sem os efeitos adversos?

3 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a atividade antitumoral do agonista parcial do PPAR γ , GQ-16, em linhagem celular tumoral da mama humana (MCF-7).

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito citotóxico de diferentes concentrações da rosiglitazona sobre as células MCF-7 em 24 e 48 horas de tratamento;

Estudar o efeito de diferentes concentrações do composto GQ-16 sobre a citotoxicidade de células MCF-7 em 24 e 48 horas de tratamento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Células

A MCF-7 (ATCC® HTB-22TM) é uma linhagem celular de células epiteliais, isoladas a partir de uma efusão pleural de uma mulher caucasiana com 69 anos que apresentava câncer da mama metastático. Possuem características aderentes, crescimento em monocamada e apresentam receptores de estrogênio (ER+) (LEVENSON & JORDAN, 1997). Estas células também expressam o PPAR γ (JAIN et al., 1998). Proteínas do PPAR estão localizadas no citoplasma e regiões perinuclear (JIANG, W. G. et al., 2000). A linhagem utilizada neste trabalho foi cedida pelo Instituto Ludwig de Pesquisa do Câncer.

4.2 Cultivo Celular

A linhagem celular foi mantida em meio RPMI Medium 1640 (GIBCO, cat. 31800-014) 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 placa de 96 poços. Inicialmente se realizou um experimento com 1x10³ ou 5x10³ células por poço para verificar qual a quantidade ideal de células MCF-7. Diante do resultado desse experimento, nos experimentos posteriores foram utilizadas 5x10³ células por poço.

4.3 Tratamento das células

Após 24 horas do plaqueamento na placa de 96 poços, as células foram tratadas com controle negativo DMSO 0,01% agonista total do PPAR γ , rosiglitazona; agonista parcial do PPAR γ , GQ-16; e como controle positivo os antineoplásicos paclitaxel e cisplatina, por 24 e 48 h em meio sem a suplementação com SFB. Em cada poço foram adicionados 80 μ L dos fármacos diluídos em meio de cultura específico para cultivo de cada linhagem celular para obtenção das concentrações específicas de cada tratamento de acordo com outros estudos. GQ-16 foi cedido pelo Professor Ivan da Rocha Pitta (Universidade Federal de Pernambuco) e rosiglitazona (*American Radiolabeled Chemicals*, cat. 71740) foram utilizados em concentrações

de 10^{-4} a 10^{-8} M em conformidade com estudos prévios do Laboratório de Farmacologia Molecular (AMATO et al., 2012), Paclitaxel 50 μ M (Accord, lote:R08168) (CARNEIRO et al., 2011) e Cisplatina 50 μ g/mL (Bergamo, lote: 1304156) (ELIAS et al., 2015).

4.4 Ensaio de citotoxicidade

O MTT é um ensaio colorimétrico descrito como um método útil e bastante utilizado para medir a citotoxicidade e proliferação celular *in vitro*. A quantidade de células viáveis pode ser estimada por meio da leitura espectrofotométrica. Este é um ensaio simples e conta com segurança nos resultados obtidos (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 (figura 3). 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).

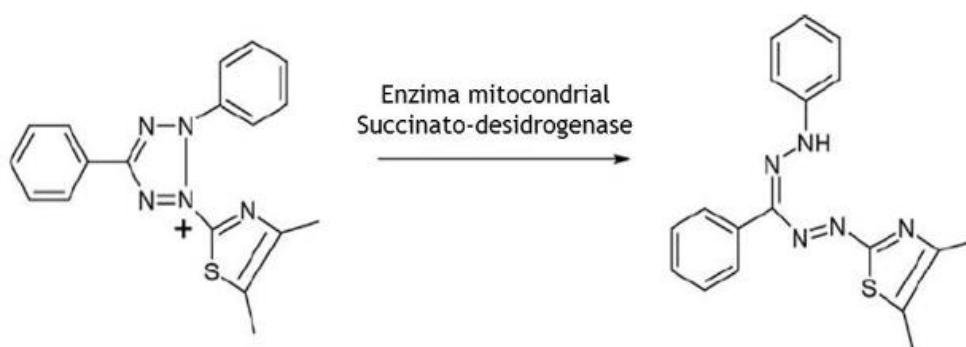
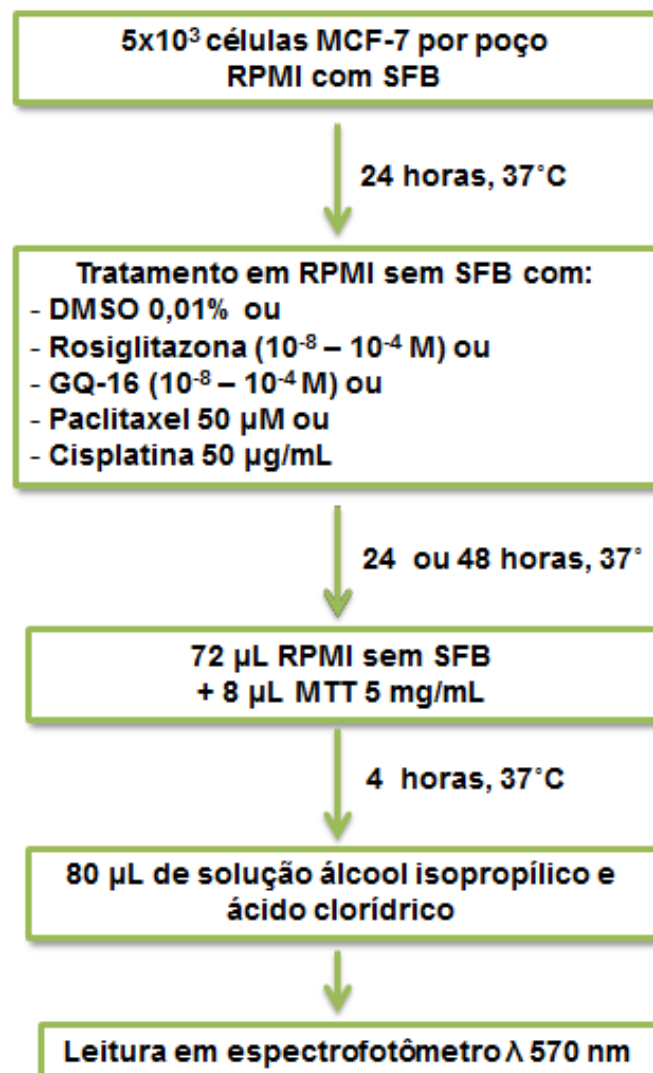


Figura 3. Conversão do sal tetrazolium MTT em formazan (produto corado) pela ação da enzima mitocondrial succinato desidrogenase

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 ou 48 horas, dependendo do tratamento realizado, cada poço teve o seu conteúdo líquido aspirado e então adicionados 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. Os testes foram realizados em setuplicata para 24 h e quadruplicata para 48 h, e em 11 ensaios distintos considerando a variabilidade inerente à técnica (fluxograma).



Fluxograma 1. Representação esquemática do procedimento experimental para o estudo do efeito citotóxico de agonistas de PPAR γ sobre células de câncer mamário MCF-7.

