



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

Efeito da Rosiglitazona e do GQ-16, agonista total e parcial de PPAR γ , sobre a viabilidade de linhagem celular de feocromocitoma

ANYK FERREIRA MARTINS

BRASÍLIA, 2017

ANYK FERREIRA MARTINS

Efeito da Rosiglitazona e do GQ-16, agonista total e parcial de PPAR γ , sobre a viabilidade de linhagem celular de feocromocitoma

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni

Co-orientadora: MSc. Cinthia Gabriel Meireles

BRASÍLIA, 2017

ANYK FERREIRA MARTINS

Efeito da Rosiglitazona e do GQ-16, agonista total e parcial de PPAR γ , sobre a viabilidade de linhagem celular de feocromocitoma

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni (Presidente)

(UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)

Profa. Dra. Angélica Amato

(UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)

MSc. Laíza Magalhães de Araújo

(UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente meus pais, José Alves e Maria Ferreira, pelo apoio nestes anos na universidade, sempre me incentivando e me proporcionando, mesmo em tempos difíceis, todo o conforto e carinho necessários.

Ao meu orientador, professor Luiz Alberto Simeoni, e à co-orientadora, Cinthia Gabriel, pela paciência e confiança. Muita obrigada pela oportunidade de aprender tanto com vocês.

Aos colegas e amigos do FarMol, obrigada pelo apoio e amizade.

Aos meus amigos quase irmãos e a minha turma de Farmácia, agradeço por todos os anos de companheirismo e amizade.

Ao meu namorado, Vinícius Santana.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química das tiazolidinadionas clássicas.....	3
Figura 2. Mecanismo de ativação transcricional pelo PPAR γ	4
Figura 3. Estrutura química do GQ-16.....	8
Figura 4. Células de feocromocitoma (PC12-Adh) e fibroblasto (CCD1059S-k).....	11
Figura 5. Ensaio de viabilidade celular por MTT em fibroblastos.....	17
Figura 6. Ensaio de viabilidade celular por MTT em feocromocitomas.....	19
Figura 7. Ensaio por exclusão com Azul de Tripán em fibroblastos.....	21
Figura 8. Ensaio por exclusão com Azul de Tripán em feocromocitoma.....	21
Figura 9. Controle e tratamento da rosiglitazona a 10^{-5} M em fibroblastos.....	22
Figura 10. Controle e tratamento do GQ-16 a 10^{-5} M em fibroblastos.....	23
Figura 11. Controle e tratamento da rosiglitazona a 10^{-5} M em feocromocitoma.....	24
Figura 12. Controle e tratamento do GQ-16 a 10^{-5} M em feocromocitomas.....	25
Figura 13. Ensaio de viabilidade por Cristal de Violeta em fibroblastos e feocromocitomas	27
Figura 14. Células de fibroblastos tratadas com rosiglitazona e GQ-16, coradas com Cristal de Violeta.....	28
Figura 15. Células de feocromocitoma tratadas com rosiglitazona e GQ-16, coradas com Cristal de Violeta.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações das intervenções utilizadas no ensaio de MTT para células de fibroblastos e PC12-Adh.....	13
--	-----------

LISTA DE ABREVIACOES

CYP	Citocromo P450
DNA	cido desoxirribonucleico
FDA	US Food and Drug Administration
GQ-16	5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona
HbA1-c	Hemoglobina glicosilada
LBD	Domínio de ligação do ligante
MAX	Proteína MAX
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NEM2	Neoplasia endócrina múltipla tipo 2
NF1	Neurofibromatose tipo 1
PBS	Tampão fosfato-salino
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
PPARα	Receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma
PPARβ	Receptor beta ativado por proliferador de peroxissoma
PPARγ	Receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
PPER	Elemento responsivo ao PPAR
RXR	Receptor do ácido 9-<i>cis</i> retinóico
SDHA	Succinato-desidrogenase subunidade A
SDHB	Succinato-desidrogenase subunidade B
SDHC	Succinato-desidrogenase subunidade C
SDHD	Succinato-desidrogenase subunidade D
SRC-1	Co-ativador 1 do receptor de esteroide
TMEM127	Proteína transmembranica 127
TZD	Tiazolidinadionas
VHL	Gene von Hippel-Liau

RESUMO

Feocromocitomas são tumores derivados de células cromafins, localizadas na medula da glândula adrenal, que causam hipersecreção de catecolaminas levando a uma alta taxa de morbidade e mortalidade devido a complicações cardíacas na maioria dos casos. Para tumores malignos ou reincidentes de feocromocitomas a terapia indicada é limitada, por isso o estudo em torno da atuação de novos agentes que atuem sobre o câncer é de grande relevância. As Tiazolidinadionas (TZDs), utilizadas no tratamento oral de diabetes mellitus tipo 2, possuem efeitos antiproliferativos já descritos, sabendo disso, a investigação sobre os ligantes de PPAR γ parece ser um alvo promissor para a redução da proliferação de células cancerígenas. O GQ-16, agonista parcial de PPAR γ , possui atividade semelhante às TZDs, portanto seria possível que assim como as TZDs o GQ-16 também tenha efeito antitumoral? Neste trabalho a viabilidade de células de feocromocitomas tratadas com rosiglitazona e GQ-16 foi avaliada por três métodos diferentes, sendo eles o ensaio de MTT, ensaio de exclusão por Azul de Tripán e ensaio por coloração com cristal de violeta. No ensaio de MTT (brometo de 3(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio) somente as células de feocromocitoma sofreram redução da viabilidade celular em 24 e 48 horas nas concentrações de 10^{-5} M e 10^{-4} M de GQ-16, mostrando que esse efeito pode ser seletivo. O percentual de células mortas e a porcentagem de proliferação celular, investigadas pelos métodos de azul de tripan e cristal de violeta, respectivamente, não tiveram diferença significativa. Nossos achados sugerem que o GQ-16 pode alterar o metabolismo celular de células de feocromocitomas.

Palavras chave: feocromocitoma; tiazolidinadionas, GQ-16, receptores ativados por proliferador de peroxissoma γ .

ABSTRACT

Pheochromocytomas are tumours caused by chromaffin cells which are located at the medulla of the adrenal gland. The Pheochromocytomas generate the hypersecretion of catecholamines and as consequence they are the source of high rates of morbidity and mortality due to further cardiac complications. When considering malignant tumour or recurrences of pheochromocytomas, therapy is limited, therefore a research about how new agents act over cancer is important. Based on other works, it is known that thiazolidinediones (TZDs), originally used in the treatment of type 2 diabetes mellitus, have antiproliferative effects. That's why an investigation of the binder of PPAR γ shows such promise to the reduction of the proliferation of cancerous cells. The GQ-16, PPAR γ 's agonist, has similar activity to TZDs, thus could it be possible that as TZDs, the GQ-16 could also have an antitumor effect? This work has been a measurement of the viability of pheochromocytomas cells treated with rosiglitazone and GQ-16 over three different methods: the first the MTT assay, the second an trypan blue assay, and finally violet crystal staining. At the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, only the pheochromocytomas cells have suffered reduction of cell viability over 24 and 48 hours at concentrations of 10^{-5} and 10^{-4} M, consequently this effect could be selective. The rates of dead cells and cellular proliferation reviewed by the other two methods have not brought any significative variation. The investigation has suggested that the GQ-16 can selectively change cellular metabolism of pheochromocytomas cells.

Key Words: pheochromocytomas, thiazolidinediones, GQ-16, receptors activated by peroxisome proliferator γ

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Feocromocitomas e paragangliomas.....	1
1.2 Tiazolidinadionas.....	2
1.3 Mecanismo de ação das TZDs.....	3
1.4 Farmacocinética das TZDs.....	5
1.5 Usos clínicos das TZDs.....	5
1.6 Efeitos adversos das TZDs.....	6
1.7 TZDs e câncer.....	6
1.8 Agonista parcial de PPAR, GQ-16.....	7
2. JUSTIFICATIVA.....	9
3. OBJETIVOS.....	10
4. MÉTODOS.....	11
4.1 Linhagem celular.....	11
4.2 Cultivo celular.....	11
4.3 Ensaios de viabilidade celular.....	12
4.3.1 MTT.....	12
4.3.2 Azul de Tripán.....	13
4.3.3 Cristal de Violeta.....	14
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	15
6. RESULTADOS.....	16
6.1 Avaliação da viabilidade celular por ensaio de MTT.....	16
6.2 Percentual de células mortas por Azul de Tripán.....	18
6.3 Percentual de proliferação celular por Cristal de Violeta.....	24
7. DISCUSSÃO.....	27
8. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
9. REFERÊNCIAS.....	31

1. INTRODUÇÃO

1.1 Feocromocitomas e paragangliomas

Feocromocitomas são tumores raros de origem neuroendócrina derivados de células cromafins localizadas na medula das glândulas adrenais. Tumores de células cromafins extra adrenais são chamados paraganglioma e podem estar presentes ao longo das cadeias ganglionares desde a região cervical até a cavidade pélvica (ANTUNES, 2014). Feocromocitomas e paragangliomas estão extensamente relacionados a fatores hereditários e apresentam mutações em genes específicos como NEM2 (Neoplasia endócrina múltipla tipo 2) , NF1 (Neurofibromatose tipo 1), VHL (Gene de von Hippel-Liau), TMEM127 (Proteína transmembranica 127), MAX (Proteína MAX) e genes codificadores das quatro subunidades do complexo succinato-desidrogenase (SDHA, SDHB, SDHC, SDHD) (MARTUCCI; PACAK, 2014).

A prevalência em pacientes com hipertensão varia entre 0,2 % e 0,6% e em crianças hipertensivas a prevalência desses tipos de tumores é de 1,7% (WYSZYŃSKA et al., 1992). Esses tumores podem ser invasivos no local, mas raramente desenvolvem metástase, ou seja, são em maioria tumores benignos. A malignidade desses tumores ocorre em aproximadamente 10% dos feocromocitomas e 40% dos paragangliomas, mostrando possuir comportamento variável e diferente de outros tipos de câncer (PLOUIN et al., 2012; DENORME et al., 2014).

O processo tumorigênico das células cromafins causam hipersecreção de uma ou mais de uma catecolamina (dopamina, adrenalina e noradrenalina) e esse aumento tem efeitos a nível cardiovascular, muscular e metabólico com alta taxa de morbidade, sendo que raramente esses tumores são silenciosos (ANTUNES, 2014; DAHIA, 2014; DENORME et al., 2014; LENDERS et al., 2014). É de fundamental importância confirmar, localizar e tratar feocromocitomas, pois estes tumores estão relacionados com a hipersecreção de catecolaminas que, mesmo com efeitos de baixa duração causam elevação da pressão arterial com alto risco de taquiarritmias e bradicardias, podendo evoluir para complicações

cardiovasculares maiores como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (LENDERS et al., 2005, 2014; PREJBISZ et al., 2011). O efeito crônico mais associado é a hipertensão arterial sistêmica, com alta taxa de morbidade e mortalidade nestes pacientes. (BROUWERS et al., 2006).

Um dos grandes desafios para o tratamento de feocromocitomas é o seu diagnóstico, pois seus sinais e sintomas clássicos (dores de cabeça, sudorese excessiva e palpitações) podem ser associados a outras condições e a possível presença do tumor não ser devidamente investigada (LENDERS et al., 2005). A dosagem bioquímica de catecolaminas e seus metabólitos é o método mais acurado para o diagnóstico de feocromocitomas e paragangliomas, sabendo que os níveis em pacientes com tais tumores, em maioria, serão elevados (LENDERS et al., 2002, 2005; CHEN et al., 2010). Depois de clara a evidência pelo teste bioquímico, o teste de imagem é indicado para a localização do tumor (LENDERS et al., 2014).

O tratamento para o feocromocitoma envolve basicamente a remoção cirúrgica do tumor, porém em tumores malignos ou recorrentes não é eficaz (ANTUNES, 2014). Recentemente, terapias alvo-dirigidas como inibidores do receptor e tirosina quinase, principalmente sunitinib, vem sendo citado no tratamento de tumores de origem neuroendócrina, dentre eles feocromocitomas, no entanto, os mecanismos de ação não estão totalmente esclarecidos e os efeitos são controversos (SAITO et al., 2012).

1.2 Tiazolidinadionas

Tiazolidinadionas são medicamentos utilizados no tratamento do diabetes tipos 2, introduzidos no mercado na década de 90. A classe é representada pelos fármacos: pioglitazona, rosiglitazona e troglitazona e promovem maior sensibilidade à insulina e redução da produção hepática de glicose, a inibição da lipólise em adipócitos, redução dos níveis de ácidos graxos livres e da adiposidade visceral, resultando em melhora de parâmetros glicêmicos e metabólicos nesses pacientes (AGENCY et al., 2002; KAHN et al., 2006).

