



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

CURSO DE FARMÁCIA

ANA CAROLINA ANDRADE DE CARVALHO

**EFEITO DE AGONISTAS DE PPAR γ NA FOSFORILAÇÃO DAS VIAS DE
SINALIZAÇÃO NF κ B E SAPK/JNK EM CULTURA DE MACRÓFAGOS**

BRASÍLIA

2019

ANA CAROLINA ANDRADE DE CARVALHO

**EFEITO DE AGONISTAS DE PPAR γ NA FOSFORILAÇÃO DAS VIAS DE
SINALIZAÇÃO NF κ B E SAPK/JNK EM CULTURA DE MACRÓFAGOS**

Trabalho apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso.

Orientadora: Carine Royer

BRASÍLIA

2019

ANA CAROLINA ANDRADE DE CARVALHO

**EFEITO DE AGONISTAS DE PPAR γ NA FOSFORILAÇÃO DAS VIAS DE
SINALIZAÇÃO NF κ B E SAPK/JNK EM CULTURA DE MACRÓFAGOS**

BANCA EXAMINADORA

ORIENTADORA: Prof.^a Dra. Carine Royer

(Faculdade de Ceilândia – Universidade de Brasília)

CONVIDADA: Prof.^a Dra. Angélica Amorim Amato

(Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília)

CONVIDADA: Mestre Carolina Martins Ribeiro

(Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília)

BRASÍLIA

2019

“Lembre da minha ordem: ‘Seja forte e corajoso! Não fique desanimado, nem tenha medo, porque eu, o Senhor, seu Deus, estarei com você em qualquer lugar para onde você for!’.”

Josué 1:9

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo à Deus, pois tenho certeza que sem as bênçãos que Ele derrama em minha vida eu não teria nem começado esse trajeto na UnB, e agora ao terminar, dedico essa vitória completamente à Ele.

À toda minha família que esteve do meu lado em toda essa trajetória. Gratidão em especial às duas mulheres mais importantes em minha vida, minha mãe Vanessa e avó Selma, que sempre estiveram do meu lado tanto nas conquistas quanto nas noites não dormidas, me ajudando com qualquer coisa que eu precisasse, emocionalmente ou não. Agradeço ao meu irmão Luiz Filipe que sempre foi um exemplo de paciência e dedicação pra mim, e ao meu padrasto Ari que sempre me aconselhou muito bem nas decisões que tinha que tomar.

Também quero agradecer aos meus primos Leonardo, Fernando e Guilherme, aos meus tios Cláudio e Renata, e ao meu pai Ronaldo e madrasta Lúcia por todo o apoio prestado durante esses 5 anos e meio. Gostaria ainda de citar minhas queridas amigas Talita e Isabela que passaram esses anos sempre ouvindo meus desabafos e realizações e me apoiando nos momentos difíceis. E ainda ao meu namorado Guilherme que é uma inspiração de dedicação e comprometimento, além de um super apoio emocional.

Agradeço à minha orientadora, professora Carine Royer, por ter sido uma segunda mãe em todos os meus anos de Farmol, sempre me aconselhando e me ensinando com todo o carinho e compreensão que uma pessoa pode ter. E também à toda ajuda da minha querida amiga Anna Paula, que esteve comigo no desenvolvimento não só deste trabalho, mas também de projetos anteriores.

Por fim, não posso deixar de mencionar também a família Farmol, principalmente Henrique, Carolina e Paloma, que sempre me ajudaram com auxílio de equipamentos e conhecimentos, sem eles esses experimentos não poderiam ter sido concluídos.

RESUMO

Como tratamento para a DM2, têm se utilizado as TZDs, fármacos que atuam como agonistas totais de PPAR γ . Além do mecanismo clássico de ação das TZDs, estudos demonstraram que os agonistas de PPAR γ podem mediar efeitos rápidos em diversos tipos celulares e que envolve uma série de eventos intracelulares. No entanto, ainda não foi explorado se estes mecanismos não-genômicos poderiam explicar os efeitos benéficos do agonista parcial, GQ-16. Estudos prévios indicaram que esse ligante apresenta efeitos sensibilizador insulínico comparáveis aos do agonista total rosiglitazona (RSG), porém sem indução de ganho de peso. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi estudar o efeito da rosiglitazona e do GQ-16 na fosforilação das vias de sinalização do NF κ B e da SAPK/JNK em cultura de macrófagos na presença ou ausência de estímulo inflamatório. Para isso, linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratadas com veículo (DMSO 0,001%), LPS (100 ng/mL), RSG (10^{-5} M), GQ-16 (10^{-5} M), RSG+LPS e GQ-16+LPS. O pré-tratamento das células com agonistas de PPAR γ foi de 30 minutos para depois adicionar o LPS por 15 ou 60 minutos. Posteriormente as células foram colhidas e realizado ensaio de *Western Blot*. O imunoensaio foi realizado com os anticorpos anti-fosfo NF κ B e anti-total NF κ B ou anti-fosfo SAPK/JNK e anti-total SAPK/JNK. As membranas foram reveladas por quimioluminescência e realizada a densitometria das bandas e a análise estatística dos dados. Os resultados obtidos demonstraram que o pré-tratamento com os agonistas apenas inibiu a fosforilação do NF κ B induzida pelo LPS em 15 minutos de tratamento. Foi observada apenas uma tendência do mesmo pela rosiglitazona na fosforilação da SAPK/JNK. Já no tratamento por 60 minutos com LPS, nem RSG e nem GQ-16 demonstraram inibição da fosforilação em nenhuma das vias estudadas. Portanto, conclui-se que possa existir uma relação entre os efeitos não-genômicos dos agonistas de PPAR γ e os efeitos anti-inflamatórios do receptor, porém mais experimentos devem ser realizados para confirmar tal afirmação.

PALAVRAS-CHAVE: PPAR γ , rosiglitazona, GQ-16, fosforilação, NF κ B, SAPK/JNK.

ABSTRACT

Currently, TZDs have been used as a treatment for DM2. These drugs act as full agonists of PPAR γ . In addition to the classic mechanism of action of TZDs, studies have shown that PPAR γ agonists can mediate rapid effects on several cell types, that it involves a series of intracellular events. However, it has not yet been explored whether these non-genomic mechanisms could explain the beneficial effects of the partial agonist, GQ-16. Previous studies have indicated that this ligand presents insulin sensitizing effects comparable to those of full agonist rosiglitazone (RSG), but without inducing weight gain. Thus, the objective of this study was to study the effect of rosiglitazone and GQ-16 on phosphorylation of the signaling pathways of NF κ B and SAPK/JNK in macrophage culture in the presence or absence of inflammatory stimulus. For this purpose, RAW 264.7 lineage of murine macrophages were treated with vehicle (DMSO 0,001%), LPS (100 ng/mL), RSG (10^{-5} M), GQ-16 (10^{-5} M), RSG+LPS e GQ-16+LPS. The pre-treatment of the cells with PPAR γ agonists was for 30 minutes and then the LPS was added for 15 or 60 minutes. Subsequently the cells were collected and the Western Blot assay was performed. The immunoassay was performed with the anti-phospho NF κ B and anti-total NF κ B or anti-phospho SAPK/JNK and anti-total SAPK/JNK antibodies. The membranes were revealed by chemiluminescence and the densitometry of the bands and statistical analysis of the data were performed. The results obtained showed that pre-treatment with agonists only inhibited phosphorylation of NF κ B induced by LPS in 15 minutes of treatment. Only one trend was observed for rosiglitazone in SAPK/JNK phosphorylation. In the 60 minute treatment with LPS, neither RSG nor GQ-16 demonstrated phosphorylation inhibition in any of the pathways. Therefore, it is concluded that there may be a relationship between the non-genomic effects of agonists from PPAR γ and the anti-inflammatory effects of the receptor, but more experiments should be conducted to confirm this statement.

KEYWORDS: PPAR γ , rosiglitazone, GQ-16, phosphorylation, NF κ B, SAPK/JNK.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação transcricional do PPAR no núcleo da célula	17
Figura 2. Estrutura química do GQ-16 em comparação às TZDs rosiglitazona e pioglitazona	22
Figura 3. Via de sinalização do NFκB canônica e não-canônica	27
Figura 4. Efeito de agonistas de PPARγ sobre a fosforilação do NFκB estimulada por 15 minutos de tratamento com LPS em células RAW 264.7	33
Figura 5. Efeito de agonistas de PPARγ sobre a fosforilação do NFκB estimulada por 60 minutos de tratamento com LPS em células RAW 264.7	34
Figura 6. Efeito de agonistas de PPARγ sobre a fosforilação da SAPK/JNK estimulada por 15 minutos de tratamento com LPS em células RAW 264.7	35
Figura 7. Efeito de agonistas de PPARγ sobre a fosforilação da SAPK/JNK estimulada por 60 minutos de tratamento com LPS em células RAW 264.7	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP1 – Ativador de proteína 1

AKT – Proteína cinase B

BCL2 – Proteína 2 de linfoma de célula B

CO₂ – Dióxido de Carbono

COX-2 – Cicloxigenase-2

CREB – Elemento responsivo ligado á proteína monofosfato cíclico de adenosina

CXCL 12 – *C-X-C Motif Chemokine Ligand 12*

CXCR4 – *C-X-C chemokine receptor type 4*

DM – Diabetes Mellitus

DM 2 – Diabetes Mellitus Tipo 2

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EGTA – Ácido egtálico

EPM – Erro padrão da média

ERK – Cinases reguladoras de sinais extracelulares

FDA – *Food and Drug Administration*

GPR40 – Receptor 40 acoplado à proteína G

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

HDAC – Desacetilases de histonas

IBMX – Isobutilmetilxantina

IGF-IR – *Insulin-like growth factors-I receptor*

IKK – Cinase I κ B

IKK α – Inibidor do fator nuclear kappa B cinase subunidade alfa

IKK β – Inibidor do fator nuclear kappa B cinase subunidade beta

IKK γ – Inibidor do fator nuclear kappa B cinase subunidade gama

IL-1 – interleucina 1

IL-6 - Interleucina 6

IL-7 – Interleucina 7

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

INF γ – Interferon Gama

JNK– Cinase c-Jun N-terminal

LBD – *Ligand-binding domain*

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPK – Proteínas cinases ativadas por mitógenos

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

NaCl – Cloreto de sódio

Na₄P₂O₇ – Pirofosfato de sódio

Na₃VO₄ – Ortovanadato de sódio

NFKB – Fator nuclear kappa B

NIH – *National Institute of Health*

NcoA – Coativador de receptor nuclear

NcoR – Correpresseore de receptor nuclear

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PC3 – Célula de câncer prostático humano

PCR – Reação em cadeia de polimerase

PGE2 – Prostaglandina E2

PI3K – Fosfatidilinositol 3 cinase

PPAR – Receptor ativado por proliferadores peroxissomais

PPAR α – Receptor alfa ativado por proliferadores peroxissomais

PPAR β/δ – Receptor beta-delta ativado por proliferador peroxissomal

PPAR γ – Receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais

PPRE – Elemento responsivo ao PPAR

PVDF – Fluoreto de polivinilideno

RN – Receptores nucleares

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RPM – Rotações por minuto

RSG – Rosiglitazona

RXR – Receptor do ácido 9-cis retinóico

SAPK – Cinase proteica ativada por estresse

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SNC – Sistema nervoso central

STAT – Transdutores de sinal e ativadores da transcrição

TBS-T – *Tris-buffered saline + Tween 20*

TFN- α – Fator de necrose tumoral alfa

TLR4 – *Toll-like receptor 4*

TZD – Tiazolidineidiona

15d-PGJ2 – 15-deoxy 12,14 prostaglandina J2

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Obesidade e diabetes	15
1.2. Receptores ativados por proliferadores peroxissomais	16
1.3. Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR γ)	19
1.4. Agonistas total e parcial de PPAR γ	20
1.5. Efeitos não-genômicos de agonistas de PPAR γ	23
1.6. Fator nuclear kappa B (NF κ B)	25
1.7. Cinase cJun-N-terminal (JNK)	27
2. METODOLOGIA	29
2.1. Cultura de células	29
2.2. Tratamentos	30
2.3. Lise celular	30
2.4. Eletroforese e transferência de amostras	30
2.5. <i>Western Blott</i>	31
2.6. Densitometria das bandas e análise estatística	31
3. RESULTADOS	31
3.1. Efeito de agonistas de PPAR γ sobre a fosforilação do NF κ B em 15 minutos de tratamento com LPS	32
3.2. Efeito de agonistas de PPAR γ sobre a fosforilação do NF κ B em 60 minutos de tratamento com LPS	33
3.3. Efeito de agonistas de PPAR γ sobre a fosforilação da SAPK/JNK em 15 minutos de tratamento com LPS	34
3.4. Efeito de agonistas de PPAR γ sobre a fosforilação da SAPK/JNK em 60 minutos de tratamento com LPS	35
4. DISCUSSÃO	36
5. CONCLUSÃO	41

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
--	-----------

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade e diabetes

Uma dieta rica em triglicerídeos e ácidos graxos livres juntamente com o sedentarismo têm contribuído para a prevalência da obesidade (WILLSON; LAMBERT; KLIEWER, 2001), a qual é uma doença caracterizada por inflamação crônica de baixo grau e resistência à insulina. O tecido adiposo atua como um órgão endócrino e secreta um grande número de proteínas como leptina, adiponectina, interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), as quais regulam o metabolismo, o consumo de energia e o armazenamento de gordura. Essas citocinas pró-inflamatórias, secretadas principalmente por macrófagos, podem induzir a resistência insulínica. Além disso, a obesidade também pode levar ao desenvolvimento da síndrome metabólica, a qual é caracterizada pelo aumento da circunferência da cintura, hipertensão, intolerância glicêmica e dislipidemia (CIRILLO *et al.*, 2019).

