



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

GABRIELLA DA MOTTA GOMES

Mecanismo não genômico do PPAR γ e sua relação com o efeito anti-inflamatório do GQ-16.

BRASÍLIA, 2021

GABRIELLA DA MOTTA GOMES

Monografia de
Conclusão de Curso
apresentada como requisito
parcial para obtenção do
grau de Farmacêutico, na
Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Prof^a Dra. Carine Royer

BRASÍLIA, 2021

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

dG118m da Motta Gomes , Gabriella
Mecanismo não genômico do PPAR? e sua relação com o efeito
anti- inflamatório do GQ-16. / Gabriella da Motta Gomes ;
orientador Carine Royer . -- Brasília, 2021.
55 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2021.

1. PPAR?. 2. Rosiglitazona. 3. GQ-16. 4. T0070907. 5.
NFKB. I. Royer , Carine, orient. II. Título.

GABRIELLA DA MOTTA GOMES

Mecanismo não genômico do PPAR γ e sua relação com o efeito anti-inflamatório do GQ-16.

BANCA EXAMINADORA

Orientador(a): Prof.^a Dra. Carine Royer
(Faculdade de Ceilândia- Universidade de Brasília)

Prof. ^a Dra. Djane Braz Duarte
(Faculdade de Ciências da Saúde- Universidade de Brasília)

Dra. Caroline Lourenço de Lima
(Departamento de Odontologia- Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, 2021.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Jeová Deus por ter cuidado de mim durante essa jornada, sempre me dando força e sabedoria para continuar em frente sem me desviar dos princípios bíblicos que aprendi.

Aos meus pais, Elieth e Luciano, que sempre foram meu porto-seguro, por todo apoio, incentivo e paciência que demonstraram por mim. Por todos os conselhos que me deram, por sempre estarem disponíveis para me ouvir, por cuidarem de todas as minhas necessidades físicas, emocionais e espirituais. Aos meus irmãos, Lucas e João Gabriel, por todo carinho e compreensão que tiveram comigo.

Ao meu marido Israel, que desde o namoro se mostrou compreensível, paciente, bondoso e abnegado. Obrigada por ouvir com atenção meus desabaços e conquistas. E especialmente nessa reta final, por ter me apoiado, consolado e incentivado de todas as formas.

Gostaria ainda de agradecer meus amigos Giovanna, Beatriz, João Vítor e Pedro, pelo companheirismo durante esses anos, nos piores e nos melhores momentos. Foram muitos trabalhos em grupo, anotações compartilhadas, rodas de estudo e almoços no RU.

Não poderia deixar de agradecer a minha orientadora Carine pela ajuda, pelos ensinamentos e incentivos que me deu. Mesmo com os desafios por causa da pandemia, foi sempre acessível, cuidadosa, paciente e disposta a ajudar. Também à minha colega de laboratório Ana Carolina, por tudo que me ensinou pacientemente e pela disposição de ajudar sempre que precisei. Sem vocês duas, não conseguiria concluir esse trabalho.

Grata a todos da equipe Farmol, por estarem dispostos a tirar dúvidas, compartilhar conhecimentos e equipamentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Resumo

As Tiazolidinedionas, agonistas totais do PPAR γ , utilizadas como tratamento para o Diabetes *Mellitus* 2, além do mecanismo clássico, podem mediar efeitos rápidos, não genômicos. Esses medicamentos apresentaram efeitos colaterais indesejáveis e os agonistas parciais como o GQ-16 mantém o efeito sensibilizador insulínico, sem ganho de peso. Os agonistas PPAR γ modulam a fosforilação da via inflamatória do NF κ B. Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar a localização do receptor após o tratamento com agonistas total e parcial, utilizando-se a imunofluorescência e estudar os efeitos da inibição da fosforilação da via do NF κ B mediada por agonistas com o pré-tratamento com o antagonista PPAR γ , T0070907. Assim, linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratadas com veículo (DMSO 0,01%), LPS (100 ng/mL), RSG (10-5M), GQ-16 (10-5M), T0070907(10-5M), RSG+LPS, GQ-16+LPS, RSG+LPS+ T007 e GQ-16+LPS+ T007. As células foram colhidas e realizado *Western Blot*. O imunoenensaio foi realizado com os anticorpos anti-fosfo NF κ B e anti-total NF κ B. As membranas foram reveladas por quimioluminescência, realizada a densitometria das bandas e a análise estatística dos dados. Os resultados demonstraram que houve um aumento do receptor PPAR γ no citoplasma das células após o tratamento com os agonistas por 15 minutos. O pré-tratamento com RSG inibiu a fosforilação do NF κ B induzida pelo LPS em 15 minutos de tratamento. O antagonista não reverteu esse efeito. Já com GQ-16 não foram obtidos tais resultados. Conclui-se que o PPAR γ pode exercer funções não relacionadas a transcrição gênica e que a inibição da fosforilação mediada por agonistas pode ser independente do PPAR γ .

Palavras chave: PPAR γ , rosiglitazona, GQ-16, T0070907, NF κ B.

Abstract

Thiazolidinediones, total PPAR γ agonists, used as a treatment for Diabetes Mellitus 2, in addition to the classic mechanism, can mediate rapid, non-genomic effects. These drugs had undesirable side effects and partial agonists such as GQ-16 maintain the insulin sensitizing effect, without weight gain. PPAR γ agonists modulate the phosphorylation of the NF κ B inflammatory pathway. Therefore, the aim of this study was to verify the location of the receptor after treatment with total and partial agonists, using immunofluorescence and to study the effects of inhibition of agonist-mediated phosphorylation of the NF κ B pathway with pretreatment with the PPAR γ antagonist, T0070907. Thus, RAW 264.7 murine macrophage lineage was treated with vehicle (0.01% DMSO), LPS (100 ng / mL), RSG (10⁻⁵M), GQ-16 (10⁻⁵M), T0070907 (10⁻⁵M), RSG + LPS, GQ-16 + LPS, RSG + LPS + T007 and GQ-16 + LPS + T007. The cells were harvested and performed Western Blot. The immunoassay was performed with the anti-phospho NF κ B and anti-total NF κ B antibodies. The membranes were revealed by chemiluminescence, densitometry of the bands and statistical analysis of the data was performed. The results showed that there was an increase in the PPAR γ receptor in the cytoplasm of cells after treatment with agonists for 15 minutes. Pretreatment with RSG inhibited LPS-induced NF κ B phosphorylation within 15 minutes of treatment. The antagonist did not reverse this effect. With GQ-16, however, no such results were obtained. It is concluded that PPAR γ can perform functions unrelated to gene transcription and that inhibition of agonist-mediated phosphorylation may be independent of PPAR γ .

Keywords: PPAR γ , rosiglitazone, GQ-16, T0070907, NF κ B.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação transcricional do PPAR no núcleo da célula	15
Figura 2. Estrutura química do GQ-16 em comparação às TZDs rosiglitazona e pioglitazona.....	21
Figura 3. Estrutura química do antagonista T0070907	22
Figura 4. As vias do NFκB.....	23
Figura 5. Imunofluorescência para o receptor PPARγ após tratamento com agonistas em linhagem de macrófagos murinos RAW 264,7	34
Figura 6. Efeito do tratamento com LPS sobre a fosforilação do NFκB em células RAW 264.7	36
Figura 7. Efeito do tratamento por 30 minutos com agonistas e antagonista PPARγ em células RAW 264.7.....	37
Figura 8. Efeito de rosiglitazona sobre a fosforilação do NFκB em células RAW 264.7 estimuladas por 15 minutos de tratamento com LPS e pré tratadas com antagonista por 30 minutos	38
Figura 9. Efeito de GQ-16 sobre a fosforilação do NFκB em células RAW 264.7 estimuladas por 15 minutos de tratamento com LPS e pré tratadas com antagonista por 30 minutos	39
Figura 10. Bandas de <i>Western Blot</i>	42

Lista de abreviaturas e siglas

AKT – Proteína cinase B

CDK5- Quinase dependente de ciclina 5

DAPI Fluoromount-G[®] - 4', 6-diamidino-2-fenilindol

DM – Diabetes *Mellitus*

DM 2 – Diabetes *Mellitus* Tipo 2

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EPM – Erro padrão da média

ERK – Cinases reguladoras de sinais extracelulares

FDA – *Food and Drug Administration*

GPR40 – Receptor 40 acoplado à proteína G

HDAC – Desacetilases de histonas

IKK – Cinase IκB

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-10 – Interleucina 10

IMC- Índice de massa corporal

INF γ – Interferon Gama

IP10- Proteína induzida por interferon- γ de 10 kDa

LBD – Domínio de ligação do ligante

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPK – Proteínas cinases ativadas por mitógenos

MCP-1- Proteína quimiotática de monócitos 1

Na₄P₂O₇ – Pirofosfato de sódio

Na₃VO₄ – Ortovanadato de sódio

NF κ B – Fator nuclear kappa B

NcoA – Coativador de receptor nuclear

NcoR – Correpresores de receptor nuclear

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PLC γ 2- Fosfolipase C gama 2

PI3K – Fosfatidilinositol 3 cinase

PKC-alfa- Proteína quinase C alfa

PMA- Homólogo diacilglicerol Phorbol 12-myristate 13-acetate

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

P38 MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno p38

RN – Receptores nucleares

RNA – Ácido ribonucleico

RPM – Rotações por minuto

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RSG – Rosiglitazona

RXR – Receptor do ácido 9-cis retinóico

SDS – Dodecil sulfato de sódio

Syk- Tirosina quinase SyK

TBS- Solução salina tamponada

TFN- α – Fator de necrose tumoral alfa

TLR4 – *Toll-like receptor 4*

TZD – Tiazolidinediona

VLDL- Lipoproteína de baixa densidade

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

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	11
1.1- Obesidade, resistência à insulina e inflamação	11
1.2- Receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPAR).....	14
1.3- Agonistas totais do PPAR γ	17
1.4- Agonistas parciais do PPAR γ	19
1.5- Antagonistas do receptor PPAR γ	22
1.6- Fator nuclear kappa B.....	23
1.7- Efeitos não genômicos do PPAR γ	24
2- JUSTIFICATIVA	30
3-OBJETIVOS	31
3.1- Objetivo geral.....	31
3.2- Objetivos específicos	31
4- METODOLOGIA.....	31
4.1- Imunofluorescência.....	31
4.2- <i>Western Blotting</i>	32
4.2.1- Tratamentos.....	32
4.2.2 - Lise celular.....	33
4.2.3 - Eletroforese.....	33
4.2.4 - Blotting.....	34
4.2.5 - Densitometria e análise estatística	34

5- RESULTADOS	35
5.1- Localização do PPAR γ em macrófagos RAW 264,7 após tratamento com agonistas de PPAR γ por 15 minutos.....	35
5.2 - Efeito do LPS na fosforilação do NF κ B com 15 minutos de tratamento.....	37
5.3- Efeito dos agonistas e do antagonista na fosforilação do NF κ B estimuladas por 30 minutos	38
5.5- Efeito do agonista parcial GQ-16 na fosforilação do NF κ B em 15 minutos de tratamento com LPS na presença e na ausência do antagonista.....	39
6.0- DISCUSSÃO	42
7.0 - CONCLUSÃO	47
8.0- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	47

1- Introdução

1.1- Obesidade, resistência à insulina e inflamação

A obesidade, definida em adultos por um índice de massa corporal (IMC) maior ou igual a 30, é uma doença caracterizada pela hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos e está associada a outras condições como diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e resistência à insulina. Como acontece em muitas outras doenças, a etiopatogênese da obesidade ocorre devido a predisposição genética associada a fatores ambientais, entre esses incluem o sedentarismo e uma dieta com alto teor de ácidos graxos e triglicerídeos (HOTAMISLIGIL, 2006; FILHO, 2016).

A Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) 2019, divulgada pelo IBGE, apontou que da população com 18 anos ou mais, 25,9% estavam obesos em 2019, o que representa 41,2 milhões de pessoas. Cerca de 96 milhões de pessoas, ou 60,3% da população nesse grupo etário, estavam com excesso de peso. De fato, no Brasil, a proporção de adultos obesos tem aumentado drasticamente (IBGE, 2020).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos com 18 anos ou mais estavam com sobrepeso. Destes, mais de 650 milhões de adultos eram obesos. No geral, cerca de 13% da população adulta mundial (11% dos homens e 15% das mulheres) era obesa em 2016. O crescente número de indivíduos obesos não se limita só entre os adultos, 41 milhões de crianças menores de cinco anos estavam acima do peso ou obesas, em 2016. O mesmo ocorreu com 340 milhões de crianças e adolescentes com idade entre 5 e 19 anos. A prevalência de sobrepeso e obesidade entre crianças e adolescentes de 5 a 19 anos aumentou drasticamente de apenas 4% em 1975 para pouco mais de 18% em 2016 (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2018).