4.5 Análise estatística

Para analisar possíveis diferenças na viabilidade das células entre os diferentes tratamentos com as drogas agonistas realizou-se, inicialmente, um teste de repetibilidade para averiguar o índice de correlação intraclassa (ICC) dos experimentos após 24 e 48 horas de tratamento. Assumido um resultado de boa repetibilidade ($ICC \geq 0,75$) destes, as variáveis foram testadas quanto ao tipo de distribuição por meio do teste de normalidade de Shapiro Wilk. Em seguida, a homogeneidade de variâncias foi analisada por meio do teste de Levene. Devido aos valores de significância de p encontrados nos métodos de Shapiro Wilk ($p > 0,05$) e no de Levene ($p > 0,05$) a diferença de médias foi analisada por meio de uma estatística paramétrica. Ainda, para comparações entre o controle (sem tratamento) e os tratamentos com as drogas agonistas em um dado tempo, foi utilizado ANOVA one way com pós teste de Dunnet (unicaudal). O nível de significância adotado foi de 5%. O programa estatístico utilizado foi o SPSS (versão 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), e para os gráficos, o GraphPrism versão 5.0

5 RESULTADOS

Para estudar o efeito de agonistas de PPAR γ sobre a viabilidade de células de câncer mamário MCF-7 foram realizados ensaios de MTT em diferentes concentrações de ligantes e tempos de tratamento.

A figura 4 mostra o efeito do agonista total rosiglitazona (ROSI) em diferentes concentrações (10^{-8} - 10^{-4} M) por 24 e 48 horas de tratamento sobre a linhagem celular de adenocarcinoma mamário. Pode-se observar que em 24 h de tratamento a rosiglitazona não reduziu a viabilidade celular em nenhuma concentração estudada, comparado ao controle negativo (0,01% DMSO). Já em 48 h de tratamento apenas a concentração de 10^{-4} M diminuiu a viabilidade das células em 49% quando comparado ao controle negativo. O controle negativo DMSO foi utilizado pois os ligantes de PPAR γ foram inicialmente diluídos em DMSO para depois fazer as diluições conforme a curva de concentração.

Nesta figura também pode-se observar que o controle positivo Paclitaxel (50 μ M) não apresentou efeito sobre a viabilidade de células de câncer mamário em nenhum tempo estudado. Do contrário, a Cisplatina (50 μ g/mL), outro controle positivo, mostrou efeito citotóxico em ambos os tempos, com 56,35% em 24 horas e 71,67% em 48 horas de tratamento, respectivamente, quando comparado ao controle negativo.

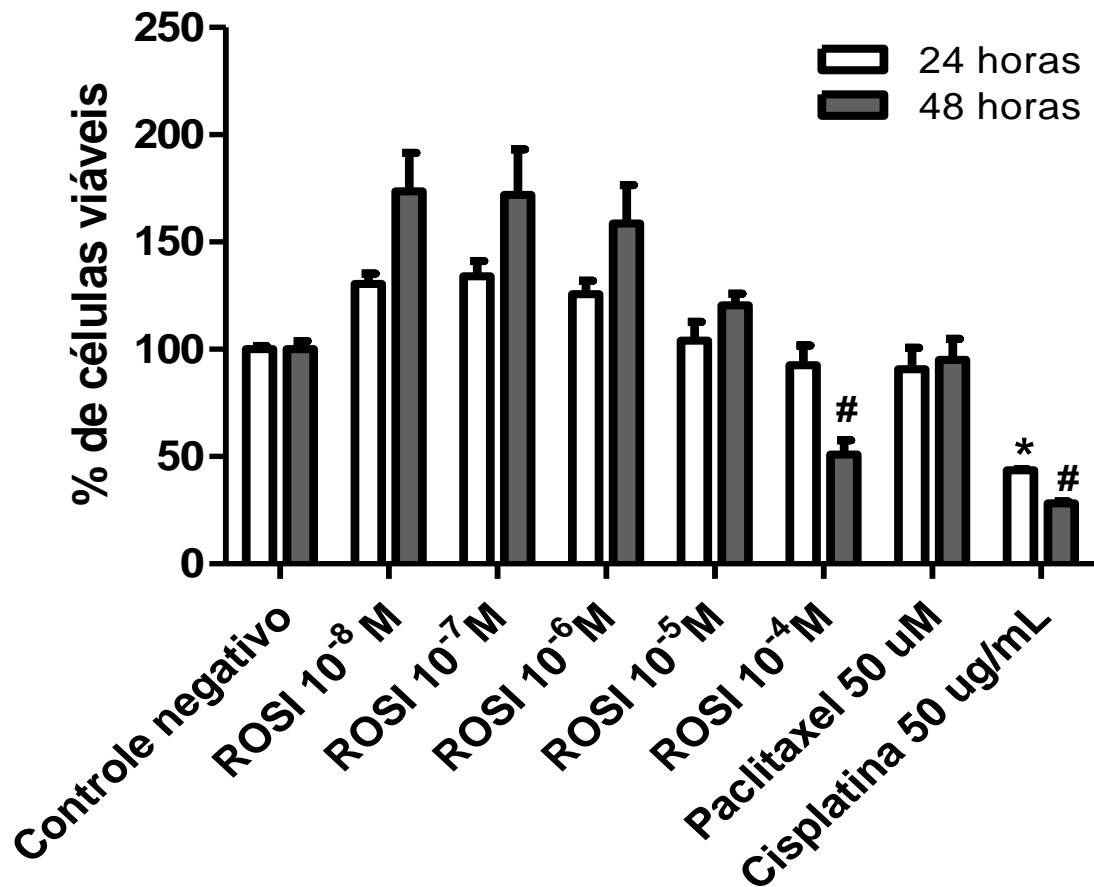


Figura 4. Viabilidade celular em células tumorais (MCF-7) da mama após tratamento com agonista total de PPAR γ rosiglitazona (ROSI). As células MCF-7 foram tratadas por 24 ou 48 horas controle negativo (0,01% DMSO), com o agonista total de PPAR γ rosiglitazona em diferentes concentrações (10⁻⁴–10⁻⁸M), ou com os controles positivos Paclitaxel 50 μ m ou Cisplatina 50 μ g/mL. (*): P<0,005, quando comparado ao controle negativo (24h, pós teste de Dunnet unicaudal); (#) P<0,005, quando comparado ao controle negativo (48h, pós teste de Dunnet unicaudal). As barras representam as médias, e as barras de erro, o Erro Padrão da média.

O agonista parcial de PPAR γ , GQ-16 mostrou ter efeito citotóxico sobre as células de câncer mamário na concentração de 10⁻⁴ M (redução da viabilidade em 41,09%) já em 24 horas de tratamento, diferente do que foi observado com o agonista total. Quando o tratamento foi de 48 horas, esse agonista parcial diminuiu a viabilidade de células de câncer mamário nas concentrações 10⁻⁶ M (36,92%), 10⁻⁵ M (39,08%) e 10⁻⁴ M (75,81%) quando comparado ao controle negativo (DMSO 0,01%). 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.