A obesidade representa hoje um importante problema de saúde, pelo aumento global de sua incidência e pelas várias condições a ela associadas: *Diabetes Mellitus* Tipo 2 (DM2), dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica (HAS). Cada uma dessas doenças, por sua vez, associa-se ao aumento dos riscos de aterosclerose e doença cardiovascular, as principais causas de mortalidade em vários países (BACHMAYER; LAMMERT; para revisão ver HASENBERG, 2013; NGUYEN, 2010; OUCHI *et al.*, 2011). O DM2 é considerado a doença mais importante associada à obesidade, por sua elevada frequência e pela morbimortalidade que determina.

A resistência à insulina é um estado patológico em que as células alvo no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo não respondem de forma adequada à insulina, o que resulta em sua incapacidade de captar e metabolizar glicose de forma eficaz (BOUCHER; KLEINRIDDERS; KAHN, 2014; LEBOVITZ, 2001; SEARS *et al.*, 2009). Além disso, este estado pode prejudicar a capacidade das ilhotas pancreáticas de sintetizar e

secretar insulina suficiente para atender às necessidades metabólicas do corpo. Dentre as manifestações clínicas que a resistência à insulina pode apresentar é possível citar: hiperinsulinemia, hiperglicemia, hiperlipidemia, aumento dos níveis de marcadores inflamatórios circulantes e diminuição dos níveis de adiponectina plasmática (BOUCHER; KLEINRIDDERS; KAHN, 2014).

A interação entre obesidade, resistência insulínica e disfunção de células beta tem sido amplamente estudada. Embora haja muito para ser compreendido, essa interação reflete o fato de o tecido adiposo não ser um simples depósito para armazenamento de lipídeos, mas um tecido dinâmico que interage continuamente com outros tecidos críticos para a regulação do metabolismo energético e homeostase da glicose, entre eles fígado, músculo esquelético e centros reguladores do apetite (EVANS; BARISH; WANG, 2004).

Nesse sentido, sabe-se hoje que o tecido adiposo – tradicionalmente considerado um órgão de armazenamento energético – produz vários mediadores inflamatórios implicados na fisiopatologia da obesidade (HOTAMISLIGIL, 2006; OUCHI *et al.*, 2011). A inflamação associada à obesidade é caracterizada pela produção anormal de citocinas e outros mediadores, e a ativação de vias de sinalização inflamatória (HOTAMISLIGIL, 2006). Outra importante característica do tecido adiposo na obesidade é a infiltração por macrófagos (CINTI *et al.*, 2005; ROSA *et al.*, 2012; WEISBERG *et al.*, 2003). Embora a função destas células no metabolismo sistêmico não esteja clara, acredita-se que sua presença no tecido adiposo contribua para o surgimento e manutenção da resposta inflamatória associada à obesidade (HOTAMISLIGIL, 2006). A modulação entre metabolismo lipídico, resposta inflamatória e homeostase da glicose é regulada, entre outros fatores pelos receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs) (EVANS; BARISH; WANG, 2004; GLASS; OGAWA, 2006).

1.2 Receptores ativados por proliferadores peroxissomais

Os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs) são fatores de transcrição que fazem parte da superfamília de receptores nucleares (RN) e atuam como fatores de transcrição regulados por ligantes (FEIGE *et al.*, 2006). Eles são ativados por ligantes sintéticos ou endógenos e, após ativação, formam heterodímeros com o receptor X retinóide (RXR) e se ligam à sequências específicas de reconhecimento, chamados elementos responsivos do receptor ativado por proliferadores peroxissomais (PPRE), na região reguladora gênica dos genes-alvo, levando à transcrição gênica (figura 1).

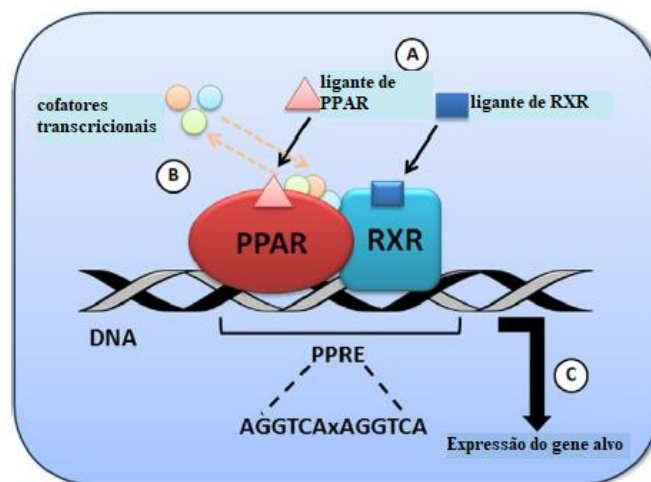


Figura 1. Ativação transcricional do PPAR no núcleo da célula. (A) ligação de ligantes de PPAR/RXR; (B) mudanças nos cofatores transcisionais associados; (C) ativação do complexo transcricional (Adaptado de Rigano, Sirignano, & Tagliatela-Scafati, 2017).

À semelhança dos demais RN, os PPARs podem regular a expressão gênica por meio de três mecanismos básicos, onde o ligante pode ou não estar presente. São eles: repressão basal, transativação e transrepressão (ARANDA; PASCUAL, 2001).

A repressão basal corresponde a ligação constitutiva do heterodímero PPAR-RXR ao PPRE, na ausência de ligante com o recrutamento de proteínas corressoras, como o corressor de RN (NOCR) e as desacetilases de histonas (HDAC). Essas proteínas mantêm a cromatina em sua forma enovelada, impedindo, assim, as atividades da maquinaria transcricional e dos complexos coativadores, resultando em uma repressão ativa da expressão gênica (SANTOS; FAIRALL; SCHWABE, 2011).

A transativação se caracteriza pela ativação da transcrição gênica de maneira ligante dependente, onde o heterodímero PPAR-RXR se liga aos PPREs dos genes alvo. Ao se ligar no PPAR, o ligante induz uma mudança conformacional do receptor com a dissociação dos correpressores e a associação dos complexos de coativadores. Estes modificam a estrutura da cromatina, facilitando o recrutamento da maquinaria transcricional ao promotor do gene alvo, resultando, assim, na ativação da transcrição (ZOETE; GROSDIDIER; MICHIELIN, 2007).

A transrepressão é regulação negativa da expressão gênica do PPARs na presença do ligante e não envolve a ligação direta do receptor aos PPREs no DNA. Embora pouco compreendida, diversos mecanismos são propostos para explicar a transrepressão, tais como (a) interação direta entre PPARs ativados e outros fatores de transcrição, o que impediria estes de se ligar aos elementos responsivos de seus genes alvo, (b) competição por coativadores, (c) disponibilização de proteínas que reprimem a atividade transcricional (d) e bloqueio da depuração de complexos de correpressores. A transrepressão é a forma como os PPARs reprimem a ação de fatores de transcrição relacionados com atividade inflamatória, tais como NFκB (RICOTE; GLASS, 2007).

A família PPAR possui 3 isoformas (α , β/δ e γ), cada uma com suas particularidades de ligação, distribuições teciduais e funções fisiológicas. O PPAR α é expresso principalmente no fígado, coração e músculo esquelético, e possui um papel fundamental na regulação do catabolismo de ácidos graxos por meio do aumento de genes que codificam enzimas na via de oxidação β (BURRI; THORESEN; BERGE, 2010; FEIGE *et al.*, 2006; KERSTEN, 2014; LEFEBVRE *et al.*, 2006). Este receptor é ativado por uma variedade de ligantes naturais, incluindo ácidos graxos de cadeia longa e fibratos. Em comparação às outras duas isoformas, o PPAR β/δ possui uma manifestação no músculo esquelético de 10 a 50 vezes maior, e é onde ele atua na regulação do metabolismo energético (KARPE; EHRENBORG, 2009; MANICKAM; WAHLI, 2017; TAN *et al.*, 2016). Já o PPAR γ é ricamente expresso no tecido adiposo, manifestando-se

também na placenta e em macrófagos. Este último receptor pode ser ativado por prostanoídes específicos e fármacos antidiabéticos, chamados tiazolidinedionas (AHMADIAN *et al.*, 2013; FAN; EVANS, 2015).

1.3 Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR γ)

O PPAR γ possui duas isoformas diferentes. A isoforma PPAR γ 1 é amplamente distribuída, estando presente em adipócitos, células musculares cardíacas e esqueléticas, células vasculares, macrófagos, bexiga, intestino e cérebro. Já a isoforma PPAR γ 2, a qual se diferencia da isoforma PPAR γ 1 por apresentar 28 aminoácidos adicionais na porção amino terminal, é expressa quase que exclusivamente no tecido adiposo (HEIKKINEN; AUWERX; ARGMANN, 2007; TONTONNOZ P, HU E, GRAVES RA, BUDAVARI AI, 1994).

Uma das principais descobertas sobre o PPAR γ foi o papel crítico que ele desempenha na diferenciação das células adiposas. Na revisão de Willson e colaboradores (2001) são citados resultados de estudos complementares, nos quais foi demonstrado que a indução da expressão de PPAR γ em cultura de fibroblastos ou mioblastos resultou na diferenciação em adipócitos brancos maduros conforme medido pela acumulação de gotículas de lipídeos neutros e pela expressão de um padrão de genes específicos de adipócitos (HU; TONTONNOZ; SPIEGELMAN, 1995; TONTONNOZ; HU; SPIEGELMAN, 1994), e que o tratamento de ratos resistentes à insulina com agonistas potentes de PPAR γ aumentou o número de pequenos adipócitos enquanto que diminuiu o número de adipócitos grandes nos depósitos de tecido adiposo branco (HALLAKOU *et al.*, 1997; OKUNO *et al.*, 1998). Dessa forma, sendo possível concluir que o PPAR γ serve como um regulador mestre na diferenciação de adipócitos (WILLSON; LAMBERT; KLIEWER, 2001).

O PPAR γ está presente em macrófagos e sua expressão é induzida rapidamente após a diferenciação de monócitos em macrófagos (CHINETTI *et al.*, 1998; VON

KNETHEN *et al.*, 2007). Foi reportado que este receptor interage com múltiplas vias de sinalização, incluindo proteína 2 de linfoma de célula B (BCL2), fator nuclear kappa B (NFκB), p53, p21, proteínas da família STAT (transdutores de sinal e ativadores da transcrição), ciclooxigenase-2 (COX-2) e ciclina D1 (FUCHS, 2009) e ainda estudos demonstraram que o tratamento de macrófagos e monócitos com agonistas de PPARγ resultou na diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNFα (fator de necrose tumoral alfa) e interleucina 6 (IL-6) e na inibição da diferenciação de monócitos em macrófagos, revelando assim uma função mais ampla do PPARγ na regulação da biologia e inflamação de monócitos/macrófagos (JIANG; TING; SEED, 1998; RICOTE *et al.*, 1998).

Essa capacidade do PPARγ de bloquear a expressão de genes pró-inflamatórios pode ser por diferentes meios, sendo que o principal é antagonizando cascatas de sinalização. Ele pode regular negativamente fatores de transcrição através da eliminação de coativadores transcripcionais como o elemento responsivo ligado á proteína monofosfato cíclico de adenosina (CREB) ou o coativador-1 do receptor de esteroide, por exemplo (YANG, W. E. N.; RACHEZ; FREEDMAN, 2000). Por outro lado, estudos já demonstraram que o PPARγ é direcionado para os complexos corepressores de histona desacetilase-3 do receptor nuclear em resposta a SUMOilação dependente de ligante (PASCUAL *et al.*, 2005), protegendo assim esse complexo da degradação proteossomal, sendo que, normalmente, a histona desacetilase-3 remove o complexo corepressor, o que provoca a expressão dos genes pró-inflamatórios. Além disso, o PPARγ reprime a ativação da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK), o que faz com que os fatores de transcrição sejam mantidos sem fosforilação e, conseqüentemente, inativos (DESREUMAUX *et al.*, 2001).

1.4 Agonistas total e parcial de PPARγ

O PPAR γ pode ser ativado tanto por compostos naturais quanto sintéticos. Os agonistas naturais incluem ácidos graxos de cadeia longa e a ciclopentenona prostaglandina 15-deoxy 12,14 prostaglandina J2 (15d-PGJ2), enquanto que os agonistas sintéticos compreendem alguns fármacos anti-inflamatórios não esteroidais e os antidiabéticos, tiazolidinedionas (TZDs) (YKI-J; PPARS, 2004).

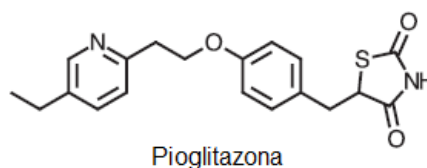
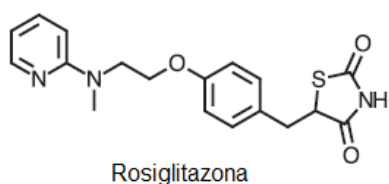
As TZDs são agonistas totais de PPAR γ que são utilizados como opção terapêutica do DM do tipo 2. São ditas como “os clássicos sensibilizadores de insulina”, uma vez que agem para restaurar a glicemia a níveis fisiológicos, elevando a sensibilidade à insulina dos tecidos-alvo sem o risco de causar hipoglicemia. O mecanismo de ação das TZDs envolve a regulação da expressão de um conjunto de genes-alvo associados ao metabolismo de glicose e lipídios, secreção de adipocinas e reações inflamatórias em tecidos-alvo (JANANI; RANJITHA KUMARI, 2015; OLEFSKY, 2000). Porém, o uso de TZDs tem sido associado a efeitos colaterais como ganho de peso, edema, toxicidade cardiovascular (NISSEN; WOLSKI, 2007), perda óssea (GREY *et al.*, 2007), câncer de bexiga (MAMTANI *et al.*, 2012). Como exemplo da implicação disso, a *Food and Drug Administration* (FDA), Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, limitou o uso da rosiglitazona devido ao aumento do risco de eventos cardiovasculares, ressaltando a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos que alcancem a sensibilização à insulina sem efeitos cardiovasculares adversos (AMATO *et al.*, 2012).

