

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

ANGÉLICA AMORIM AMATO

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE BENZILIDENO- E
ACRIDINILIDENO-TIAZOLIDINEDIONAS E DE ISOFLAVONAS NOS
RECEPTORES ALFA, BETA/DELTA E GAMA ATIVADOS POR
PROLIFERADORES PEROXISSOMAS**

BRASÍLIA

2008

ANGÉLICA AMORIM AMATO

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE BENZILIDENO- E
ACRIDINILIDENO-TIAZOLIDINEDIONAS E DE ISOFLAVONAS NOS
RECEPTORES ALFA, BETA/DELTA E GAMA ATIVADOS POR
PROLIFERADORES PEROXISSOMAIAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves

BRASÍLIA

2008

Há duas formas para viver a sua vida:
Uma é acreditar que não existe milagre.
A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre.

Fernando Pessoa

Aos meus pais, Marco Antonio e Solange, e à minha irmã, Daniela, que em seu mundo repleto de lógica, mostraram-me o que é mais abstrato e mais verdadeiro em minha vida.

Ao Leandro, pela feliz oportunidade de reconhecer que sou uma metade, a sua metade!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Francisco, meu orientador, toda minha gratidão e admiração. Levarei sempre comigo seu exemplo de honestidade e generosidade, a paixão que dedica ao seu trabalho e a forma como conquista o respeito e a admiração de todos a sua volta. Mais do que respostas, você pediu perguntas... Mais do que ensinar o que fazer, você ensinou por que fazer... Foi um grande privilégio conviver com você durante esses anos!

À Professora Marie, pelos ensinamentos, paciência, atenção e carinho. Aos Professores Luiz, Andréa e Fátima, pela colaboração, afeto e momentos de descontração. À Cristina, por todo seu apoio, carinho e colaboração. À Rilva, pelos valiosos ensinamentos, paciência e exemplo de profissionalismo.

À querida amiga Karime, por todo o carinho, colaboração e apoio. Pela combinação perfeita de meiguice e força. Sua amizade foi um grande presente! Às amigas Dani, Vivi, Rut e Adriana, pelo apoio, companheirismo e motivação; pelos sorrisos e pelo carinho. Ao amigo Luciano, pelo apoio, carinho e preocupação; pela presença confortante; pelo exemplo de dedicação e determinação. Aos amigos Rani e Gustavo, pelo apoio paciente, pela disponibilidade e pelo exemplo de seriedade, tranquilidade e inteligência. Às amigas Juana, Sílvia, Cíntia e Layana, pelo carinho e pela alegria contagiante que deu colorido aos nossos dias!

Aos eternos Professores, Dra. Luciana, Dr. Augusto, Dr. Luiz Augusto, Dra. Mônica, Dra. Fátima e Dra. Adriana, pelos exemplos de capacidade, determinação, generosidade e trabalho em equipe. À amiga Monalisa, pelo companheirismo e generosidade. À Miza, Ana Rachel, Érica, Rodrigo, Ingrid e Aline, pela motivação que sua juventude e comprometimento representaram.

PREFÁCIO

A identificação dos receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs) como reguladores-chave do metabolismo energético e da resposta inflamatória tornou esses receptores alvos farmacológicos promissores na última década. Há hoje indícios de que a modulação farmacológica da atividade dos PPARs por ligantes com características químicas diversas resulta em efeitos metabólicos favoráveis em modelos animais de resistência insulínica e dislipidemia. Entretanto, a segurança de ligantes de PPARs utilizados atualmente na prática clínica, e também de ligantes em estudos pré-clínicos e clínicos, vem sendo questionada.

A ativação do PPAR α pelos fibratos no tratamento da hipertrigliceridemia está associada a miopatia e rabdomiólise, aumento da concentração plasmática de homocisteína e creatinina, colelitíase e distúrbios gastrointestinais. A ativação do PPAR γ pelas tiazolidinedionas (TZDs), utilizadas como sensibilizadores insulínicos no tratamento do *diabetes mellitus* tipo 2, é limitada por ganho ponderal, retenção hídrica, toxicidade cardiovascular e perda de massa óssea, e uma preocupação adicional é seu potencial de carcinogenicidade observado em roedores. Assim, o desenvolvimento de novos agonistas de PPAR que mantenham os efeitos benéficos da ativação desses receptores e não apresentem os efeitos desfavoráveis documentados em estudos pré-clínicos e clínicos é um dos principais focos de pesquisa em PPARs.