A obesidade, segundo a OMS, é um dos grandes problemas mundiais, considerada doença crônica multifatorial e também fator de risco para várias

outras, como hipertensão arterial, diabetes, doença coronariana, infarto do miocárdio, algumas formas de câncer, além do aumento da mortalidade em geral. A OMS estimou que o excesso de peso é responsável por 58% da carga de doença relativa à diabetes tipo 2, 39% da doença hipertensiva, 21% do infarto do miocárdio, 12% do câncer de cólon e reto e 8% do câncer de mama (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2018).

O tecido adiposo é mais do que um depósito de gordura, ele atua como órgão endócrino, interagindo com outros tecidos que também estão envolvidos na homeostase da glicose, como fígado e músculo esquelético. Para isso, tanto os adipócitos como as células imunes do tecido adiposo produzem substâncias químicas, as adipocinas, como por exemplo: leptina, adiponectina, resistina, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (CINTI et al., 2005; HOTAMISLIGIL, 2006).

Essas adipocinas podem ser anti ou pró- inflamatórias, e o bom funcionamento do tecido depende do equilíbrio entre essas substâncias. Na obesidade, há justamente um desequilíbrio dessas citocinas, com aumento da produção de citocinas pró inflamatórias, tais como: TNF- α e IL-6. Esses mediadores inflamatórios são produzidos principalmente por macrófagos, uma vez que há um aumento dessas células imunes no tecido adiposo na obesidade. (LEE; LEE, 2014; BURHANS et al., 2019).

Os macrófagos são geralmente categorizados como M1 e M2. O fenótipo M1 é mais reativo, demonstra uma tendência de resposta para Th1, são considerados macrófagos pró-inflamatórios e secretam TNF- α e IL-6. A maioria dos macrófagos encontrados nos locais de inflamação em doenças inflamatórias são considerados macrófagos M1. Já o fenótipo M2 são influenciados por Th2 e acredita-se que desempenhem mais papéis nas vias anti-inflamatórias, remodelação de tecidos e cicatrização de feridas (LEE; LEE, 2014; BURHANS et al., 2019).

Na obesidade, há uma polarização do fenótipo M2 para M1, que se torna o fenótipo predominante nesse tecido. Diante dos fatos apresentados, pode-se afirmar que a obesidade é caracterizada por uma inflamação crônica, de baixo grau e resistência à insulina. De baixo grau porque produz menos citocinas circulantes do que em outras condições inflamatórias e crônica porque precisa de tratamentos de dieta relativamente longos antes da inflamação se tornar evidente (HOTAMISLIGIL, 2006; LEE; LEE, 2014).

O tecido adiposo também possui várias outras células imunes que contribuem para o estado inflamatório durante a obesidade, tais como neutrófilos, eosinófilos que produzem citocinas como IL-4 que também estão envolvidas na resistência à insulina, além de linfócitos T e B. Mas, os macrófagos são predominantes, tanto que diz-se que o tecido adiposo obeso está infiltrado de macrófagos (LEE; LEE, 2014; BURHANS et al., 2019). Além disso, são principalmente os macrófagos que promovem resistência à insulina. Desta forma, há diminuição de moléculas anti-inflamatórias tais como adiponectina e interleucina 10 (IL-10). Por outro lado, o tecido passa a liberar muito mais moléculas pró-inflamatórias, como o TNF- α . Estudos já mostraram que o TNF- α é superexpresso no tecido adiposo de camundongos obesos (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; UYSAL et al., 1997).

Vários estudos também descrevem a infiltração de macrófagos em ilhotas pancreáticas de pacientes com DM2, sendo estes responsáveis pelo aumento da produção de interleucina-1 neste tecido. Da mesma forma, a ativação de vias de sinalização como do NF- κ B prejudica a função de células β - pancreáticas. Os macrófagos também podem ter um papel importante na hiperplasia de células β em indivíduos obesos(YING *et al.*, 2020).

Por causa da obesidade, observa-se ainda aumento de ácidos graxos livres, que por si só já contribui para resistência à insulina. Soma-se ainda que, este excesso de ácidos graxos livres, deposita-se em vários órgãos, tais como fígado e músculo esquelético, promovendo mais alterações no metabolismo da glicose,

a chamada lipotoxicidade (UYSAL et al., 1997; XU et al., 2003; HEIKKINEN; AUWERX; ARGMANN, 2007).

Já que a inflamação está intimamente relacionada com a piora do quadro clínico de obesidade e resistência à insulina, muito se têm discutido sobre alvos terapêuticos, como o receptor PPAR, com capacidade de modular o metabolismo lipídico e a homeostase da glicose, que poderia ser usado tanto para auxiliar no tratamento de obesidade e suas condições associadas, como também em outras condições como cânceres, dislipidemias e inflamações crônicas.

1.2- Receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPAR)

Os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPAR) têm um papel importante na fisiopatologia da obesidade. Estes constituem uma família de receptores nucleares que formam heterodímeros com o receptor retinoide X (RXR) e ligam-se numa parte do DNA, denominada elemento de resposta ao PPAR (PPRE), regulando a transcrição gênica. A família PPAR possui 3 isoformas (α , β/δ e γ), cada uma com sua peculiaridade de função e distribuição. A variedade de ligantes, tanto endógenos quanto sintéticos, têm afinidades diferentes por cada isoforma (STRAUS; GLASS, 2007).

Os PPARs, assim como outros receptores nucleares, apresentam 3 domínios de ligação distintos: (1) A porção amino terminal (NH_2); (2) Domínio de ligação ao DNA (DBD); (3) Domínio de ligação ao ligante (LBD). A porção amino terminal tem a função de ativação transcricional independente do ligante e também reconhece co-ativadores e outros fatores de transcrição, sendo bastante variável dentre os membros da superfamília. Já o DBD tem como principal função a ligação ao DNA e permanece conservado entre os receptores nucleares. Por fim, o LBD, que se localiza na porção carboxi-terminal, sofre mudanças conformacionais na presença do ligante, ativando a transcrição. Este domínio também interage com proteínas co-repressoras e co-ativadoras, ativando ou reprimindo a transcrição gênica e é a região que mais sofre variação entre os

membros da superfamília de receptores. (HEIKKINEN, AUWERX e ARGMANN, 2007).

A família de receptores nucleares PPAR possui 3 mecanismos de ação básicos, responsáveis pela transcrição gênica: repressão basal, transativação e transrepressão. A repressão basal acontece na ausência de ligantes e envolve proteínas correpressoras que impedem a ação da maquinaria transcricional. Já a transativação se dá com a presença do ligante ao receptor, que induz uma mudança conformacional neste, resultando na liberação de correpressores e recrutamento de co-ativadores, tornando possível a transcrição gênica. A transrepressão também envolve a presença do ligante, porém ele regula de forma negativa o receptor, e não envolve a ligação direta do PPAR aos PPREs no DNA (ARANDA; PASCUAL, 2001).

Em relação ao PPAR γ , o gene que codifica esta isoforma foi mapeado no cromossomo 3, região 3p25, dando origem a dois RNA mensageiros: PPAR γ 1 e PPAR γ 2, que diferem em sua extremidade 5', como consequência de diferentes promotores e ao splicing alternativo, por apresentarem 28 aminoácidos extras na região amino terminal no caso do PPAR γ 2. Esta extensão do domínio de ativação independente do ligante torna o PPAR γ 2 um melhor ativador transcricional em relação ao PPAR γ 1 (TONTONNOZ et al., 1994; HEIKKINEN; AUWERX; ARGMANN, 2007). Enquanto o PPAR γ 1 é expresso de forma ubíqua, podendo ser encontrado em adipócitos, células musculares cardíacas e esqueléticas, células vasculares, macrófagos, bexiga, intestino e cérebro, a expressão do PPAR γ 2 é principalmente restrita ao tecido adiposo. Neste tecido, esta isoforma tem um papel importante na diferenciação dos adipócitos, armazenamento de lipídeos, homeostase da glicose, expressão de proteínas desacopladoras mitocondriais e regulação negativa de leptina (HEIKKINEN; AUWERX; ARGMANN, 2007; STRAUS; GLASS, 2007).

Acredita-se que a ativação deste receptor é fundamental para regular a expressão de citocinas pró-inflamatórias, inibindo vias de sinalização envolvidas na produção de tais citocinas, como as da proteína quinase ativada por mitógenos

(MAPK) e do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (MIRZA; ALTHAGAFI; SHAMSHAD, 2019).

A respeito da ativação do PPAR γ , o processo se inicia com a ligação do ligante ao LBD, uma região com características hidrofóbicas, que causa alterações conformacionais na estrutura do receptor. Isso resulta na dissociação de proteínas cofatoras, como corepressor de receptor nuclear (NCoR) ou na associação de coativadores como coativador-1 de receptor de esteroide (SRC-1) que inibem ou aumentam a transcrição do gene, respectivamente (figura 1) (WRIGHT et al., 2014).

A liberação de proteínas corepressoras coincide com a heterodimerização do PPAR com o receptor retinóide X (RXR). O heterodímero de PPAR-RXR então atua como um andaime para o recrutamento de proteínas coativadoras, como as histonas acetil transferases e a maquinaria de transcrição do gene (complexo de RNA polimerase), que juntos iniciam o relaxamento da cromatina para permitir a transcrição de genes (figura 1) (WRIGHT et al., 2014).

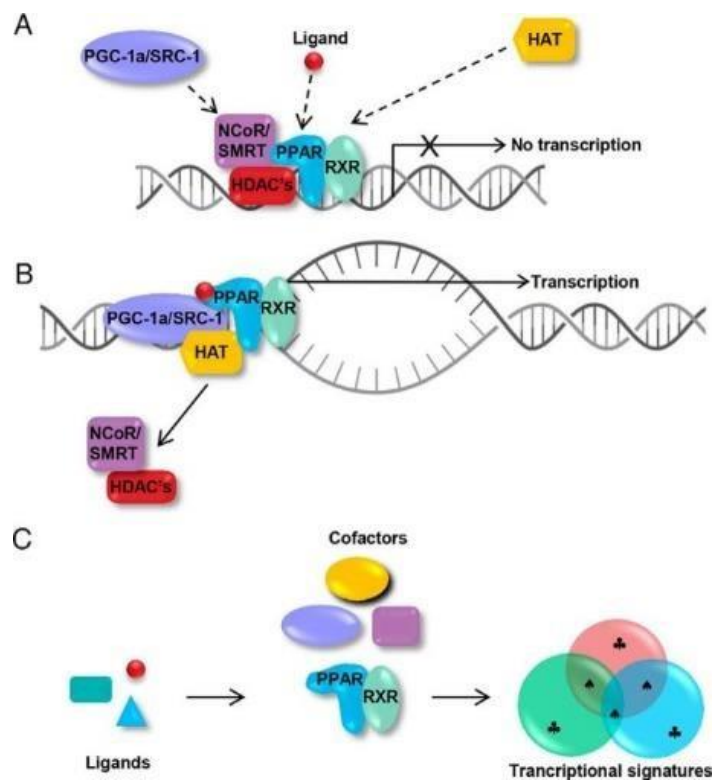


Figura 1. Ativação transcricional do receptor PPAR γ . (A) Papel dos cofatores na função PPAR. Na ausência do ligante, proteínas corepressoras, inibem a

transcrição ao interagir com histonas desacetilases. (B) Após a ligação de um ligante ao PPAR, o receptor sofre uma mudança conformacional, promovendo a transcrição. (C) Cada ligante pode induzir conformações ligeiramente diferentes do receptor que influenciam o recrutamento de coativadores: FONTE: (WRIGHT et al., 2014).

Além de seu papel na regulação metabólica, sabe-se que agonistas de PPAR γ estão envolvidos na imunidade adaptativa, pois atuam como reguladores negativos na diferenciação de células T. Já nas células dendríticas, o PPAR γ atua reprimindo a maturação delas, diminuindo a produção de quimiocinas e afetando negativamente sua capacidade de apresentar antígenos. Os macrófagos também expressam este receptor, e o tratamento dessas células com agonistas PPAR γ inibiu sua ativação e reduziu a secreção de citocinas inflamatórias (CHAWLA et al., 2001; STRAUS; GLASS, 2007).

1.3- Agonistas totais do PPAR γ

A variedade de ligantes dos receptores PPAR, tanto naturais quanto sintéticos, têm diferentes afinidades por cada isoforma. De maneira geral, os ácidos graxos de cadeia longa são ligantes naturais do PPAR. Já o 15-deoxy-D12,14-PGJ2(15d-PGJ2), bem como a lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox) são ligantes naturais com mais afinidade pelo PPAR γ . Por outro lado, os ligantes sintéticos com mais afinidade por este receptor são representados pela classe de antidiabéticos tiazolidinedionas (TZD), como a rosiglitazona (RSG) e a pioglitazona, bem como compostos derivados de tirosina, por exemplo Farglitazare GW7845 (STRAUS; GLASS, 2007).