Diante disso, se teve conhecimento da descoberta de agonistas parciais, os quais são ligantes com eficácia apenas parcial na ativação do PPAR γ , porém que mantêm as ações de sensibilização à insulina. Muitos agonistas parciais foram relatados como tendo menos efeitos colaterais em comparação aos agonistas totais, o que sugeriu que ligantes que mantêm a sensibilização à insulina de TZDs poderiam ser desenvolvidos sem os efeitos colaterais indesejáveis (AMATO *et al.*, 2012). Como exemplo disso, é possível citar o estudo de Hou e colaboradores (2018) no qual é demonstrado que o tratamento de camundongos com o agonista parcial de PPAR γ , CMHX008, resultou no aumento da

sensibilização insulínica comparáveis aos da rosiglitazona, porém com um menor risco de perda óssea (HOU *et al.*, 2018). Outro caso é o do MDCCCL1636 também identificado como agonista parcial de PPAR γ , o qual demonstrou melhora na sensibilidade insulínica tanto *in vitro* como *in vivo* sem provocar ganho de peso (LIU, H. -J. *et al.*, 2015).

O mecanismo no qual esses agonistas parciais possuem poder sensibilizador insulínico comparáveis aos de agonistas totais pode ser explicado pelo estudo de Choi e colaboradores (2010), o qual demonstrou que a fosforilação do PPAR γ no resíduo de Ser273 possui relação com a obesidade e resistência insulínica, uma vez que resulta na desregulação de genes-alvo, como a adiponectina. Além disso sugeriu que tanto as TZDs quanto os agonistas parciais melhoravam a sensibilidade insulínica principalmente pela inibição da fosforilação do PPAR γ mediada por Cdk5 na Ser273 (LAZNIK *et al.*, 2010). Ainda, agonistas parciais parecem possuir um recrutamento diferencial de coreguladores, levando a uma mudança na expressão de genes em comparação aos agonistas totais (BERGER *et al.*, 2003).

O desenvolvimento de vários compostos sintéticos ligantes de PPAR γ levou à elaboração do GQ-16 (figura 2). Estudos demonstraram que este ligante é específico para o PPAR γ , não sendo capaz de ativar outros subtipos PPAR. Ademais, ensaios de transativação demonstraram que o GQ-16 atua como um agonista parcial fraco, e mesmo altas concentrações do ligante provocaram apenas aproximadamente um terço da ativação máxima estimulada pela rosiglitazona. Finalmente, foi observado que além desse agonista parcial possuir efeito adipogênico menor, ele ainda demonstrou efeito sensibilizador insulínico semelhante ao da rosiglitazona em camundongos, porém sem a indução do ganho de peso que é característico do agonista total (AMATO *et al.*, 2012).



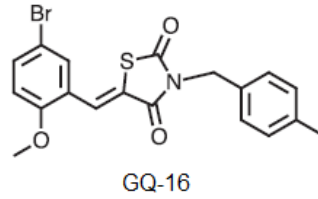


Figura 2. Estrutura química do GQ-16 em comparação às TZDs rosiglitazona e pioglitazona (Amato et al., 2012).

1.5 Efeitos não-genômicos de agonistas de PPAR γ

Assim como muitos hormônios esteroidais, além do clássico efeito genômico, vários estudos têm mostrado que os agonistas de PPAR γ TZDs podem exercer efeitos rápidos extranucleares, na ordem de segundos ou minutos, e que independem da alteração da expressão gênica em diversos tipos celulares. Estes efeitos podem ser mediados via PPAR γ ou mediados por outras vias que independem deste receptor (CANTINI *et al.*, 2010; ENDO *et al.*, 2011; GRAS *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2005; LEBRASSEUR *et al.*, 2006; LUCONI; CANTINI; SERIO, 2010; MIECZKOWSKA *et al.*, 2012; VON KNETHEN *et al.*, 2007).

As ações rápidas de agonistas de PPAR γ também podem explicar alguns efeitos metabólicos das TZDs. A cinase AMP, envolvida com homeostasia da glicose e lipídeos e sensibilidade insulínica, é rapidamente fosforilada e ativada por diferentes TZDs no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo, resultando na fosforilação da acetil CoA carboxilase, estimulação da captação de glicose e oxidação de ácidos graxos (FEDIUC *et al.*, 2008; FRYER; PARBU-PATEL; CARLING, 2002; LEBRASSEUR *et al.*, 2006).

A regulação de vias sinalizadoras citoplasmáticas por agonistas de PPAR γ também já foi demonstrada em diversos tipos celulares. A rosiglitazona interfere com a fosforilação da ERK1/2 (cinases reguladoras de sinais extracelulares) assim como com a atividade da PI3K (Fosfatidilinositol 3 cinase) induzida por IGF-IR (*insulin-like growth factors-1 receptor*) em células de câncer adrenocortical humano (Cantini *et al.*, 2008) e em células de câncer prostático humano PC3 (PAPAGEORGIU *et al.*, 2008)

diminuindo a atividade de ambas as vias sinalizadoras. Em contrapartida, em células da musculatura lisa vascular, agonistas de PPAR γ rapidamente, dentro de 15 minutos, ativaram a via da ERK1/2 com envolvimento da via PI3K. Este estímulo da fosforilação da ERK1/2 está envolvido com o aumento da expressão do gene *c-fos* nestas células. Estes efeitos rápidos de agonistas de PPAR γ em células da musculatura lisa vascular poderiam estar implicadas no efeito cardioprotetor de tais ligantes (TAKEDA *et al.*, 2001).

Estudos envolvendo as ações não-genômicas de agonistas de PPAR γ sobre a atividade anti-inflamatória das TZDs também foram desenvolvidos. von Knethen e colaboradores (2007) demonstraram a presença de PPAR γ na região nuclear e citoplasmática de macrófagos RAW 264.7. A localização citoplasmática do PPAR γ também foi demonstrada em linhagens de células de pró-monócitos HL-60 e K-562, especialmente após o tratamento com troglitazona (HUANG *et al.*, 2005). No entanto poucos estudos demonstraram a importância da localização extranuclear do PPAR γ e qual seria o impacto de tal localização com a ação anti-inflamatória atribuída ao receptor.

Com relação ao efeito anti-inflamatório dos agonistas, estudos demonstraram por exemplo que a ação de TZDs foram observadas apenas em concentrações bem superiores aos valores de EC₅₀ dos agonistas (WILLSON *et al.*, 1996, 2000). Além do mais, o uso do antagonista de PPAR γ , PGF2 α , não foi capaz de reverter o efeito anti-inflamatório induzido pela pioglitazona, a qual inibiu a adesão da interleucina 1 β dependente de monócitos às células endoteliais da veia umbilical humana, evidenciando assim mais um exemplo de efeito de agonista de PPAR γ independente do receptor (REGINATO *et al.*, 1998; TORIUMI *et al.*, 2003). Por outro lado, estudos já demonstraram que a rosiglitazona é capaz de inibir a via da ERK1/2 através de uma ação rápida que é dependente do receptor (CANTINI *et al.*, 2010; LOMBARDI *et al.*, 2008a, 2009)

Efeitos não-genômicos também podem ser vistos em células tumorais. Já foi evidenciado que na linhagem celular de leucemia humana a troglitazona induziu morte celular, a qual foi associada à diminuição da expressão dos oncogenes *c-myc*, *c-myb*

ciclina D2 e, como esses genes não possuem um elemento responsivo de PPAR nas suas regiões promotoras, esse efeito não poderia mediado pelo PPAR γ (LAURORA *et al.*, 2003). E ainda, a inibição do crescimento tumoral em células-tronco embrionárias pela troglitazona e ciglitazona foi vista nos estudo de Palakurthi e colaboradores (2001) tanto em camundongos que possuíam o PPAR γ quanto nos que não possuíam o receptor (PALAKURTHI *et al.*, 2001).

Recentemente, foi observado que esses fármacos podem se ligar e ativar o receptor 40 acoplado à proteína G (GPR40) (GRAS *et al.*, 2009; KOTARSKY *et al.*, 2003; MIECZKOWSKA *et al.*, 2012; SMITH *et al.*, 2009; STODDART; BROWN; MILLIGAN, 2007; ZHOU *et al.*, 2010), um receptor de membrana associado com a secreção de ácido graxo livre e insulina induzida por glicose (ALQUIER *et al.*, 2009; ITOH; KAWAMATA; HARADA, 2003), e foi visto que essa via de sinalização pode induzir a rápida ativação da ERK, MAPK p38 e JNK (MIECZKOWSKA *et al.*, 2012; SMITH *et al.*, 2009).

Assim como a via da ERK, já foi observado que tanto o fator nuclear kappa B (NF κ B) quanto a cinase c-Jun N-terminal (JNK) são essenciais no processo inflamatório, o qual é ativado por ácidos graxos saturados que induzem resistência insulínica a um nível hipotalâmico (ONO, 2019). Porém, a inibição dessas vias pelo GQ-16 ainda não foi identificada, podendo isso ser responsável pelo efeito sensibilizador insulínico do agonista parcial.

1.6 Fator nuclear kappa B (NF κ B)

O NF κ B é um fator de transcrição que serve como resposta chave às mudanças no ambiente, desempenhando papel de via de sinalização em uma variedade de processos biológicos (HAYDEN; GHOSH, 2004). Ele é expresso em todas as células de mamíferos e pode ser ativado por uma diversidade de estímulos. Embora esse fator desempenhe função essencialmente benéfica na fisiologia normal com relação a resposta imune e inflamatória (CAAMAN; HUNTER, 2002; LI; VERMA; PINES, 2002; LIOU, 2002;

NEURATH MF, BECKER C, 1998), a sua ativação também foi observada associada a maioria dos cânceres (DITSWORTH; ZONG, 2016; LUO *et al.*, 2004; NEURATH MF, BECKER C, 1998; NF- *et al.*, 2004; SATHE *et al.*, 2004; WE *et al.*, 2004) ou ainda doenças cardiovasculares (BROWN; JONES, 2004), diabetes (LGSSIAR *et al.*, 2004; NAWROTH, 2004), inflamação crônica (LUO *et al.*, 2004; NEURATH MF, BECKER C, 1998) e doenças relacionadas ao sistema nervoso central (SNC) (CVETKOVIC *et al.*, 2004; GUO, C. *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2005).

A família do NFκB em mamíferos é composta por cinco membros: RelA (também chamado de p65), RelB, c-Rel, NFκB1 p50, e NFκB2 p52, os quais formam vários complexos diméricos que ativam genes alvos por meio da ligação com o κB. As proteínas do NFκB são normalmente sequestradas do citoplasma por uma família de inibidores, incluindo o IκBα (SUN, S.; LEY, 2008).

A via de sinalização canônica do NFκB (figura 3) é estimulada por uma gama de estímulos, dentre os quais se pode citar as citocinas pró-inflamatórias e moléculas associadas à patogenicidade (ISRAËL, 2000). A sua ativação depende da degradação de IκBs, particularmente IκBα, o que leva à translocação de vários complexos NFκB para o núcleo, predominantemente do dímero p50/RelA (HAYDEN; GHOSH, 2008; VALLABHAPURAPU; KARIN, 2009). A degradação do IκBα é mediada por meio da sua fosforilação pela cinase IκB (IKK), um complexo trimérico composto por duas subunidades catalíticas, IKKα e IKKβ, e uma subunidade regulatória, IKKγ (SUN, S.; LEY, 2008). A ativação deste heterodímero foi observado associado com o aumento da transcrição de genes que codificam quimiocinas (GUO, M. *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004), citocinas (ABDEL-MAGEED, 2003; LEE *et al.*, 2004), moléculas de adesão (WILSON *et al.*, 2001; YOSHIMURA *et al.*, 2001); enzimas que produzem mediadores inflamatórios secundários e inibidores de apoptose (LEE *et al.*, 2004; WE *et al.*, 2004). Essa via tem sido considerada importante na coordenação da expressão de múltiplos genes inflamatórios e imunes através da manutenção da sobrevivência de células imunes

durante infecções bacterianas ou estímulos inflamatórios agudos (CAAMAN; HUNTER, 2002; GHOSH; KARIN; HAVEN, 2002; LIOU, 2002; LIOU; HSIA, 2003; WEIL; ISRAE, 2004).

Além desta via, uma via NFκB não-canônica ativa o complexo RelB/p52 usando um mecanismo que depende do processamento do p100 ao invés da degradação do IκBα (figura 3). Evidências genéticas sugerem que essa via do NFκB regula funções biológicas importantes, como a organogênese linfóide, a sobrevivência e maturação de linfócitos B, ativação de células dendríticas e metabolismo ósseo. Portanto, a desregulação da via de sinalização do NFκB não-canônica é associada com malignidades linfóides (DEJARDIN, 2006).