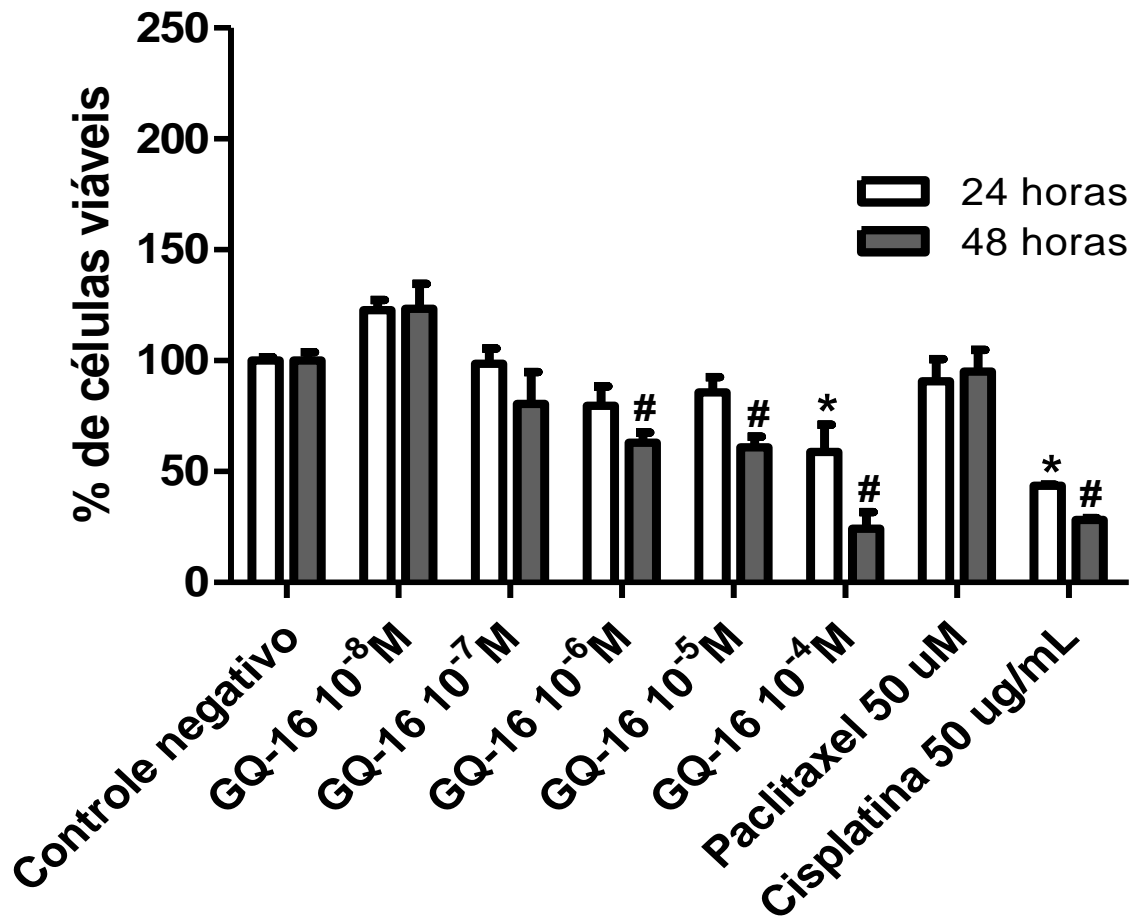


Figura 5. Viabilidade celular em células tumorais (MCF-7) da mama após tratamento com agonista parcial de PPAR γ GQ-16. As células MCF-7 foram tratadas por 24 ou 48 horas com o controle negativo (0,01% DMSO), agonista parcial de PPAR γ GQ-16 em diferentes concentrações (10⁻⁴–10⁻⁸ M), ou com os controles positivos Paclitaxel 50 μ M ou Cisplatina 50 μ g/mL. (*) P<0,005: quando comparado ao controle negativo (24 h, pós teste de Dunnet unicaudal); # P<0,005, quando comparado ao controle negativo (48h, pós teste de Dunnet unicaudal). As barras representam as médias, e as barras de erro, o Erro Padrão da média.

O efeito inibitório da viabilidade celular da rosiglitazona e do GQ-16, neste presente estudo, sugere ser dependente da dose e do tempo de tratamento.

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 animais de obesidade e resistência insulínica, e também em humanos (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 no intuito de desenvolver agonistas parciais de PPAR γ que apresentem os efeitos benéficos das TZDs sem apresentar os efeitos adversos como retenção hídrica e ganho de peso (AMATO et al., 2012; MING et al., 2014; PAL et al., 2014).

Em estudos prévios do laboratório de Farmacologia Molecular, o GQ-16 mostrou 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 antiinflamatória e sobre a viabilidade de células de câncer.

O tecido adiposo é o tecido com o maior nível de expressão do PPAR γ , porém este receptor também é expresso em vários outros tecidos e tipos de células do corpo,

como monócitos e macrófagos (WU & LAZAR, 1998), fígado (DUBOIS et al., 1998; VIDAL-PUIG et al., 1996), músculo esquelético (PARK et al., 1997), mama e próstata (KUBOTA et al., 1998).

O PPAR γ também é alvo de estudo em câncer. Já foi demonstrado que agonistas do PPAR γ interferem no crescimento de glioblastoma (GROMMES, C. et al., 2006) e inibem o crescimento de células tronco de tumor cerebral (CHEARWAE & BRIGHT, 2008). Tratamento *in vitro* com células de câncer de pulmão com ativadores do PPAR γ resultou em diferenciação e apoptose das células (CHANG & SZABO, 2000; INOUE et al., 2001; SATOH et al., 2002). Vários estudos mostram que a ativação do PPAR γ diminui o crescimento celular, migração e capacidade invasiva de células do câncer pancreático (ADRIAN et al., 2008; KUMEI et al., 2009; MOTOMURA et al., 2004; MOTOMURA et al., 2000; TOYOTA et al., 2002; TSUJIE, 2003).

Entre vários tecidos cancerosos, o da mama tem significativa capacidade adipogênica. A modulação do metabolismo de gordura tem sido associada a alteração do crescimento de células cancerosas e apoptose. No estudo realizado por KIM e colaboradores (2006), a rosiglitazona induziu a diferenciação das células MCF-7 e aumentou o acúmulo de lipídeos. Já o KR-62980, outro agonista de PPAR γ não alterou a diferenciação e teve menor efeito no acúmulo de lipídeos. Com esses dados, pode-se sugerir que a ativação do PPAR γ pode ter efeitos diferentes nas células do câncer dependendo do tipo de ligante.

O papel do PPAR γ no câncer de mama ainda não é bem definido. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que ligantes do PPAR γ podem suprimir o crescimento do câncer de mama. Porém, dois modelos murinos geneticamente modificados mostraram que a super expressão do PPAR γ no tecido mamário acelera o desenvolvimento de tumores da mama e a perda de um alelo do PPAR γ , reduzindo a sua expressão, também aumentou o risco de desenvolver o câncer (KOEFFLER, 2003). Por isso, o papel do PPAR γ e seus ligantes no câncer de mama necessitam de mais estudos.

No presente estudo, os tratamentos com o agonista total de PPAR γ rosiglitazona por 24 h promoveram uma tendência à diminuição da viabilidade celular, porém não de forma significativamente estatística. Já em 48h de tratamento observou-se que a rosiglitazona promoveu a diminuição da viabilidade celular de

células MCF-7 em 49%, quando comparado ao controle negativo. A falta de efeito da rosiglitazona sobre a viabilidade de células de câncer de mama também foi observado por Bonofiglio e colaboradores (2009). Esse estudo realizou o tratamento com rosiglitazona 10^{-7} M por 48 horas em diferentes linhagens de câncer de mama. Apenas a associação de rosiglitazona com ligante do receptor RXR, 9-cis-ácido retinóico (9RA) foi visto uma diminuição significativa da viabilidade celular, bem como aumento da expressão do RNA mensageiro e proteína do gene supressor de tumor p53.