As TZDs representam atualmente 21% nos Estados Unidos e 5% na Europa das prescrições médicas para os portadores de diabetes tipo 2 (AGENCY et al., 2002).

Em março de 2001 a Food and Drug Administration (FDA) retirou a troglitazona do mercado devido a preocupações com sua segurança (KRISCHE, 2000). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) cancelou o registro de rosiglitazona no Brasil em 2010, indicado para o controle da diabetes tipo 2. O cancelamento aconteceu pela alta probabilidade de ocorrência de doenças isquêmicas, tais como: infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, parada cardíaca, derrames, isquemia do miocárdio e outros distúrbios cardíacos (ANVISA, 2010). Atualmente somente a pioglitazona possui registro liberado no Brasil (ANVISA, 2010).

As TZDs Possuem como característica um anel tiazolidinona na sua estrutura química, que confere a atividade anti-hiperglicêmica e o restante da molécula difere entre as substâncias desse grupo levando a uma específica farmacodinâmica e cinética (AGENCY et al., 2002).

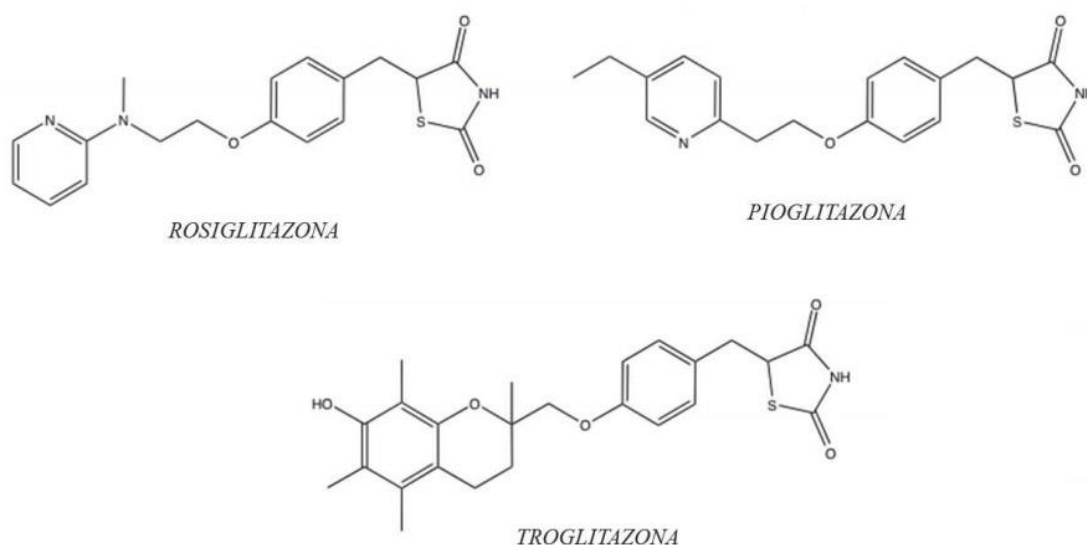


Figura 1. Estrutura química das Tiazolidinadionas clássicas. Adaptado de: Souza, 2012.

1.3 Mecanismo de ação das TZDs

Essas substâncias são agonistas totais de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma γ (PPAR γ) que pertencem à superfamília de receptores nucleares, e

regulam vários genes envolvidos no metabolismo de glicose e lipídeos, transporte de ácidos graxos, diferenciação de adipócitos, genes envolvidos na carcinogênese e inflamação (GOUDA et al., 2010).

Existem 3 isoformas de PPARs : PPAR α , PPAR β e PPAR γ , sendo que a isoforma PPAR γ é a mais utilizada como alvo terapêutico para doenças metabólicas, tendo uma ampla distribuição dentre os tecidos, principalmente no adiposo (HAYDON et al., 2002).

Os PPARs são receptores ligantes dependentes que regulam a expressão de um gene-alvo pela ligação a específicos PPREs (elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma) situados em sítios regulatórios de cada gene. Quando o PPAR γ é ativado por um ligante, forma-se um heterodímero com outro receptor, o RXR (Receptor do ácido 9-*cis* retinóico). Este complexo liga-se ao PPRE, recrutando co-ativadores com atividade acetiltransferase. A ligação produz mudança na estrutura da cromatina, possibilitando a transcrição gênica. (Figura 2) (GROMMES et al.,2004; TAVARES et al., 2007).

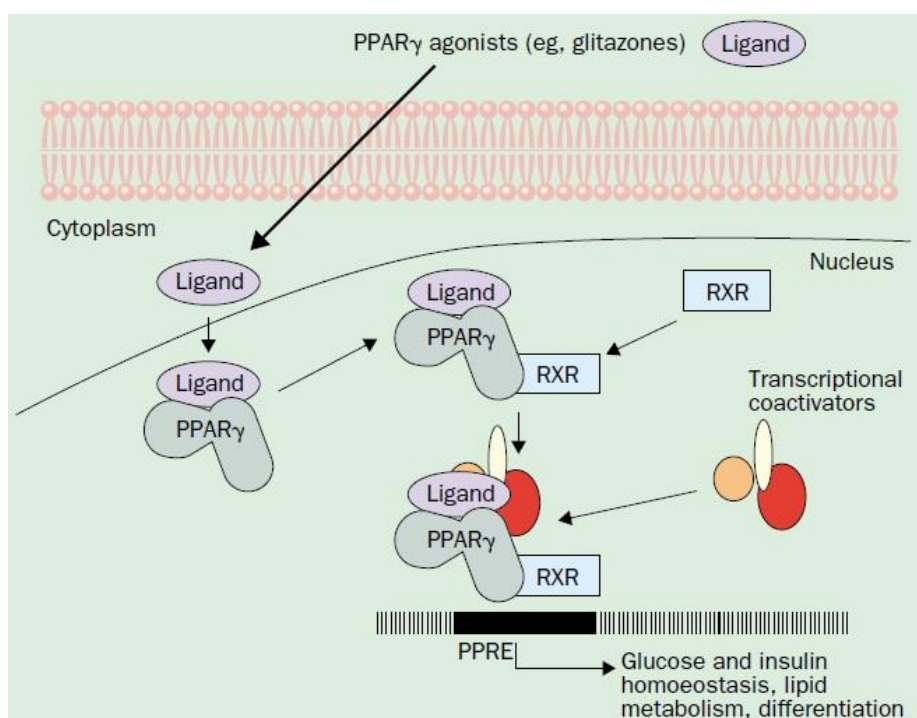


Figura 2. Mecanismo de ativação transcripcional pelo PPAR γ ; Extraído de: GROMMES et. al., 2004.

As TZDs ligam-se ao PPAR ativando-o e melhorando a sensibilidade insulínica não só no tecido adiposo, mas também no músculo esquelético e fígado (TAVARES et al.,

2007). Mesmo esse efeito de sensibilização não sendo completamente elucidado existem algumas hipóteses que estão relacionadas, sendo elas: o aumento da captação e armazenamento de ácidos graxos livres pelo tecido adiposo (OAKES et al., 2001); inibição da secreção de citocinas inflamatórias que induzem resistência insulínica no fígado e músculo esquelético (MILES et al., 1997) e pelo aumento da produção de adiponectina, um produto secretório do adipócito com atividade sensibilizadora de insulina (COMBS et al., 2002).

1.4 Farmacocinética das TZDs

As TZDs são fármacos de administração via oral, de metabolismo hepático, porém não induzido pelo citocromo P450 (CYP) 3A4, isso explica sua não interação medicamentosa com outros fármacos como contraceptivos orais, por exemplo, A dose de pioglitazona, único medicamento da classe ainda no mercado no Brasil, é de 15 a 45 mg, podendo ser uma vez ao dia. Apesar de a eliminação ser urinária, insuficiências renais leves a moderadas não alteram a excreção, não necessitando aumento de dose (ARAÚJO; BRITTO; PORTO DA CRUZ, 2000).

1.5 Usos clínicos das TZDs

A utilização das Tiazolidinadionas para o tratamento do diabetes tipo 2 é indicada em 3 casos, basicamente: Em monoterapia quando o paciente não obteve melhora com dieta e exercícios físicos. Pacientes tratados com esses medicamentos, que praticavam exercícios físicos e dieta, reduziram os níveis de HbA1-c em 1,7% e de 50 mg/dL na glicemia em jejum (LEBOVITZ et al., 2001; HERNÁNDEZ HERRERA, 2008). Escolha como terapia de segunda linha, juntamente com metformina ou a sulfoniureia, nos casos em que as maiores doses destes não apresentaram melhora significativa (DIXON, 2004; HERNÁNDEZ HERRERA, 2008). Combinação da pioglitazona com insulina, no qual se

afirma que a utilização de glitazona com insulina diminui a necessidade de insulina exógena, devido a melhora da insulina endógena (BELL, 2003).

1.6 Efeitos adversos das TZDs

Os efeitos adversos mais comuns relacionados a essa classe de medicamentos são ganho de peso, edema, anemia dilucional e hepatotoxicidade (GOMES, 2006). O ganho de peso é um efeito dose-depende e parece ter uma diminuição de 50% quando associado a outros medicamentos antidiabéticos como a metformina (TAVARES et al., 2005). Não é clara ainda a causa estabelecida para formação de edema, porém as hipóteses prováveis relacionam o aumento da reabsorção de sódio e da expressão do fator de crescimento endotelial (KITZMILLER JL, 2003). O hematócrito pode chegar a 2,5%, com aparecimento de anemia tendo que ser retirada a utilização do medicamento em menos de 1% dos pacientes. Estudos recentes descreveram a expressão de PPAR γ em células hematopoiéticas (AKBIYIK et al., 2004), tal achado pode estar relacionado com os casos de leucopenia e trombocitopenia em pacientes diabéticos tratados com glitazonas (DORMANDY et al., 2005). Os casos de hepatotoxicidade associados ao uso de troglitazona motivaram a retirada do medicamento do mercado, porém a causa não é totalmente elucidada (GOMES, 2006).

1.7 TZDs e câncer

Já é amplamente difundido que, além do tecido adiposo, várias linhagens celulares de cânceres humanos possuem uma alta expressão de PPAR γ , e que a exposição dessas linhagens as TZDs levam à inibição do crescimento celular, sugerindo uma atividade antitumoral desses medicamentos (KOEFFLER, 2003; GROMMES et al., 2004). A citotoxicidade, efeitos pró-apoptóticos e diminuição da proliferação celular induzidos pelas TZDs são relatados em vários tipos de câncer como: mama, próstata, colorretal, pâncreas e

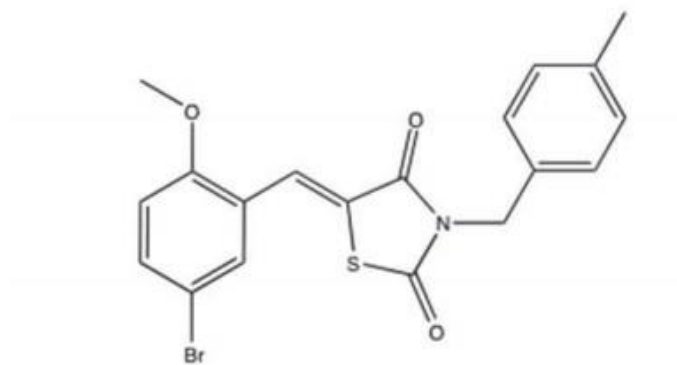
pulmão (OSAWA et al., 2003; ANNICOTTE et al., 2006; LYON et al., 2009; BOJKOVÁ et al., 2010; KOGA et al., 2012; FRÖHLICH; WAHL, 2015).

Mesmo apresentando bons resultados na manutenção do controle glicêmico a longo prazo e apresentarem efeito antiproliferativo em vários tipos de tumores, nos últimos anos essa classe de medicamentos têm tido seu uso questionado por efeitos adversos graves como toxicidade hepática, ganho de peso, edema e complicações cardíacas.

A completa ativação do PPAR γ causada por seus agonistas totais é a principal causa relacionada com os seus efeitos adversos, uma boa estratégia para reduzir esses efeitos foi desenvolvimento de outros ligantes de PPAR γ que modulam diferentemente esses receptores (RUBENSTRUNK et al., 2007; AMATO, 2008).