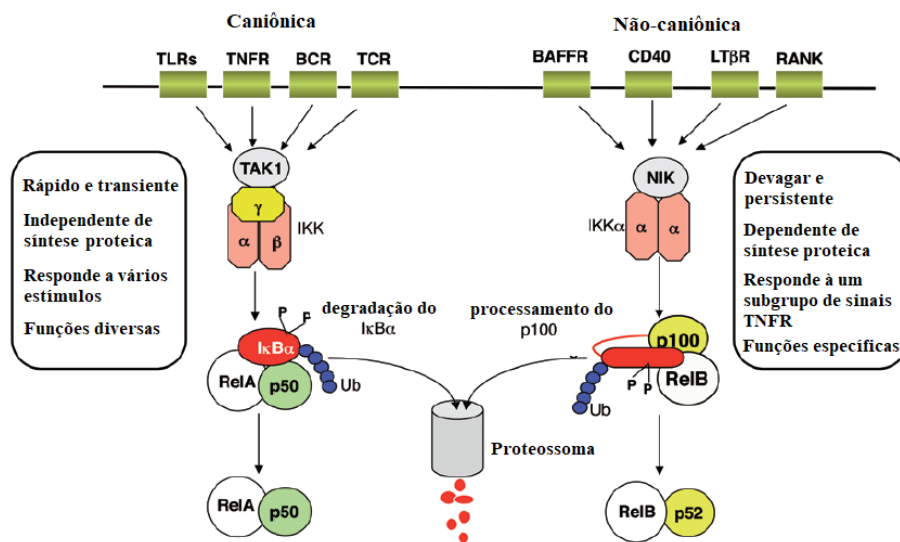


Figura 3. Via de sinalização do NFκB canônica e não-canônica. A via canônica é acionada por numerosos sinais, incluindo os mediadores por receptores inatos e adaptativos. Ela envolve a ativação do complexo IKK pela Tak1, fosforilação do IκBα mediado por IKK, e subsequente degradação, resultando na translocação rápida e transitente para o núcleo do heterodímero RelA/p50. A via não-canônica depende do processamento do p100 induzido por fosforilação, o qual é desencadeado pela sinalização de um subconjunto de membros TNFR. Essa via de sinalização é dependente de NIK e IκBα, mas não do complexo trimérico IKK e media a ativação persistente do complexo RelB/p52 (Adaptado de S. C. Sun, 2011).

1.7 Cinase cJun-N-terminal (JNK)

Nos mamíferos, três grupos principais de MAPKs foram identificados: as cinases reguladoras de sinais extracelulares 1/2 (ERK1/2), a cinase cJun-N-terminal 1/2/3 e as

isoformas p38 (α , β , γ e δ), sendo que cada grupo é ativado por uma cascata de proteínas quinase (DAVIS, 2000).

A família da cinase cJun-N-terminal inclui três proteínas, JNK1, JNK2 e JNK3, as quais são codificadas por três genes diferentes, *jnk1* (*mapk8*), *jnk2* (*mapk9*) e *jnk3* (*mapk10*). Enquanto JNK1 e JNK2 possuem uma ampla distribuição nos tecidos de mamíferos, a expressão da JNK3 é restrita aos tecidos neuronais (RAMAN; CHEN; COBB, 2007). As proteínas JNK são também conhecidas como cinases proteicas ativadas por estresse (SAPKs) e são estimuladas por uma variedade de estímulos extracelulares, incluindo estresse ambiental como choque térmico, radiação ionizante, estresse oxidante e danos ao DNA; citocinas pró-inflamatórias; fatores de crescimento; inibição da síntese de DNA e proteínas; patógenos; toxicinas; e drogas (BUBICI; PAPA, 2014; KYRIAKIS; AVRUCH, 2001).

A ativação das isoformas da JNK requer uma fosforilação dupla nos resíduos de treonina e tirosina. As MAPKKs que catalisam essa reação são conhecidas como MKK4 (também chamada de SEK1) e MKK7, as quais parecem cooperar com a fosforilação e consequente ativação das proteínas JNKs (LAWLER *et al.*, 1998). As MKK4 e 7 são fosforiladas e ativadas por várias MAPKKs, incluindo MEKK1 a 4, MLK1 a 3, Tpl-2, DLK, TAO1/2, TAK1 e ASK1/2 (KYRIAKIS; AVRUCH, 2001; WAGNER; NEBRED, 2009).

Sabe-se que as funções de cada proteína JNK pode tanto diferir ou sobrepor-se dependendo do tipo celular (BUBICI; PAPA, 2014). A revisão de Papa e colaboradores (2019) por exemplo menciona vários estudos que apontam que as proteínas JNK podem desempenhar papel no desenvolvimento tumoral, assim como JNK1 e JNK2 possuem funções distintas ou redundantes, e se eles irão afetar diferencialmente as alterações metabólicas associadas ao câncer é uma questão de investigação (PAPA; CHOY; BUBICI, 2019). Além disso, foi demonstrado que a ativação da via da SAPK pela chaetocina, inibidor da histona metiltransferase, a qual induz apoptose em células

cancerosas pela indução da produção de ROS, resultou na redução da absorção de glicose e produção de lactato em células de glioma (DIXIT *et al.*, 2014).

Além de células cancerosas, foi demonstrado que a JNK1 também pode suprimir a glicólise em tecidos normais. A inibição da JNK1 em células hepáticas normais aumentou a expressão de grupos de genes envolvidos na síntese de glicose e triglicerídeos, sugerindo que a atividade basal da JNK1 regula negativamente a glicólise hepática e a formação de biomassa (YANG, R. *et al.*, 2007). Isso foi posteriormente confirmado por estudos usando camundongos sob dieta com alto teor de gordura e deficiência de JNK1 e JNK2 nos hepatócitos, o que resultou em um aumento da expressão de enzimas glicolíticas e produção de lactato acompanhados da redução do nível de consumo de oxigênio pela mitocôndria. Esses efeitos da supressão das JNKs foram associados com um aumento de genes envolvidos com o PPAR, levando a elevação acentuada da taxa de oxidação de ácidos graxos, à cetogenese e à melhora da ação insulínica hepática nos camundongos. Isso indica que tanto JNK1 e JNK2 em hepatócitos reduz glicólise, a oxidação de ácidos graxos e a cetogênese em resposta a uma dieta rica em gordura (VERNIA *et al.*, 2014).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o de observar o efeito do agonista total de PPAR γ rosiglitazona e do agonista parcial GQ-16 na fosforilação das vias de sinalização do NF κ B e da SAPK/JNK em cultura de macrófagos, na ausência e presença de estímulo inflamatório, para determinar se a ativação dessas vias seria um efeito não-genômico dos agonistas.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultura de células: Macrófagos murinos RAW 264.7 foram cultivados em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contendo 2 nM de glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 μ g/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino, em placas para cultura de tecidos de 150 mm. As células foram mantidas em incubadora

a 37°C e com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado dia sim, dia não. Ao atingirem confluência, as células foram plaqueadas em placa de 6 poços, com 5x10⁵ células/poço.

2.2 Tratamentos: Conforme confluência após plaqueamento, macrófagos RAW 264.7 foram tratados com o controle DMSO 0,001% e agonistas total de PPAR γ , rosiglitazona (10⁻⁵ M), e parcial de PPAR γ , GQ-16 (10⁻⁵ M) na presença e ausência do estímulo inflamatório LPS (100ng/mL) As células foram incubadas com os agonistas por 30 minutos e em seguida, adicionado o LPS por 15 ou 60 minutos. Por fim, foi realizada a lise das células. A concentração desses agonistas usadas neste trabalho se deve a estudos prévios (AMATO *et al.*, 2012).

2.3 Lise celular: A cultura de células foi lavada com solução de PBS 1x (phosphate-buffered saline 1x) a 4°C e então adicionado tampão de lise gelado (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, glicerol 10%, TritonX-100 1%, MgCl₂ 1,5 mM, EGTA 1 mM, pH7,5) contendo inibidores de fosfatases (Na₃VO₄ 2 Mm e Na₄P₂O₇ 10 mM) e coquetel com inibidores de proteases (Sigma-Aldrich P8340) diluído 100 vezes. As células aderentes foram removidas com o auxílio de um raspador de células de plástico, em seguida, transferidas para tubos cônicos de 1,5 mL e lisadas com seringa e agulha. Cada tubo foi deixado em banho de gelo por 30 minutos e posteriormente as células foram centrifugadas a 12000 RPM por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado em freezer a -80°C e feita a dosagem de proteínas pelo método de Bradford.

2.4 Eletroforese e transferência de amostras: A mesma quantidade de proteína (20 μ g) foi desnaturada por aquecimento (95 a 100°C por 5 minutos) em tampão de amostra Laemmli contendo mercaptoetanol (Tris 150 mM, glicerol 20 %, BME 1%, SDS 4% e azul de bromofenol 0,01%). As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida 37,5:1) 10% e corridas em tampão (Tris 250 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%), a 100V, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos, a temperatura ambiente. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para a membrana de PVDF (poro de 0,45 μ m, Immobilon P, Millipore) na presença do tampão

(Tris 250 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) utilizando-se o aparelho de transferência (Trans-blot cell, Bio Rad Laboratories), a 24V, por 1 hora e 30 minutos, a temperatura ambiente.

2.5 Western Blott: As membranas foram bloqueadas com solução de leite em pó desnatado a 5% em tampão TBS-T (10mM de Tris-base, 150 mM de NaCl e 0,1% de Tween 20), por 2 horas, a temperatura ambiente. Após esse período, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com o anticorpo primário. Como anticorpos primários foram utilizados o anticorpo que reconhece a forma total do NFkB p65 (diluição 1:1000) ou o anticorpo policlonal de coelho contra a forma fosforilada do NFkB p65 (Ser536) (diluição 1:1000), e o anticorpo que reconhece a forma total da SAPK/JNK (diluição 1:3000) ou o anticorpo policlonal de coelho contra a forma fosforilada da SAPK/JNK que detecta níveis endógenos de p46 e p54 (Thr183/Tyr185) (diluição 1:1000) em tampão de bloqueio, por 16 horas, a 4°C, sob agitação. Após esse período, as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos com TBS-T e incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase diluído 1:4000 em solução de leite em pó desnatado a 1% em tampão TBS-T, por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes de 5 minutos com TBS-T. O produto final da reação foi revelado com o reagente ECL e quimioluminescência em fotodocumentador (Amersham Imager 600, GE).

2.6 Densitometria das bandas e análise estatística: O *software* usado para quantificação das bandas foi o ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA), disponível no sítio do *National Institute of Health* (NIH). Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e comparados por ANOVA seguido pós-teste de Tukey. O critério de significância para todas as análises foi o valor $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

No presente estudo, foram observados os efeitos do agonista total de PPAR γ , rosiglitazona, e do agonista parcial, GQ-16, na fosforilação das vias do NF κ B e da SAPK/JNK, em cultura de macrófagos RAW 264.7, na ausência ou na presença de estímulo inflamatório por 15 ou 60 minutos. Para tal, foram realizados ensaios de *Western Blot* e utilizados anticorpos contra a forma total e forma fosforilada do NF κ B p65 (Ser536), e contra a forma total e fosforilada da SAPK/JNK p46 e p54 (Thr183/Tyr185).

Já foi visto que agonistas de PPAR γ , além dos efeitos genômicos clássicos, podem mediar efeitos rápidos, em questão de minutos, em diversos tipos celulares. Porém, ainda não foi visto se essas ações não-genômicas poderiam explicar os efeitos benéficos do GQ-16.

3.1 Efeito de agonistas de PPAR γ sobre a fosforilação do NF κ B em 15 minutos de tratamento com LPS

O tratamento com LPS por 15 minutos aumentou a fosforilação do NF κ B em relação ao controle (DMSO 0,001%), porém, o mesmo não foi visto no tratamento com os agonistas (figura 4A).

Posteriormente, cultura de macrófagos RAW 264.7 foi pré-tratada com agonistas de PPAR γ e então adicionado o LPS por 15 minutos para ver se seria possível bloquear o efeito do LPS na fosforilação do NF κ B. Foi observado que tanto o agonista total quanto o agonista parcial do PPAR γ foram capazes de inibir o efeito do LPS em 15 minutos de tratamento (figura 4B).