Alguns estudos mostram que tratamentos *in vivo* e em linhagem de células MCF-7 com TZDs nas concentrações de 10^{-6} M e 10^{-5} M foram capazes de inibir a proliferação e induzir diferenciação das células tumorais (ELSTNER et al., 1998; MUELLER et al., 1998). O tratamento com rosiglitazona (10-50 μ M) por 72 h diminuiu a viabilidades das células MCF-7 e na dose de 50 μ M, chegou a inibição de 50% (SEARGENT et al., 2004). Esses estudos utilizaram a mesma faixa de concentração de rosiglitazona utilizadas no presente estudo. Ainda, os estudos em que a rosiglitazona apresentou efeito antitumoral foi realizado por um período de tempo superior ao do presente estudo o que evidencia a necessidade de períodos maiores de tratamento com esse agonista.

O presente estudo mostrou que a rosiglitazona em concentrações menores apresentou tendência a aumentar a viabilidade de células de câncer mamário. Resultados antagônicos dependentes da dose de rosiglitazona utilizada no tratamento também foram observados por Talbert e colaboradores (2008). Nesse estudo foi demonstrado que o tratamento de células MCF-7 com rosiglitazona por 3 dias em altas doses (50 μ M) inibiam a proliferação celular e em baixas doses (10 μ M) aumentava a proliferação.

Taxanos, um dos principais grupos de drogas anticâncer, é representado principalmente pelo paclitaxel, um composto natural. Esta classe pode alterar a função normal dos microtúbulos celulares, interferindo no crescimento das células (PAVLIKOVA et al., 2015). O paclitaxel é amplamente utilizado no tratamento de câncer de mama e em outros tumores sólidos. Este fármaco não é efetivo em todos os tumores, porém não há um consenso quanto as características que definem a resistência ou sensibilidade dos tumores ao paclitaxel (HOLMES et al., 1991; MAMOUNAS et al., 2005).

Jänicke e colaboradores (1998). mostraram que o paclitaxel não foi capaz de induzir a morte das células MCF-7. esse insucesso do fármaco foi associado ao fato

de as células não apresentarem caspase 3, uma protease importante na apoptose celular e que é necessária para indução da apoptose por paclitaxel (LU et al, 2005). Pavlíková e colaboradores, 2014 relataram alguns genes que apresentaram relação com a resistência das células MCF-7 ao paclitaxel, entre eles o principal foi o gene TRIP (*thyroid hormone-interacting protein 6*) que ao ser silenciado, houve a diminuição do crescimento das células MCF-7. Esses estudos poderiam explicar a falta de efeito citotóxico do paclitaxel sobre as células MCF-7 observada no presente estudo.

Quando analisado o efeito do agonista parcial de PPAR γ GQ-16, o presente estudo mostrou que este induziu a diminuição da viabilidade celular de forma significativa na concentração 10^{-4} M em 24 h de tratamento quando comparado ao controle negativo. Em 48 h de tratamento o GQ-16 foi ainda mais potente diminuindo a viabilidade das células MCF-7 nas concentrações 10^{-6} M, 10^{-5} M e 10^{-4} M em relação ao controle negativo. Embora muitos estudos tem sido feito para analisar o efeito de agonistas parciais de PPAR γ sobre doenças metabólicas, poucos estudos foram realizados para verificar o efeitos de tais agonistas no câncer. Diante disso, é importante ressaltarmos o efeito citotóxico apresentado pelo agonista parcial de PPAR γ GQ-16 que foi até mesmo superior ao da rosigliazona nos tempos estudados. Este resultado foi promissor, pois poderia esse agonista parcial ser utilizado no tratamento de câncer de mama e assim não apresentar os efeitos adversos dos agonistas totais.

Corroborando com o presente estudo, Pal e colaboradores (2014) demonstraram que agonistas parciais do PPAR γ derivados de oxazol-5-Ones apresentam efeito citotóxico sobre células de câncer mamário MCF-7, sugerindo que os agonistas parciais poderiam ser estudados como antitumorais. No entanto, estudos adicionais precisam ser realizados para comprovar os efeitos de agonistas parciais sobre a viabilidade celular quando dado em associação com os fármacos atualmente utilizados no tratamento do câncer de mama.

Vários são os mecanismos propostas pelo qual o PPAR γ e seus ligantes atuam no câncer. Ligantes do PPAR podem induzir respostas anti-proliferativas, parada no ciclo celular e apoptose através da ativação transcricional de vários genes responsáveis por estes processos. Estas respostas podem ser potencializadas por um ligante do RXR em associação a agonista do PPAR γ (BONOFIGLIO et al., 2009; CROWE & CHANDRARATNA, 2004).

A ativação do PPAR γ induz a expressão do gene supressor de tumor PTEN o que leva a atividade antiproliferativa em células cancerosas (PATEL et al., 2001). Além disso, a região promotora do PTEN contém a sequência do elemento responsivo de PPAR (PPARE), indicando que o PTEN pode ser regulado diretamente pelo PPAR γ a nível transcricional (GRATTON et al., 2001).

Sabe-se que a obesidade é um fator de risco para o câncer de mama. A leptina é um dos hormônios secretados pelos adipócitos e recentemente este hormônio foi associado a processos tumorigênicos no tecido mamário por ativar diretamente o receptor de estrógeno e possivelmente modular a atividade da aromatase (CATALANO et al., 2003; GAROFALO & SURMACZ, 2006; VONA-DAVIS & ROSE, 2007). As TZDs inibem a expressão da leptina, por isso Catalano e colaboradores (2011) sugeriram que a inibição da sinalização da leptina pelos ligantes de PPAR γ pode neutralizar o efeito estimulatório da leptina na sinalização do estrógeno.

Estudos mostram que as TZDs e outros ligantes do PPAR γ diminuem a proliferação celular por alterar proteínas envolvidas no ciclo celular. Em linhagem de MCF-7, 24 h de exposição à rosiglitazona (1 μ M, 10 μ M, 50 μ M) induziu parada no ciclo celular nos pontos G0-G1 acompanhada de diminuição da proporção de células entrando na fase S (BONOFIGLIO et al., 2006). Supõe-se que essa parada no ciclo celular pode ser mediada por aumento nos níveis de inibidores da ciclina dependente de quinase (CDK), como p27, p21 e p18. Isso também acontece em outras linhagens de câncer de mama, como na MDA-MB-231. (SU et al., 2007; VANDERLAAG et al., 2008).

Outro mecanismo para explicar como a ativação do PPAR γ pode atuar em células de câncer é através da indução da apoptose. Pignatelli e colaboradores (2003) demonstraram que os ligantes do PPAR γ , 15d-PGJ2 e rosiglitazona, aumentaram os níveis proteicos de BRCA1. Esta proteína é um supressor do tumor por induzir a apoptose em células MCF-7. Com isso sugere-se que estes ligantes podem ser um modulador da expressão do gene BRCA1 e ser importante no controle da doença.

A morte por apoptose das células cancerosas por ligantes do PPAR γ pode ser pela ativação da caspase-3. Este evento está associado à diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (ELSTNER et al., 1998; GUPTA et al., 2001; MOON et al., 2010) e aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax (MOON et al., 2010).

Ainda, a combinação do ligante do PPAR γ com outro agente pode melhorar a eficácia de tais abordagens de tratamento. Um estudo recente sugere que regimes com multidrogas, como uma combinação de TZDs e hidralazina pode promover efeitos antiproliferativos e apoptose em células de câncer de mama triplo-negativo e diminuição da proliferação do tumor (JIANG. et al., 2011).