1.8 Agonista parcial de PPAR, GQ-16

Em estudos realizados pelo Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco foram identificados novos ligantes de PPAR γ , dentre eles o GQ-16 (5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona) (AMATO, 2008). O GQ-16 é um composto não comercial que está sendo testado e mostrou atividade agonista parcial do GQ-16 em PPAR γ de pró-monócitos humanos U-937. O GQ-16 se difere das TZDs clássicas, pois apresentou atividade agonista parcial de PPAR, competiu pela ligação LBD do PPAR, induziu a interação entre o PPAR e o coativador SRC-1 (Coativador 1 do receptor de esteroide), além disso, a ligação do GQ-16 com o PPAR ocasionou em uma modificação conformacional do receptor de forma diferente da rosiglitazona. Esses estudos ainda mostraram bons resultados *in vivo* e *in vitro* em pesquisas de desordens metabólicas relacionadas à obesidade, diabetes mellitus e inflamação crônica (AMATO, 2008; AMATO et al., 2012). O GQ-16 demonstrou semelhanças consideráveis com as TZDs quanto ao aumento da sensibilidade da insulina endógena, mas não aumentou o ganho de peso; efeito adverso já descrito por tiazolidinadionas clássicas (AMATO et al., 2012).



GQ-16

Figura 3. Estrutura química do GQ-16. Adaptado de: SOUZA, 2012.

No contexto de efeitos antiproliferativo e/ou anti-tumoral dos TZDs e ainda, considerando que esses efeitos podem se aplicar ao GQ16, pois ambos possuem efeitos semelhantes, não existem, até o momento, estudos que mostrem ação das TZDs e GQ16 em linhagens celulares de feocromocitoma.

2. JUSTIFICATIVA

Grande parte dos tumores malignos ou reincidentes de feocromocitomas não são responsivos aos tratamentos medicamentosos disponíveis. Neste contexto, torna-se indispensável a busca por novos alvos terapêuticos que visem reduzir a progressão do tumor, aumentar a sobrevida de pacientes com feocromocitoma e ainda reduzir a exposição a reações adversas graves causadas pela terapia disponível. Já se sabe que os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma γ (PPAR γ), envolvidos na expressão de genes reguladores de metabolismo lipídico, são altamente expressos em vários tipos de tumores e que estes poderiam ser um alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos antitumorais. Nos últimos anos os ligantes destes receptores, como as TZDs clássicas, foram relacionadas com efeitos antiproliferativos, porém seus efeitos adversos podem vir a se tornar uma grande limitação para essa classe. O GQ-16, agonista parcial de PPAR γ , já demonstrou possuir atividade semelhante às TZDs, com efeitos adversos menos severos. Partindo desse ponto, a investigação sobre possível atividade antiproliferativa do GQ-16, assim como as TZDs, se torna relevante.

3. OBJETIVOS

- Objetivo Geral

Avaliar o efeito do agonista parcial de PPAR γ , GQ-16, sobre a viabilidade de linhagem celular de feocromocitomas.

- Objetivos Específicos

Investigar o efeito de várias concentrações do agonista total de PPAR, rosiglitazona, e do agonista parcial, GQ-16, sobre a viabilidade de feocromocitomas em cultura. Avaliar a atividade mitocondrial pelo ensaio de MTT, a integridade das membranas de feocromocitoma pelo ensaio de Azul de Tripán e proliferação celular por coloração com Cristal de Violeta.

4. MÉTODOS

4.1 Linhagem celular

Nesse estudo foram utilizados dois tipos celulares: células PC12-Adh (ATCC® CRL-1721™) derivadas de feocromocitomas da glândula adrenal de ratos (*Rattus norvegicus*), machos; e células CCD-1059Sk (ATCC® CRL-2072™), fibroblastos da pele de uma mulher, adulta, caucasiana. Os dois tipos celulares foram adquiridos pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

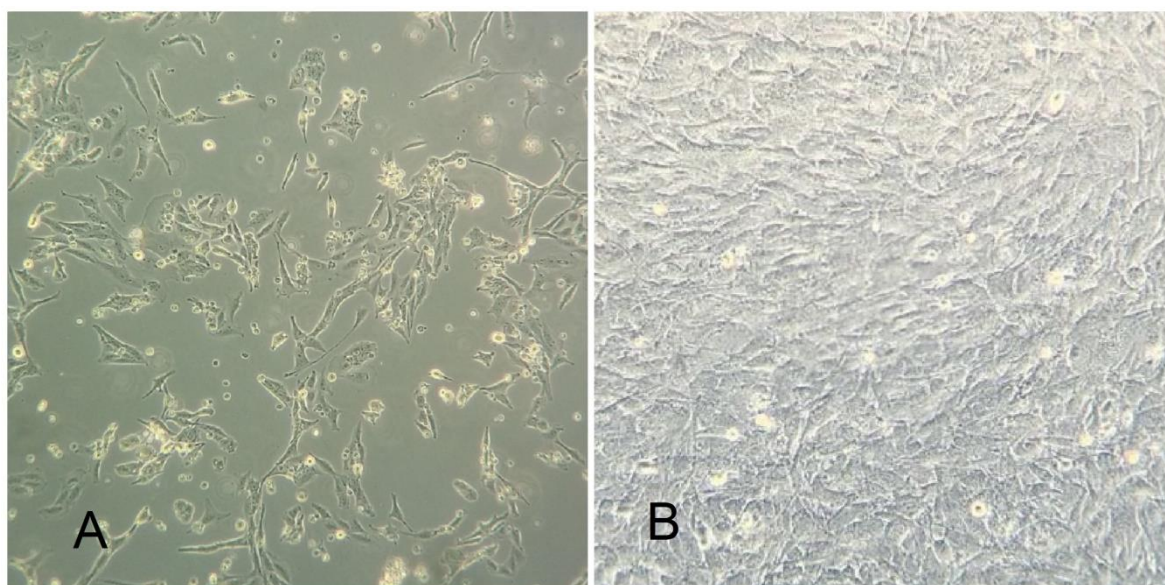


Figura 4. Células de feocromocitoma (PC12-Adh) e fibroblasto (CCD1059S-k). A – Células de feocromocitoma no aumento 10X. B – Células de fibroblastos no aumento 10X.

4.2 Cultivo celular

As células PC12-Adh foram mantidas em meio HAM F12 suplementado com 15% de soro de cavalo, 2,5% de soro fetal bovino (SFB), 50U/mL de penicilina e 50µg/mL de estreptomicina. As células CCD-1059Sk foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina e estreptomicina. As duas linhagens foram mantidas a 37 °C com 5% de CO₂.

4.3 Ensaio de viabilidade celular

No estudo descrito foi avaliado a viabilidade celular por meio de 3 métodos, sendo eles: o ensaio de MTT, ensaio de exclusão por Azul de Tripán e ensaio de coloração por Cristal de Violeta. A escolha por mais de um método foi devido a limitação implícita de cada um deles possui e que com a realização de todos, isso poderia ser minimizado, levando também em consideração que cada método possui um fundamento diferente e se relaciona a diferentes resultados, porém complementares.

4.3.1 MTT

O ensaio de MTT é um método rápido, fácil e amplamente utilizado para se determinar viabilidade celular *in vitro*. Ele é determinado pela quantidade de células viáveis após o tratamento escolhido, já que estas farão a redução mitocondrial do sal de MTT em cristais de formazam pela enzima succinato-desidrogenase (produto na cor azul). A quantidade de cristais de formazam produzida é medida espectrofotometricamente e é proporcional ao número de células com respiração ativa, ou seja, células sobreviventes (MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011).

Para o estudo em questão, foi avaliada a viabilidade celular das células PC12-Adh e CCD-1059Sk pelo método de MTT. As células, PC12-Adh e CCD-1059Sk, foram plaqueadas em placas de 96 poços com 8×10^3 células por poço, cada tipo celular com uma placa para 24 e 48 horas. Depois de plaqueadas por 24 horas, os meios de cultura foram aspirados e adicionados 80 μL das intervenções para se observar os resultados em 24h e 48h. As intervenções avaliadas foram rosiglitazona (10^{-8}M , 10^{-7}M , 10^{-6}M , 10^{-5}M e 10^{-4}M) e GQ-16 (10^{-8}M , 10^{-7}M , 10^{-6}M , 10^{-5}M e 10^{-4}M).

Tabela 1. Concentrações das intervenções utilizadas no ensaio de MTT para células de fibroblastos (CCD1059S-k) e PC12-Adh.

<i>Concentrações das intervenções utilizadas no ensaio de MTT para células de fibroblastos (CCD1059S-k) e PC12-Adh</i>	
<i>Rosiglitazona</i>	<i>GQ-16</i>
10^{-8} M	10^{-8} M
10^{-7} M	10^{-7} M
10^{-6} M	10^{-6} M
10^{-5} M	10^{-5} M
10^{-4} M	10^{-4} M

O MTT foi diluído em meio de cultura HAM F12 (para PC12-Adh) e DMEM (para CCD1059S-k), na concentração de 5mg/mL. Após 24 horas dos tratamentos, foram adicionados 72µL de meio de cultura e 8 µL de MTT e as placas foram incubadas a 37°C por 4 horas, protegidas da exposição a luz. Logo em seguida foram adicionados 80 µL de DMSO para solubilizar os cristais de formazam. Foram então quantificados por espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. Após 48 horas realizou-se o mesmo procedimento na segunda placa de cada tipo celular. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

4.3.2 Azul de Tripán

O ensaio de exclusão por azul de tripan é um método amplamente utilizado para avaliar a citotoxicidade mensurando a viabilidade celular pela integridade da membrana celular. Baseia-se no fato que as células mortas absorvem o Azul de Tripán para seu citoplasma por perda de seletividade da membrana, enquanto que a células vivas permanecem intactas, ou seja, o número relativo de células mortas e vivas é feito contando as células coradas (mortas) e as incolores (vivas) com uma câmara de Neubauer. (AVELAR-FREITAS et al., 2014; STROBER, 2015).

Trata-se de um método conveniente, pois o método é barato e o rompimento da membrana plasmática é um fato que determina a morte celular. O ensaio foi realizado então

da seguinte forma: os dois tipos celulares foram cultivadas em placas de 48 poços com 50×10^3 células por poço, placas para 24 e 48 horas cada. Após 24 horas os meios de cultura foram aspirados e adicionados 200 μL dos seguintes tratamentos: Rosiglitazona (10^{-5}M), GQ-16 (10^{-5}M) e o controle de cada um deles DMSO 0,01% em meio de cultura. Depois de 24 horas os tratamentos foram aspirados, os poços foram lavados, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em PBS 1x. O azul de tripan foi diluído em água destilada numa concentração de 5mg/mL, então, 18 μL de azul de tripan foram adicionados com 2 μL de cada solução contendo as células tratadas, deixou-se reagir por 4 minutos e foi feita a contagem de células vivas e mortas em câmara de Neubauer. O mesmo procedimento foi realizado com placas tratadas por 48 horas. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

4.3.3 Cristal de Violeta

O ensaio por coloração com cristal de violeta é um método qualitativo e consiste na atividade desse corante se acumular dentro dos núcleos das células porque tem capacidade de se ligar ao DNA. As células que estão vivas continuam aderidas na placa depois de fixadas e pode-se observar o efeito citotóxico da substância- teste através da densidade celular na placa (CARVALHO, 2011).

Cultivou-se em placas de 6 poços, com os dois tipos celulares numa concentração de 25×10^3 células por poço, após 24 horas o meio de cultura respectivo foi aspirado e, em seguida, adicionados os tratamentos Rosiglitazona (10^{-5}M) GQ-16 (10^{-5}M) e o controle de cada um deles DMSO 0,01% em meio de cultura. Foram inseridos 2mL de cada intervenção por poço. Depois de 5 dias em tratamento em incubadora a 37°C , os tratamentos foram aspirados, os poços lavados com PBS 1X, as células foram fixadas com metanol absoluto por 20 minutos, depois coradas com Cristal de violeta solução a 0,2% por 15 minutos, os poços lavados novamente para retirar toda a solução cristal de violeta e, por fim, foram realizadas fotografias para a avaliação da densidade celular pelo ImageJ.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Devido ao um pequeno número amostral os dados foram considerados com distribuição não-gausseana e o teste selecionado foi Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e para curva foi utilizado regressão não-linear com curva dose-resposta.

6. RESULTADOS

6.1 Avaliação da viabilidade celular por ensaio de MTT

A Figura 5 mostra o efeito da, agonista total de PPAR γ , rosiglitazona (ROSI) e, agonista parcial de PPAR γ , GQ-16 em 5 diferentes concentrações (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M) por 24 e 48 horas de tratamento no percentual de viabilidade celular em fibroblastos.