Desde a aprovação do uso clínico das TZDs, mais de 50 compostos foram registrados como ligantes de PPAR no FDA (*Food and Drug Administration*), e nenhum deles chegou à prática clínica. Embora esses compostos compartilhem efeitos adversos, o motivo para a descontinuação de estudos pré-clínicos e clínicos em todos os casos foi composto-específico. O mecanismo desses efeitos desfavoráveis não está completamente caracterizado, e é possível que envolva vias independentes da ativação dos PPARs pelos ligantes estudados.

Nesse cenário, o desenvolvimento de novos agonistas de PPAR como potenciais agentes terapêuticos em doenças metabólicas humanas é um desafio. A

ampliação dos conhecimentos sobre o papel fisiológico dos PPARs e sobre as características dos agonistas atualmente disponíveis tem aumentado os questionamentos sobre como o receptor poderia ser mais bem explorado no tratamento de doenças metabólicas e inflamatórias, de modo a se evitarem os efeitos desfavoráveis de sua ativação suprafisiológica, ou mesmo os efeitos deletérios de alguns ligantes que possivelmente não sejam mediados pela ativação desses receptores. Com isso, o conceito de “ligante seguro” de PPAR vem sendo modificado consideravelmente, embora ainda seja necessário compreender melhor as vias moleculares que originam os efeitos desfavoráveis da ativação desses receptores, determinar a forma mais adequada de se investigarem essas vias e, também, caracterizar melhor efeitos aparentemente independentes da ativação de PPARs observados com ligantes atualmente disponíveis.

Novos ligantes de PPAR podem também representar instrumentos químicos valiosos para melhorar a compreensão do papel biológico dos PPARs. Ligantes sintéticos têm sido utilizados não apenas para identificar receptores nucleares, mas também para compreender melhor seu papel biológico. Essa estratégia, denominada “endocrinologia reversa”, resultou na identificação de vias de sinalização previamente não conhecidas e com implicações fisiológicas e farmacológicas importantes.

Com o objetivo de identificar novos ligantes de PPARs, foram realizados dois estudos em que foram investigados potenciais ligantes sintéticos e também naturais. O primeiro estudo foi realizado em colaboração com o Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, com o objetivo de identificar novos ligantes sintéticos de PPAR γ . Diversos compostos derivados da 5-benzilideno-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona e da 3-benzil-5-acridinilideno-tiazolidina-2,4-diona foram investigados quanto à sua atividade agonista em PPAR γ , por meio de ensaios de gene repórter em pró-monócitos humanos U-937. Um deles, GQ-16, apresentou atividade agonista nesses ensaios e foi então caracterizado como um ligante de PPAR γ por meio de estudos *in vitro* e em cultura de células. O GQ-16, diferentemente das TZDs clássicas, apresentou atividade agonista parcial e específica em PPAR γ , competiu pela ligação ao LBD do PPAR γ , embora com menor

afinidade que a rosiglitazona e, em concordância com seu efeito agonista, induziu a interação entre o PPAR γ e o coativador SRC-1. O GQ-16 também apresentou potencial adipogênico em cultura de células, embora inferior ao da rosiglitazona em alguns modelos de adipogênese *in vitro*. De forma inesperada diante de sua atividade agonista parcial, o GQ-16 não antagonizou os efeitos da rosiglitazona sobre a atividade transcricional do PPAR γ ou adipogênese.

No segundo estudo, como parte da linha de pesquisa do Laboratório de Farmacologia Molecular que envolve a avaliação da atividade farmacológica de compostos naturais nos PPARs, foi investigado o efeito de uma fração metanólica de sementes e da casca de soja sobre a atividade transcricional do PPAR α , $-\beta/\delta$ e $-\gamma$. Esse trabalho foi realizado em conjunto com pesquisadores da Universidade Estadual de Maringá e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Nossa participação consistiu na realização dos ensaios de transativação dos PPARs em pró-monócitos humanos U-937. Esse trabalho foi submetido para publicação no *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, e por esse motivo será apresentado somente sob a forma de manuscrito.