O efeito do GQ-16 sobre a citotoxicidade de células da mama não-tumorais, bem como a via pelo qual o GQ-16 diminui a viabilidade de células de câncer mamário (diminuição da proliferação e/ou aumento da apoptose) precisa ser verificado. No entanto os resultados mostrados no presente estudo evidenciam que o GQ-16 é um alvo promissor para pesquisas que direcionam a novas terapias antitumorais empregadas no câncer de mama, e muito provavelmente em outros tipos de câncer.

7 CONCLUSÕES FINAIS

Atualmente, vários estudos têm sido feitos com agonistas parciais de PPAR γ que apresentam os mesmos efeitos benéficos da TZDs, no entanto, sem os efeitos adversos.

A rosiglitazona, agonista total do PPAR γ , no maior tempo de tratamento e na maior concentração foi capaz de reduzir a viabilidade das células de adenocarcinoma mamário.

O agonista parcial de PPAR γ , GQ-16, mostrou ter efeito negativo sobre a viabilidade das células MCF-7 já no menor tempo de tratamento e em mais concentrações. Este efeito mostrou ser dependente da dose e do tempo de tratamento. Com isso, sugere-se que este fármaco pode ser estudado como agente antitumoral.

Novos estudos são necessários para elucidar como este fármaco reduziu a viabilidade das células de câncer mamário, que mecanismo de ação está por trás desse efeito inibitório. Também é necessário o ensaio com células não tumorais da mama, para avaliar se os efeitos citotóxicos apresentados na MCF-7 pelo GQ-16 se aplicam nas células normais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULJABBAR, R.; AL-KAABI, M. M.; NEGM, O. H.; JERJEES, D.; MUFTAH, A. A.; MUKHERJEE, A.; LAI, C. F.; BULUWELA, L.; ALI, S.; TIGHE, P. J.; GREEN, A.; ELLIS, I.; RAKHA, E. Prognostic and biological significance of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in luminal breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 150, **3**, p. 511-22, Apr 2015.

ADRIAN, T. E.; HENNIG, R.; FRIESS, H.; DING, X. The Role of PPARgamma Receptors and Leukotriene B(4) Receptors in Mediating the Effects of LY293111 in Pancreatic Cancer. **PPAR Res**, v. 2008, p. 827096, 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, A. A.; RAJAGOPALAN, S.; LIN, J. Z.; CARVALHO, B. M.; FIGUEIRA, A. C.; LU, J.; AYERS, S. D.; MOTTIN, M.; SILVEIRA, R. L.; SOUZA, P. C.; MOURAO, R. H.; SAAD, M. J.; TOGASHI, M.; SIMEONI, L. A.; ABDALLA, D. S.; SKAF, M. S.; POLIKPARPOV, I.; LIMA, M. C.; GALDINO, S. L.; BRENNAN, R. G.; BAXTER, J. D.; PITTA, I. R.; WEBB, P.; PHILLIPS, K. J.; NEVES, F. A. GQ-16, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligand, promotes insulin sensitization without weight gain. **J Biol Chem**, v. 287, **33**, p. 28169-79, Aug 10 2012.

AMENDOLA, L. C. B.; VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, **4**, p. 325-330, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **American Cancer Society**. Cancer Facts & Figures 2011. **American Cancer Society**, 2011.

BONOFILIO, D.; AQUILA, S.; CATALANO, S.; GABRIELE, S.; BELMONTE, M.; MIDDEA, E.; QI, H.; MORELLI, C.; GENTILE, M.; MAGGIOLINI, M.; ANDO, S. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activates p53 gene promoter binding to the nuclear factor-kappaB sequence in human MCF7 breast cancer cells. **Mol Endocrinol**, v. 20, **12**, p. 3083-92, Dec 2006.

BONOFILIO, D.; CIONE, E.; QI, H.; PINGITORE, A.; PERRI, M.; CATALANO, S.; VIZZA, D.; PANNO, M. L.; GENCHI, G.; FUQUA, S. A.; ANDO, S. Combined low doses of PPARgamma and RXR ligands trigger an intrinsic apoptotic pathway in human breast cancer cells. **Am J Pathol**, v. 175, **3**, p. 1270-80, Sep 2009.

BOSSLET, K.; STRAUB, R.; BLUMRICH, M.; CZECH, J.; GERKEN, M.; SPERKER, B.; KROEMER, H. K.; GESSON, J. P.; KOCH, M.; MONNERET, C. Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy. **Cancer Res**, v. 58, **6**, p. 1195-201, Mar 15 1998.

BRASIL. **Instituto Nacional do Câncer**. Estimativa 2014. Incidência do Câncer no Brasil. 2013.

BRASIL. **Instituto Nacional do Câncer**. Controle do câncer de mama. Documento de consenso., 2004. Disponível em: <
<http://www.inca.gov.br/publicações/Consensointegra.pdf> >.

BRUNTON, L. L.; KNOLLMANN, B. C.; CHABNER, B. A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 12a. McGraw Hill, 2012.

CARNEIRO, M. L.; NUNES, E. S.; PEIXOTO, R. C.; OLIVEIRA, R. G.; LOURENCO, L. H.; DA SILVA, I. C.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C.; DE SOUZA, A. R.; LACAVA, Z. G.; BAO, S. N. Free Rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate magnetic carriers as potential strategies for breast cancer therapy. **J Nanobiotechnology**, v. 9, p. 11, 2011.

CATALANO, S.; MARSICO, S.; GIORDANO, C.; MAURO, L.; RIZZA, P.; PANNO, M. L.; ANDO, S. Leptin enhances, via AP-1, expression of aromatase in the MCF-7 cell line. **J Biol Chem**, v. 278, **31**, p. 28668-76, Aug 1 2003.

CHANG, T. H.; SZABO, E. Induction of differentiation and apoptosis by ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in non-small cell lung cancer. **Cancer Res**, v. 60, **4**, p. 1129-38, Feb 15 2000.

CHEARWAE, W.; BRIGHT, J. J. PPARgamma agonists inhibit growth and expansion of CD133+ brain tumour stem cells. **Br J Cancer**, v. 99, **12**, p. 2044-53, Dec 16 2008.

CHOI, J. H.; BANKS, A. S.; ESTALL, J. L.; KAJIMURA, S.; BOSTROM, P.; LAZNIK, D.; RUAS, J. L.; CHALMERS, M. J.; KAMENECKA, T. M.; BLUHER, M.; GRIFFIN, P. R.; SPIEGELMAN, B. M. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5. **Nature**, v. 466, **7305**, p. 451-6, Jul 22 2010.

CLARKE, M.; COLLINS, R.; DARBY, S.; DAVIES, C.; EVANS, V.; GODWIN, J.; GRAY, R.; MCGALE, P.; PETO, R.; WANG, Y. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. **Lancet**, v. 365, **9472**, p. 1687-717, May 14-20 2005.

CROWE, D. L.; CHANDRARATNA, R. A. A retinoid X receptor (RXR)-selective retinoid reveals that RXR-alpha is potentially a therapeutic target in breast cancer cell lines, and that it potentiates antiproliferative and apoptotic responses to peroxisome proliferator-activated receptor ligands. **Breast Cancer Res**, v. 6, **5**, p. R546-55, 2004.

DAS, M.; MOHANTY, C.; SAHOO, S. K. Ligand-based targeted therapy for cancer tissue. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 6, **3**, p. 285-304, Mar 2009.