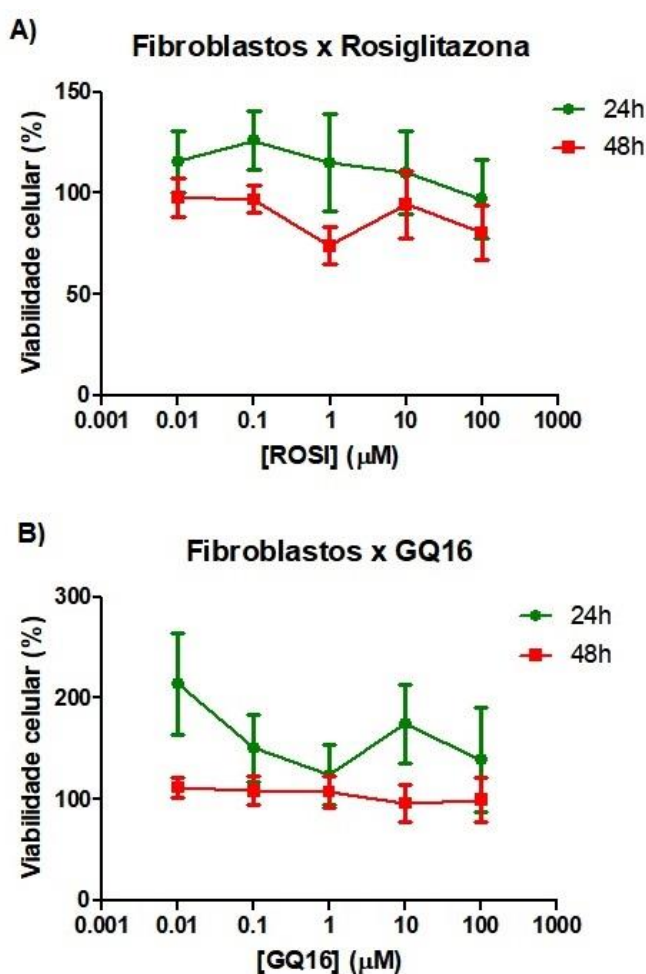


Figura 5. Ensaio de viabilidade celular por MTT em fibroblastos. **A** - Células de fibroblasto (CCD1059S-k) tratadas por 24 e 48 horas com rosiglitazona em 5 concentrações (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M). **B** - Células de fibroblasto (CCD1059S-k) tratadas por 24 e 48 horas com GQ-16 em 5 concentrações (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M). (n=3).

A rosiglitazona reduziu a viabilidade celular de fibroblastos, para aproximadamente 60%, na concentração de 10^{-6} M em 48h não sendo constante nas outras concentrações. O

GQ-16 não diminuiu a viabilidade celular, ou seja, em nenhuma concentração a viabilidade foi percebida menor do que 100%.

A Figura 6 mostra o efeito da, agonista total de PPAR γ , rosiglitazona (ROSI) e, agonista parcial de PPAR γ , GQ-16 na viabilidade de células de feocromocitomas (PC12-Adh) em 24h e 48 h, nas concentrações 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M.

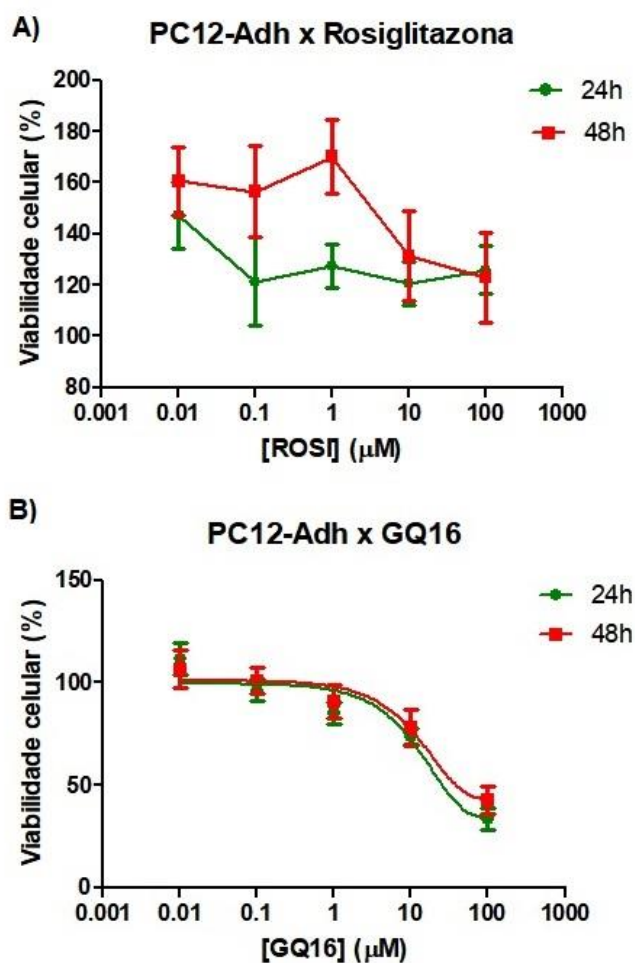


Figura 6. Ensaio de viabilidade celular por MTT em feocromocitomas . **A** - Células de feocromocitomas (PC12-Adh) tratadas por 24 e 48 horas com GQ-16 em 5 concentrações (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M). **B** - Células de feocromocitoma (PC12-Adh) tratadas por 24 e 48 horas com GQ16 em 5 concentrações (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M). (n=3).

Em células de fibroblastos o tratamento com GQ-16 em 24 e 48 horas não alterou a viabilidade celular, em nenhuma das concentrações a porcentagem de viabilidade celular foi menor que 100%.

O tratamento em células de PC12-Adh com GQ-16 alterou a viabilidade celular, pois reduziu em mais de 50% tanto em 24h como 48h, tendo um significativo decaimento de células viáveis na concentração de 10^{-4} M.

6.2 Percentual de células mortas por Azul de Tripán

O segundo ensaio escolhido para determinação da viabilidade celular foi o de exclusão por azul de tripan. Com base nos resultados do ensaio de MTT, foi escolhida uma determinada concentração para realizar este ensaio, sendo a concentração escolhida a de 10^{-5} M para rosiglitazona e GQ-16. Considerando a quantidade total de células (viáveis e não viáveis) como 100% a taxa de mortalidade foi obtida pela porcentagem de células não viáveis (coradas de azul).

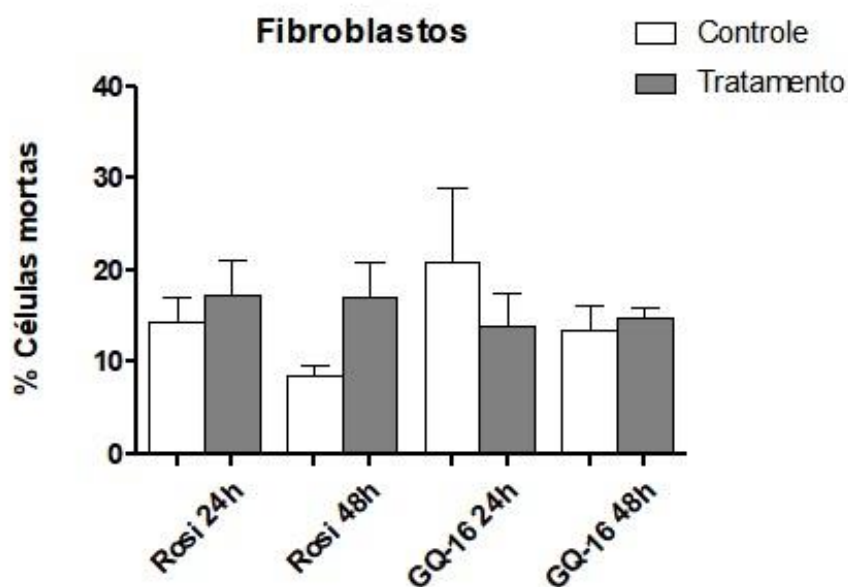


Figura 7. Ensaio de viabilidade por exclusão com Azul de Tripán em fibroblastos. Percentual de células mortas de fibroblastos tratadas com rosiglitazona e GQ-16: as células foram tratadas na concentração de 10^{-5} M de cada intervenção em 24 e 48 horas. Em seguida, realizado ensaio de Azul de Tripán. Kruskal-Wallis com pos teste de Dunns. (n=3).

A Figura 7 apresenta o percentual de células mortas de fibroblastos tratadas com rosiglitazona e GQ-16. Não foi observado aumento do percentual de células mortas de fibroblastos com nenhum dos tratamentos utilizados, rosiglitazona e GQ-16 a 10^{-5} M.

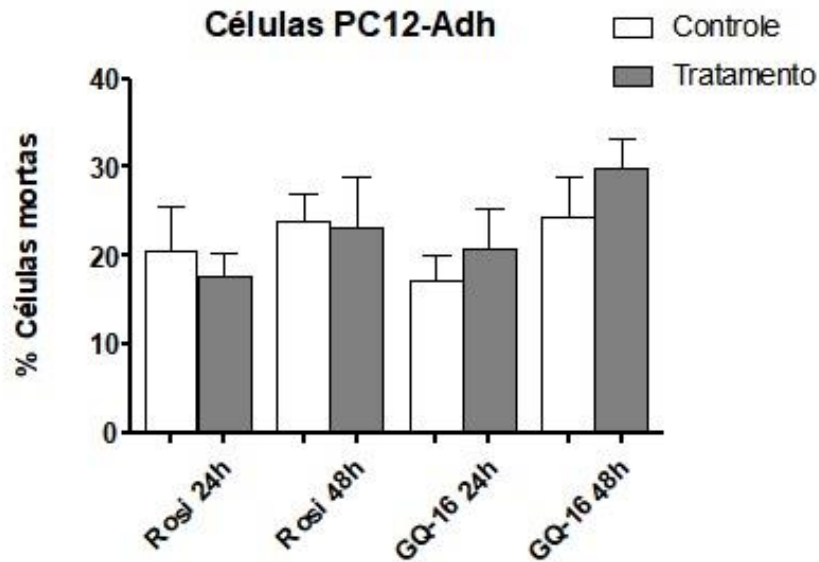


Figura 8. Ensaio de viabilidade por exclusão com Azul de Tripán em feocromocitomas. Percentual de células mortas de PC12-Adh tratadas com rosiglitazona e GQ-16: as células foram tratadas na concentração de 10^{-5} M de cada intervenção em 24 e 48 horas. Em seguida, realizado ensaio de Azul de Tripán. Kruskal-Wallis com pos teste de Dunns $p < 0,05$ ($n=3$)

Na Figura 8 pode-se observar que as intervenções não alteraram o percentual de células mortas de feocromocitomas quando comparadas ao controle.

As figuras seguintes (Figura 9, 10 11 e 12) são as fotos referentes aos controles e tratamentos de rosiglitazona e GQ-16 nos dois tipos celulares utilizados (CCD1059S-k PC12-Adh) no ensaio de exclusão por azul de tripan.

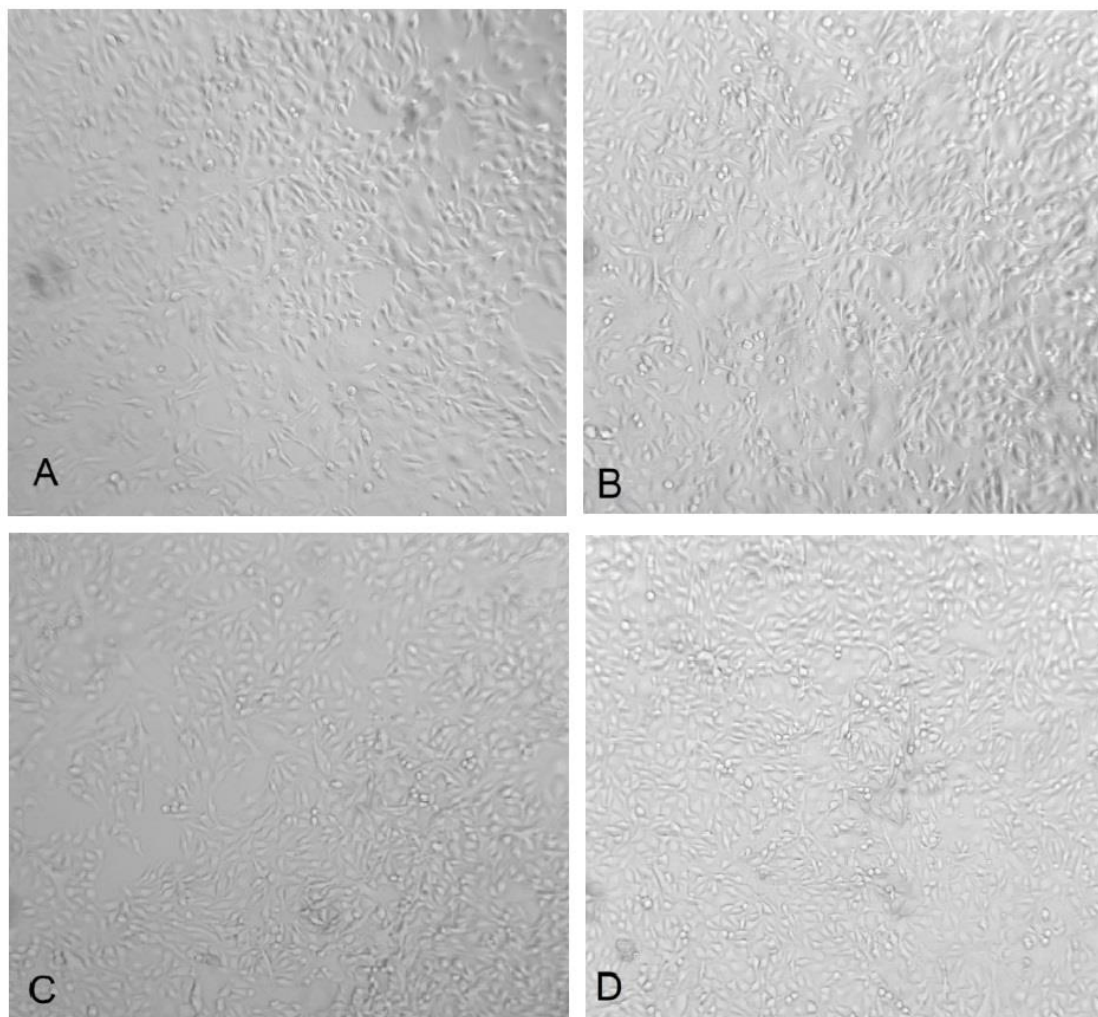


Figura 9. Controle e tratamento da rosiglitazona a 10^{-5} M em células de fibroblastos (CCD1059S-k). **A** – Controle de células com DMSO 0,01% em 24 horas. **B** – Tratamento com rosiglitazona 10^{-5} M em 24 horas. **C**- Controle de células com DMSO 0,01% em 48 horas. **D** – Tratamento com rosiglitazona 10^{-5} M em 48 horas.