A classe de medicamentos antidiabéticos TZDs, são agonistas totais de PPAR γ e foram desenvolvidos para serem utilizados como sensibilizadores insulínicos no tratamento de DM2. Genes estimulados por TZDs estão envolvidos na regulação do metabolismo de carboidratos e lipídeos. Esses fármacos ligam-se ao LBD do receptor PPAR γ , induzindo uma mudança conformacional na hélice 12 do LBD, permitindo o recrutamento da maquinaria transcrricional. Por isso, as TZDs têm a função de aumentar a sensibilidade à insulina em tecidos periféricos

e a captação de glicose pelo transportador Glut-4 presente no músculo esquelético e adipócito (NAGY; SCHWABE, 2004; MIRZA; ALTHAGAFI; SHAMSHAD, 2019).

Outra maneira das TZDs promoverem sensibilização à insulina é por alterar o perfil de secreção das adipocinas. Em camundongos, o tratamento com TZDs aumentou a expressão e a concentração plasmática de adiponectina, uma proteína fortemente correlacionada com a sensibilidade insulínica e que está diminuída no tecido adiposo obeso (STEPPAN et al., 2001). Além disso, as TZDs foram capazes de inibir a expressão de citocinas relacionadas à resistência à insulina como a resistina e o TNF α (PERALDI; XU; SPIEGELMAN, 1997; YANG et al., 2002). Demonstrando que, parte dos efeitos farmacológicos das TZDs estão relacionados com a supressão da inflamação gerada na obesidade.

Choi e colaboradores (2011) demonstraram que a quinase dependente de ciclina 5 (CDK5), uma enzima que pode ser ativada no tecido adiposo por citocinas inflamatórias como o TNF- α e a IL-6, é capaz de fosforilar o PPAR γ no resíduo de serina 273. Essa fosforilação leva à desregulação de genes cuja expressão encontra-se alterada na obesidade, por exemplo, diminui a expressão de adiponectina. Apesar de não alterar a capacidade adipogênica, essa fosforilação mediada por CDK5 é inibida com o tratamento com agonistas totais como RSG e com o agonista parcial, MLR24 (CHOI et al., 2010, 2011).

Além da atividade antidiabética, também foi demonstrada a atividade anti-inflamatória das TZDs. O tratamento de monócitos e macrófagos com altas concentrações de agonistas de PPAR γ , reduziu a secreção de citocinas inflamatórias como o TNF- α , IL-1 e IL-6. No entanto, não se descarta a possibilidade deste efeito anti-inflamatório ser independente de PPAR (CHAWLA et al., 2001).

Com respeito à supressão da inflamação, sabe-se que o receptor PPAR também é expresso em células pancreáticas e, além de controlar a secreção de insulina, demonstrou ser importante no crescimento celular, metabolismo,

apoptose e inflamação. A ativação do receptor mostrou atenuar a gravidade da inflamação em modelos de camundongos com pancreatite aguda e pancreatite (SHIMIZU et al., 2002).

Um modelo de camundongo com pancreatite aguda e nocaute do receptor PPAR γ foi utilizado para investigar o efeito anti-inflamatório da RSG. Camundongos do grupo controle e do grupo nocaute para o receptor PPAR γ foram não tratados ou pré-tratados com rosiglitazona por 10 dias na dose de 10 mg/Kg. A pancreatite aguda foi induzida por oito injeções consecutivas de ceruleína, um análogo da colecistoquinina, que leva à pancreatite edematosa. O pré- tratamento de dez dias com RSG diminuiu significativamente a pancreatite aguda induzida por ceruleína em camundongos que expressam o receptor PPAR γ . A RSG diminuiu o número de macrófagos que infiltraram o pâncreas, o edema pancreático e a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IVASHCHENKO et al., 2007). De fato, esse é mais um exemplo que demonstra a importância dos agonistas PPAR γ no contexto da inflamação, e o envolvimento do PPAR γ nesse modelo.

No entanto, alguns efeitos colaterais indesejados foram observados com o uso das TZDs, incluindo ganho de peso, edema, toxicidade cardiovascular e perda óssea, o que levou a Food and Drug Administration (FDA) a restringir seu uso e a retirada de RSG do mercado no Brasil e na Europa (NISSEN; WOLSKI, 2007). Desta forma, procuraram-se alternativas terapêuticas, como o GQ-16, que ativa parcialmente o receptor, mas mantém as ações de sensibilização à insulina, sem o ganho de peso (AMATO et al., 2012).

1.4- Agonistas parciais do PPAR γ

Devido aos efeitos colaterais produzidos pelo uso dos agonistas totais do receptor PPAR γ , como as TZDs, pesquisadores começaram a se interessar por moléculas que tivessem papel de agonistas parciais, com o objetivo de preservar o efeito sensibilizador insulínico mas sem os efeitos indesejados. Diversos estudos foram conduzidos nesse sentido, tanto com substâncias naturais como

sintéticas (WRIGHT et al., 2014; CHIGURUPATI; DHANARAJ; BALAKUMAR, 2015).

Diversos agonistas parciais evidenciaram ter efeito sensibilizador insulínico. Pesquisas indicam que o INT131, um ligante potente e seletivo para PPAR γ , estruturalmente diferente das TZDs, é altamente eficaz na redução dos níveis de glicose em modelos animais de DM2, mas causa muito menos ganho de peso e edema do que a RSG. Acredita-se que, esse efeito acontece porque INT131 melhorou a atividade PI3K estimulada pela insulina e aumentou a ativação da AKT estimulada pela insulina no músculo esquelético e tecido adiposo de camundongos obesos resistentes à insulina (HIGGINS; MANTZOROS, 2008; MOTANI et al., 2009; LEE et al., 2012).

Apesar de INT131 ligar-se no LBD do receptor PPAR γ , assim como as TZDs, ele ocupa um espaço diferente dentro do LBD e por isso apresenta padrões distintos de transcrição gênica, o que gera diferentes efeitos biológicos. Por exemplo, enquanto as TZDs aumentam o acúmulo de lipídeos nos adipócitos 3T3-L1, o agonista parcial INT131 tem pouco efeito nesse sentido (HIGGINS; MANTZOROS, 2008; MOTANI et al., 2009; LEE et al., 2012).

Outros estudos também indicam que agonistas parciais podem ser promissores no tratamento de Diabetes tipo 2. CMHX008, um análogo de TZDs e agonista parcial de PPAR γ também mostrou um efeito hipoglicêmico comparável ao da RSG, mas com menor ganho de peso e menor perda óssea (MING et al., 2014).

Diante dos dados promissores dos agonistas parciais, um novo fármaco, análogo das TZDs, foi sintetizado na Universidade do Pernambuco, o GQ-16 (figura 2). Este composto apresenta atividade de agonista parcial pelo PPAR γ , tem uma afinidade moderada pelo domínio de ligação ao ligante (LBD) do PPAR γ , além de ser específico para esta isoforma. Utilizando-se as células murinas 3T3-L1 e C3H10T1, que são modelos de adipogênese, foi possível

observar diminuição do acúmulo intracelular de lipídeos após o tratamento com GQ-16 quando comparada à RSG (AMATO et al., 2012).

Apesar de ter afinidade pelo LBD do PPAR γ , GQ-16 apresenta diferenças de ligação em relação a RSG, que se liga perpendicularmente à hélice 3, enquanto o GQ-16 ocupa uma posição vertical, paralela àquela hélice e além disso, não faz contato direto com a hélice 12, diferentemente dos agonistas totais. Mesmo com essa divergência, o GQ-16 bloqueou a fosforilação da serina 273 de forma tão eficiente quanto a RSG e a troca de hidrogênio de deutério revelou que ele também promoveu a estabilização da hélice 12 de forma similar à RSG, isso poderia explicar o porquê o GQ-16 mantém o efeito sensibilizador insulínico. (AMATO et al., 2012).

Mas o fato de GQ-16 se ligar ao receptor de forma diferente de RSG, sugere que agonistas parciais podem estimular genes diferentes dos estimulados por RSG. Um estudo, que procurou avaliar o perfil de expressão gênica ao tratar adipócitos 3T3-L1 com GQ-16 e RSG, mostrou que GQ-16 induz de forma menos intensa, comparado à RSG, a expressão de genes relacionados à adipogênese, durante o processo de diferenciação. O que explicaria o menor ganho de peso com o tratamento com GQ-16. Já em adipócitos maduros, GQ-16 promoveu a repressão de genes relacionados ao processo inflamatório, de forma similar à RSG, como o *Orm1* e *Orm2*, que codificam proteínas inflamatórias da fase aguda induzidas pelo tratamento com as IL1 e IL6, o gene *Hp*, cuja expressão aumenta no tecido adiposo em resposta a processos inflamatórios e o gene *Dcn*, que codifica a decorina, descrita como receptor para a resistina em células mesenquimais (MILTON et al., 2015).

Além disso, ao tratar com GQ-16 os modelos de camundongos com obesidade, mantidos com uma dieta rica em gorduras, foi possível notar que o tratamento melhorou a sensibilidade à insulina e que houve bloqueio dos efeitos da dieta hiperlipídica, por meio de uma regulação negativa de vias de sinalização responsáveis pela resistência à insulina, como a do NF- κ B (AMATO et al., 2012).

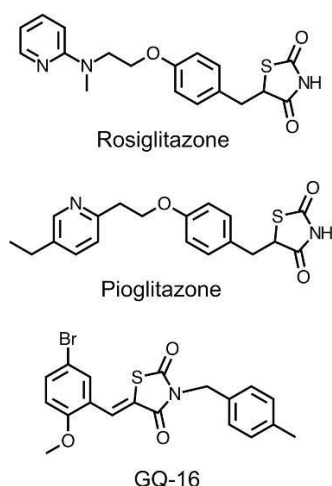


Figura 2. Estrutura química do GQ-16 em comparação às TZDs rosiglitazona e pioglitazona. Fonte: Amato et al., 2012.

1.5- Antagonistas do receptor PPAR γ

O interesse pelo estudo dos antagonistas PPAR γ têm sido importantes. Ao bloquear o receptor é possível impedir as possíveis consequências de sua ativação, o que por si só pode gerar efeitos benéficos (ZAYTSEVA et al., 2011). Utilizar antagonistas também é importante quando se quer determinar se os efeitos observados com o tratamento de agonistas depende ou não do receptor, de modo que se o antagonista conseguir reverter a ativação é um bom indício que o receptor está envolvido em mediar efeitos observados.

Nesse sentido, o T0070907 (Figura 3), é um potente antagonista seletivo de PPAR γ . Demonstra uma preferência maior que 800x por esse receptor em relação aos demais PPARs (LEE et al., 2002).

Pesquisas indicam que esse antagonista não tem nenhum efeito. Mesmo na presença de RSG, T0070907 é um inibidor potente da transativação do receptor PPAR γ . Essa inibição não se dá por citotoxicidade. O tratamento com 1 μ M de T0070907 foi capaz de inibir o acúmulo de lipídeos em células 3T3-L1, tratadas com insulina (LEE et al., 2002).

Um mapeamento proteolítico via espectrometria de massa foi usado para explicar o mecanismo pelo o qual o T0070907 antagoniza as funções do

PPAR γ . Foi identificada uma ligação covalente no resíduo cisteína 313 na hélice 3 do LBD do receptor como o local que é modificado pelo antagonista (LEE et al., 2002).

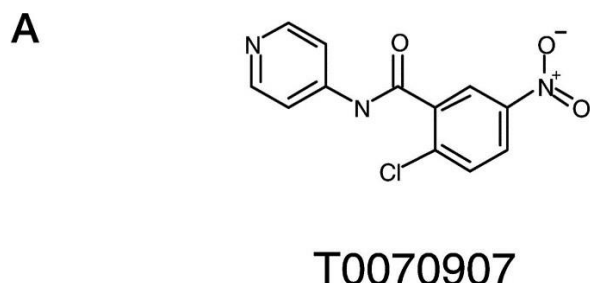


Figura 3. Estrutura química do T0070907. Fonte: Adaptado de LEE et al., 2002.

1.6- Fator nuclear kappa B

Durante a resposta inflamatória, vias de sinalização são ativadas para modular a expressão de moléculas pró e anti-inflamatórias. Sendo assim, a via pró-inflamatória do NF- κ B tem sido amplamente estudada por estar presente nas mais diversas patologias como cânceres, diabetes, inflamações crônicas e doenças relacionadas ao sistema nervoso central. Citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1, que são liberadas em lesões ou infecções de tecidos, podem ativar essa via que estimula genes envolvidos na expressão de mais citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão (LAWRENCE, 2009).

O aumento de ácidos graxos livres, a infiltração de macrófagos e consequente aumento de citocinas pró- inflamatórias como a IL-6, levam a ativação desta via de sinalização. Já que o tecido adiposo, bem como músculo esquelético e fígado possuem receptores para essas citocinas e esses receptores quando ativados, ativam vias de sinalização intracelulares que culminam na ativação do NF κ B, um fator de transcrição que altera a transcrição gênica, levando a produção de mais citocinas pró- inflamatórias e ativando lipases intracelulares, que estimulam ainda mais a quebra de triglicerídeos, aumento os ácidos graxos livres e promovendo mais resistência a ação da insulina (DEMCHENKO; KUEHL, 2010;KORBECKI; BOBIŃSKI; DUTKA, 2019).