DEMETRI, G. D.; FLETCHER, C. D.; MUELLER, E.; SARRAF, P.; NAUJOKS, R.; CAMPBELL, N.; SPIEGELMAN, B. M.; SINGER, S. Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, **7**, p. 3951-6, Mar 30 1999.

DITSCH, N.; VREKOUSSIS, T.; LENHARD, M.; RUHL, I.; GALLWAS, J.; WEISSENBACHER, T.; FRIESE, K.; MAYR, D.; MAKRIGIANNAKIS, A.; JESCHKE, U. Retinoid X receptor alpha (RXRalpha) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression in breast cancer: an immunohistochemical study. **In Vivo**, v. 26, **1**, p. 87-92, Jan-Feb 2012.

DONG, J. T. Anticancer activities of PPARgamma in breast cancer are context-dependent. **Am J Pathol**, v. 182, **6**, p. 1972-5, Jun 2013.

DUBOIS, R. N.; GUPTA, R.; BROCKMAN, J.; REDDY, B. S.; KRAKOW, S. L.; LAZAR, M. A. The nuclear eicosanoid receptor, PPARgamma, is aberrantly expressed in colonic cancers. **Carcinogenesis**, v. 19, **1**, p. 49-53, Jan 1998.

ELIAS, S. T. et al. Radiation induced a supra-additive cytotoxic effect in head and neck carcinoma cell lines when combined with plant extracts from Brazilian Cerrado biome. **Clin Oral Investig**, v. 19, n. 3, p. 637-46, Apr 2015

ELSTNER, E.; MULLER, C.; KOSHIZUKA, K.; WILLIAMSON, E. A.; PARK, D.; ASOU, H.; SHINTAKU, P.; SAID, J. W.; HEBER, D.; KOEFFLER, H. P. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, **15**, p. 8806-11, Jul 21 1998.

EVANS, R. M.; BARISH, G. D.; WANG, Y. X. PPARs and the complex journey to obesity. **Nat Med**, v. 10, **4**, p. 355-61, Apr 2004.

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 PPAR gamma. **Cell**, v. 83, **5**, p. 803-12, Dec 1 1995.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia Clínica - Fundamentos da Terapêutica Racional**. 4. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 2010.

GARCIA-BATES, T. M.; LEHMANN, G. M.; SIMPSON-HAIDARIS, P. J.; BERNSTEIN, S. H.; SIME, P. J.; PHIPPS, R. P. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its ligands in the treatment of hematological malignancies. **PPAR Res**, v. 2008, p. 834612, 2008.

GAROFALO, C.; SURMACZ, E. Leptin and cancer. **J Cell Physiol**, v. 207, **1**, p. 12-22, Apr 2006.

GELMAN, L.; FEIGE, J. N.; DESVERGNE, B. Molecular basis of selective PPARgamma modulation for the treatment of Type 2 diabetes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1771, **8**, p. 1094-107, Aug 2007.

GRATTON, J. P.; MORALES-RUIZ, M.; KUREISHI, Y.; FULTON, D.; WALSH, K.; SESSA, W. C. Akt down-regulation of p38 signaling provides a novel mechanism of vascular endothelial growth factor-mediated cytoprotection in endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 276, **32**, p. 30359-65, Aug 10 2001.

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

GROMMES, C.; LANDRETH, G. E.; SASTRE, M.; BECK, M.; FEINSTEIN, D. L.; JACOBS, A. H.; SCHLEGEL, U.; HENEKA, M. T. Inhibition of in vivo glioma growth and invasion by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist treatment. **Mol Pharmacol**, v. 70, 5, p. 1524-33, Nov 2006.

GUASCH, L.; SALA, E.; CASTELL-AUVI, A.; CEDO, L.; LIEDL, K. R.; WOLBER, G.; MUEHLBACHER, M.; MULERO, M.; PINENT, M.; ARDEVOL, A.; VALLS, C.; PUJADAS, G.; GARCIA-VALLVE, S. Identification of PPARgamma partial agonists of natural origin (I): development of a virtual screening procedure and in vitro validation. **PLoS One**, v. 7, 11, p. e50816, 2012.

GUPTA, R. A.; BROCKMAN, J. A.; SARRAF, P.; WILLSON, T. M.; DUBOIS, R. N. Target genes of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colorectal cancer cells. **J Biol Chem**, v. 276, 32, p. 29681-7, Aug 10 2001.

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.

HAMAGUCHI, N.; HAMADA, H.; MIYOSHI, S.; IRIFUNE, K.; ITO, R.; MIYAZAKI, T.; HIGAKI, J. In vitro and in vivo therapeutic efficacy of the PPAR-gamma agonist troglitazone in combination with cisplatin against malignant pleural mesothelioma cell growth. **Cancer Sci**, v. 101, 9, p. 1955-64, Sep 2010.

HEIKKINEN, S.; AUWERX, J.; ARGMANN, C. A. PPARgamma in human and mouse physiology. **Biochim Biophys Acta**, v. 1771, 8, p. 999-1013, Aug 2007.

HOLMES, F. A.; WALTERS, R. S.; THERIAULT, R. L.; FORMAN, A. D.; NEWTON, L. K.; RABER, M. N.; BUZDAR, A. U.; FRYE, D. K.; HORTOBAGYI, G. N. Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 83, 24, p. 1797-805, Dec 18 1991.

INOUE, K.; KAWAHITO, Y.; TSUBOUCHI, Y.; KOHNO, M.; YOSHIMURA, R.; YOSHIKAWA, T.; SANO, H. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor

gamma in renal cell carcinoma and growth inhibition by its agonists. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 287, 3, p. 727-32, Sep 28 2001.

JAIN, S.; PULIKURI, S.; ZHU, Y.; QI, C.; KANWAR, Y. S.; YELDANDI, A. V.; RAO, M. S.; REDDY, J. K. Differential expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and its coactivators steroid receptor coactivator-1 and PPAR-binding protein PBP in the brown fat, urinary bladder, colon, and breast of the mouse. **Am J Pathol**, v. 153, 2, p. 349-54, Aug 1998.

JANICKE, R. U. et al. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. **J Biol Chem**, v. 273, n. 16, p. 9357-60, Apr 17 1998

JIANG, W. G.; REDFERN, A.; BRYCE, R. P.; MANSEL, R. E. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR-gamma) mediates the action of gamma linolenic acid in breast cancer cells. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 62, 2, p. 119-27, Feb 2000.

JIANG, Y.; HUANG, Y.; CHENG, C.; LU, W.; ZHANG, Y.; LIU, X.; ZOU, L.; BEN, Q.; SHEN, A. Combination of thiazolidinedione and hydralazine suppresses proliferation and induces apoptosis by PPARgamma up-expression in MDA-MB-231 cells. **Exp Mol Pathol**, v. 91, 3, p. 768-74, Dec 2011.

JING, X.; ZHANG, H.; HU, J.; SU, P.; ZHANG, W.; JIA, M.; CHENG, H.; LI, W.; ZHOU, G. beta-arrestin 2 is associated with multidrug resistance in breast cancer cells through regulating MDR1 gene expression. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, 2, p. 1354-63, 2015.

KIM, K. Y.; KIM, S. S.; CHEON, H. G. Differential anti-proliferative actions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists in MCF-7 breast cancer cells. **Biochem Pharmacol**, v. 72, 5, p. 530-40, Aug 28 2006.