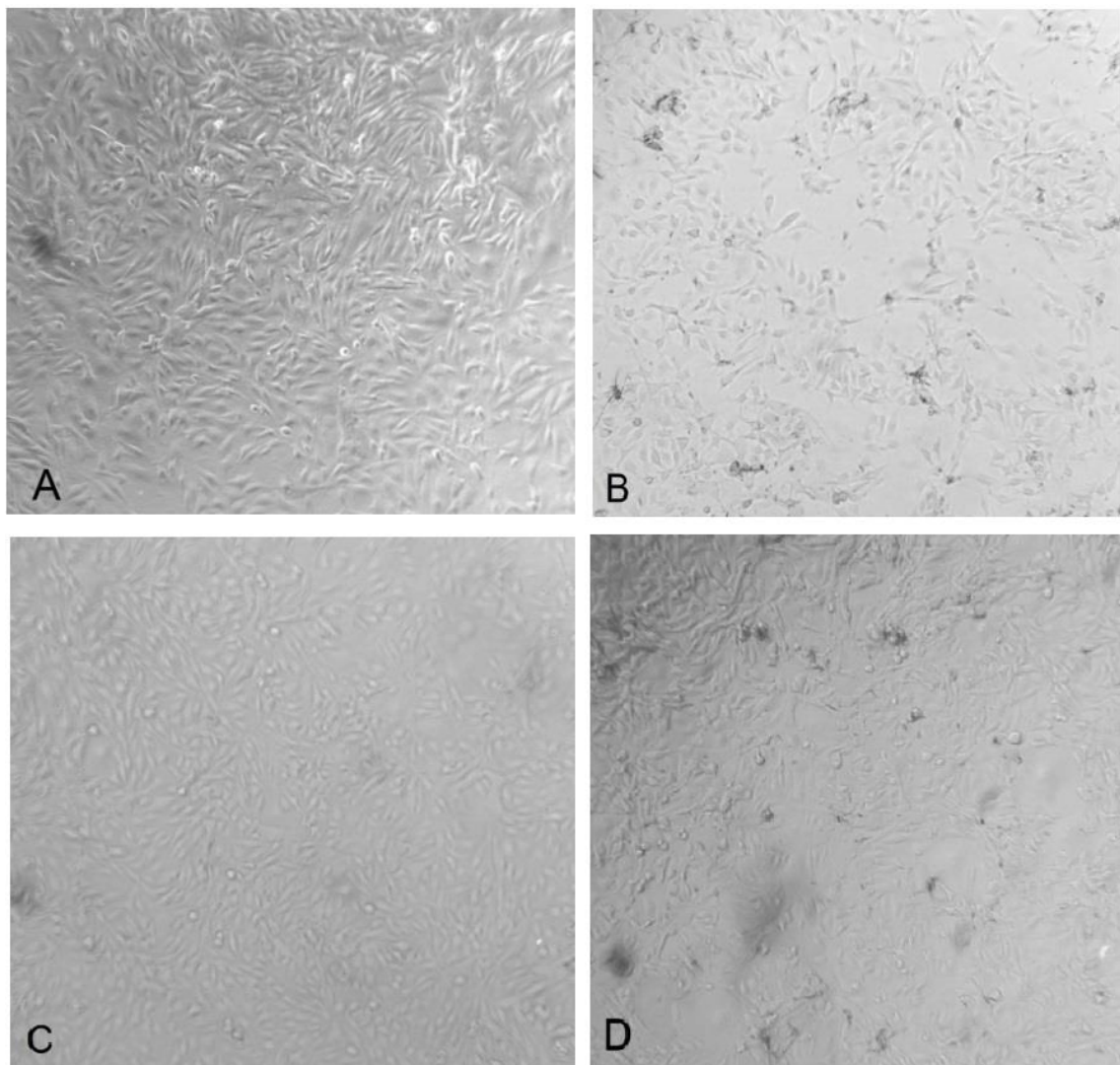


Figura 10. Controle e tratamento da GQ-16 a 10^{-5} M em células de fibroblastos (CCD1059S-k). **A** – Controle de células com DMSO 0,01% em 24 horas. **B** – Tratamento com GQ-16 10^{-5} M em 24 horas. **C**- Controle de células com DMSO 0,01% em 48 horas. **D** – Tratamento com GQ-16 a 10^{-5} M em 48 horas.

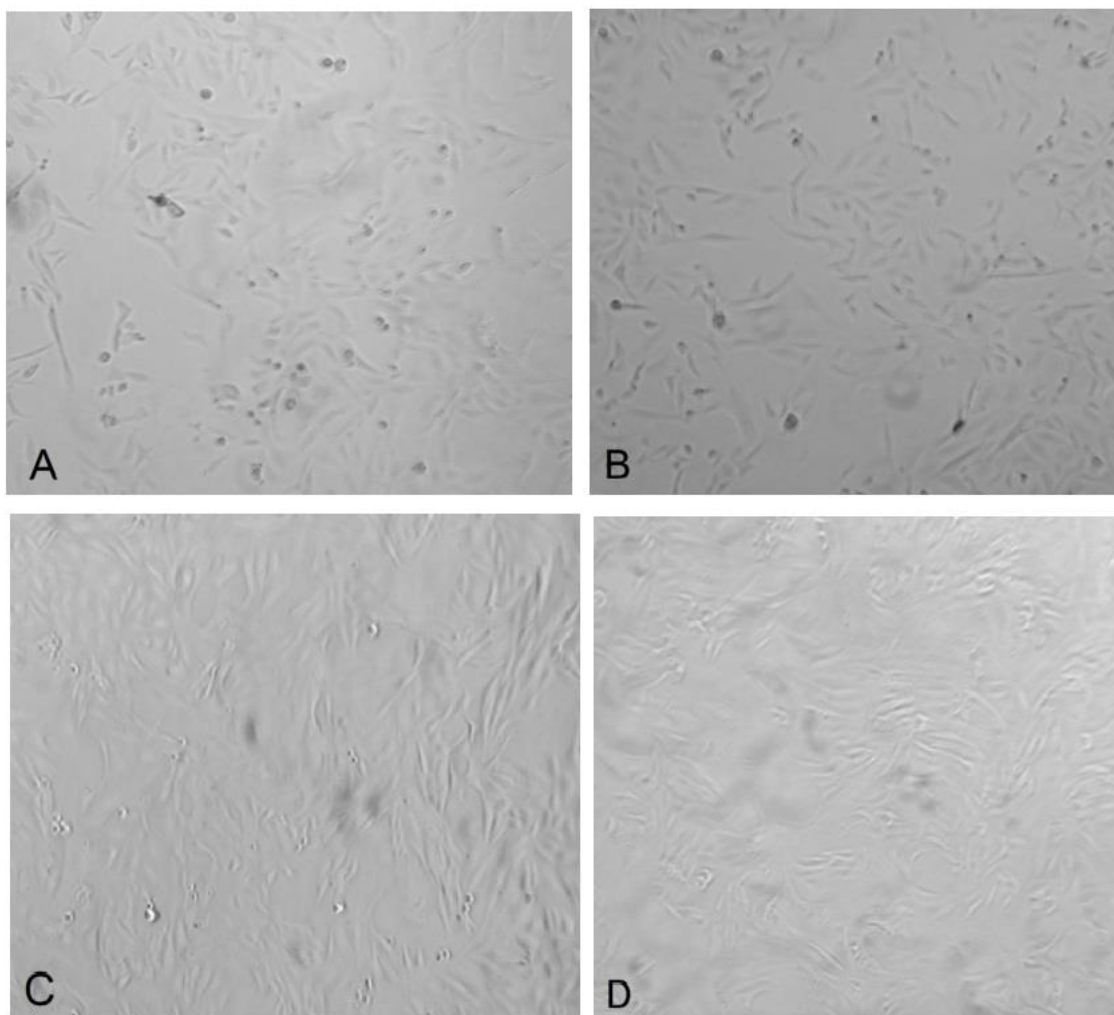


Figura 11. Controle e tratamento da rosiglitazona a 10^{-5} M em células de feocromocitoma (PC12-Adh). **A** – Controle de células com DMSO 0,01% em 24 horas. **B** – Tratamento com rosiglitazona 10^{-5} M em 24 horas. **C** – Controle de células com DMSO 0,01% em 48 horas. **D** – Tratamento com rosiglitazona a 10^{-5} M em 48 horas.

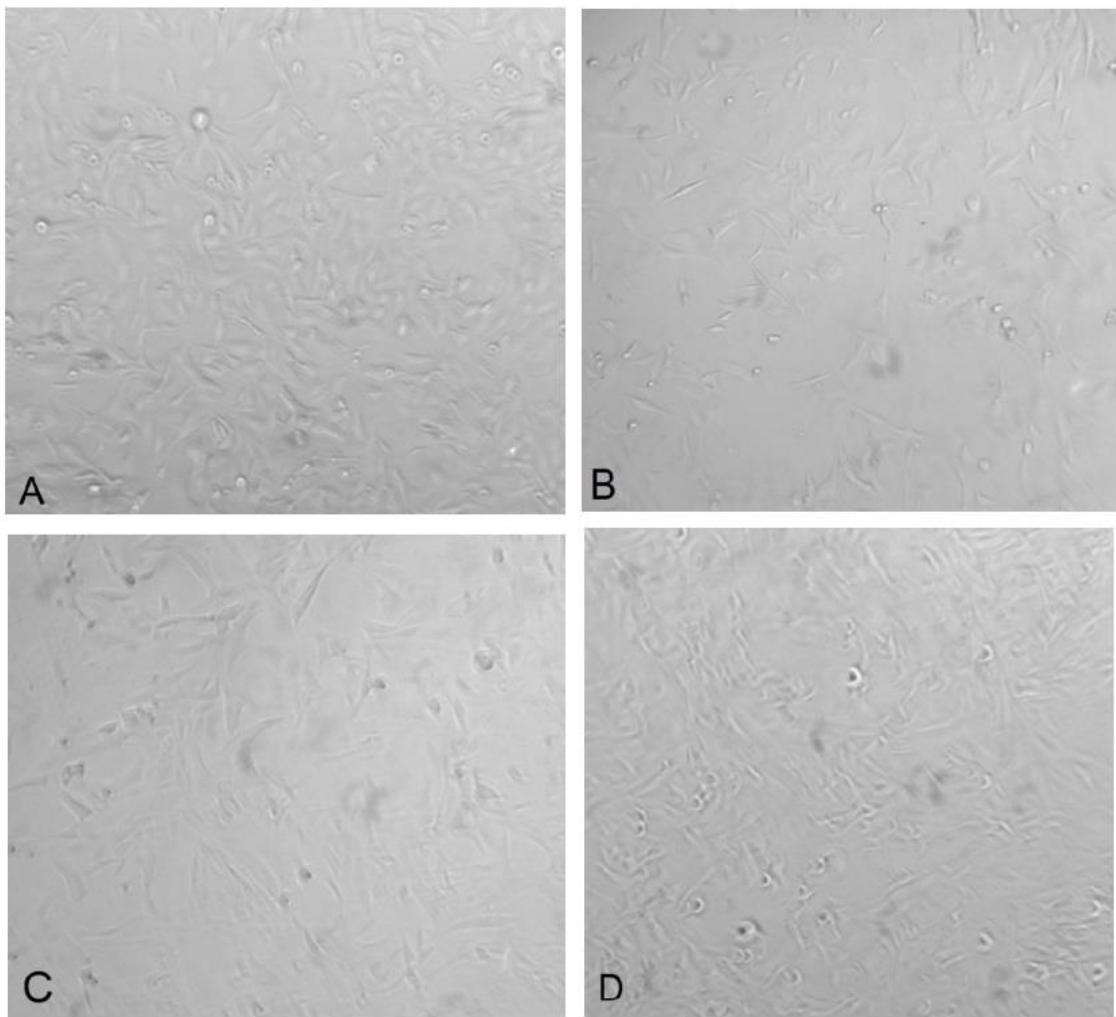


Figura 12. Controle e tratamento da GQ-16 a 10^{-5} M em células de feocromocitoma. **A** – Controle de células com DMSO 0,01% em 24 horas. **B** – Tratamento com GQ-16 10^{-5} M em 24 horas. **C**- Controle de células com DMSO 0,01% em 48 horas. **D** – Tratamento com GQ-16 a 10^{-5} M em 48 horas.