São descritas duas vias de ativação da família de fatores de transcrição NF κ B, a via clássica e a alternativa (Figura 4). Para que a via clássica seja ativada é

necessária a degradação do inibidor I κ B α que se dá por meio da fosforilação e consequente degradação desta proteína pelo complexo IKK, um complexo trimérico composto por duas subunidades catalíticas, IKK α e IKK β , e uma regulatória, IKK γ . Conseqüentemente, os vários heterodímeros NF- κ B sofrem translocação para o núcleo, principalmente o dímero p50/RelA (também chamado de p65). Essa via tem um papel importante no controle da resposta imune e da inflamação, sendo necessária também para aumentar a sobrevivência e a proliferação das células. A ativação do PPAR aumenta a expressão de I κ B α impedindo a ativação de NF- κ B (DEMCHENKO; KUEHL, 2010; KORBECKI; BOBIŃSKI; DUTKA, 2019).

Na via alternativa, NIK (quinase indutora de NF κ B) ativa IKK α , que fosforila NF κ B2 resultando na geração da subunidade p52, que leva ao acúmulo de heterodímeros p52 / RelB no núcleo. A via alternativa do NF κ B é importante no desenvolvimento linfóide e maturação das células B (DEMCHENKO; KUEHL, 2010).

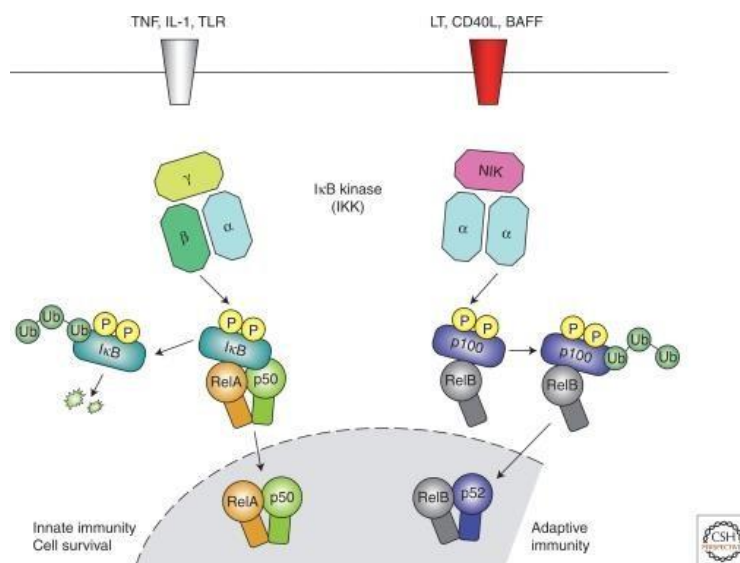


Figura 4. As vias do NF κ B. As vias canônicas e alternativas para a ativação de NF- κ B (LAWRENCE, 2009).

1.7- Efeitos não genômicos do PPAR γ

Os efeitos antidiabéticos e anti-inflamatórios observados após o tratamento com agonistas de PPAR γ foram inicialmente atribuídos exclusivamente ao mecanismo genômico do receptor. Porém, já foi constatado que, além do efeito

clássico dos agonistas de PPAR γ , os ligantes deste receptor também podem exercer efeitos rápidos, não genômicos (LUCONI; CANTINI; SERIO, 2010). Estes efeitos podem ser mediados via PPAR γ ou mediados por outras vias que independem deste receptor. Os efeitos rápidos, não relacionados à regulação direta da transcrição gênica, foram observados em diversas linhagens celulares, nas mais variadas patologias (LIU et al., 2005; VON KNETHEN et al., 2007; LUCONI; CANTINI; SERIO, 2010) .

De fato, vários estudos mostraram que o mecanismo rápido também pode estar envolvido na mediação desses efeitos observados com o tratamento de agonistas, podendo atuar em conjunto com a transcrição gênica (REMELS et al., 2009; CHIGURUPATI; DHANARAJ; BALAKUMAR, 2015;

Além do metabolismo de carboidratos e lipídeos, sabe-se que o PPAR γ está envolvido na resposta inflamatória. Certamente, a ativação deste receptor pode exercer efeitos anti-inflamatórios em diversos tipos celulares, como macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas. Esses eventos observados estão relacionados a inibição de vias de sinalização envolvidas nas respostas inflamatórias, como a do NF- κ B (REMELS et al., 2009).

A modulação dessas vias de sinalização inflamatórias está relacionada a atividade transcricional do receptor PPAR γ , mas estudos apontam que os mecanismos rápidos, não relacionados a transcrição gênica direta, também podem estar envolvidos em modular vias de sinalização inflamatórias (LUCONI; CANTINI; SERIO, 2010).

Embora os mecanismos não genômicos do PPAR γ não estejam totalmente elucidados, algo que contribuiu para um maior entendimento destes mecanismos foi demonstrar a presença do PPAR γ , um receptor dito nuclear, no citoplasma. E que a presença dele neste compartimento celular modulou a atividade de enzimas importantes na cascata de transdução de sinais intracelulares. Estudos de Von Knethen e colaboradores (2007) apontam a presença de PPAR γ na região nucleare citoplasmática de macrófagos RAW 264,7. A localização citoplasmática desse receptor também foi demonstrada em linhagens de células de pró-monócitos HL-K-562, especialmente após o tratamento com troglitazona (VON KNETHEN et al.,

2007).

A presença de PPAR γ no citosol bloqueia a translocação da proteína quinase C alfa (PKC- α) para a membrana celular de macrófagos, causando dessensibilização. Neste estudo, também foi possível verificar que agonistas PPAR γ atenuam a depleção de PKC- α em resposta ao homólogo diacilglicerol Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) em macrófagos RAW 264.7 e que esse efeito é dose-dependente. Nessas células, foi observada inibição dependente de PPAR γ do fator nuclear- κ B e expressão de TNF- α em resposta a PMA, na presença de agonistas (VON KNETHEN et al., 2007).

Tendo em vista que o tratamento com agonistas levou a translocação do PPAR γ do núcleo para o citoplasma e que isso poderia explicar os efeitos não genômicos deste receptor, diversas pesquisas foram conduzidas, envolvendo várias condições patológicas e diferentes linhagens celulares, a fim de determinar os possíveis efeitos do PPAR γ fora do núcleo (REMELS et al., 2009).

Por exemplo, alguns autores procuraram verificar se o mecanismo não genômico poderia estar envolvido em mediar as alterações nociceptivas observadas com o tratamento de agonistas totais de PPAR. Griggs e colaboradores (2015) investigaram se o tratamento com pioglitazona poderia reduzir a dor neuropática. A pioglitazona atenuou a hiperalgesia mecânica após 30 minutos da sua administração via intratecal, e a co-administração do antagonista de PPAR γ , GW9662, bloqueou completamente as ações anti-hiperalgésicas da pioglitazona. Ela também reduziu o comportamento nociceptivo ao ser administrada 20 minutos antes de capsaicina, um composto químico irritante. Em apenas 5 minutos, RSG e pioglitazona foram capazes de atenuar a hipersensibilidade mecânica associada a lesão cerebral e esse efeito foi mantido na presença de 100 μ g de anisomicina (utilizada para inibir a síntese de proteínas) (GRIGGS et al., 2015).

É importante notar três pontos interessantes nas ações das TZDs sobre a hiperalgesia.(1) Os efeitos observados aconteceram em poucos minutos; (2) a síntese de proteínas foi inibida; (3) e o antagonista PPAR γ conseguiu reverter os efeitos. Esses fatos indicam que não houve tempo e nem condições viáveis para transcrição gênica e o fato do antagonista ter revertido os efeitos, evidencia que o receptor PPAR está envolvido. Esses desfechos demonstram que os mecanismos não genômicos também estão intermediando o efeito de redução do comportamento semelhante a dor (GRIGGS et al., 2015).

Esses resultados estão de acordo com pesquisas de Fehrenbacher e colaboradores (2009), que apontam o PPAR γ como alvo farmacológico para distúrbios neurodegenerativos, inflamatórios e para síndromes de dor neuropática(FEHRENBACHER et al., 2009). Pois, ao testarem o agonista PPAR γ natural, 15d-PGJ2, e o agonista sintético RSG, houve diminuição de maneira dose-dependente à hipersensibilidade mecânica e ao frio. Também foi investigado se o receptor poderia estar mediando os efeitos anti-alodinia observados, para isso foi utilizado um antagonista, de modo que ele reduziu significativamente e de forma dependente da dose o efeito anti-alodínico de 15d-PGJ2 (CHURI et al., 2008).

Outra maneira de avaliar a atividade não genômica do receptor PPAR é investigando os efeitos do tratamento com agonistas desse receptor em células anucleadas. Sabe-se que eritrócitos maduros expressam receptores nucleares. Da mesma forma, embora as plaquetas sejam fragmentos anucleados derivados de megacariócitos, também expressam receptores nucleares como o PPAR e RXR, bem como fator de transcrição NF- κ B (KOJOK; EL-KADIRY; MERHI, 2019; LANNAN et al., 2015). Estudos têm investigado o papel sobre a ativação e agregação plaquetária com o tratamento de agonistas PPAR γ .

Estudo de Moraes e colaboradores (2010) apontou que houve uma supressão significativa da inibição da agregação plaquetária estimulada por colágeno por 15d-PGJ 2 e RSG. Verificou-se que este efeito de inibição é dependente da concentração e do tempo de incubação com os agonistas. Ainda foi utilizado o antagonista do PPAR- γ , GW9662, por 5 minutos antes da incubação

com os agonistas para confirmar a relação entre o receptor PPAR γ e os efeitos observados (MORAES et al., 2010).

O cálcio é fundamental em desencadear a cascata de coagulação, que envolve a ativação plaquetária. O estudo ainda mostrou que RSG causou inibição das concentrações do pico de cálcio estimuladas por colágeno. Devido a este efeito, foram investigadas também proteínas sinalizadoras anteriores a mobilização do cálcio, como quinase Syk, proteína adaptadora transmembrana (LAT) e a enzima PLC γ 2. RSG reduziu os níveis de fosforilação de tirosina da proteína LAT resultando na inibição da mobilização de cálcio. Ao adicionar o antagonista GW9662 este efeito observado foi revertido, demonstrando que a ativação do receptor PPAR é necessária (MORAES et al., 2010).

Por certo, a inibição da agregação plaquetária por RSG mostrou ser um exemplo de efeito não genômico dos ligantes PPAR γ , pois além das plaquetas não possuem núcleo, os efeitos observados iniciaram-se com apenas 5 minutos de tratamento, tempo inviável para acontecer transcrição gênica. Além do mais, o tratamento com RSG também afetou de forma rápida a mobilização de cálcio intracelular através de proteínas citoplasmáticas como LAT.

De fato, vários estudos nas mais diferentes patologias são conduzidos envolvendo os efeitos de agonistas PPAR γ e todos contribuem para um melhor entendimento dos efeitos não genômicos deste receptor. Porém, pensando ainda que o receptor PPAR γ pode não ser o único envolvido em mediar os efeitos das TZDs, alguns estudos procuraram explorar o papel das TZDs em ativar o receptor de ácido graxo livre GPR40, um receptor acoplado a proteína G que está envolvido na secreção de insulina induzida por ácido graxo e glicose. O resultado da ligação das TZDs no receptor GPR40 é a ativação rápida da via de sinalização de p38 MAPK. Desta forma, procurou-se avaliar se a ativação do receptor GPR40 poderia interferir na atividade transcricional do receptor PPAR γ , de modo que os dois agissem em sinergia ou ainda se suas atividades seriam independentes. Como silenciamento da via p38 e o tratamento com antagonista GPR40 foi possível observar uma repressão significativa da atividade de PPRE (elemento de resposta

ao PPAR), em células endoteliais humanas. Por outro lado, a super expressão de GPR40 aumentou a atividade transcricional de PPAR γ induzida por RSG. Esses resultados sugerem que a sinalização de TZD por GPR40 com subsequente ativação de p38 MAPK pode modular a atividade transcricional de PPAR γ no endotélio humano (GRAS et al., 2009).

Outra via de sinalização com importância clínica e relacionada à ativação do receptor PPAR γ é a da ERK1/2. Assim, Cantini e colaboradores (2010) investigaram o envolvimento de PPAR γ na mediação dos efeitos de RSG sob a secreção de proteína induzida por interferon- γ de 10 kDa (IP10). Essa proteína, é uma quimiocina inflamatória envolvida no recrutamento de leucócitos e monócitos, auxiliando na resposta imune (VAZIRINEJAD et al., 2014). Foi demonstrado que RSG inibe de maneira concentração-dependente a secreção de IP10, estimulada por fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ), interferindo na rápida ativação de ERK1/2 induzida pelas 2 citocinas. Ao silenciar o receptor, houve uma reversão significativa desse efeito da RSG na secreção de IP10, mostrando que parte do efeito é mediado por PPAR γ . Mas não é descartado um componente independente do PPAR já que a reversão dos efeitos não foi completa. A interferência de RSG com a sinalização intracelular de TNF α e IFN- γ independente de ERK também não pode ser excluída (LUCONI; CANTINI; SERIO, 2010).