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

KOEFFLER, H. P. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers. **Clin Cancer Res**, v. 9, 1, p. 1-9, Jan 2003.

KUBOTA, T.; KOSHIZUKA, K.; WILLIAMSON, E. A.; ASOU, H.; SAID, J. W.; HOLDEN, S.; MIYOSHI, I.; KOEFFLER, H. P. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. **Cancer Res**, v. 58, **15**, p. 3344-52, Aug 1 1998.

KUMEI, S.; MOTOMURA, W.; YOSHIKAWA, T.; TAKAKUSAKI, K.; OKUMURA, T. Troglitazone increases expression of E-cadherin and claudin 4 in human pancreatic cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 380, **3**, p. 614-9, Mar 13 2009.

LEHMANN, J. M.; MOORE, L. B.; SMITH-OLIVER, T. A.; WILKISON, W. O.; WILLSON, T. M.; KLIEWER, S. A. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). **J Biol Chem**, v. 270, **22**, p. 12953-6, Jun 2 1995.

LEVENSON, A. S.; JORDAN, V. C. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. **Cancer Res**, v. 57, **15**, p. 3071-8, Aug 1 1997.

LI, A. C.; BROWN, K. K.; SILVESTRE, M. J.; WILLSON, T. M.; PALINSKI, W.; GLASS, C. K. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. **J Clin Invest**, v. 106, **4**, p. 523-31, Aug 2000.

LIU, H. J.; ZHANG, C. Y.; SONG, F.; XIAO, T.; MENG, J.; ZHANG, Q.; LIANG, C. L.; LI, S.; WANG, J.; ZHANG, B.; LIU, Y. R.; SUN, T.; ZHOU, H. G. A Novel Partial Agonist of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma with Excellent Effect on Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 353, **3**, p. 573-81, Jun 2015.

LONGO, D. L.; BRAUNWALD, E.; FAUCI, A. S.; HAUSER, S. L. J., J. LARRY; KASPER, D. L. **Medicina Interna de Harrison**. 18a. Porto Alegre: 2013.

LU, K. H. et al. Paclitaxel induces apoptosis via caspase-3 activation in human osteogenic sarcoma cells (U-2 OS). **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, n. 5, p. 988-994, 2005.

LUI, W. O.; FOUKAKIS, T.; LIDEN, J.; THOPPE, S. R.; DWIGHT, T.; HOOG, A.; ZEDENIUS, J.; WALLIN, G.; REIMERS, M.; LARSSON, C. Expression profiling reveals a distinct transcription signature in follicular thyroid carcinomas with a PAX8-PPAR(gamma) fusion oncogene. **Oncogene**, v. 24, **8**, p. 1467-76, Feb 17 2005.

MACLEOD, K. Tumor suppressor genes. **Curr Opin Genet Dev**, v. 10, 1, p. 81-93, Feb 2000.

MAMOUNAS, E. P.; BRYANT, J.; LEMBERSKY, B.; FEHRENBACHER, L.; SEDLACEK, S. M.; FISHER, B.; WICKERHAM, D. L.; YOTHERS, G.; SORAN, A.; WOLMARK, N. Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP B-28. **J Clin Oncol**, v. 23, 16, p. 3686-96, Jun 1 2005.

MICHALIK, L.; AUWERX, J.; BERGER, J. P.; CHATTERJEE, V. K.; GLASS, C. K.; GONZALEZ, F. J.; GRIMALDI, P. A.; KADOWAKI, T.; LAZAR, M. A.; O'RAHILLY, S.; PALMER, C. N.; PLUTZKY, J.; REDDY, J. K.; SPIEGELMAN, B. M.; STAELS, B.; WAHLI, W. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. **Pharmacol Rev**, v. 58, 4, p. 726-41, Dec 2006.

MING, Y.; HU, X.; SONG, Y.; LIU, Z.; LI, J.; GAO, R.; ZHANG, Y.; MEI, H.; GUO, T.; XIAO, L.; WANG, B.; WU, C.; XIAO, X. CMHX008, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma partial agonist, enhances insulin sensitivity in vitro and in vivo. **PLoS One**, v. 9, 7, p. e102102, 2014.

MOON, H. S.; GUO, D. D.; LEE, H. G.; CHOI, Y. J.; KANG, J. S.; JO, K.; EOM, J. M.; YUN, C. H.; CHO, C. S. Alpha-eleostearic acid suppresses proliferation of MCF-7 breast cancer cells via activation of PPARgamma and inhibition of ERK 1 / 2. **Cancer Sci**, v. 101, 2, p. 396-402, Feb 2010.

MOTOMURA, W.; NAGAMINE, M.; TANNO, S.; SAWAMUKAI, M.; TAKAHASHI, N.; KOHGO, Y.; OKUMURA, T. Inhibition of cell invasion and morphological change by troglitazone in human pancreatic cancer cells. **J Gastroenterol**, v. 39, 5, p. 461-8, 2004.

MOTOMURA, W.; OKUMURA, T.; TAKAHASHI, N.; OBARA, T.; KOHGO, Y. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by troglitazone inhibits cell growth through the increase of p27KIP1 in human. Pancreatic carcinoma cells. **Cancer Res**, v. 60, 19, p. 5558-64, Oct 1 2000.

MUELLER, E.; SARRAF, P.; TONTONOZ, P.; EVANS, R. M.; MARTIN, K. J.; ZHANG, M.; FLETCHER, C.; SINGER, S.; SPIEGELMAN, B. M. Terminal

differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. **Mol Cell**, v. 1, 3, p. 465-70, Feb 1998.

NEWMAN, B.; MU, H.; BUTLER, L. M.; MILLIKAN, R. C.; MOORMAN, P. G.; KING, M. C. Frequency of breast cancer attributable to BRCA1 in a population-based series of American women. **JAMA**, v. 279, 12, p. 915-21, Mar 25 1998.

NISSEN, S. E.; WOLSKI, K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. **N Engl J Med**, v. 356, 24, p. 2457-71, Jun 14 2007.

PAL, T.; JOSHI, H.; RAMAA, C. S. Design and development of oxazol-5-ones as potential partial PPAR-gamma agonist against cancer cell lines. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 14, 6, p. 872-83, 2014.

PARK, K. S.; CIARALDI, T. P.; ABRAMS-CARTER, L.; MUDALIAR, S.; NIKOULINA, S. E.; HENRY, R. R. PPAR-gamma gene expression is elevated in skeletal muscle of obese and type II diabetic subjects. **Diabetes**, v. 46, 7, p. 1230-4, Jul 1997.

PATEL, L.; PASS, I.; COXON, P.; DOWNES, C. P.; SMITH, S. A.; MACPHEE, C. H. Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN. **Curr Biol**, v. 11, 10, p. 764-8, May 15 2001.

PAVLIKOVA, N.; BARTONOVA, I.; BALUSIKOVA, K.; KOPPEROVA, D.; HALADA, P.; KOVAR, J. Differentially expressed proteins in human MCF-7 breast cancer cells sensitive and resistant to paclitaxel. **Exp Cell Res**, v. 333, 1, p. 1-10, Apr 10 2015.

PERSIDIS, A. Cancer multidrug resistance. **Nat Biotechnol**, v. 17, 1, p. 94-5, Jan 1999.

PFUTZNER, A.; MARX, N.; LUBBEN, G.; LANGENFELD, M.; WALCHER, D.; KONRAD, T.; FORST, T. Improvement of cardiovascular risk markers by pioglitazone is independent from glycemic control: results from the pioneer study. **J Am Coll Cardiol**, v. 45, 12, p. 1925-31, Jun 21 2005.