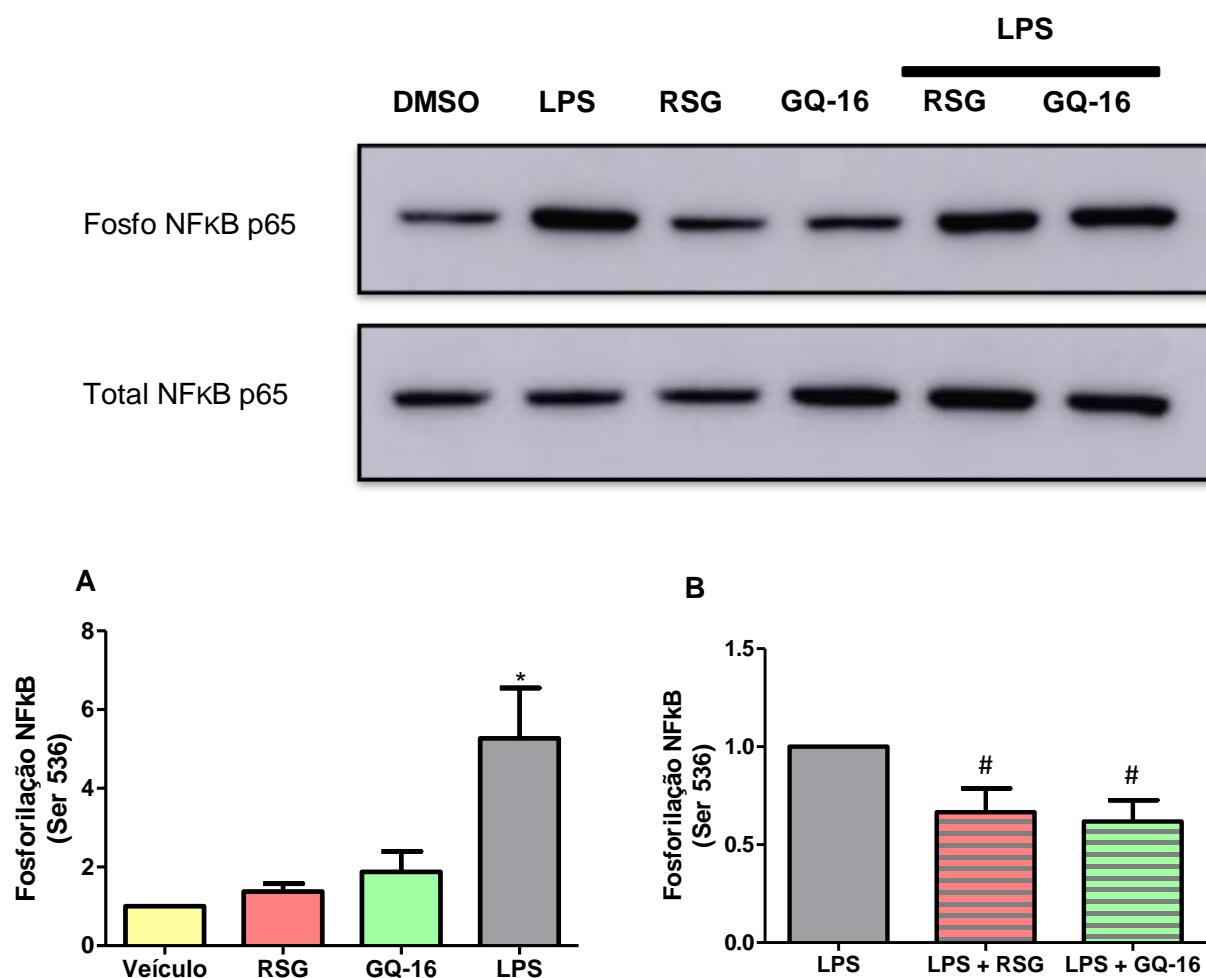


Figura 4. Efeito de agonistas de PPAR γ sobre a fosforilação do NFκB estimulada por 15 minutos de tratamento com LPS em células RAW 264.7. **A)** Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com o veículo (DMSO 0,001%), rosiglitazona (RSG, 10^{-5} M), GQ-16 (10^{-5} M) por 30 minutos ou LPS (100 ng/mL) por 15 minutos. **B)** Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com rosiglitazona (RSG, 10^{-5} M) ou GQ-16 (10^{-5} M) por 30 minutos e então o LPS (100 ng/mL) adicionado por mais 15 minutos. As células foram colhidas e a proteína NFκB foi detectada por *Western blot*. O imunoensaio foi realizado com os anticorpos anti-fosfo NFκB (forma fosforilada do NFκB) ou anti- NFκB (forma total do NFκB). Análise densitométrica foi realizada dos resultados obtidos dos autorradiogramas, normalizados pela expressão do NFκB total e expressos em relação ao controle. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão de 5 experimentos. **A)*** Significativamente diferente em relação ao controle **B)**# Significativamente diferente do LPS, por ANOVA seguida de comparação múltipla de *Tukey*.

3.2 Efeito de agonistas de PPAR γ sobre a fosforilação do NFκB em 60 minutos de tratamento com LPS

Também no tratamento de 60 minutos com o LPS foi observado aumento significativo da fosforilação do NFκB em comparação ao controle, enquanto que o tratamento com os agonistas não demonstrou o mesmo efeito (figura 5A). Já o pré-tratamento com os agonistas não alterou o efeito do LPS em 60 minutos de tratamento (figura 5B), diferentemente do que ocorreu em 15 minutos.

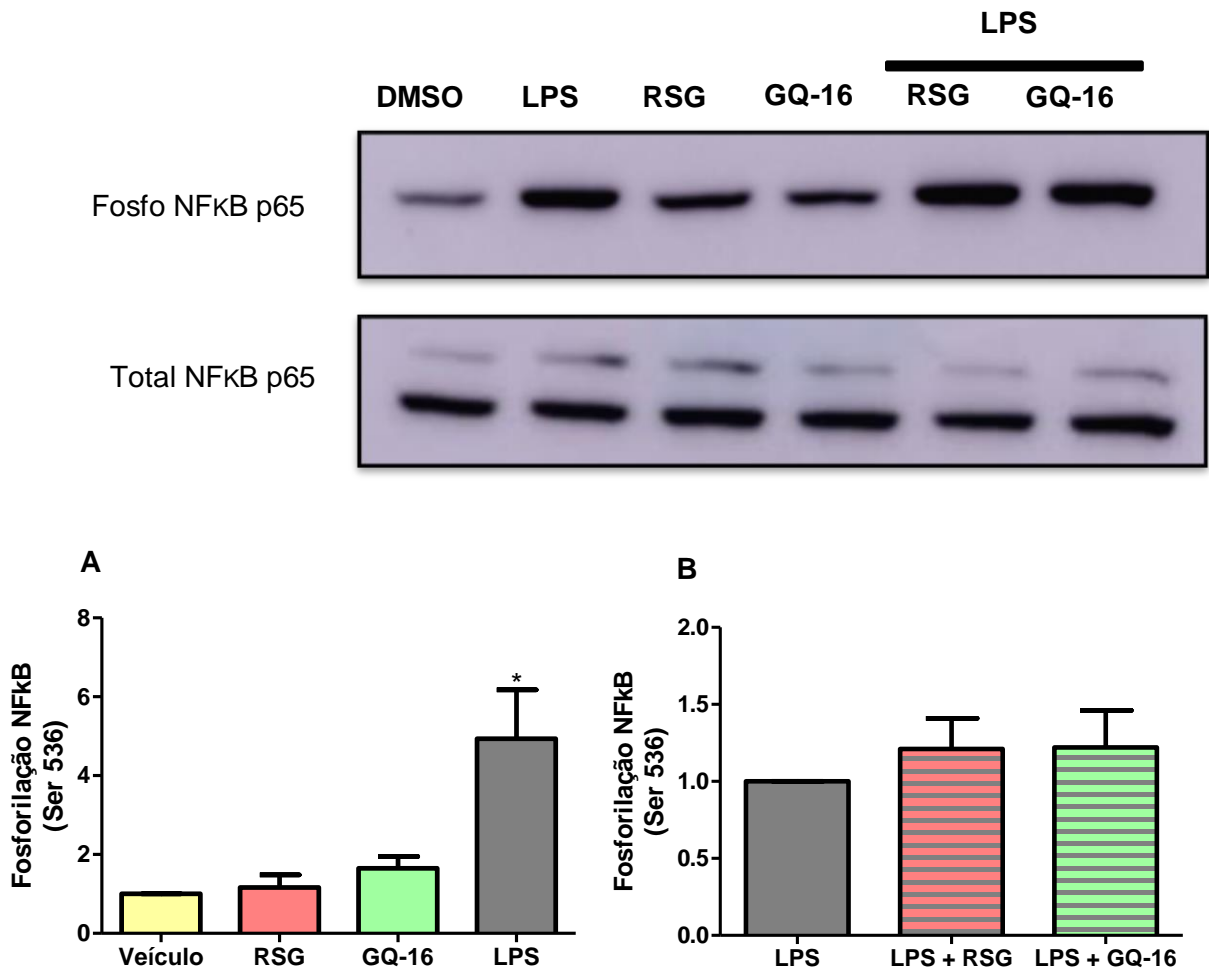


Figura 5. Efeito de agonistas de PPAR γ sobre a fosforilação do NFκB estimulada por 60 minutos de tratamento com LPS em células RAW 264.7. **A)** Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com o veículo (DMSO 0,001%), rosiglitazona (RSG, 10^{-5} M), GQ-16 (10^{-5} M) por 30 minutos ou LPS (100 ng/mL) por 60 minutos. **B)** Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com rosiglitazona (RSG, 10^{-5} M) ou GQ-16 (10^{-5} M) por 30 minutos e então o LPS (100 ng/mL) adicionado por mais 60 minutos. As células foram colhidas e a proteína NFκB foi detectada por *Western blot*. O imunoensaio foi realizado com os anticorpos anti-fosfo NFκB (forma fosforilada do NFκB) ou anti- NFκB (forma total do NFκB). Análise densitométrica foi realizada dos resultados obtidos dos autorradiogramas, normalizados pela expressão do NFκB total e expressos em relação ao controle. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão de 3 experimentos. **A)*** Significativamente diferente em relação ao controle, por ANOVA seguida de comparação múltipla de *Tukey*.

3.3 Efeito de agonistas de PPAR γ sobre a fosforilação da SAPK/JNK em

15 minutos de tratamento com LPS

O tratamento por 15 minutos com LPS embora tenha aumentado a fosforilação da SAPK/JNK, não foi estatisticamente significativo. Isso pode ser devido ao fato de ter apenas 3 experimentos (figura 6A). O pré-tratamento com os agonistas de PPAR γ não alterou o efeito do LPS na fosforilação da SAPK/JNK, no entanto o agonista total rosiglitazona apresentou uma tendência a diminuir tal efeito do estímulo inflamatório (figura 6B).

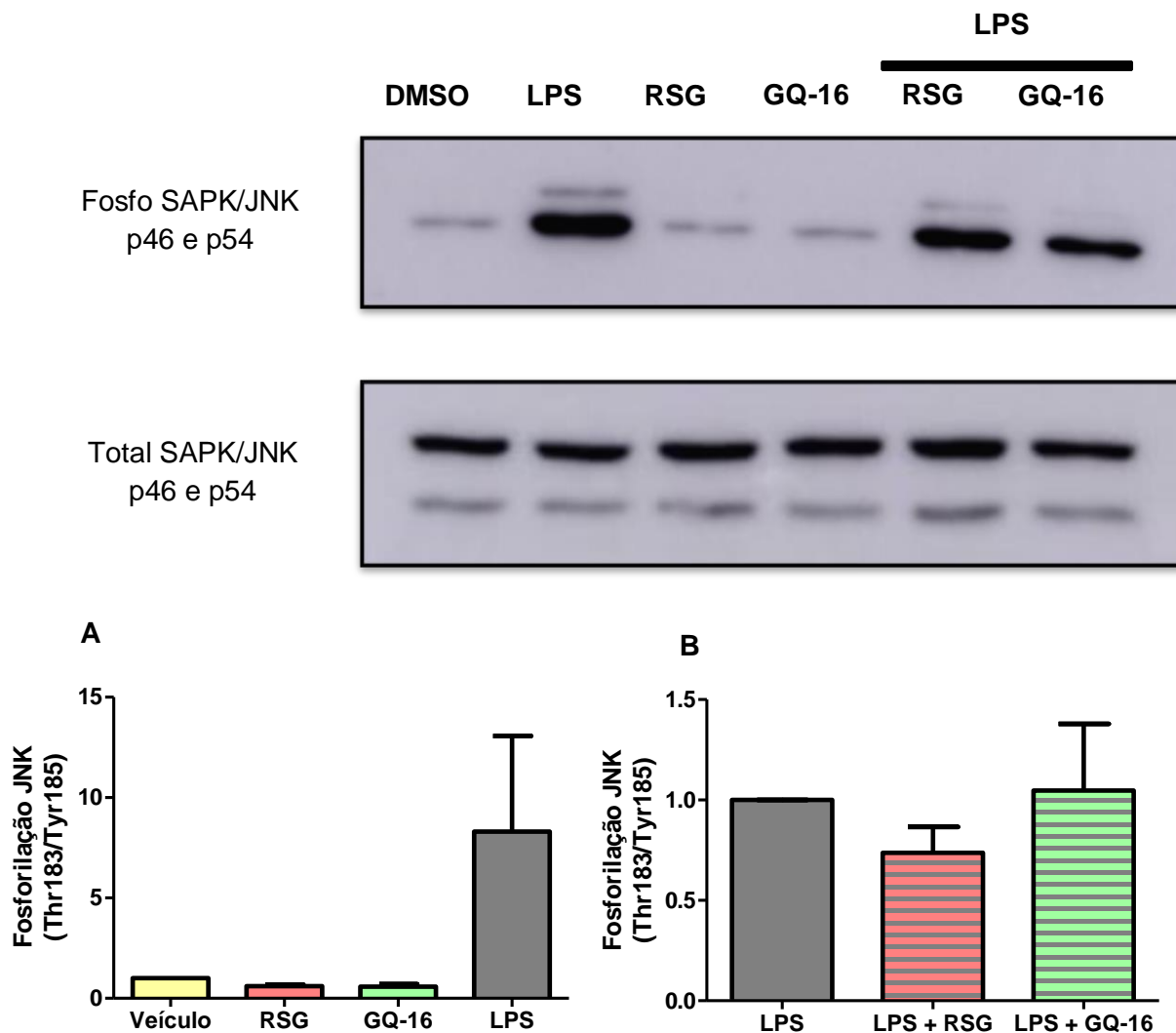


Figura 6. Efeito de agonistas de PPAR γ sobre a fosforilação da SAPK/JNK estimulada por 15 minutos de tratamento com LPS em células RAW 264.7. **A)** Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com o veículo (DMSO 0,001%), rosiglitazona (RSG, 10^{-5} M), GQ-16 (10^{-5} M) por 30 minutos ou LPS (100 ng/mL) por 15 minutos. **B)** Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com rosiglitazona (RSG, 10^{-5} M) ou GQ-16 (10^{-5} M) por 30 minutos e então o LPS (100 ng/mL) adicionado por mais 15 minutos. As células foram colhidas e a proteína SAPK/JNK foi detectada por *Western blot*. O imunensaio foi realizado com os anticorpos anti-fosfo SAPK/JNK (forma fosforilada da SAPK/JNK) ou anti-SAPK (forma total da SAPK/JNK). Análise densitométrica foi realizada dos resultados obtidos dos autoradiogramas, normalizados pela expressão da SAPK/JNK total e expressos em relação ao controle. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão de 3 experimentos. **A)*** Significativamente diferente em relação ao controle, por ANOVA seguida de comparação múltipla de *Tukey*.