Com essa gama de estudos acima descritos, vê-se que as investigações a respeito dos efeitos do PPAR γ e seus agonistas são amplas. Alguns efeitos observados dependem do receptor e de sua capacidade de ativar a transcrição gênica, observou-se também que outros fatores de transcrição podem modular a transcrição gênica mediada pelo PPAR. Ainda, há casos em que os efeitos se dão pela ativação rápida do receptor e mais tardiamente a transcrição gênica é acionada.

Além disso, foi observado como o tratamento com antagonistas é importante para se confirmar os eventos observados. De fato, o receptor PPAR γ é um alvo terapêutico em muitas doenças e condições clínicas e exercem diversos efeitos benéficos, mas os mecanismos por trás disso ainda não foram

completamente elucidados em muitos casos, tornando-se cada vez mais necessário a investigação deles.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar a localização do receptor PPAR γ , em macrófagos RAW 264,7, nos diferentes compartimentos celulares, tanto no núcleo como no citoplasma, em condições basais e após o tratamento com o agonista total, RSG e parcial GQ-16. E analisar se o efeito da ativação do PPAR γ sobre proteínas da via inflamatória NF κ B se dá através de mecanismos dependentes ou não do PPAR γ .

2- Justificativa

O grande aumento de indivíduos obesos tem preocupado as autoridades de saúde. A pesquisa VIGITEL (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico) mostrou que em um período de 10 anos, a frequência de indivíduos obesos quase que dobrou. Enquanto em 2008 a frequência variou entre 9,7% e 15,9%, em 2018 a frequência de adultos obesos variou entre 15,7% e 23,0% (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE.,2009).

Sabe-se que o tecido adiposo obeso é infiltrado por macrófagos que liberam citocinas pró- inflamatórias, contribuindo para desenvolvimento de resistência a insulina e DM2. Desta forma, torna necessária a busca por tratamentos para esses distúrbios, com fármacos seguros e eficazes (HOTAMISLIGIL, 2006; KOLB; SUTTERWALA; ZHANG, 2016).

Os medicamentos sensibilizadores insulínicos da classe das TZDs, como a RSG, agonistas totais do receptor PPAR γ , mostraram-se inicialmente promissores. Mas, seu uso foi descontinuado por apresentar diversos efeitos indesejáveis, ao passo que os agonistas parciais, como o GQ-16 ganharam atenção justamente pelo fato de apresentar o mesmo efeito terapêutico sem os efeitos colaterais (AMATO et al, 2012).

A partir daí novos compostos começaram a ser pesquisados para o tratamento não só de resistência à insulina, mas também de distúrbios inflamatórios, já que a ativação do PPAR γ pode regular a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Nosso estudo buscou compreender melhor os efeitos anti-inflamatórios e antidiabéticos desses agonistas e se estão relacionados com o mecanismo não genômico do PPAR γ .

3-Objetivos

3.1- Objetivo geral

O trabalho tem como objetivo estudar os efeitos não genômicos do PPAR γ em cultura de macrófagos RAW 264.7 após o tratamento com agonistas total RSG e parcial GQ-16.

3.2- Objetivos específicos

- Investigar a localização do PPAR γ nos diferentes compartimentos celulares em condições basais e após o tratamento de macrófagos com RSG e GQ-16 por 15 minutos;
- Analisar se a modulação da via de sinalização inflamatória NF κ B pela RSG e GQ-16 em macrófagos é atribuída ao PPAR γ .

4- Metodologia

4.1- Imunofluorescência

A localização celular do PPAR γ foi avaliada por meio de ensaio de imunofluorescência. Macrófagos murinos RAW 264.7 foram cultivados em meio de cultura DMEM, com 10% de soro fetal bovino, mantidos em incubadora a 37°C com 5% de CO $_2$, plaqueados em placas de 6 poços e tratados com 0,01% de veículo (DMSO), 10 $^{-5}$ M de GQ-16 e 10 $^{-5}$ M de Rosiglitazona por 15 minutos

(AMATO et al, 2012; FERREIRA, 2015; SILVA, 2016; CARVALHO, 2019).

Após os tratamentos, as lamínulas contendo as células foram lavadas em PBS (NaCl 137,00 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 8,03 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, pH 7,2-7,4) e fixadas em paraformaldeído 4% por 20 minutos a temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas em PBS e permabilizadas com PBS e 0,2% Triton X-100 por 5 minutos a temperatura ambiente e em seguida, lavadas com PBS. Posteriormente, as células foram incubadas com solução de bloqueio (0,1% Triton X-100 + 10% soro de cabra + 1% de albumina + 22,52 mg/ml glicina) por 1 hora.

Em seguida, foi feita a incubação com anticorpo primário anti-PPAR- γ diluído 1:100 em solução de PBS + 0,1% Triton X-100 + 1% BSA por 2 horas a temperatura ambiente. Feito isso, as células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário conjugado com fluoróforo diluído 1:200 em solução de PBS + 0,1% Triton X-100 + 1% BSA por 45 minutos a temperatura ambiente e então foram lavadas com PBS e montadas com DAPI e fluoromount para posterior visualização em microscópio de fluorescência.

4.2- Western Blot

4.2.1- Tratamentos

Para avaliar o efeito da ativação do PPAR- γ sobre proteínas de vias inflamatórias, experimentos de *Western Blot* foram realizados. Para isso, as células da linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 também foram cultivados em meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino, em placas para cultura de células de 150 mm. As células foram mantidas em incubadora a 37°C e com 5% de CO₂, trocando-se o meio de cultura em dias alternados. Sob confluência, as células foram plaqueadas em 2 placas de 6 poços para posteriormente serem tratadas, sendo que havia 5x10⁵ de células por poço.

As células foram tratadas com o antagonista T00070907 (20 μ M) por 30 minutos. Após esse período, o agonista total do PPAR γ Rosiglitazona (RSG, 10⁻⁵M) e o agonista parcial GQ-16 (10⁻⁵M) e o veículo (0,01% DMSO) foram adicionados na presença e ausência de estímulo inflamatório LPS (100ng/mL). As células foram incubadas com o agonista por 30 minutos e após isso o LPS foi adicionado por mais 15 minutos (CARVALHO, A, 2019; FERREIRA, A, 2015; SILVA, M, 2016; AMATO et al, 2012).

4.2.2 - Lise celular

Após o tratamento, as células foram lavadas com solução de PBS 1x (tampão fosfato salina 1x) 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 contendo inibidores de fosfatases (Na₃VO₄ 2 Mm e Na₄P₂O₇ 10 mM) e coquetel com inibidores de proteases. Foi feita a remoção mecânica das células com o auxílio de um raspador de células de plástico. Em seguida, a suspensão de células foi transferida para tubos cônicos de 1,5 mL e lisadas com seringa e agulha. Os tubos foram deixados em banho de gelo por 30 minutos e posteriormente o lisado celular foi centrifugado a 12000 RPM por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e a dosagem de proteínas foi feita pelo método de Bradford. As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C.

4.2.3 - Eletroforese

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. Terminada 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 de transferência, (Tris 250 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) que precisa estar gelado, a 24 V, por 1 hora e 30 minutos, a temperatura ambiente. O aparelho utilizado para transferência foi o Trans-blot cell da Bio Rad

Laboratories.

4.2.4 - Blotting

Foi preparada uma solução bloqueadora de leite em pó desnatado a 5% em tampão TBS-T (10mM de Tris-base, 150mM de NaCl e 0,1% de tween 20). As membranas foram bloqueadas por 2 horas, a temperatura ambiente, com essa solução. Decorridas as duas horas, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com o anticorpo primário. Foram utilizados o anticorpo que reconhece a forma total do NFkB ou o anticorpo que reconhece a forma fosforilada do NFkB, na diluição de 1:1000. A incubação das membranas com o anticorpo primário foi feita na presença de tampão de bloqueio, por 16 horas, a 4°C, sob agitação constante.

Após esse período, as membranas foram lavadas 3 vezes a cada 10 minutos com TBS-T. O anticorpo secundário conjugado com peroxidase foi preparado, sendo que uma solução de leite em pó a 1% em tampão TBS-T foi utilizado para diluir o anticorpo, com a diluição de 1:4000. As membranas foram incubadas com anticorpo secundário, por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação constante. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes a cada 5 minutos com TBS-T. Ao término do processo de incubação, as membranas foram reveladas com o reagente ECL e quimioluminescência em fotodocumentador (Amersham Imager 600, GE).

4.2.5 - Densitometria 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). Diferenças estatísticas entre duas médias foram determinadas por meio do teste *t* de Student. Mais de duas médias foram comparadas por ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. O critério de significância estatística para todas as análises foi o valor $p < 0,05$.

5- Resultados

No presente estudo, foi observada a localização do receptor PPAR γ nos diferentes compartimentos celulares, após o tratamento com o veículo DMSO, com agonista total, RSG e agonista parcial, GQ-16, por 15 minutos. Ainda, foram examinados os efeitos do agonista total de PPAR γ RSG, do agonista parcial GQ-16, e do antagonista do PPAR γ T0070907 na fosforilação da via do NF κ B, em cultura de macrófagos murinos RAW 264.7, na ausência ou na presença de estímulo inflamatório por 15 minutos. Para este fim, foram realizados ensaios de *Western Blot* e utilizados anticorpos contra a forma total e forma fosforilada do NF κ B p65 (Ser536).

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. E que essas ações não genômicas podem explicar os efeitos benéficos de tais agonistas. No entanto, para confirmar se esses efeitos benéficos dependem do receptor PPAR γ , ou são independentes, foi utilizado um antagonista do PPAR γ .

5.1- Localização do PPAR γ em macrófagos RAW 264,7 após tratamento com agonistas de PPAR γ por 15 minutos

Obteve-se uma boa marcação do núcleo (contracorado de azul) e ausência de marcação do receptor PPAR γ no controle negativo (ausência do anticorpo primário), isso indica que o anticorpo secundário conjugado com fluoróforo é específico para o anticorpo primário anti-PPAR γ , não se ligando em outras estruturas (Figura 5A). Após o tratamento com o veículo DMSO 0,01% por 15 minutos, observa-se marcação do receptor PPAR γ (vermelho) predominantemente no núcleo, comparando-se a marcação do núcleo (azul) e a do receptor (vermelho) percebe-se que são semelhantes (Figura 5B).

Por outro lado, após o tratamento com o agonista total RSG (10^{-5} M), e com o agonista parcial GQ-16 (10^{-5} M), por 15 minutos, observa-se que houve a translocação do receptor PPAR γ do núcleo para o citoplasma, nota-se uma marcação mais difusa e menos intensa do receptor em relação ao núcleo.