PINES, A.; KELSTRUP, C. D.; VROUWE, M. G.; PUIGVERT, J. C.; TYPAS, D.; MISOVIC, B.; DE GROOT, A.; VON STECHOW, L.; VAN DE WATER, B.; DANEN,

E. H.; VRIELING, H.; MULLENDERS, L. H.; OLSEN, J. V. Global phosphoproteome profiling reveals unanticipated networks responsive to cisplatin treatment of embryonic stem cells. **Mol Cell Biol**, v. 31, **24**, p. 4964-77, Dec 2011.

PONDER, B. A. J. Cancer genetics. **Nature**, v. 411, **6835**, p. 336-341, 05/17/print 2001.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. **J Biol Chem**, v. 276, **41**, p. 37731-4, Oct 12 2001.

RUBENSTRUNK, A.; HANF, R.; HUM, D. W.; FRUCHART, J. C.; STAELS, B. Safety issues and prospects for future generations of PPAR modulators. **Biochim Biophys Acta**, v. 1771, **8**, p. 1065-81, Aug 2007.

SATOH, T.; TOYODA, M.; HOSHINO, H.; MONDEN, T.; YAMADA, M.; SHIMIZU, H.; MIYAMOTO, K.; MORI, M. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma stimulates the growth arrest and DNA-damage inducible 153 gene in non-small cell lung carcinoma cells. **Oncogene**, v. 21, **14**, p. 2171-80, Mar 28 2002.

SEARGENT, J. M.; YATES, E. A.; GILL, J. H. GW9662, a potent antagonist of PPARgamma, inhibits growth of breast tumour cells and promotes the anticancer effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone, independently of PPARgamma activation. **Br J Pharmacol**, v. 143, **8**, p. 933-7, Dec 2004.

SEMPLE, R. K.; CHATTERJEE, V. K.; O'RAHILLY, S. PPAR gamma and human metabolic disease. **J Clin Invest**, v. 116, **3**, p. 581-9, Mar 2006.

SHEARER, B. G.; BILLIN, A. N. The next generation of PPAR drugs: do we have the tools to find them? **Biochim Biophys Acta**, v. 1771, **8**, p. 1082-93, Aug 2007.

SINGLETERY, S. E.; CONNOLLY, J. L. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. **CA Cancer J Clin**, v. 56, **1**, p. 37-47; quiz 50-1, Jan-Feb 2006.

SU, Y.; VANDERLAAG, K.; IRELAND, C.; ORTIZ, J.; GRAGE, H.; SAFE, S.; FRANKEL, A. E. 1,1-Bis(3'-indolyl)-1-(p-biphenyl)methane inhibits basal-like breast cancer growth in athymic nude mice. **Breast Cancer Res**, v. 9, 4, p. R56, 2007.

SWEETMAN, S. C. Antineoplastics. **Martindale: The Complete Drug Reference**, Greenwood Village, Colorado, USA, 2014. Disponível em: < www.micromedexsolutions.com >. Acesso em: 13 nov 2014.

SZANTO, A.; NAGY, L. The many faces of PPARgamma: anti-inflammatory by any means? **Immunobiology**, v. 213, 9-10, p. 789-803, 2008.

SZELES, L.; TOROCSIK, D.; NAGY, L. PPARgamma in immunity and inflammation: cell types and diseases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1771, 8, p. 1014-30, Aug 2007.

TALBERT, D. R.; ALLRED, C. D.; ZAYTSEVA, Y. Y.; KILGORE, M. W. Transactivation of ERalpha by Rosiglitazone induces proliferation in breast cancer cells. **Breast Cancer Res Treat**, v. 108, 1, p. 23-33, Mar 2008.

TONTONOZ, P.; HU, E.; GRAVES, R. A.; BUDAVARI, A. I.; SPIEGELMAN, B. M. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. **Genes Dev**, v. 8, 10, p. 1224-34, May 15 1994.

TONTONOZ, P.; SINGER, S.; FORMAN, B. M.; SARRAF, P.; FLETCHER, J. A.; FLETCHER, C. D.; BRUN, R. P.; MUELLER, E.; ALTIOK, S.; OPPENHEIM, H.; EVANS, R. M.; SPIEGELMAN, B. M. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, 1, p. 237-41, Jan 7 1997.

TOYOTA, M.; MIYAZAKI, Y.; KITAMURA, S.; NAGASAWA, Y.; KIYOHARA, T.; SHINOMURA, Y.; MATSUZAWA, Y. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma reduces the growth rate of pancreatic cancer cells through the reduction of cyclin D1. **Life Sci**, v. 70, 13, p. 1565-75, Feb 15 2002.

TSUJIE, M. Thiazolidinediones inhibit growth of gastrointestinal, biliary, and pancreatic adenocarcinoma cells through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ /retinoid X receptor α pathway. **Experimental Cell Research**, v. 289, 1, p. 143-151, 2003.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Methods Mol Biol**, v. 731, p. 237-45, 2011.

VANDERLAAG, K.; SU, Y.; FRANKEL, A. E.; GRAGE, H.; SMITH, R., 3RD; KHAN, S.; SAFE, S. 1,1-Bis(3'-indolyl)-1-(p-substituted phenyl)methanes inhibit proliferation of estrogen receptor-negative breast cancer cells by activation of multiple pathways. **Breast Cancer Res Treat**, v. 109, 2, p. 273-83, May 2008.

VIDAL-PUIG, A.; JIMENEZ-LINAN, M.; LOWELL, B. B.; HAMANN, A.; HU, E.; SPIEGELMAN, B.; FLIER, J. S.; MOLLER, D. E. Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. **J Clin Invest**, v. 97, 11, p. 2553-61, Jun 1 1996.

VONA-DAVIS, L.; ROSE, D. P. Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. **Endocr Relat Cancer**, v. 14, 2, p. 189-206, Jun 2007.

WAN, H.; WILLIAMS, R. L.; DOHERTY, P. J.; WILLIAMS, D. F. A study of cell behaviour on the surfaces of multifilament materials. **J Mater Sci Mater Med**, v. 8, 1, p. 45-51, Jan 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Globocan**. França: International Agency for Research on Cancer, 2008

WU, G. D.; LAZAR, M. A. A gut check for PPAR γ . **Gastroenterology**, v. 115, 5, p. 1283-1285, 1998.

YAMAKAWA-KARAKIDA, N.; SUGITA, K.; INUKAI, T.; GOI, K.; NAKAMURA, M.; UNO, K.; SATO, H.; KAGAMI, K.; BARKER, N.; NAKAZAWA, S. Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces apoptosis of leukemia cells by down-regulating the c-myc gene expression via blockade of the Tcf-4 activity. **Cell Death Differ**, v. 9, 5, p. 513-26, May 2002.

YKI-JÄRVINEN, H. Thiazolidinediones. **New England Journal of Medicine**, v. 351, 11, p. 1106-1118, 2004.

YOKOYAMA, Y.; XIN, B.; SHIGETO, T.; MIZUNUMA, H. Combination of ciglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, and cisplatin enhances the inhibition of growth of human ovarian cancers. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 137, **8**, p. 1219-28, Aug 2011.

YOUSSEF, J.; BADR, M. Peroxisome proliferator-activated receptors and cancer: challenges and opportunities. **Br J Pharmacol**, v. 164, **1**, p. 68-82, Sep 2011.