3.4 Efeito de agonistas de PPAR γ sobre a fosforilação da SAPK/JNK em

60 minutos de tratamento com LPS

O LPS em 60 minutos de tratamento aumentou a fosforilação da SAPK/JNK em torno de 35 vezes, e o tratamento com os agonistas de PPAR γ não foi capaz de alterar a fosforilação da mesma via (figura 6A). O pré-tratamento com os agonistas de PPAR γ não alterou o efeito do LPS sobre a fosforilação da SAPK/JNK (figura 6B).

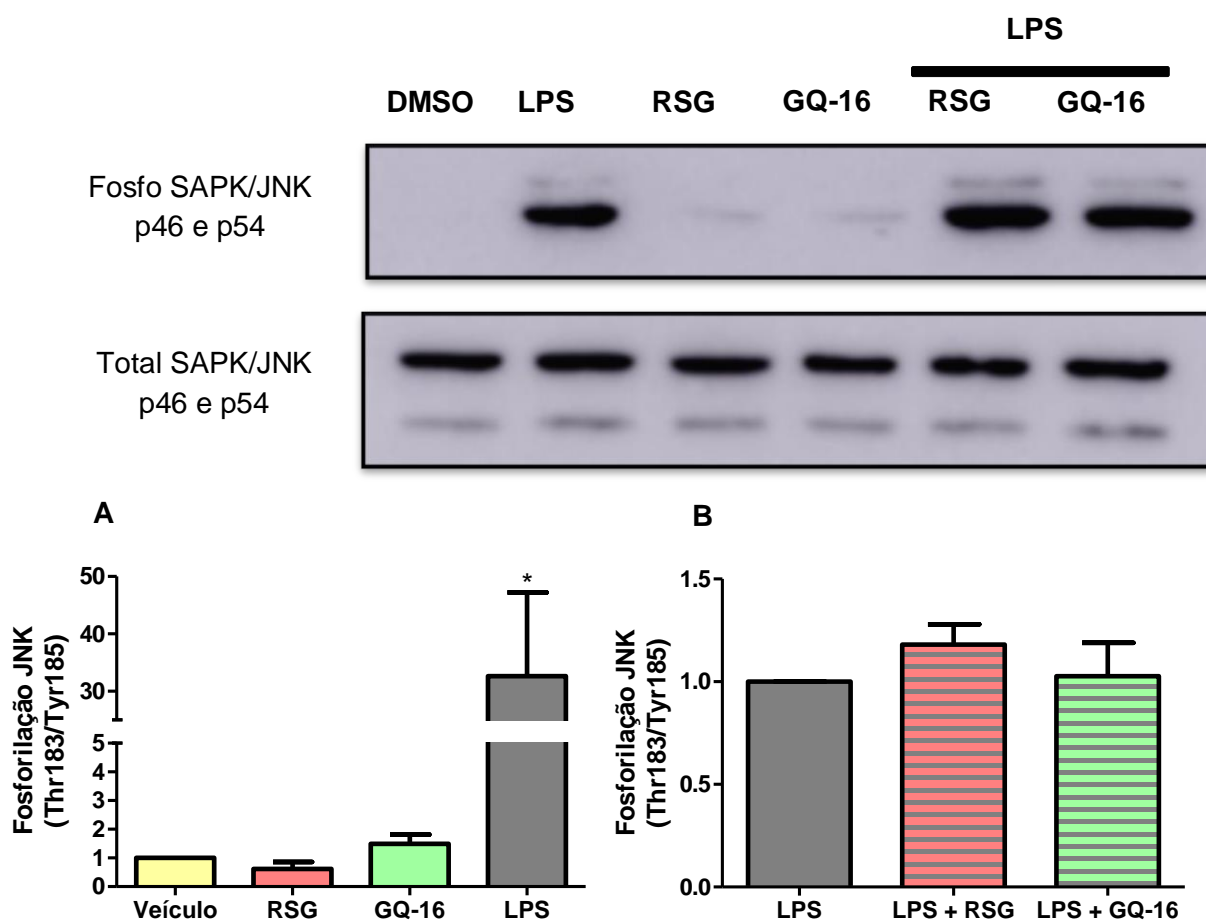


Figura 7. Efeito de agonistas de PPAR γ sobre a fosforilação da SAPK/JNK estimulada por 60 minutos de tratamento com LPS em células RAW 264.7. **A)** Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com o veículo (DMSO 0,001%), rosiglitazona (RSG, 10^{-5} M), GQ-16 (10^{-5} M) por 30 minutos ou LPS (100 ng/mL) por 60 minutos. **B)** Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com rosiglitazona (RSG, 10^{-5} M) ou GQ-16 (10^{-5} M) por 30 minutos e então o LPS (100 ng/mL) adicionado por mais 60 minutos. As células foram colhidas e a proteína SAPK/JNK foi detectada por *Western blot*. O imunoenensaio foi realizado com os anticorpos anti-fosfo SAPK/JNK (forma fosforilada da SAPK/JNK) ou anti-SAPK (forma total da SAPK/JNK). Análise densitométrica foi realizada dos resultados obtidos dos autoradiogramas, normalizados pela expressão da SAPK/JNK total e expressos em relação ao controle. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão de 5 experimentos. **A)*** Significativamente diferente em relação ao controle, por ANOVA seguida de comparação múltipla de *Tukey*.

4. DISCUSSÃO

A organização mundial de saúde (OMS) estima que a obesidade no mundo aumentou mais que o dobro desde 1980. Em 2008, 1,5 bilhões de adultos, com 20 anos ou mais, estavam acima do peso (*WORLD HEALTH ORGANIZATION 2011a,b*). Juntamente com a obesidade, surgem várias condições a ela associadas, como por exemplo o *Diabetes Mellitus* Tipo 2 (DM2), uma vez que esse excesso de gordura no corpo promove um estado de inflamação crônica e resistência insulínica (*CIRILLO et al., 2019*). De acordo com a OMS, o número de pessoas diabéticas aumentou de 108

milhões em 1980 para 422 milhões em 2014, e em 2016, uma estimativa de 1,6 milhões de mortes foram diretamente causadas pelo diabetes (*WORLD HEALTH ORGANIZATION* 2018). As quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias geradas devido à essa condição são secretadas principalmente pelos macrófagos que são recrutados para o tecido adiposo (CIRILLO *et al.*, 2019), e por isso no presente estudo foi utilizada a linhagem celular de macrófagos RAW 264.7 para realização dos tratamentos.

Para a indução do processo inflamatório nos macrófagos foi utilizado o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas, uma vez que pouco tempo de estimulação com LPS já induz (e reprime) a expressão de várias centenas de genes em macrófagos (RAMSEY *et al.*, 2008; RAVASI; WELLS; HUME, 2007). O LPS é reconhecido pelo TLR4 (*toll-like receptor 4*) na superfície de macrófagos e resulta na ativação das vias de sinalização das três famílias de MAPK (ERK1/2, p38 e SAPK/JNK) e do NFkB, que regulam a expressão de genes relacionados com a inflamação como por exemplo TNF, IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10 (MEDZHITOV; HORNG, 2009; SMALE, 2012; TAKEUCHI; AKIRA, 2010; para revisão ver ULLOA; TRACEY, 2005; VAURE; LIU, 2014). A ativação das vias de sinalização SAPK/JNK e NFkB pelo LPS foi observada no presente estudo em 15 e 60 minutos de tratamento. O tratamento por 15 minutos com LPS não alterou significativamente a fosforilação da SAPK/JNK, embora tenha apresentado uma tendência. Isso pode ser explicado devido ao baixo número de experimentos (apenas 3), necessitando se aumentar esse número.

Como tratamento medicamentoso utilizado para combater o DM2 são utilizadas as TZDs, as quais são agonistas totais de PPAR γ . Estas possuem efeitos sensibilizador insulínico e anti-inflamatórios, porém seu uso tem sido associado à efeitos adversos. Diante disso, foram desenvolvidos agonistas parciais, os quais são ligantes com eficácia apenas parcial na ativação do PPAR γ , porém que mantêm as ações de sensibilização à insulina e com menos efeitos colaterais (AMATO *et al.*, 2012).

Nesse caso, o agonista parcial utilizado para a realização dos experimentos foi o GQ-16, o qual em estudos anteriores demonstrou efeito sensibilizador insulínico comparáveis ao da rosiglitazona, porém sem a indução do ganho de peso (AMATO *et al.*, 2012). Coelho e colaboradores (2016) demonstraram em camundongos tratados com dieta hiperlipídica, que o GQ-16 reduziu o ganho de peso em comparação com a rosiglitazona, mesmo tendo aumentado o consumo energético. Ainda, o tratamento com GQ-16 induziu a expressão de genes relacionados com a termogênese no tecido adiposo marrom e no tecido adiposo branco epididimal (COELHO *et al.*, 2016). O trabalho de Milton e colaboradores (2015) comparou os efeitos da rosiglitazona e do GQ-16 em células de adipócitos maduros 3T3-L1 usando *microarray* e PCR em tempo real, onde a rosiglitazona alterou a expressão de 1156 genes, enquanto que o GQ-16 alterou apenas 89 genes. O GQ-16, de forma geral, demonstrou um efeito fraco sobre os genes induzidos pela rosiglitazona, consistente com as ações de um agonista parcial, porém, eficientemente reprimiu alguns genes responsivos negativamente regulados pelo PPAR γ , o que poderia contribuir com as ações fisiológicas do ligante (MILTON *et al.*, 2015).

Nos experimentos realizados neste trabalho, que analisaram a fosforilação da SAPK/JNK e do NF κ B, os agonistas de PPAR γ foram adicionados antes do estímulo inflamatório para verificar se tais agonistas conseguiriam inibir o estímulo do LPS. O pré-tratamento com o agonista total de PPAR γ , rosiglitazona, e com o agonista parcial GQ-16, entretanto, apenas demonstrou inibição do efeito do LPS em 15 minutos de tratamento sobre a fosforilação do NF κ B. Apesar disso, foi possível observar uma tendência de diminuição da fosforilação da SAPK/JNK pela rosiglitazona também em 15 minutos de tratamento e é possível que a significância estatística não tenha sido observada devido à pouca quantidade de experimentos realizados, e portanto mais experimentos devem feitos antes de se poder excluir o efeito do agonista total nessa via. Por outro lado, nenhum dos ligantes foi capaz de inibir o efeito gerado por 60 minutos de

tratamento com LPS, demonstrando assim que este é um mecanismo dependente do tempo.

Foi realizada, anteriormente aos experimentos, uma curva de tempo com o LPS para se verificar quais seriam os tempos utilizados no tratamento com este estímulo inflamatório, e, diante disso, foram escolhidos os tempos de 15 e 60 minutos. Além disso, outros estudos também já demonstraram que a rosiglitazona inibiu o estímulo inflamatório induzido pelo tratamento com LPS em diferentes tipos celulares. Em células da veia umbilical humana, este agonista total de PPAR γ demonstrou significativa diminuição da apoptose, produção de ROS e das concentrações de TNF α , IL-6, CXCL12 e CXCR4 induzidos por 24 horas de tratamento com LPS (JI *et al.*, 2018). E ainda, à semelhança do presente estudo, já foi visto que a rosiglitazona foi capaz de inibir a ativação da AKT em cultura de células RAW 264.7, estimuladas por 15 minutos de tratamento com LPS (LIN *et al.*, 2014).

Trabalhos anteriores já mostraram que as TZDs interferem com a fosforilação da SAPK/JNK e do NF κ B em diferentes tipos celulares. Okami e colaboradores (2013) por exemplo, demonstraram que a rosiglitazona bloqueou a fosforilação da SAPK/JNK no tecido cerebral isquêmico e sendo capaz assim de reduzir a morte celular, dessa forma demonstrando o efeito neuroprotetor de TZDs ao reduzir o estresse oxidativo e prevenindo a apoptose. (OKAMI *et al.*, 2013). Ainda, foi observada uma diminuição na fosforilação do NF κ B induzida pela interleucina 7 (IL-7) e TNF α após tratamento com a pioglitazona em células do núcleo pulposo, mostrando assim que esse agonista é capaz de inibir a ativação desta via de sinalização, exercendo assim efeito anti-inflamatório (LIU, Y. *et al.*, 2019). Isso pôde ser visto no presente trabalho, uma vez que os agonistas foram capazes de inibir a fosforilação do NF κ B induzida pelo LPS, e não terem efeito na ausência do estímulo inflamatório. Mas, por outro lado, o mesmo não foi observado na fosforilação da via da SAPK/JNK, e mais estudos devem ser realizados nessa área para se confirmar o efeito inibidor da rosiglitazona nessa via.