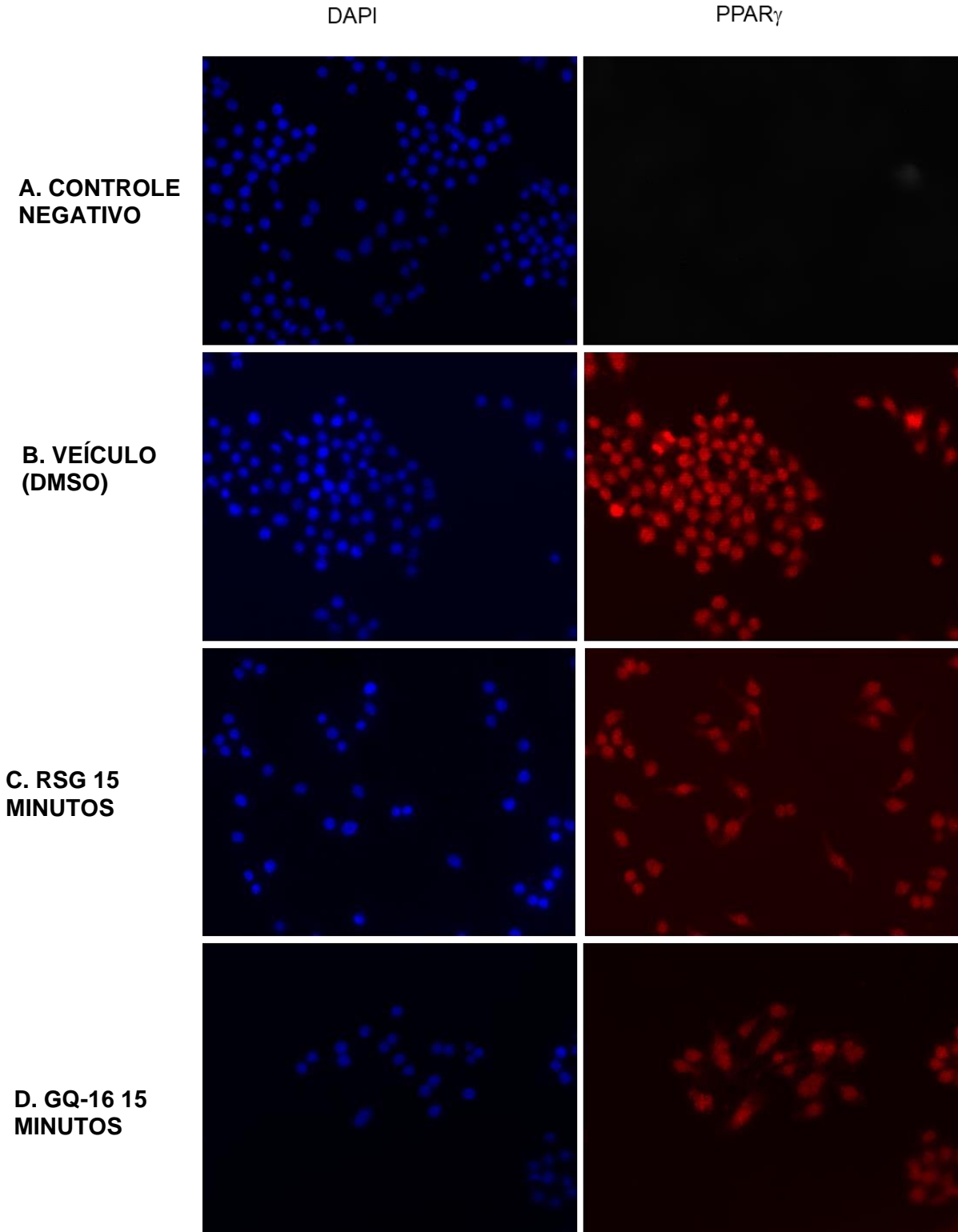


Figura 5. Imunofluorescência para o receptor PPAR γ após tratamento com agonistas em linhagem de macrófagos murinos RAW 264,7. Linhagem de macrófagos murinos RAW 264,7 foram tratados com veículo (DMSO 0,01%), rosiglitazona (RSG, 10^{-5} M) ou GQ-16 (10^{-5} M) por 15 minutos. Localização por imunofluorescência para o receptor PPAR- γ (vermelho) e núcleo contraincorado com DAPI (azul). Esse experimento foi repetido 3 vezes.

5.2 - Efeito do LPS na fosforilação do NF κ B com 15 minutos de tratamento

Pode ser observado na figura 6 que o tratamento de cultura de macrófagos com LPS por 15 minutos aumentou significativamente a fosforilação do NF κ B em relação ao controle DMSO 0,01%, assim como era esperado.

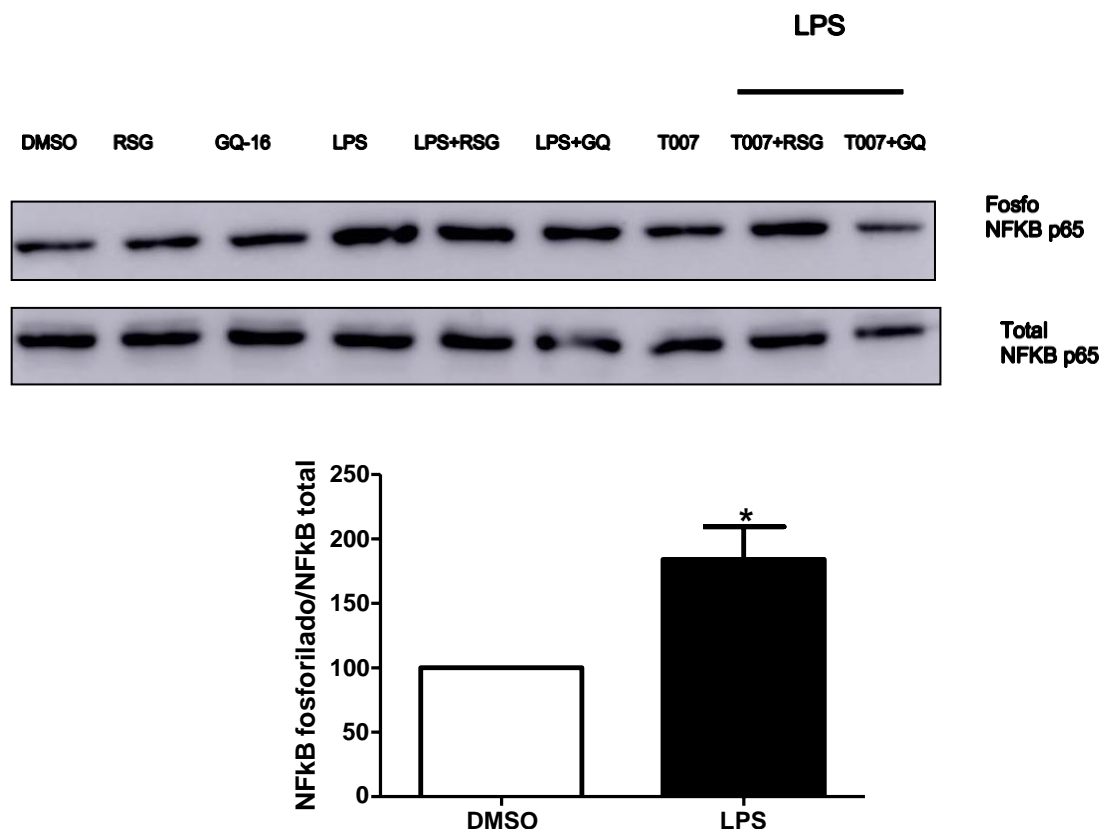


Figura 6. Efeito do tratamento com LPS sobre a fosforilação do NF κ B em células RAW 264.7. Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com o veículo (DMSO 0,01%) por 30 minutos e o LPS(100 ng/mL) por 15 minutos. As células foram colhidas e a proteína NFκB foi detectada por *Western blot*. O imunoenensaio foi realizado com os anticorpos anti-fosfo NFκB (forma fosforilada do NFκB) ou anti- NFκB (forma total do NFκB). Análise densitométrica foi realizada das imagens digitais, normalizados pela expressão do NFκB total e expressos em relação ao controle (DMSO). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão de 3 experimentos. * Significativamente diferente em relação ao controle, por Teste *t* de Student. Valor de $p < 0,05$.

5.3- Efeito dos agonistas e do antagonista na fosforilação do NFkB estimuladas por 30 minutos

Quando foi verificado o efeito dos agonistas RSG e GQ-16, e do antagonista T0070907 de PPAR γ , observou-se que não tiveram efeito sobre a fosforilação do NFkB, (Figura 7).

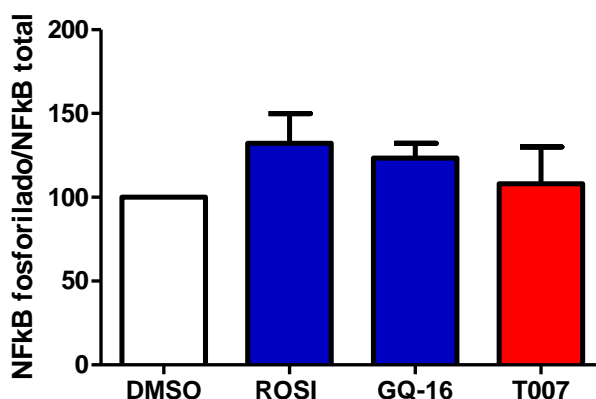


Figura 7. Efeito do tratamento por 30 minutos com agonistas e antagonista PPAR γ em células RAW 264.7. Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com o veículo (DMSO 0,01%), rosiglitazona (RSG, 10^{-5} M), GQ-16 (10^{-5} M) e T007 (10^{-5} M) por 30 minutos. As células foram colhidas e a proteína NFkB foi detectada por *Western Blot*. O imunoensaio foi realizado com os anticorpos anti- fosfo NFkB(forma fosforilada do NFkB) ou anti-NFkB(forma total do NFkB). Análise densitométrica foi realizada dos resultados obtidos das imagens digitais, normalizados pela expressão do NFkB total e expressos em relação ao controle (DMSO). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão de 3 experimentos. Valor de $p < 0,05$.

5.4- Efeito do agonista total RSG na fosforilação do NFkB em 15 minutos de tratamento com LPS na presença e na ausência do antagonista.

Quando a cultura de macrófagos foi pré- tratada com a RSG, agonista total do PPAR γ , antes da adição do LPS por 15 minutos, observou-se diminuição da fosforilação do NFkB quando comparado ao efeito apenas do LPS. Para verificar se o PPAR γ poderia estar envolvido neste efeito da RSG sobre a fosforilação do NFkB estimulada pelo LPS, a cultura de macrófagos foi pré- incubada com o antagonista de PPAR γ T0070907 para então adicionar a RSG e posteriormente LPS por 15 minutos. Os resultados demonstraram que o antagonista não alterou a resposta da RSG sobre o efeito do LPS na fosforilação do NFkB, assim

evidenciando que o PPAR γ não está envolvido neste efeito.

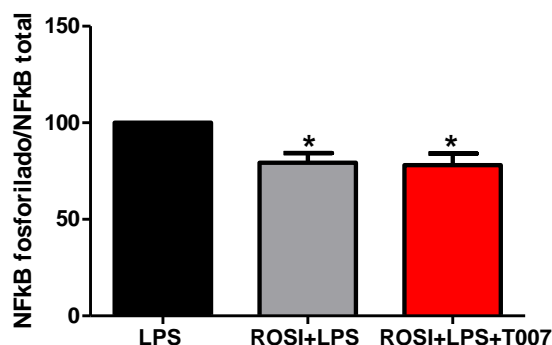


Figura 8. Efeito de rosiglitazona sobre a fosforilação do NFkB em células RAW 264.7 estimuladas por 15 minutos de tratamento com LPS e pré tratadas com antagonista por 30 minutos. Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com antagonista T007 por 30 minutos, após isso foi adicionado o agonista total, rosiglitazona (RSG, 10-5M) por 30 minutos e por fim o LPS (100 ng/mL) foi adicionado por 15 minutos. As células foram colhidas e a proteína NFkB foi detectada por *Western blot*. O imunoensaio foi realizado com os anticorpos anti-fosfo NFkB (forma fosforilada do NFkB) ou anti- NFkB (forma total do NFkB). Análise densitométrica foi realizada dos resultados obtidos das imagens digitais, normalizados pela expressão do NFkB total e expressos em relação ao LPS. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão de 3 experimentos. * Significativamente diferente em relação ao LPS, por ANOVA seguida de comparação múltipla de *Tukey*. Valor de $p < 0,05$.

5.5- Efeito do agonista parcial GQ-16 na fosforilação do NFkB em 15 minutos de tratamento com LPS na presença e na ausência do antagonista.

O pré-tratamento de cultura de macrófagos com o agonista parcial de PPAR γ GQ-16, não mostrou efeitos significativos sobre a fosforilação do NFkB provocada pelo estímulo inflamatório LPS. O antagonista de PPAR não alterou a resposta do GQ-16 na presença do estímulo inflamatório (figura 9). Na imagem das bandas de *Western Blot* (figura 10) é possível notar uma redução da intensidade da banda do NFkB fosforilado no tratamento com GQ-16 na presença do estímulo LPS, mas devido a quantidade pequena de amostras (3 experimentos) não foi possível estabelecer significância estatística. Mais experimentos foram realizados, mas foram descartados pois o LPS não estimulou as células.

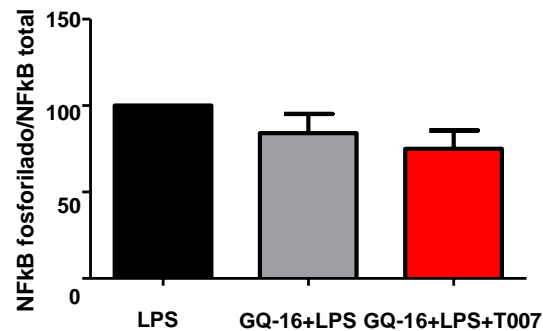


Figura 9. Efeito de GQ-16 sobre a fosforilação do NFKB em células RAW 264.7 estimuladas por 15 minutos de tratamento com LPS e pré tratadas com antagonista por 30 minutos. Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com antagonista T007 por 30 minutos, depois com GQ-16 (10⁻⁵M) por 30 minutos e então o LPS (100 ng/mL) foi adicionado por mais 15 minutos. As células foram colhidas e a proteína NFKB foi detectada por *Western blot*. O imunoensaio foi realizado com os anticorpos anti-fosfo NFKB (forma fosforilado NFKB) ou anti- NFKB (forma total do NFKB). Análise densitométrica foi realizada dos resultados obtidos das imagens digitais , normalizados pela expressão do NFKB total e expressos em relação ao LPS. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão de 3 experimentos. Sem significância estatística por ANOVA seguida de comparação múltipla de *Tukey*. Valor de $p < 0,05$.