6.3 Percentual de proliferação celular por Cristal de Violeta

Após 5 dias incubadas com os tratamentos (rosiglitazona e GQ-16) a proliferação celular obtida foi relacionada com a viabilidade celular destas células, sabendo que somente as células viáveis eram fixadas e coradas na cor violeta. O ensaio por coloração com cristal violeta não demonstrou diferença na proliferação celular em nenhum dos dois tipos celulares e também em nenhuma das duas intervenções.

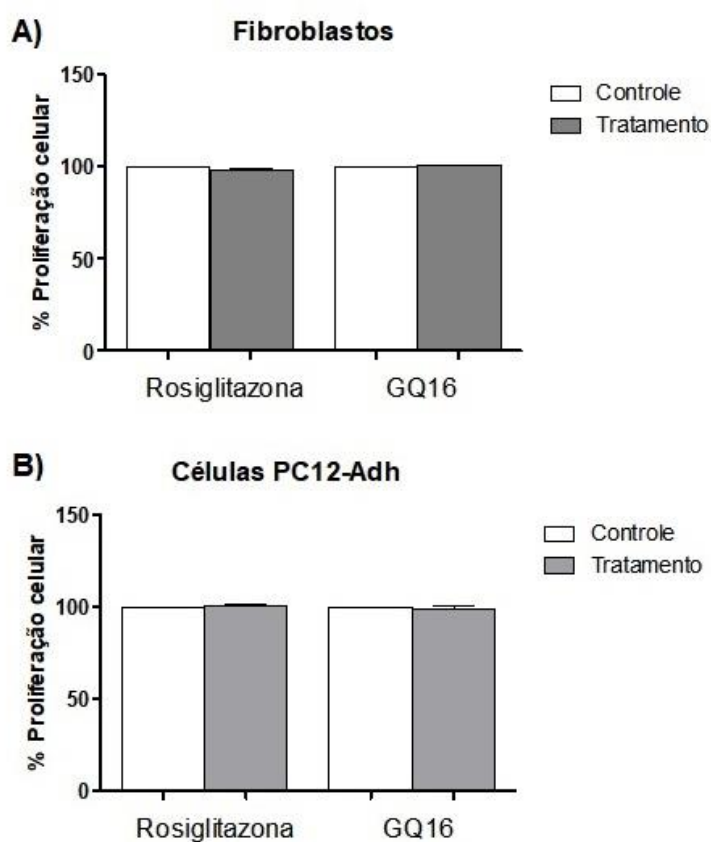


Figura 13. Ensaio de viabilidade por Cristal de Violeta em fibroblastos e feocromocitomas. Percentual de proliferação celular. **A** - Células de fibroblastos (CCD1059S-k) tratadas por 5 dias com rosiglitazona e GQ-16 na concentração de 10^{-5} M, das duas intervenções. **B**- Células de feocromocitoma (PC12-Adh) tratadas por 5 dias com rosiglitazona e GQ-16 na concentração de 10^{-5} M, das duas intervenções. Em seguida, realizado ensaio de coloração por cristal de violeta. (n=3)

As Figuras 14 e 15 são referentes aos controles e tratamentos de rosiglitazona e GQ-16 nos dois tipos celulares escolhidos corados com cristal de violeta para observação da proliferação celular.

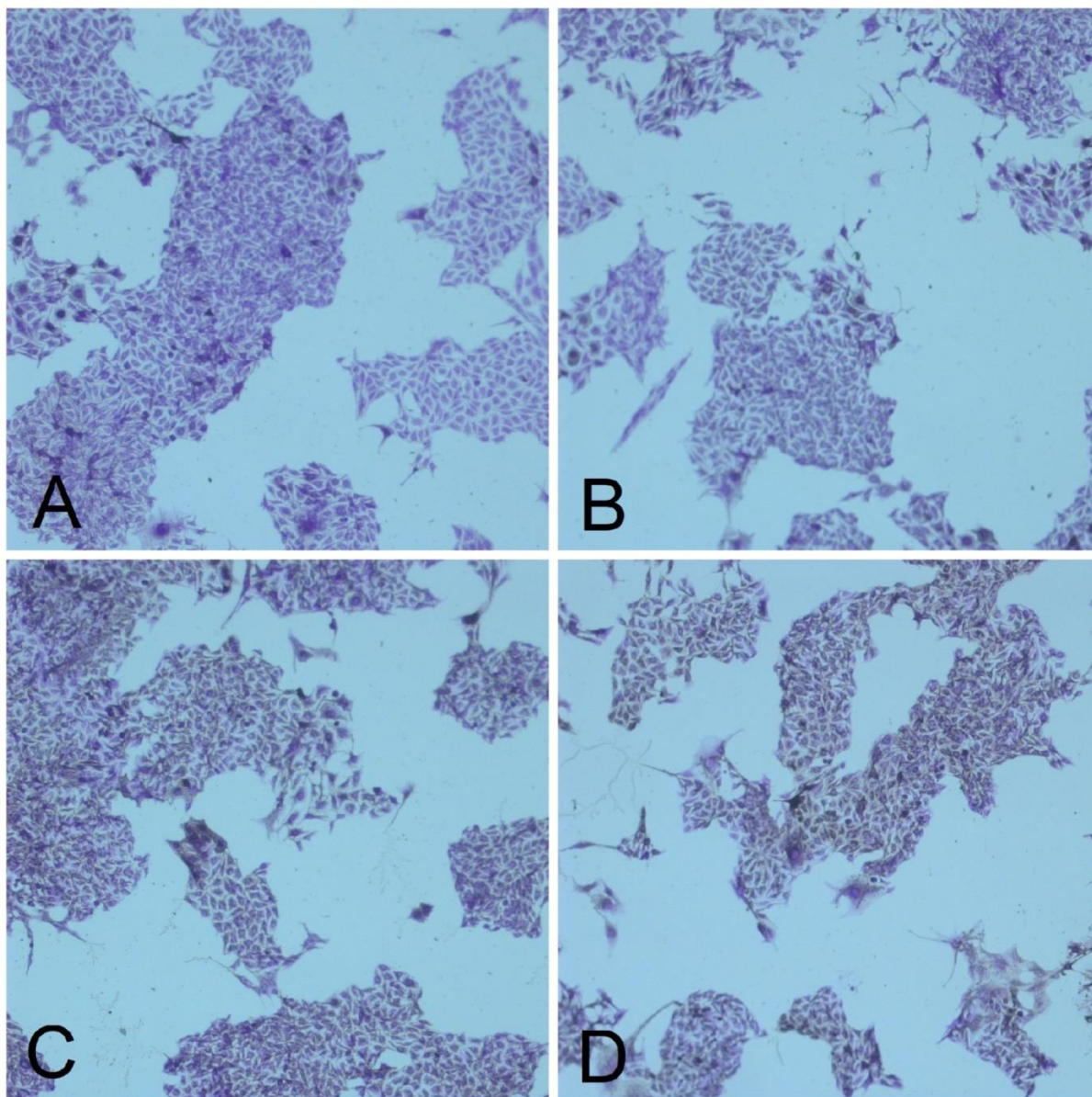


Figura 14. Células de fibroblastos tratadas com rosiglitazona e GQ-16, coradas com Cristal de Violeta. **A** - Controle de células com DMSO 0,01%. **B** - Células tratadas com rosiglitazona a 10^{-5} M. **C** - Controle de células tratadas com DMSO 0,01%. **D** - Células tratadas com GQ-16 a 10^{-5} M.

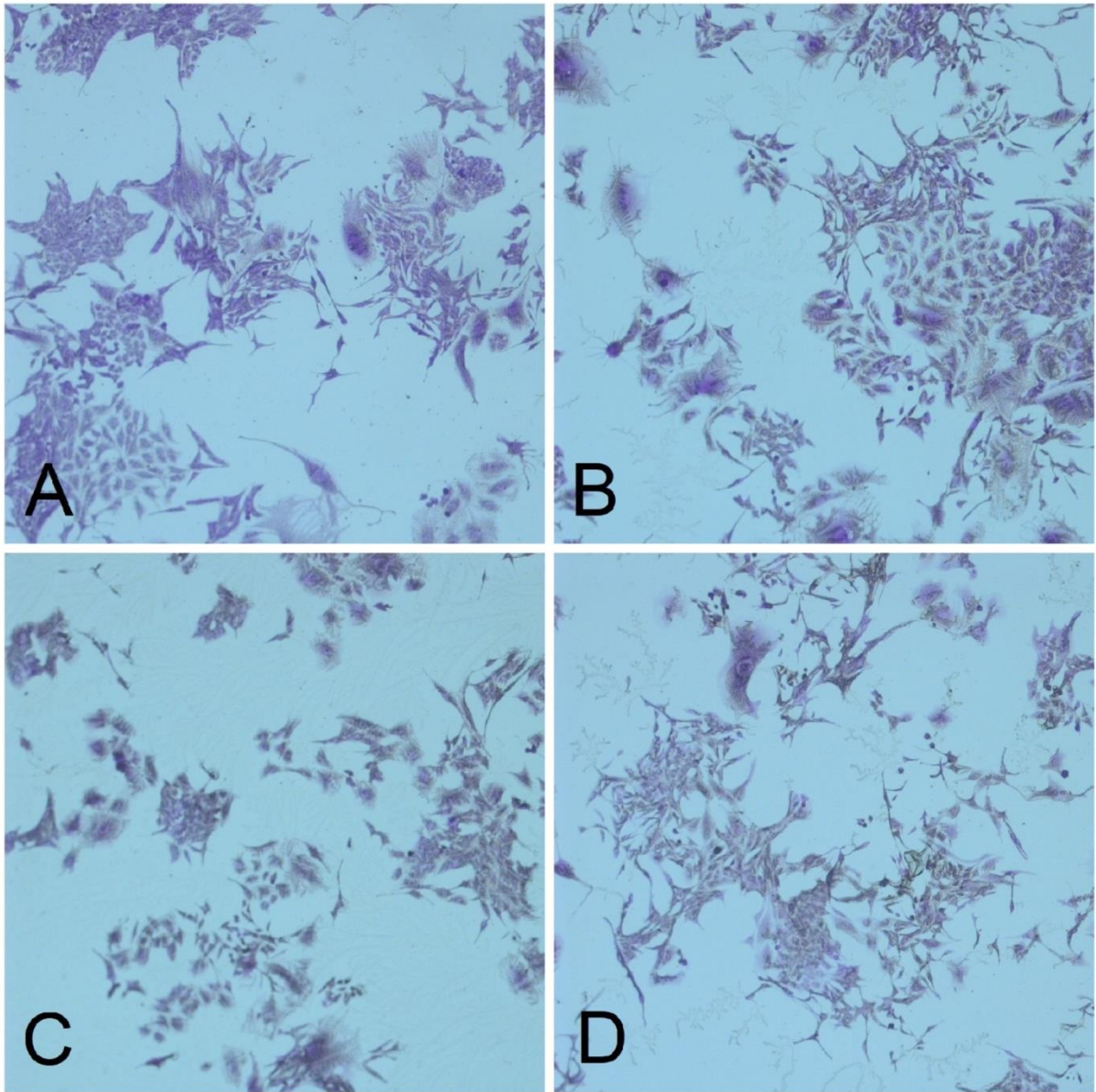


Figura 15. Células de feocromocitoma tratadas com rosiglitazona e GQ-16, coradas com Cristal de Violeta. **A-** Controle de células com DMSO 0,01%. **B** – Células tratadas com rosiglitazona a 10^{-5} M. **C-** Controle de células tratadas com DMSO 0,01%. **D-** Células tratadas com GQ-16 a 10^{-5} M.