As concentrações utilizadas dos agonistas foram devido a estudos anteriores que também utilizaram 10^{-5} M de rosiglitazona e GQ-16 para realização dos experimentos (AMATO *et al.*, 2012). Além do mais, ensaios de viabilidade celular foram realizados, os quais demonstraram que tanto rosiglitazona quanto GQ-16, nessa concentração, não causaram efeito sobre a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 e portanto não sendo tóxicos para a célula (SILVA, 2016). Ainda é importante comentar que o uso de maiores concentrações do GQ-16 causam a precipitação do agonista parcial, e portanto essa utilização não foi possível.

A participação do PPAR γ nessas vias de sinalização é controversa. Estudos mostraram que os efeitos que os agonistas de PPAR γ exercem sobre as vias de sinalização são de forma independente de PPAR γ . De fato, já foi demonstrado que a rosiglitazona pode agir via um receptor de membrana acoplado à proteína G, o GPR40 (GRAS *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2013; PAPAGEORGIOU *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2015).

Já foi visto que em células endoteliais humanas a rosiglitazona interfere com a ação pró-inflamatória do TNF α e do IFN γ (indução da secreção de citocinas inflamatórias, expressão de moléculas de adesão) através da rápida inibição da fosforilação da ERK1/2 estimulada pelo TNF α e IFN γ (LOMBARDI *et al.*, 2008b, 2009) e experimentos de silenciamento do PPAR γ claramente demonstraram o envolvimento do receptor em mediar tanto o efeito rápido não-genômico da fosforilação da ERK1/2 quanto os efeitos a longo prazo na secreção de citocinas e quimiocinas (LUCONI; CANTINI; SERIO, 2010). Por outro lado, os resultados de Wang e colaboradores (2015) demonstraram que o GPR40 e o PPAR γ podem funcionar juntos como uma via de sinalização de transdução integrada de dois receptores. Além da ativação direta no receptor PPAR γ , a rosiglitazona também exigiu o GPR40 para propagar de forma ideal um sinal nuclear do PPAR γ no endotélio humano. O GPR40 e o PPAR γ pareceram funcionar aditivamente e, às vezes, sinergicamente para iniciar respostas genômicas do PPAR γ , dependendo do contexto transcricional (WANG *et al.*, 2015). E ainda, já na ausência do ligante, o PPAR γ se liga a

específicos PPREs em genes responsivos, recrutando complexos correpressores (NcoR) e assim inibindo a transcrição. Já a ligação ao receptor induz uma troca de um estado de repressão para um estado de transativação por meio da liberação do NcoR e recrutamento do NcoA (LUCONI; CANTINI; SERIO, 2010).

5. CONCLUSÃO

Conclui-se com os resultados deste estudo que tanto rosiglitazona quanto GQ-16 foram capazes de inibir o efeito da fosforilação do NFκB em 15 minutos de tratamento com o LPS, sugerindo assim que a ativação desta via de sinalização pode ser um efeito não-genômico dos agonistas total e parcial de PPARγ e que também existe uma relação entre os efeitos não-genômicos dos agonistas e o efeito anti-inflamatório do receptor. No que se diz respeito à fosforilação da via da SAPK/JNK foi possível observar uma tendência pela rosiglitazona de inibição do efeito gerado pelo LPS, porém é necessária realização de um maior número de experimentos para se obter uma análise estatística mais precisa.

Além disso, é preciso verificar se estes efeitos não-genômicos são realmente dependentes de PPARγ, se são dependentes da ligação com outro receptor ou ainda dependentes da ligação tanto com o PPARγ quanto com outro receptor. Ainda, é preciso confirmar que o efeito dos agonistas nessas vias de sinalização estão de fato envolvidos com o efeito anti-inflamatório.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAGEED, A. B. NF-κB-dependent gene expression of proinflammatory cytokines in T24 cells: possible role in interstitial cystitis. p. 300–305, 2003.

AHMADIAN, M. *et al.* Pparγ signaling and metabolism: The good, the bad and the future.

Nature Medicine, v. 19, n. 5, p. 557–566, 2013. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1038/nm.3159>>.

ALQUIER, T. *et al.* Deletion of GPR40 Impairs Glucose-Induced Insulin Secretion In Vivo in Mice Without Affecting Intracellular Fuel Metabolism in Islets. v. 58, n. November, p. 2607–2615, 2009.

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

ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological Reviews*, v. 81, n. 3, p. 1269–1304, 2001.

BACHMAYER, C.; LAMMERT, A.; HASENBERG, T. Healthy Obese and Post Bariatric Patients – Metabolic and Vascular Patterns. p. 483–487, 2013.

BERGER, J. P. *et al.* Distinct properties and advantages of a novel peroxisome proliferator-activated protein [gamma] selective modulator. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, v. 17, n. 4, p. 662–76, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12554792>>.

BOUCHER, J.; KLEINRIDDER, A.; KAHN, C. R. Insulin Receptor Signaling in Normal. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014, v. 6, p. a009191, 2014.

BROWN, M. A.; JONES, W. K. NF-kappaB action in sepsis: the innate immune system and the heart. *Frontiers in Bioscience*, v. 1, n. 12, p. 1201–1217, 2004.

BUBICI, C.; PAPA, S. JNK signalling in cancer: In need of new, smarter therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology*, v. 171, n. 1, p. 24–37, 2014.

BURRI, L.; THORESEN, G. H.; BERGE, R. K. The role of PPAR activation in liver and muscle. *PPAR Research*, v. 2010, 2010.

CAAMAN, J.; HUNTER, C. A. NF- κ B Family of Transcription Factors : Central Regulators of Innate and Adaptive Immune Functions. v. 15, n. 3, p. 414–429, 2002.

CANTINI, G. *et al.* Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is required for modulating endothelial inflammatory response through a nongenomic mechanism. *European Journal of Cell Biology*, v. 89, n. 9, p. 645–653, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.04.002>>.

CHINETTI, G. *et al.* Activation of Proliferator-activated Receptors α and β Induces Apoptosis of Human Monocyte-derived Macrophages *. v. 273, n. 40, p. 25573–25580, 1998.

CINTI, S. *et al.* Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. v. 46, p. 2347–2355, 2005.

CIRILLO *et al.* Obesity, Insulin Resistance, and Colorectal Cancer: Could miRNA Dysregulation Play A Role? *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 12, p. 2922, 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/20/12/2922>>.

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

CVETKOVIC, I. *et al.* Taxol activates inducible nitric oxide synthase in rat astrocytes : the role of MAP kinases and NF- κ B. v. 61, p. 1167–1175, 2004.

DAVIS, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, v. 103, n. 2, p. 239–252, 2000.

DEJARDIN, E. The alternative NF- κ B pathway from biochemistry to biology: Pitfalls and promises for future drug development. *Biochemical Pharmacology*, v. 72, n. 9 SPEC. ISS., p. 1161–1179, 2006.

DESREUMAUX, P. *et al.* Attenuation of Colon Inflammation through Activators of the

Retinoid X Receptor (R α r)/Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (Ppar γ) Heterodimer. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 193, n. 7, p. 827–838, 2001. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.193.7.827>>.

DITSWORTH, D.; ZONG, W. NF-kappaB: Key mediator of inflammation associated cancer. *Cancer Biology & Therapy*, v. 4047, n. March, 2016.

DIXIT, D. *et al.* Chaetocin-induced ROS-mediated apoptosis involves ATM-YAP1 axis and JNK-dependent inhibition of glucose metabolism. *Cell Death and Disease*, v. 5, n. 5, p. e1212-13, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2014.179>>.

ENDO, Y. *et al.* Thiazolidinediones enhance sodium-coupled bicarbonate absorption from renal proximal tubules via PPAR γ -dependent nongenomic signaling. *Cell Metabolism*, v. 13, n. 5, p. 550–561, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.015>>.

EVANS, R. M.; BARISH, G. D.; WANG, Y. OUR TENTH YEAR PPARs and the complex journey to obesity. v. 10, n. 4, p. 1–7, 2004.

FAN, W.; EVANS, R. PPARs and ERRs: molecular mediators of mitochondrial metabolism. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 118, n. 24, p. 6072–6078, 2015.

FEDIUC, S. *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase, inhibition of pyruvate dehydrogenase activity, and redistribution of substrate partitioning mediate the acute insulin-sensitizing effects of troglitazone in skeletal muscle cells. *Journal of Cellular Physiology*, v. 215, n. 2, p. 392–400, 2008.

FEIGE, J. N. *et al.* From molecular action to physiological outputs: Peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Progress in Lipid Research*, v. 45, n. 2, p. 120–159, 2006.

FRYER, L. G. D.; PARBU-PATEL, A.; CARLING, D. The anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling

pathways. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 28, p. 25226–25232, 2002.

FUCHS, C. S. Colorectal Cancer Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPARG, PPARgamma) Is Associated With Good Prognosis. *YGAST*, v. 136, n. 4, p. 1242–1250, 2009. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2008.12.048>>.

GHOSH, S.; KARIN, M.; HAVEN, N. Missing Pieces in the NF- κ B Puzzle. v. 109, p. 81–96, 2002.

GIULIA, C. *et al.* Rosiglitazone inhibits adrenocortical cancer cell proliferation by interfering with the IGF-IR intracellular signaling. *PPAR Research*, v. 2008, 2008.

GLASS, C. K.; OGAWA, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. v. 6, n. January, p. 44–55, 2006.

GRAS, D. *et al.* Thiazolidinediones induce proliferation of human bronchial epithelial cells through the GPR40 receptor. p. 970–978, 2009.

GREY, A. *et al.* The peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist rosiglitazone decreases bone formation and bone mineral density in healthy postmenopausal women: A randomized, controlled trial. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 92, n. 4, p. 1305–1310, 2007.

GUO, C. *et al.* Interleukin-1 α Upregulates Functional Expression of α via NF- κ B in Astrocytes. v. 266, n. June, p. 259–266, 2004.

GUO, M. *et al.* Fibrinogen regulates the expression of inflammatory chemokines through NF- κ B activation of endothelial cells. p. 858–866, 2004.

HALLAKOU, S. *et al.* Pioglitazone Induces In Vivo Adipocyte Differentiation in the Obese Zucker/Yfa/fa Rat. v. 1, p. 1393–1399, [S.d.].

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell*, v. 132, n. 3, p. 344–362, 2008.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Signaling to NF- κ B. p. 2195–2224, 2004.

HEIKKINEN, S.; AUWERX, J.; ARGMANN, C. A. PPAR γ in human and mouse physiology. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1771, n. 8, p. 999–1013, 2007.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. v. 444, n. December, 2006.

HOU, Y. *et al.* CMHX008, a PPAR γ partial agonist, enhances insulin sensitivity with minor influences on bone loss. *Genes and Diseases*, v. 5, n. 3, p. 290–299, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.004>>.

HU, E.; TONONZOZ, P.; SPIEGELMAN, B. M. 95 PNAS Tontonoz Transdifferentiation Myoblasts PPAR γ CEBP α .pdf. v. 92, n. October, p. 9856–9860, 1995.

HUANG, Y. *et al.* NF- κ B precursor p105, and NF- κ B inhibitor I κ B α , are both elevated in Alzheimer disease brain. v. 373, p. 115–118, 2005.

ISRAËL, A. The IKK complex : an integrator of all signals that activate NF- κ B ? v. 8924, n. 1998, p. 129–133, 2000.

ITOH, Y.; KAWAMATA, Y.; HARADA, M. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic b cells through GPR40. v. 1600, n. 2000, p. 2001–2004, 2003.

JANANI, C.; RANJITHA KUMARI, B. D. PPAR gamma gene - A review. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, v. 9, n. 1, p. 46–50, 2015.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dsx.2014.09.015>>.

JI, X. *et al.* Rosiglitazone Reduces Apoptosis and Inflammation in Lipopolysaccharide-Induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Medical Science Monitor*, v. 24, p. 6200–6207, 2018.

JIANG, C.; TING, A. T.; SEED, B. inflammatory cytokines. v. 391, n. January, p. 82–86, 1998.

KARPE, F.; EHRENBORG, E. E. PPAR δ in humans: Genetic and pharmacological evidence for a significant metabolic function. *Current Opinion in Lipidology*, v. 20, n. 4, p. 333–336, 2009.

KERSTEN, S. Integrated physiology and systems biology of PPAR α . *Molecular Metabolism*, v. 3, n. 4, p. 354–371, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2014.02.002>>.

KIM, H. *et al.* PPAR- γ Activation Increases Insulin Secretion through the Up-regulation of the Free Fatty Acid Receptor GPR40 in Pancreatic β -Cells. v. 8, n. 1, p. 23–29, 2013.

KOTARSKY, K. *et al.* A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs. v. 301, p. 406–410, 2003.

KYRIAKIS, J. M.; AVRUCH, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological reviews*, v. 81, n. 2, p. 807–69, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274345>>.

LAURORA, S. *et al.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Ligands Affect Growth-Related Gene Expression in Human Leukemic Cells. v. 305, n. 3, p. 932–942, 2003.

LAWLER, S. *et al.* Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Current Biology*, v. 8, n. 25, p. 1387–1391, 1998.

LAZNIK, D. *et al.* Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR γ by Cdk5. v. 466, n. July, 2010.

LEBOVITZ, H. E. Insulin resistance definition and facts. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, v. 109, p. 135–148, 2001. Disponível em: <http://www.medicinenet.com/insulin_resistance/article.htm>.

LEBRASSEUR, N. K. *et al.* Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 291, n. 1, p. E175–E181, 2006.