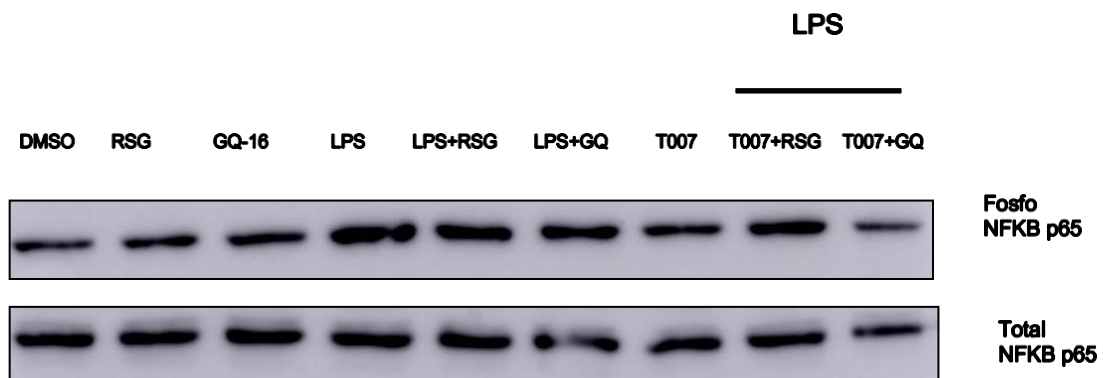


Figura 10. Bandas de *Western Blot*. Os macrófagos murinos RAW 264,7 foram pré tratados com T0070907 por 30 minutos, depois os agonistas total e parcial foram adicionados por mais 30 minutos e por fim o estímulo inflamatório LPS (100 ng/mL) foi adicionado por mais 15 minutos. As células foram colhidas e a proteína NFKB foi detectada por *Western blot*. A figura representa as bandas de *Western blot* de um único experimento, com todos os tratamentos. Observa-se o estímulo inflamatório do LPS sobre a fosforilação do NFKB.

6.0- Discussão

O grande aumento de indivíduos obesos tem preocupado as autoridades de saúde. Dados da pesquisa VIGITEL 2018 (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), realizada pelo Ministério da Saúde, mostraram que naquele ano mais da metade da população, 55,7%, estava com excesso de peso. O aumento da prevalência foi maior entre as faixas etárias de 18 a 24 anos. Enquanto que a frequência de adultos obesos variou entre 15,7% e 23,0%. A obesidade se torna mais preocupante por ser um fator de risco para várias outras doenças, como hipertensão arterial e diabetes (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2019). Desta forma, faz-se necessário cada vez mais investigações de moléculas com potencial farmacológico para tratar a obesidade e as condições associadas.

Os agonistas totais do receptor PPAR γ , representados pelas TZDs, foram desenvolvidos para serem utilizados no DM2. São ditos como os clássicos sensibilizadores insulínicos, pois estimulam genes envolvidos no metabolismo da glicose e lipídeos (MIRZA; ALTHAGAFI; SHAMSHAD, 2019) Porém, seu uso foi descontinuado por apresentar sérios efeitos colaterais indesejáveis, como ganho de peso, edema, toxicidade cardiovascular e perda óssea (NISSEN; WOLSKI, 2007).

Além do mais, o mecanismo genônimo clássico não foi suficiente para explicar os efeitos observados com o tratamento de agonistas PPAR γ . Desse modo, os agonistas parciais chamaram à atenção de pesquisadores, que procuraram avaliar até que ponto a ativação parcial do receptor poderia manter os efeitos benéficos das TZDs e se haveria melhora dos efeitos colaterais (AMATO et al., 2012).

Nesse contexto, foi desenvolvido um composto análogo das TZDs, o GQ-16, que ativa parcialmente o receptor PPAR γ e foi capaz de reduzir a níveis aceitáveis a glicose em jejum de camundongos com obesidade induzida por dieta, diminuiu o ganho de peso induzido por dieta hiperlipídica e a massa de tecido

adiposo branco visceral, além de diminuir o conteúdo hepático de triglicerídeos (AMATO et al., 2012; COELHO et al., 2016).

A partir daí, outros estudos foram conduzidos utilizando-se esse composto. Estes trabalhos evidenciaram que o agonista completo de PPAR γ , RSG, tem efeito adipogênico mesmo no início da diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 e esse efeito é, pelo menos em parte, devido a ativação da via da MAPK. Por outro lado, o efeito adipogênico do GQ-16 foi menor quando comparado a RSG e parece não envolver essa via de sinalização (FERREIRA, A, 2019). Isso nos mostra que o agonista total RSG e o agonista parcial GQ-16 agem por diferentes mecanismos em adipócitos. E isso está de acordo com o trabalho de Amato e colaboradores (2012) que demonstraram que esses agonistas provocam modificações diferentes do receptor PPAR γ ao se ligarem (AMATO et al., 2012).

A ativação do PPAR γ em adipócitos é consistente com uma ação anti-inflamatória, pois os agonistas total e parcial de PPAR γ foram capazes de inibir a expressão do RNAm do gene inflamatório *IL-6* nessas células. Além disso, RSG diminuiu a expressão de genes inflamatórios também em macrófagos que foram estimulados com LPS antes da adição dos agonistas, efeito não observado com o GQ-16 (FERREIRA, 2019).

Tendo em vista esses resultados do tratamento com agonistas PPAR γ sobre a ativação da via da MAPK, outro estudo foi conduzido e nele verificou-se que agonistas PPAR γ podem modular as vias de sinalização inflamatórias como a do NF κ B e SAPK/JNK, em macrófagos. Tanto o agonista total quanto o agonista parcial do PPAR γ foram capazes de inibir o efeito do LPS na fosforilação do NF κ B em 15 minutos de tratamento, o que não aconteceu com 60 minutos de estimulação com LPS. No entanto, o pré-tratamento com os agonistas não alterou a fosforilação provocada por LPS na via da SAPK/JNK (CARVALHO, 2019).

Esses estudos abriram a mente para o efeito anti-inflamatório de agonistas PPAR γ , tanto em macrófagos quanto em pré-adipócitos no início da diferenciação adipogênica. Portanto, neste estudo, procurou-se confirmar se essa modulação

na via do NF κ B é por meio da ativação do receptor PPAR γ , ou se ocorre por outra via, assim como já demonstrado em outros estudos (LUCONI; CANTINI; SERIO, 2010). Por isso, optou-se por utilizar juntamente com os agonistas um antagonista PPAR γ seletivo, o T0079797.

Em estudos anteriores observou-se inibição da fosforilação com o tratamento de agonistas principalmente na via de sinalização do NF κ B, por isso decidiu-se avaliar melhor os efeitos do tratamento nesta via. Da mesma forma, o tratamento com LPS por 15 minutos mostrou resultados mais promissores, justificando a escolha de estimular as células com esse lipopolissacarídeo por 15 minutos (CARVALHO, A, 2019).

Macrófagos murinos RAW 264.7 foram utilizados para estes experimentos pois na obesidade há uma infiltração predominante de macrófagos no tecido adiposo e estas células imunes são responsáveis por produzir as citocinas envolvidas na resistência à insulina. Além do mais, macrófagos expressam o receptor PPAR γ . E este receptor também está envolvido em uma série de processos inflamatórios em outras patologias (LEE; LEE, 2014; BURHANS et al., 2019).

Nos experimentos anteriores realizados no Laboratório de Farmacologia Molecular como trabalho de iniciação científica, verificou-se que houve uma translocação do receptor PPAR γ do núcleo para o citoplasma após 5 minutos de tratamento com agonistas total e parcial em macrófagos. Tendo como base esses dados, o presente estudo mostrou que o tratamento com os agonistas total e parcial por 15 minutos também foi capaz de translocar o receptor do núcleo para o citoplasma.

Já foi provado que os receptores nucleares, incluindo os receptores de progesterona e glicocorticóides, o receptor da vitamina D e o receptor do hormônio tireoidiano, alternam constantemente entre o citoplasma e o núcleo (KUMAR et al., 2006). Umemoto e Fujiki (2012) também observaram que PPAR α e PPAR γ se movem dinamicamente entre o núcleo e o citoplasma e que há aumento da

importação nuclear de PPAR α e PPAR γ quando estimulados por seus ligantes (UMEMOTO; FUJIKI, 2012). Estudos também mostraram que MEK1 exporta PPAR γ do núcleo para o citoplasma. A estimulação mitogênica das células causa interação de MEKs nucleares com PPAR γ , e isso é seguido por uma exportação nuclear rápida do complexo, esta exportação nuclear reduz a atividade transcricional do PPAR γ e permite que ele interaja com componentes citosólicos e de membrana (BURGERMEISTER et al., 2007).

Tendo confirmado a presença do receptor PPAR γ no citoplasma de macrófagos e analisando estudos anteriores que mostram que o tratamento com agonistas PPAR γ inibe a fosforilação em vias de sinalização inflamatória tais como a do NF κ B, o presente estudo utilizou além dos agonistas, um antagonista, a fim de avaliar o envolvimento do receptor.

As concentrações utilizadas dos agonistas se basearam em 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 demonstraram que tanto rosiglitazona quanto GQ-16, nessa concentração, não causaram efeito sobre a viabilidade de macrófagos RAW 264.7, não sendo tóxicos para a célula (SILVA, 2016). Sobretudo, o uso de maiores concentrações do GQ-16 causam a precipitação do agonista parcial, inviabilizando o uso. Foi utilizado como estímulo inflamatório o LPS, que é reconhecido pelo TLR4 (*toll-like receptor 4*) na superfície de macrófagos, resultando na ativação de vias de sinalização como a do NF κ B. Estudos mostraram que o tratamento com 100 ng/ml de LPS por 15 minutos já é possível induzir o processo inflamatório e rosiglitazona foi capaz de inibir a ativação da AKT em cultura de células RAW 264.7, estimuladas por 15 minutos de tratamento com LPS (MEDZHITOV; HORNG, 2009; GÜNZL et al., 2010; LIN et al., 2014). Estudos prévios também indicaram que o T0070907 na concentração de 20 μ M é capaz de inibir a ativação do receptor PPAR γ , não sendo tóxico para a células (LI et al., 2017). A pequena quantidade de antagonista disponibilizada para este estudo inviabilizaram o uso de maiores concentrações e a realização de uma curva dose- resposta.

Assim como em outros estudos, foi possível observar que com apenas 15 minutos o LPS foi capaz de aumentar a fosforilação do NF κ B, em relação ao

controle DMSO. Por outro lado, o efeito da RSG na fosforilação do NFκB não foi alterado na presença do antagonista T0070907, sugerindo que o PPARγ não está envolvido nesse efeito da RSG. Esses resultados concordam com estudos anteriores, que demonstram que o efeito anti-inflamatório e de sensibilização insulínica dos agonistas PPARγ podem acontecer mesmo sem a presença do receptor (LUCONI; CANTINI; SERIO, 2010; WANG et al., 2018).

Chawla (2001) verificou que o ligante natural 15d-PGJ2 e as TZDs inibiram a secreção de TNF-α e IL-6 em macrófagos, que expressam o receptor PPARγ e foi igualmente eficaz em macrófagos deficientes em PPARγ. Além disso, ainda demonstraram que tanto os ligantes naturais quanto os sintéticos foram capazes de inibir a expressão de genes pró- inflamatórios de iNOS e COX-2, em ambos os macrófagos, tanto os que expressavam PPAR como os que eram deficientes para este receptor. Desta forma, concluiu que PPARγ não é necessário para mediar o efeitos anti-inflamatórios de 15d-PGJ2 ou TZDs em macrófagos (CHAWLA et al., 2001).

Sabendo-se que os efeitos dos agonistas PPAR nem sempre dependem da ativação do receptor, alguns autores avaliaram se as TZDs poderiam ativar outros receptores, que poderiam tanto agir em sinergia com o PPAR como de forma independente.

Nesse contexto, é importante lembrar que os ácidos graxos saturados, como o palmitato, estão aumentados na síndrome metabólica e aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias induzidas por lipopolissacarídeos (LPS) em macrófagos, por meio da amplificação da sinalização inflamatória mediada por Toll-like (TLR4) de MAPK e NFκB. Assim, pesquisadores demonstraram que a expressão do receptor GPR40 e CD36 é regulada positivamente por LPS (LI et al., 2019).

Por outro lado, Oh et al. (2010) relataram que GPR120 atua como um receptor anti-inflamatório em macrófagos pró-inflamatórios e adipócitos maduros. A sinalização de GPR120 é ativada por ácidos eicosapentaenoico (EPA) e

docosahexaenoico (DHA). DHA e EPA inibe a sinalização do receptor Toll-like (TLR) (OH et al., 2010). E apesar de serem necessários mais estudos sobre a ativação de GPR40 em macrófagos, Oliveira et al. (2015) relataram que os ácidos α -linolênico (ω 3) ou oleico (ω 9) melhoraram a resistência à insulina no contexto de obesidade induzida por dieta rica em gordura e diabetes tipo 2 (OLIVEIRA et al., 2015).

O resultado da ligação das TZDs no receptor GPR40 é a ativação rápida da via de sinalização de p38 MAPK. Com o silenciamento da via p38 e o tratamento com antagonista GPR40 foi possível observar uma repressão significativa da atividade de PPRE (elemento de resposta ao PPAR), em células endoteliais humanas. Por outro lado, a super expressão de GPR40 aumentou a atividade transcricional de PPAR γ induzida por RSG. Esses resultados sugerem que a sinalização de TZD por GPR40 com subsequente ativação de p38 MAPK pode modular a atividade transcricional de PPAR γ no endotélio humano (GRAS et al., 2009).