7. DISCUSSÃO

As evidências acumuladas nos últimos anos sugerem que a ativação de PPAR γ , realizada por medicamentos agonistas, desempenham um papel importante na regulação de crescimento de células cancerígenas (WU et al., 2016). Esse efeito antiproliferativo já foi demonstrado em muitos tipos de câncer como o de fígado (CAO, 2015), próstata (ANNICOTTE et al., 2006), mama (MUELLER et al., 1998) e câncer gástrico (CHO et al., 2015) por meio da regulação da expressão e bloqueio de proteínas oncogênicas.

Já se sabe da atividade antiproliferativa extensamente descrita das TZDs, um exemplo é o estudo de Cao e colaboradores onde a rosiglitazona inibiu significativamente a proliferação de células de retinoblastoma em concentrações de 5 μ M, 25 μ M, 125 μ M em 24, 48 e 72 horas por ensaio de MTT. A inibição foi dose e tempo dependente, onde as taxas variaram de 1,7%, na menor dose em 24 horas, a 63,2% após 72 horas de exposição (CAO, 2015).

O GQ-16 foi desenvolvido a partir das TZDs e é um agonista parcial de PPAR γ , diferente das TZDs clássicas que possuem atividade agonista total. O novo agente não possui mecanismo caracterizado, porém possivelmente, causa modificações na conformação dos receptores levando a uma menor afinidade por coativadores (PIKE et al., 1999). O GQ-16 mostrou eficácia antidiabética semelhante à rosiglitazona, em camundongos, mas não provocou ganho de peso ou edema, efeitos colaterais comuns associados à ativação completa de PPAR γ (AMATO et al., 2012). Sugerindo que assim como as TZDs clássicas o GQ-16 também pode ser um possível tratamento em doenças metabólicas.

Como os agonistas de PPAR γ se tornaram alvos de estudo para o desenvolvimento de fármacos no tratamento de câncer nos últimos anos surgiu à questão se o GQ-16 também teria um efeito antiproliferativo, este então está sendo inicialmente testado.

Ao contrário do esperado, no presente estudo a rosiglitazona não apresentou diferença na viabilidade celular de feocromocitomas pelo ensaio de MTT, nenhuma das concentrações diminuiu a viabilidade em menos de 100%. Já para o ensaio com GQ-16 a viabilidade celular foi reduzida em mais de 50% na concentração de 10^{-4} M, demonstrando ser mais efetivo na redução da viabilidade celular. O estudo onde-se avaliou o efeito na viabilidade celular de células de câncer de mama tratadas com GQ-16 por ensaio de MTT. O estudo utilizou as concentrações de 10^{-8} a 10^{-4} M de GQ-16 e rosiglitazona e sugeriu que o agonista parcial GQ-16 é mais efetivo pois reduziu a viabilidade em várias concentrações (36,92% a 10^{-6} M ; 39,08% a 10^{-5} M; 75,81% a 10^{-4} M) (FERREIRA et al., 2017).

Sabendo o princípio do ensaio de MTT que avalia atividade mitocondrial, relacionado com metabolismo celular pode-se deduzir que o GQ-16 ocasionou redução do metabolismo celular em células de feocromocitomas e não foi observado o mesmo efeito em células normais, fibroblastos. Tal resultado não pode ser explicado pelo ensaio, uma vez que este só avalia uma variável que é a atividade da mitocôndria, mas pode sugerir que a molécula de GQ-16 possui certa seletividade ou afinidade por células de feocromocitoma, diminuindo seu metabolismo.

No ensaio de exclusão com Azul de tripan é avaliada a viabilidade celular por outra variável: a integridade da membrana plasmática. Nele somente as células que possuem sua membrana rompida ou não íntegra são invadidas pelo azul de tripan e ficam coradas de cor diferente das células íntegras (STROBER, 2015). No presente estudo observou-se a manutenção da integridade da membrana celular de fibroblastos e feocromocitomas, tratadas com rosiglitazona e GQ-16. Não houve diferença significativa no percentual de células mortas comparadas ao controle em nenhuma das concentrações testadas. Correlacionando com o resultado do ensaio de MTT pode-se sugerir que a atividade mitocondrial sofre redução, no tratamento com GQ-16, porém não causa nenhum dano a membrana dessas células. Strober em seu protocolo sobre o ensaio de exclusão com azul de tripan já relata que a viabilidade celular de uma célula pode ser comprometida sem que

haja rompimento da sua membrana e que a outra limitação do ensaio é o fato da contagem ser realizada de forma subjetiva, a célula corada em pouca quantidade pode passar despercebida (STROBER, 2015).

Estudos que utilizaram as TZDs clássicas e outros ligantes seletivos de PPAR γ para avaliar a viabilidade celular de osteossarcoma e melanoma pelo ensaio com cristal de violeta obtiveram redução na proliferação (HAYDON et al., 2002; EASTHAM et al., 2008). No presente estudo não se observou diferença na redução da proliferação celular de feocromocitomas em nenhuma das intervenções, sendo elas rosiglitazona e GQ-16.

O agonista parcial de PPAR γ utilizado pode interferir na redução da viabilidade celular de feocromocitomas por meio da diminuição da atividade mitocondrial, não alterando a integridade da membrana e a proliferação celular destas. Sugere-se que a atividade do GQ-16 em feocromocitomas seja por uma via alternativa ao PPAR γ , já que este demonstrou atividade distinta a rosiglitazona. É importante reconhecer que o GQ-16 possivelmente não será um alvo para o tratamento para feocromocitomas, porém no tratamento de outras doenças metabólicas, como o diabetes mellitus, os resultados podem ser relevantes. O GQ-16 não está associado à citotoxicidade de células normais (fibroblastos) e sabe-se que possui efeitos adversos menos severos do que a rosiglitazona.

8. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O agonista total de PPAR γ , rosiglitazona, não alterou a viabilidade celular de feocromocitomas em nenhum ensaio observado (atividade mitocondrial, integridade da membrana celular e proliferação celular) já o agonista parcial de PPAR γ , GQ-16, não diminuiu a atividade mitocondrial de feocromocitomas, sem alterar a integridade da membrana e proliferação desta linhagem celular.

O GQ-16 pode alterar o metabolismo celular de feocromocitomas que pode não estar associada à via de ativação do PPAR γ .

9. REFERÊNCIAS

- AGENCY, E. M.; DIRECTIVE 75/318/EEC; EMEA; GOMES, M. de B.; PROPRIETARY, C. for M. P.; SEREM, M. A.; PELOS, I. Pharmacokinetic studies in man. **Reproduction**, v. 44, n. May, p. 1–28, 2002.
- AKBIYIK, F.; RAY, D. M.; GETTINGS, K. F.; BLUMBERG, N.; FRANCIS, C. W.; PHIPPS, R. P.; SAITO, H. Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPARgamma, and PPARgamma agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes. **Blood**, v. 104, n. 5, p. 1361–8, 1 set. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2998511>>. Acesso em: 11 nov. 2017.
- AMATO, A. A. Investigação da atividade farmacológica de benzilideno-e acridinilideno-tiazolidinedionas e de isoflavonas nos receptores alfa, beta/delta e gama ativados por proliferadores peroxissomais. 2008. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/1492>>. Acesso em: 20 out. 2017.
- AMATO, A. A.; RAJAGOPALAN, S.; LIN, J. Z.; CARVALHO, B. M.; FIGUEIRA, A. C. M.; LU, J.; AYERS, S. D.; MOTTIN, M.; SILVEIRA, R. L.; SOUZA, P. C. T.; MOURÃO, R. H. V.; SAAD, M. J. A.; TOGASHI, M.; SIMEONI, L. A.; ABDALLA, D. S. P.; SKAF, M. S.; POLIKPARPOV, I.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; BRENNAN, R. G.; BAXTER, J. D.; PITTA, I. R.; WEBB, P.; PHILLIPS, K. J.; NEVES, F. A. R. GQ-16, a novel peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligand, promotes insulin sensitization without weight gain. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 33, p. 28169–79, 10 ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22584573>>. Acesso em: 13 nov. 2017.
- ANNICOTTE, J.-S.; IANKOVA, I.; MIARD, S.; FRITZ, V.; SARRUF, D.; ABELLA, A.; BERTHE, M.-L.; NOËL, D.; PILLON, A.; IBORRA, F.; DUBUS, P.; MAUDELONDE, T.; CULINE, S.; FAJAS, L. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates E-cadherin expression and inhibits growth and invasion of prostate cancer. **Molecular and cellular biology**, v. 26, n. 20, p. 7561–74, 15 out. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17015477>>. Acesso em: 12 nov. 2017.
- ANTUNES, P. M. B. B. FEOCROMOCITOMA E PARAGANGLIOMA MALIGNOS: A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO GENÉTICO. 2014. Disponível em: <[https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/28615/1/Feocromocitoma e Paraganglioma Maligno-A Importância do Estudo Genético_FMUC_Pedro Antunes.pdf](https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/28615/1/Feocromocitoma%20e%20Paraganglioma%20Maligno-A%20Import%C3%A2ncia%20do%20Estudo%20Gen%C3%A9tico_FMUC_Pedro%20Antunes.pdf)>. Acesso em: 3 out. 2017.
- ANVISA. **Avandia® (rosiglitazona): Cancelamento do registro devido ao risco cardiovascular do medicamento.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=400778&_101_type=content&_101_groupId=33>. Acesso em: 12 nov. 2017.
- ARAÚJO, L. M. B.; BRITTO, M. M. dos S.; PORTO DA CRUZ, T. R. Tratamento do diabetes mellitus do tipo 2: novas opções. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, n. 6, p. 509–518, dez. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302000000600011&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 11 nov. 2017.
- AVELAR-FREITAS, B. A.; ALMEIDA, V. G.; PINTO, M. C. X.; MOURÃO, F. A. G.; MASSENSINI, A. R.; MARTINS-FILHO, O. A.; ROCHA-VIEIRA, E.; BRITO-MELO, G. E. A. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2014.
- BELL, D. S. H. Beta-cell rejuvenation with thiazolidinediones. **The American journal of medicine**, v. 115 Suppl 8A, p. 20S–23S, 8 dez. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14678861>>. Acesso em: 11 nov. 2017.
- BOJKOVÁ, B.; GARAJOVÁ, M.; KAJO, K.; PÉČ, M.; KUBATKA, P.; KASSAYOVÁ, M.; KISKOVÁ, T.; ORENDÁŠ, P.; AHLERSOVÁ, E.; AHLERS, I. Pioglitazone in chemically induced mammary carcinogenesis in rats. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 19, n. 5, p. 379–384, set. 2010. Disponível em:

<<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00008469-201009000-00010>>. Acesso em: 12 nov. 2017.

BROUWERS, F. M.; EISENHOFER, G.; LENDERS, J. W. M.; PACAK, K. Emergencies Caused by Pheochromocytoma, Neuroblastoma, or Ganglioneuroma. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 35, n. 4, p. 699–724, dez. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17127142>>. Acesso em: 28 set. 2017.

CAO, X.; HE, L.; LI, Y. Effects of PPAR γ agonist rosiglitazone on human retinoblastoma cell in vitro and in vivo. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 10, p. 12549–56, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26722443>>. Acesso em: 26 out. 2017.

CARVALHO, A. A. Estudo Do Potencial Antimetastático Da Biflorina. p. 70, 2011.

CHEN, H.; SIPPEL, R. S.; O'DORISIO, M. S.; VINIK, A. I.; LLOYD, R. V.; PACAK, K.; NORTH AMERICAN NEUROENDOCRINE TUMOR SOCIETY (NANETS). The North American Neuroendocrine Tumor Society consensus guideline for the diagnosis and management of neuroendocrine tumors: pheochromocytoma, paraganglioma, and medullary thyroid cancer. **Pancreas**, v. 39, n. 6, p. 775–83, ago. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20664475>>. Acesso em: 9 nov. 2017.

CHO, S.-J.; KOOK, M.-C.; HO LEE, J.; SHIN, J.-Y.; PARK, J.; BAE, Y.-K.; JU CHOI, I.; WON RYU, K.; KIM, Y.-W. Peroxisome proliferator-activated receptor γ upregulates galectin-9 and predicts prognosis in intestinal-type gastric cancer. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 4, p. 810–820, 15 fev. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.29056>>. Acesso em: 13 nov. 2017.

COMBS, T. P.; WAGNER, J. A.; BERGER, J.; DOEBBER, T.; WANG, W.-J.; ZHANG, B. B.; TANEN, M.; BERG, A. H.; O'RAHILLY, S.; SAVAGE, D. B.; CHATTERJEE, K.; WEISS, S.; LARSON, P. J.; GOTTESDIENER, K. M.; GERTZ, B. J.; CHARRON, M. J.; SCHERER, P. E.; MOLLER, D. E. Induction of Adipocyte Complement-Related Protein of 30 Kilodaltons by PPAR γ Agonists: A Potential Mechanism of Insulin Sensitization. **Endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 998–1007, 1 mar. 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo.143.3.8662>>. Acesso em: 12 nov. 2017.