LEE, S. *et al.* CpG oligodeoxynucleotides induce expression of proinflammatory cytokines and chemokines in astrocytes : the role of c- Jun N-terminal kinase in CpG ODN-mediated NF- κ B activation. v. 153, p. 50–63, 2004.

LEFEBVRE, P. *et al.* Sorting out the roles of PPAR α in energy metabolism and vascular homeostasis Find the latest version : Review series Sorting out the roles of PPAR α in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest.*, v. 116, n. 3, p. 571–580, 2006.

LGSSAR, A. *et al.* Interleukin-11 inhibits NF- κ B and AP-1 activation in islets and prevents diabetes induced with streptozotocin in mice. *Experimental Biology and Medicine*, n. 15, p. 425–436, 2004.

LI, Q.; VERMA, I. M.; PINES, N. T. NF- κ B Regulation in the immune system. v. 2, n. October, 2002.

LIN, C.-F. *et al.* Rosiglitazone Regulates Anti-Inflammation and Growth Inhibition via PTEN. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1–14, 2014.

LIOU, H. Regulation of the Immune System by NF- κ B and I κ B. v. 35, n. 6, p. 537–546, 2002.

LIOU, H.; HSIA, C. Y. Distinctions between c-Rel and other NF- κ B proteins in immunity and disease. p. 767–780, 2003.

LIU, H. -J. *et al.* A Novel Partial Agonist of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor with Excellent Effect on Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 353, n. 3, p. 573–581, 2015.

LIU, Y. *et al.* PPAR- γ agonist pioglitazone protects against IL-17 induced intervertebral disc inflammation and degeneration via suppression of NF- κ B signaling pathway.

International Immunopharmacology, v. 72, n. 107, p. 138–147, 2019.

LOMBARDI, A. *et al.* A New Mechanism Involving ERK Contributes to Rosiglitazone Inhibition of Tumor Necrosis Factor- α and Interferon- γ Inflammatory Effects in Human. p. 718–724, 2008a.

LOMBARDI, A. *et al.* A new mechanism involving ERK contributes to rosiglitazone inhibition of tumor necrosis factor- α and interferon- γ inflammatory effects in human endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 28, n. 4, p. 718–724, 2008b.

LOMBARDI, A. *et al.* Molecular mechanisms underlying the pro-inflammatory synergistic effect of tumor necrosis factor α and interferon γ in human microvascular endothelium. v. 88, p. 731–742, 2009.

LUCONI, M.; CANTINI, G.; SERIO, M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): Is the genomic activity the only answer? *Steroids*, v. 75, n. 8–9, p. 585–594, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2009.10.012>>.

LUO, J. *et al.* Inhibition of NF- κ B in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNF- α to TRAIL-mediated tumor regression. v. 6, n. September, p. 297–305, 2004.

MAMTANI, R. *et al.* Association between longer therapy with thiazolidinediones and risk of bladder cancer: A cohort study. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 104, n. 18, p. 1411–1421, 2012.

MANICKAM, R.; WAHLI, W. Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor β/δ in skeletal muscle physiology. *Biochimie*, v. 136, n. February 2019, p. 42–48, 2017.

MEDZHITOV, R.; HORNG, T. Transcriptional control of the inflammatory response.

Nature Reviews Immunology, v. 9, n. 10, p. 692–703, 2009. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1038/nri2634>>.

MIECZKOWSKA, A. *et al.* Thiazolidinediones Induce Osteocyte Apoptosis by a G Protein-coupled Receptor 40-dependent Mechanism * □. v. 287, n. 28, p. 23517–23526, 2012.

MILTON, F. A. *et al.* PPAR γ partial agonist GQ-16 strongly represses a subset of genes in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 464, n. 3, p. 718–723, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.011>>.

NAWROTH, P. Reduction of Postprandial Hyperglycemia in Patients with Type 2 Diabetes Reduces NF- κ B Activation in PBMCs. *Original Clinical*, v. 65, 2004.

NEURATH MF, BECKER C, B. K. Role of NF- κ B in immune and inflammatory responses in the gut. *gut*, p. 856–860, 1998.

NF-, B. *et al.* NF- κ B activates IL-6 expression through cooperation with c-Jun and IL6-AP1 site, but is independent of its IL6-NF κ B regulatory site in autocrine human multiple myeloma cells. *Cancer Biology & Therapy*, n. October, p. 1007–1017, 2004.

NGUYEN, D. M. T h e E p i d e m i o l o g y of Obesity. *Gastroenterology Clinics of NA*, v. 39, n. 1, p. 1–7, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gtc.2009.12.014>>.

NISSEN, S. E.; WOLSKI, K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *The New England Journal of Medicine*, p. 2457–2471, 2007.

OKAMI, N. *et al.* Prevention of JNK phosphorylation as a mechanism for rosiglitazone in neuroprotection after transient cerebral ischemia: Activation of dual specificity phosphatase. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, v. 33, n. 1, p. 106–114, 2013.

OKUNO, A. *et al.* Troglitazone Increases the Number of Small Adipocytes without the Change of White Adipose Tissue Mass in Obese Zucker Rats insulin resistance • thiazolidinedione • obesity • adipocyte • peroxisome proliferator-activated receptor. *J. Clin. Invest.*, v. 101, n. 6, p. 1354–1361, 1998. Disponível em: <<http://www.jci.org>>.

OLEFSKY, J. M. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. *Journal of Clinical Investigation*, v. 106, n. 4, p. 467–472, 2000.

ONO, H. Molecular Mechanisms of Hypothalamic Insulin Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 6, p. 1317, 2019.

OUCHI, N. *et al.* Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews. Immunology*, v. 11, n. 2, p. 85–97, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21252989>%0A<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3518031>>.

PALAKURTHI, S. S. *et al.* Anticancer Effects of Thiazolidinediones Are Independent of Peroxisome Proliferator-activated Receptor α and Mediated by Inhibition of Translation Initiation 1. p. 6213–6218, 2001.

PAPA, S.; CHOY, P. M.; BUBICI, C. The ERK and JNK pathways in the regulation of metabolic reprogramming. *Oncogene*, v. 38, n. 13, p. 2223–2240, 2019.

PAPAGEORGIU, E. *et al.* Rosiglitazone Attenuates Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Survival Signaling in PC-3 Cells. *Molecular Medicine*, v. 14, n. 7–8, p. 403–411, 2008.

PASCUAL, G. *et al.* A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- γ . *Nature*, v. 437, n. 7059, p. 759–763, 2005.

RAMAN, M.; CHEN, W.; COBB, M. H. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, v. 26, n. 22, p. 3100–3112, 2007.

RAMSEY, S. A. *et al.* Uncovering a macrophage transcriptional program by integrating evidence from motif scanning and expression dynamics. *PLoS Computational Biology*, v. 4, n. 3, 2008.

RAVASI, T.; WELLS, C. A.; HUME, D. A. Systems biology of transcription control in macrophages. *BioEssays*, v. 29, n. 12, p. 1215–1226, 2007.

REGINATO, M. J. *et al.* Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 4, p. 1855–1858, 1998.

RICOTE, M. *et al.* The peroxisome proliferator-activated receptor- α is a negative regulator of macrophage activation. v. 471, n. 1989, p. 468–471, 1998.

RICOTE, M.; GLASS, C. K. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1771, n. 8, p. 926–935, 2007.

RIGANO, D.; SIRIGNANO, C.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. The potential of natural products for targeting PPAR α . *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 7, n. 4, p. 427–438, 2017.

ROSA, V. I. A. T. *et al.* Bioactive compounds with effects on inflammation markers in humans. v. 63, n. September, p. 749–765, 2012.

SANTOS, G. M.; FAIRALL, L.; SCHWABE, J. W. R. Negative regulation by nuclear receptors: A plethora of mechanisms. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 22, n. 3, p. 87–93, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2010.11.004>>.

SATHE, S. S. *et al.* Mutant human cells with constitutive activation of NF- κ B. v. 101, n. 1, 2004.

SEARS, D. D. *et al.* Mechanisms of human insulin resistance and thiazolidinedione-mediated insulin sensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106,

n. 44, p. 18745–18750, 2009.

SILVA, Matheus Tavares. Ação do agonista parcial do PPAR γ , GQ-16, na viabilidade de macrófagos em cultura. 2016. 50f., il. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

SMALE, S. T. Transcriptional regulation in the innate immune system. *Current Opinion in Immunology*, v. 71, n. 2, p. 233–236, 2012.

SMITH, N. J. *et al.* The Action and Mode of Binding of Thiazolidinedione Ligands at Free Fatty Acid Receptor 1 * □. v. 284, n. 26, p. 17527–17539, 2009.

STODDART, L. A.; BROWN, A. J.; MILLIGAN, G. Uncovering the Pharmacology of the G Protein-Coupled Receptor GPR40 : High Apparent Constitutive Activity in Guanosine 5 J - O - (3- [35 S] thio) triphosphate Binding Studies Reflects Binding of an Endogenous Agonist. v. 71, n. 4, p. 994–1005, 2007.

SUN, S. C. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Research*, v. 21, n. 1, p. 71–85, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cr.2010.177>>.

SUN, S.; LEY, S. New insights into NF-kappaB regulation and function. *Trends in Immunology*, v. 118, n. 24, p. 6072–6078, 2008.

TAKEDA, K. *et al.* 15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 and Thiazolidinediones Activate the MEK/ERK Pathway through Phosphatidylinositol 3-Kinase in Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 52, p. 48950–48955, 2001.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 805–20, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303872>>.

TAN, N. S. *et al.* Transcriptional control of physiological and pathological processes by the nuclear receptor PPAR β/δ . *Progress in Lipid Research*, v. 64, p. 98–122, 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163782716300133>>.

TONTONOZ P, HU E, GRAVES RA, BUDAVARI AI, S. B. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes & development*, v. 4, p. 1–2, 1994.

TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B. M. Stimulation of Adipogenesis in Fibroblasts by PPAR γ 2 , a Lipid-Activated Transcription. v. 79, p. 1147–1156, 1994.

TORIUMI, Y. *et al.* Pioglitazone reduces monocyte adhesion to vascular endothelium under flow by modulating RhoA GTPase and focal adhesion kinase. *FEBS Letters*, v. 553, n. 3, p. 419–422, 2003.

ULLOA, L.; TRACEY, K. J. The “cytokine profile”: A code for sepsis. *Trends in Molecular Medicine*, v. 11, n. 2, p. 56–63, 2005.

VALLABHAPURAPU, S.; KARIN, M. Regulation and Function of NF- κ B Transcription Factors in the Immune System. *Annual Review of Immunology*, v. 27, n. 1, p. 693–733, 2009.

VAURE, C.; LIU, Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. JUL, p. 1–15, 2014.

VERNIA, S. *et al.* The PPAR α -FGF21 hormone axis contributes to metabolic regulation by the hepatic JNK signaling pathway. *Cell Metabolism*, v. 20, n. 3, p. 512–525, 2014.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.06.010>>.

VON KNETHEN, A. *et al.* PPAR γ 1 attenuates cytosol to membrane translocation of PKC α to desensitize monocytes/macrophages. *Journal of Cell Biology*, v. 176, n. 5, p. 681–694, 2007.

WAGNER, E. F.; NEBREDA, Á. R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer*, v. 9, n. 8, p. 537–549, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc2694>>.

WANG, S. *et al.* G protein-coupled receptor 40 (GPR40) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ): An integrated two-receptor signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 32, p. 19544–19557, 2015.

WE, A. *et al.* NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*, p. 461–466, [S.d.].

WEIL, R.; ISRAEL, A. T-cell-receptor- and B-cell-receptor-mediated activation of NF- κ B in lymphocytes Robert Weil and Alain Israel. p. 374–381, 2004.

WEISBERG, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation. v. 112, n. 12, 2003.

WILLSON, T. M. *et al.* The PPARs: From orphan receptors to drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, n. 4, p. 527–550, 2000.

WILLSON, T. M. *et al.* The structure - Activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor γ agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 39, n. 3, p. 665–668, 1996.

WILLSON, T. M.; LAMBERT, M. H.; KLIEWER, S. A. PPAR gamma and Metabolic Diseases. 2001.

WILSON, S. J. *et al.* Effects of Budesonide and Formoterol on NF- κ B, Adhesion Molecules, and Cytokines in Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 164, n. 23, p. 1047–1052, 2001.

World Health Organization 2011a Diabetes Fact Sheet.

World Health Organization 2011b Obesity and Overweight Fact Sheet.

World Health Organization 2018 Diabetes Fact Sheet.

YANG, R. *et al.* Liver-specific knockdown of JNK1 up-regulates proliferator-activated

receptor γ coactivator 1 β and increases plasma triglyceride despite reduced glucose and insulin levels in diet-induced obese mice. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 31, p. 22765–22774, 2007.

YANG, W. E. N.; RACHEZ, C.; FREEDMAN, L. P. Discrete Roles for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α and Retinoid X Receptor in Recruiting Nuclear Receptor Coactivators. v. 20, n. 21, p. 8008–8017, 2000.

YKI-J, H.; PPARS, T. Thiazolidinediones. *The New England Journal of Medicine*, p. 1106–1118, 2004.

YOSHIMURA, S. *et al.* Effective antigen presentation by dendritic cells is NF- κ B dependent : coordinate regulation of MHC , co-stimulatory molecules and cytokines. v. 13, n. 5, p. 675–683, 2001.

ZHOU, C. *et al.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Discovery of 5-aryloxy-2 , 4-thiazolidinediones as potent GPR40 agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 20, n. 3, p. 1298–1301, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.10.052>>.

ZOETE, V.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: Ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1771, n. 8, p. 915–925, 2007.