Outro motivo que explicaria os resultados observados neste estudo é que o próprio antagonista, T0070907, parece exercer atividade sobre a fosforilação do PPAR γ , ou até mesmo afetar outros alvos terapêuticos. O tratamento com T0070907 (10 μ M) reduziu a capacidade do PPAR γ de se ligar ao PPRE em células MB-231, células invasivas de câncer de mama. Importante ressaltar que, o tratamento com T0070907 não afetou o nível de proteína de PPAR γ ou RXR em quaisquer concentrações testadas, mas alterou a fosforilação de PPAR γ em 0,1 μ M e concentrações mais altas em células MB-231. O estudo ainda mostrou que T0070907 diminuiu a fosforilação de ERK1/ 2 de uma maneira dependente da dose tanto em células de câncer de mama invasivas, MB -231, como em células não invasivas, MCF-7 (ZAYTSEVA et al., 2011).

7.0- Conclusão

Infere-se portanto que, o tratamento por 15 minutos com agonista total, RSG e agonista parcial, GQ-16, foi capaz de aumentar a translocação do receptor PPAR γ do núcleo para o citoplasma, confirmando assim que o PPAR γ pode exercer efeitos não relacionados a transcrição gênica.

Ademais, a RSG foi capaz de inibir o efeito da fosforilação do NF κ B em 15 minutos de tratamento com o LPS. Porém, o antagonista T0070907, não foi capaz de reverter a inibição da fosforilação estimulada por RSG, sugerindo que o efeito observado com o tratamento de agonistas PPAR γ , pode na verdade ser independente do receptor e que outros receptores ou vias de sinalização podem estar mediando esse efeito, sendo que esses receptores podem agir em sinergia com o PPAR γ ou não. Por outro lado, o tratamento com o agonista parcial GQ-16 não foi capaz de alterar a fosforilação do NF κ B, na ausência e na presença do antagonista T0070907. Porém, mais estudos são necessários para confirmar essas informações e que receptores e vias de sinalização estão envolvidas nos efeitos de agonistas PPAR γ .

8.0- Referência Bibliográfica

AMATO, A. A. et al. 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. 28169–28179, ago. 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigitel Brasil 2018: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquerito telefônico**. [s.l: s.n.].

BURGERMEISTER, E. et al. Interaction with MEK causes nuclear export and downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Molecular and cellular biology**, v. 27, n. 3, p. 803–817, fev. 2007.

BURHANS, M. S. et al. Contribution of adipose tissue inflammation to the development of type 2 diabetes HHS Public Access. **Physiology & behavior**, v. 9, n. 1, p. 1–58, 2019.

CARVALHO, A. **Efeito de agonistas PPAR γ na fosforilação das vias de sinalização NF κ B e SAPK/JNK em cultura de macrófagos**. Tese (Trabalho de

conclusão de curso de graduação em Farmácia)- Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília, p. 1-56, 2019.

CHAWLA, A. et al. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. **Nature medicine**, v. 7, n. 1, p. 48–52, jan. 2001. CHIGURUPATI, S; DHANARAJ, S.A; BALAKUMAR, P.A step ahead of PPAR γ full agonists to PPAR γ partial agonist: therapeutic perspectives in the management of diabetic insulin resistance. **European journal of pharmacology**, v. 755, p. 50–57, maio 2015.

CHOI, J. H. et al. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR γ by Cdk5. **Nature**, v. 466, n. 7305, p. 451–456, jul. 2010.

CHOI, J. H. et al. Antidiabetic actions of a non-agonist PPAR γ ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. **Nature**, v. 477, n. 7365, p. 477–481, set. 2011.

CHURI, S. B. et al. Intrathecal rosiglitazone acts at peroxisome proliferator-activated receptor-gamma to rapidly inhibit neuropathic pain in rats. **The journal of pain**, v. 9, n. 7, p. 639–649, jul. 2008.

CINTI, S. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **Journal of lipid research**, v. 46, n. 11, p. 2347–2355, nov. 2005.

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. e0154310, 2016.

DA SILVA, T. Ação do agonista parcial do PPAR γ , GQ-16, na viabilidade de macrófagos em cultura. Tese (Trabalho de conclusão de curso de graduação em Farmácia)- Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília. Brasília, p. 1-51, 2016.

DEMCHENKO, Y. N.; KUEHL, W. M. A critical role for the NF κ B pathway in multiple myeloma. **Oncotarget**, v. 1, n. 1, p. 59–68, maio 2010.

FEHRENBACHER, J. C. et al. Rapid pain modulation with nuclear receptor ligands. **Brain research reviews**, v. 60, n. 1, p. 114–124, abr. 2009.

FERREIRA, A. **Estudo do envolvimento da via ERK1/2 sobre a resposta adipogênica e anti- inflamatória de agonistas de PPAR γ em macrófagos e adipócitos**. Tese (Mestrado em Ciências da Saúde). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília, p. 1-86, 2019.

GRAS, D. et al. Thiazolidinediones induce proliferation of human bronchial epithelial cells through the GPR40 receptor. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 296, n. 6, p. L970-8, jun. 2009.

GRIGGS, R. B. et al. Pioglitazone rapidly reduces neuropathic pain through astrocyte and nongenomic PPAR γ mechanisms. **Pain**, v. 156, n. 3, p. 469–482, mar. 2015.

GÜNZL, P. et al. Anti-inflammatory properties of the PI3K pathway are mediated by IL-10/DUSP regulation. **Journal of leukocyte biology**, v. 88, n. 6, p. 1259–1269, dez. 2010.

HIGGINS, L. S.; MANTZOROS, C. S. The Development of INT131 as a Selective PPAR γ Modulator: Approach to a Safer Insulin Sensitizer. **PPAR research**, v. 2008, p. 936906, 2008.

HEIKKINEN, S.; AUWERX, J.; ARGMANN, C. A. PPAR γ in human and mouse physiology. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1771, n. 8, p. 999–1013, ago. 2007.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–867, dez. 2006.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science (New York, N.Y.)**, v. 259, n. 5091, p. 87–91, jan. 1993.

IBGE. **Pesquisa Nacional de Saúde 2019: informações sobre domicílios, acesso e utilização dos serviços de saúde**. [s.l.: s.n.].

IVASHCHENKO, C. Y. et al. PPAR- γ knockout in pancreatic epithelial cells abolishes the inhibitory effect of rosiglitazone on caerulein-induced acute pancreatitis. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 293, n. 1, p. G319-26, jul. 2007.

KOJOK, K.; EL-KADIRY, A. E.-H.; MERHI, Y. Role of NF- κ B in Platelet Function. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 17, ago. 2019.

KOLB, R.; SUTTERWALA, F. S.; ZHANG, W. Obesity and cancer: inflammation bridges the two. **Current opinion in pharmacology**, v. 29, p. 77–89, ago. 2016.

KORBECKI, J.; BOBIŃSKI, R.; DUTKA, M. Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 68, n. 6, p. 443–458, jun. 2019.

KUMAR, S. et al. Intracellular localization and nucleocytoplasmic trafficking of steroid receptors: an overview. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 246, n. 1–2, p. 147–156, fev. 2006.

LANNAN, K. L. et al. Breaking the mold: transcription factors in the anucleate platelet and platelet-derived microparticles. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 48, 2015.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 6, p. a001651, dez. 2009.

LEE, B.-C.; LEE, J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1842, n. 3, p. 446–462, mar. 2014.

LEE, D. H. et al. Selective PPAR γ modulator INT131 normalizes insulin signaling defects and improves bone mass in diet-induced obese mice. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 302, n. 5, p. E552–60, mar. 2012.

LEE, G. et al. T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, functions as an antagonist of biochemical and cellular activities. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 22, p. 19649–19657, maio 2002.

LI, H. DI et al. Wogonin attenuates inflammation by activating PPAR- γ in alcoholic liver disease. **International Immunopharmacology**, v. 50, n. March, p. 95–106, 2017.

LI, G. et al. Upregulation of free fatty acid receptors in periodontal tissues of patients with metabolic syndrome and periodontitis. **Journal of periodontal research**, v. 54, n. 4, p. 356–363, ago. 2019.

LIN, C.-F. et al. Rosiglitazone regulates anti-inflammation and growth inhibition via PTEN. **BioMed research international**, v. 2014, p. 787924, 2014.

LIU, J. et al. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma ligands induced cell growth inhibition and its influence on matrix metalloproteinase activity in human myeloid leukemia cells. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 56, n. 4, p. 400–408, out. 2005.

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.

MEDZHITOV, R.; HORNG, T. Transcriptional control of the inflammatory response. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 10, p. 692–703, out. 2009.

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, ago. 2015.

MING, Y. et al. CMHX008, a novel peroxisome proliferator-activated receptor γ partial agonist, enhances insulin sensitivity in vitro and in vivo. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e102102, 2014.

MIRZA, A. Z.; ALTHAGAFI, I. I.; SHAMSHAD, H. Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. **European journal of medicinal chemistry**, v. 166, p. 502–513, mar. 2019.

MORAES, L. A. et al. Non-genomic effects of PPAR γ ligands: inhibition of GPVI-stimulated platelet activation. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 8, n. 3, p. 577–587, mar. 2010.

MOTANI, A. et al. INT131: a selective modulator of PPAR γ . **Journal of molecular biology**, v. 386, n. 5, p. 1301–1311, mar. 2009.

NAGY, L.; SCHWABE, J. W. R. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. **Trends in biochemical sciences**, v. 29, n. 6, p. 317–324, jun. 2004.

NISSEN, S.; WOLSKI, K. Effect of Rosiglitazone on the Risk of Myocardial Infarction and Death from Cardiovascular Causes. **Journal of Vascular Surgery**, v. 46, p. 608, 2007.

OH, D. Y. et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. **Cell**, v. 142, n. 5, p. 687–698, set. 2010.

OLIVEIRA, V. et al. Diets Containing α -Linolenic (ω 3) or Oleic (ω 9) Fatty Acids Rescues Obese Mice From Insulin Resistance. **Endocrinology**, v. 156, n. 11, p. 4033–4046, nov. 2015.

PERALDI, P.; XU, M.; SPIEGELMAN, B. M. Thiazolidinediones block tumor necrosis factor- α -induced inhibition of insulin signaling. **The Journal of clinical investigation**, v. 100, n. 7, p. 1863–1869, out. 1997.

REMELS, A. H. V et al. PPAR γ inhibits NF- κ B-dependent transcriptional activation in skeletal muscle. **American journal of physiology**.

Endocrinology and metabolism, v. 297, n. 1, p. E174-83, jul. 2009.

SHIMIZU, K. et al. Thiazolidinedione derivatives as novel therapeutic agents to prevent the development of chronic pancreatitis. **Pancreas**, v. 24, n. 2, p. 184–190, mar. 2002.

STEPPAN, C. M. et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 307–312, jan. 2001.

STRAUS, D. S.; GLASS, C. K. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. **Trends in immunology**, v. 28, n. 12, p. 551–558, dez. 2007.

TONTONOZ, P. et al. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. **Genes & development**, v. 8, n. 10, p. 1224–1234, maio 1994.

UMEMOTO, T.; FUJIKI, Y. Ligand-dependent nucleo-cytoplasmic shuttling of peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR α and PPAR γ . **Genes to Cells**, v. 17, n. 7. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) play important roles in diverse biological processes including metabolisms of sugars and lipids and differentiation of cells such as adipocytes. PPARs are transcription factors belonging to the ligand-d, p. 576–596, 2012.

UYSAL, K. T. et al. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. **Nature**, v. 389, n. 6651, p. 610–614, out. 1997.

VAZIRINEJAD, R. et al. The biological functions, structure and sources of CXCL10 and its outstanding part in the pathophysiology of multiple sclerosis. **Neuroimmunomodulation**, v. 21, n. 6, p. 322–330, 2014.

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

WANG, Q. A. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Its Role in Adipocyte Homeostasis and Thiazolidinedione-Mediated Insulin Sensitization. **Molecular and cellular biology**, v. 38, n. 10, maio 2018.

WRIGHT, M. B. et al. Minireview: Challenges and opportunities in development of ppar agonists. **Molecular Endocrinology**, v. 28, n. 11, p. 1756–1768, nov. 2014.

XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1821–1830, dez. 2003.

YANG, W.-S. et al. Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone, increases plasma levels of adiponectin in type 2 diabetic patients. **Diabetes care**, v. 25, n. 2, p. 376–380, fev. 2002.

YING, W. et al. The role of macrophages in obesity-associated islet inflammation and β -cell abnormalities. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 16, n.2, p. 81–90, fev. 2020.

ZAYTSEVA, Y. Y. et al. The PPARgamma antagonist T0070907 suppresses breast cancer cell proliferation and motility via both PPARgamma-dependent and -independent mechanisms. **Anticancer research**, v. 31, n. 3, p. 813–823, mar. 2011