DAHIA, P. L. M. Pheochromocytoma and paraganglioma pathogenesis: learning from genetic heterogeneity. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 2, p. 108–119, 20 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc3648>>. Acesso em: 27 set. 2017.

DENORME, M.; YON, L.; ROUX, C.; GONZALEZ, B. J.; BAUDIN, E.; ANOUAR, Y.; DUBESSY, C. Both sunitinib and sorafenib are effective treatments for pheochromocytoma in a xenograft model. **Cancer Letters**, v. 352, n. 2, p. 236–244, out. 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383514003413>>. Acesso em: 27 set. 2017.

DIXON, J. B. Recent advances in therapy of diabetes. **The Medical journal of Australia**, v. 180, n. 7, p. 368, 5 abr. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15059063>>. Acesso em: 11 nov. 2017.

DORMANDY, J. A.; CHARBONNEL, B.; ECKLAND, D. J. A.; ERDMANN, E.; MASSI-BENEDETTI, M.; MOULES, I. K.; SKENE, A. M.; TAN, M. H.; LEFÈVRE, P. J.; MURRAY, G. D.; STANDL, E.; WILCOX, R. G.; WILHELMSSEN, L.; BETTERIDGE, J.; BIRKELAND, K.; GOLAY, A.; HEINE, R. J.; KORÁNYI, L.; LAAKSO, M.; MOKÁŇ, M.; NORKUS, A.; PIRAGS, V.; PODAR, T.; SCHEEN, A.; SCHERBAUM, W.; SCHERNTHANER, G.; SCHMITZ, O.; ŠKRHA, J.; SMITH, U.; TATOŇ, J. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial in macroVascular Events): A randomised controlled trial. **Lancet**, 2005.

EASTHAM, L. L.; MILLS, C. N.; NILES, R. M. PPAR α/γ Expression and Activity in Mouse and Human Melanocytes and Melanoma Cells. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 6, p. 1327–1333, 3 jun. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18172578>>. Acesso em: 5 nov. 2017.

FERREIRA, A. P.; COELHO, M. S.; AMATO, A. A.; NEVES, F. de A. R.; RODRIGUES, I. C.; ROYER,

C. Effect of PPAR Partial Agonist, GQ-16, on Viability of Breast Cancer Cells in Culture. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 1 Supplement, p. 876.5-876.5, 1 abr. 2017. Disponível em: <http://www.fasebj.org/content/31/1_Supplement/876.5.short>. Acesso em: 13 nov. 2017.

FRÖHLICH, E.; WAHL, R. Chemotherapy and chemoprevention by thiazolidinediones. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

GOMES, M. de B. Glitazonas e síndrome metabólica: mecanismos de ação, fisiopatologia e indicações terapêuticas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 271–280, abr. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302006000200013&lng=pt&lng=pt>. Acesso em: 11 nov. 2017.

GOUDA, H. N.; SAGOO, G. S.; HARDING, A.-H.; YATES, J.; SANDHU, M. S.; HIGGINS, J. P. T. The Association Between the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ 2 (PPARG2) Pro12Ala Gene Variant and Type 2 Diabetes Mellitus: A HuGE Review and Meta-Analysis. **American Journal of Epidemiology**, v. 171, n. 6, p. 645–655, 15 mar. 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/aje/kwp450>>. Acesso em: 24 out. 2017.

GROMMES, C.; LANDRETH, G. E.; HENEKA, M. T. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. **The Lancet. Oncology**, v. 5, n. 7, p. 419–29, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470204504015098%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15231248>>.

HAYDON, R. C.; ZHOU, L.; FENG, T.; BREYER, B.; CHENG, H.; JIANG, W.; ISHIKAWA, A.; PEABODY, T.; MONTAG, A.; SIMON, M. A.; HE, T.-C. Nuclear receptor agonists as potential differentiation therapy agents for human osteosarcoma. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 8, n. 5, p. 1288–94, maio 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12006550>>. Acesso em: 5 nov. 2017.

HERNÁNDEZ HERRERA, J. M. USO DE LAS TIAZOLIDINEDIONAS EN PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2. **Diabetologia**, n. 582, p. 53–58, 2008. Disponível em: <<http://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2008/rmc081k.pdf>>. Acesso em: 9 nov. 2017.

KAHN, S. E.; HAFFNER, S. M.; HEISE, M. A.; HERMAN, W. H.; HOLMAN, R. R.; JONES, N. P.; KRAVITZ, B. G.; LACHIN, J. M.; O'NEILL, M. C.; ZINMAN, B.; VIBERTI, G. Glycemic Durability of Rosiglitazone, Metformin, or Glyburide Monotherapy. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 23, p. 2427–2443, 7 dez. 2006. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa066224>>. Acesso em: 12 out. 2017.

KITZMILLER JL. Poor Correlation of Pulse-Wave Velocity and Intima-Media Thickness in Diabetic Subjects. **Diabetes Care**, 2003.

KOEFLER, H. P. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 1 jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538445>>. Acesso em: 12 out. 2017.

KOGA, H.; SELVENDIRAN, K.; SIVAKUMAR, R.; YOSHIDA, T.; TORIMURA, T.; UENO, T.; SATA, M. **International journal of oncology**. [s.l.] University of Crete, Faculty of Medicine, Laboratory of Clinical Virology, 2012. v. 40

KRISCHE, D. The glitazonas: proceed with caution. **The Western journal of medicine**, v. 173, n. 1, p. 54–7, jul. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10903299>>. Acesso em: 12 out. 2017.

LEBOVITZ, H. E.; DOLE, J. F.; PATWARDHAN, R.; RAPPAPORT, E. B.; FREED, M. I. Rosiglitazone Monotherapy Is Effective in Patients with Type 2 Diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 1, p. 280–288, 1 jan. 2001. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem.86.1.7157>>. Acesso em: 11 nov. 2017.

LENDERS, J. W. M.; DUH, Q.-Y.; EISENHOFER, G.; GIMENEZ-ROQUEPLO, A.-P.; GREBE, S. K. G.; MURAD, M. H.; NARUSE, M.; PACAK, K.; YOUNG, W. F. Pheochromocytoma and Paraganglioma: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 6, p. 1915–1942, 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2014-1498>>.

LENDERS, J. W. M.; EISENHOFER, G.; MANNELLI, M.; PACAK, K. Phaeochromocytoma. **Lancet (London, England)**, v. 366, n. 9486, p. 665–75, 20 ago. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16112304>>. Acesso em: 28 set. 2017.

LENDERS, J. W. M.; PACAK, K.; WALTHER, M. M.; LINEHAN, W. M.; MANNELLI, M.; FRIBERG, P.; KEISER, H. R.; GOLDSTEIN, D. S.; EISENHOFER, G. Biochemical Diagnosis of Pheochromocytoma. **JAMA**, v. 287, n. 11, p. 1427–1434, 20 mar. 2002. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.287.11.1427>>. Acesso em: 9 nov. 2017.

LYON, C. M.; KLINGE, D. M.; DO, K. C.; GRIMES, M. J.; THOMAS, C. L.; DAMIANI, L. A.; MARCH, T. H.; STIDLEY, C. A.; BELINSKY, S. A. Rosiglitazone prevents the progression of preinvasive lung cancer in a murine model. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 12, p. 2095–2099, 1 dez. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgp260>>. Acesso em: 12 nov. 2017.

MARTUCCI, V. L.; PACAK, K. Pheochromocytoma and paraganglioma: diagnosis, genetics, management, and treatment. **Current problems in cancer**, v. 38, n. 1, p. 7–41, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24636754>>. Acesso em: 27 set. 2017.

MEERLOO, J. Van; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell sensitivity assay: The MTT Assay. **Methods Mol Biol.**, v. 731, n. 3, p. 237–245, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-080-5>>.

MILES, P. D.; ROMEO, O. M.; HIGO, K.; COHEN, A.; RAFAAT, K.; OLEFSKY, J. M. TNF-alpha-induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone. **Diabetes**, v. 46, n. 11, p. 1678–83, 1 nov. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9356012>>. Acesso em: 10 out. 2017.

MUELLER, E.; SARRAF, P.; TONTONAZ, P.; EVANS, R. M.; MARTIN, K. J.; ZHANG, M.; FLETCHER, C.; SINGER, S.; SPIEGELMAN, B. M. Terminal Differentiation of Human Breast Cancer through PPAR γ . **Molecular Cell**, 1998.

OAKES, N. D.; THALÉN, P. G.; JACINTO, S. M.; LJUNG, B. Thiazolidinediones increase plasma-adipose tissue FFA exchange capacity and enhance insulin-mediated control of systemic FFA availability. **Diabetes**, v. 50, n. 5, p. 1158–65, 1 maio 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11334421>>. Acesso em: 10 out. 2017.

OSAWA, E.; NAKAJIMA, A.; WADA, K.; ISHIMINE, S.; FUJISAWA, N.; KAWAMORI, T.; MATSUHASHI, N.; KADOWAKI, T.; OCHIAI, M.; SEKIHARA, H.; NAKAGAMA, H. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands suppress colon carcinogenesis induced by azoxymethane in mice. **Gastroenterology**, 2003.

PIKE, A. C.; BRZOWSKI, A. M.; HUBBARD, R. E.; BONN, T.; THORSELL, A. G.; ENGSTRÖM, O.; LJUNGGREN, J.; GUSTAFSSON, J. A.; CARLQUIST, M. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. **The EMBO journal**, v. 18, n. 17, p. 4608–18, 1 set. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10469641>>. Acesso em: 13 nov. 2017.

PLOUIN, P. F.; FITZGERALD, P.; RICH, T.; AYALA-RAMIREZ, M.; PERRIER, N. D.; BAUDIN, E.; JIMENEZ, C. **Metastatic pheochromocytoma and paraganglioma: Focus on therapeutics** *Hormone and Metabolic Research*, 2012. .

PREJBISZ, A.; LENDERS, J. W. M.; EISENHOFER, G.; JANUSZEWICZ, A. Cardiovascular manifestations of phaeochromocytoma. **J Hypertens Wolters Kluwer Health Journal of Hypertension**, v. 29, n. 29, 2011. Disponível em:

<<https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=21826022>>. Acesso em: 28 set. 2017.

RUBENSTRUNK, A.; HANF, R.; HUM, D.; FRUCHART, J.; STAELS, B. Safety issues and prospects for future generations of PPAR modulators. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1771, n. 8, p. 1065–1081, ago. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198107000352>>. Acesso em: 20 out. 2017.

SAITO, Y.; TANAKA, Y.; AITA, Y.; ISHII, K.-A.; IKEDA, T.; ISOBE, K.; KAWAKAMI, Y.; SHIMANO, H.; HARA, H.; TAKEKOSHI, K. Sunitinib induces apoptosis in pheochromocytoma tumor cells by inhibiting VEGFR2/Akt/mTOR/S6K1 pathways through modulation of Bcl-2 and BAD. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 302, n. 6, p. E615-25, 15 mar. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21878661>>. Acesso em: 27 set. 2017.

STROBER, W. **Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability** *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan*, 2015. .

TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): molecular study in glucose homeostasis, lipid metabolism and therapeutic approach. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 51, n. 4, p. 526–533, 2007.

TAVARES, V.; HIRATA, R. D. C.; RODRIGUES, A. C.; MONTE, O.; SALLES, J. E. N.; SCALISSI, N.; SPERANZA, A. C.; HIRATA, M. H. Association between Pro12Ala polymorphism of the PPAR- γ 2 gene and insulin sensitivity in Brazilian patients with type-2 diabetes mellitus. **Diabetes, obesity & metabolism**, v. 7, n. 5, p. 605–11, set. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1463-1326.2004.00453.x>>. Acesso em: 11 nov. 2017.

WU, K.; YANG, Y.; LIU, D.; QI, Y.; ZHANG, C.; ZHAO, J.; ZHAO, S. Activation of PPAR γ suppresses proliferation and induces apoptosis of esophageal cancer cells by inhibiting TLR4-dependent MAPK pathway. **Oncotarget**, v. 7, n. 28, p. 44572–44582, 12 jul. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27323819>>. Acesso em: 26 out. 2017.

WYSZYŃSKA, T.; CICHOCKA, E.; WIETESKA-KLIMCZAK, A.; JOBS, K.; JANUSZEWICZ, P. A single pediatric center experience with 1025 children with hypertension. **Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)**, v. 81, n. 3, p. 244–6, mar. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1511199>>. Acesso em: 3 out. 2017.