Estudos envolvendo modelos animais de obesidade e resistência insulínica indicam que a ingestão de proteína de soja apresenta efeitos favoráveis sobre a sensibilidade insulínica, perfil lipídico e peso corporal. Estudos observacionais também sugerem efeitos benéficos da ingestão de soja sobre o perfil lipídico em humanos. Entretanto, os componentes efetivos da proteína da soja e os mecanismos envolvidos em seus efeitos metabólicos favoráveis não estão completamente definidos. Há dados sugestivos de que as isoflavonas, um dos componentes da soja, podem influenciar o metabolismo lipídico por modular a atividade de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes envolvidos em síntese e catabolismo de lipídeos, entre eles os PPARs, o receptor X hepático e a proteína 1 ligadora do elemento regulador de esterol (SREBP1). Em estudos *in vivo* as isoflavonas de soja apresentam efeitos metabólicos semelhantes aos dos fibratos e das TZDs, agonistas do PPAR α e $-\gamma$, respectivamente, e estudos em culturas de células indicam que as isoflavonas induzem a atividade transcricional desses isotipos de PPAR. Até o momento, no entanto, não foi descrita atividade

agonista das isoflavonas no PPAR β/δ . Nesse trabalho, foi identificada atividade agonista da fração metanólica da semente da soja no PPAR β/δ , por meio de ensaios de gene repórter. A indução da atividade transcricional do receptor por essa fração rica em isoflavonas foi comparável à indução pelo bezafibrato, um ligante sintético com atividade agonista conhecida em PPAR β/δ . Embora o significado fisiológico da ativação desse isotipo de PPAR por componentes da soja não tenha sido explorado, é possível que contribua para os efeitos metabólicos favoráveis das isoflavonas de soja observados em estudos pré-clínicos, particularmente sobre o peso corporal e colesterol HDL, estes últimos classicamente atribuídos à ativação do receptor estrogênico por esses compostos.

SUMÁRIO

PREFÁCIO	iv
LISTA DE SIGLAS	xii
PARTE 1	1
Investigação da atividade farmacológica de benzilideno- e acridinilideno- tiazolidinedionas no receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais	
RESUMO	2
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO	4
2 REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 Superfamília dos receptores nucleares	7
2.2 Receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPAR)	9
2.2.1 Regulação transcricional positiva ou transativação dependente de li- gante	9
2.2.2 Regulação transcricional negativa	11
2.2.3 Características estruturais do domínio de ligação ao ligante	14
2.2.4 Ligantes endógenos	15
2.2.5 Distribuição tecidual e função fisiológica	16
2.2.5.1 Receptor alfa ativado por proliferadores peroxissomais alfa (PPAR α)	17
2.2.5.2 Receptor beta/delta ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR β/δ)	18

2.2.5.3 Receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR γ) .	19
A) Efeitos metabólicos	20
B) Efeitos vasculares	25
2.3 Ligantes de PPAR e doenças metabólicas humanas: dificuldades e perspectivas	25
2.3.1 Ativação dos PPARs por agonistas sintéticos	26
2.3.1.1 PPAR α	26
2.3.1.2 PPAR β/δ	27
2.3.1.3 PPAR γ	28
2.3.1.4 Tiazolidinedionas, ganho ponderal e adipogênese	29
2.3.1.5 Tiazolidinedionas e aparelho cardiovascular	29
A) Retenção hídrica e insuficiência cardíaca	30
B) Eventos cardiovasculares	30
2.3.1.6 Tiazolidinedionas e homeostase esquelética	33
2.3.1.7 Ativação dos PPARs e carcinogênese	35
2.3.1.8 Novos ligantes de PPAR	36
A) Agonistas duplos e panagonistas de PPAR	37
B) Moduladores seletivos do PPAR	38
3 OBJETIVO	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Material	41
4.2 Plasmídeos	41
4.3 Cultura de células	42

4.4 Ensaio de transativação (transfecção transitória e ensaio de gene repórter)	43
4.5 Ensaio de ligação	45
4.6 Ensaio de proteção contra digestão por protease	47
4.7 Ensaio de interação proteína-proteína (ensaio “ <i>GST pull-down</i> ”)	47
4.8 Ensaio de diferenciação de adipócitos	49
4.8.1 Coloração por óleo vermelho O	51
4.8.2 Expressão da proteína ligadora de ácidos graxos (análise por <i>western blotting</i>)	51
4.9 Análise estatística	52
5 RESULTADOS	53
5.1 Investigação da atividade de benzilideno- e acridinilideno-tiazolidinedionas sintéticas em PPAR γ	53
5.2 O GQ-16 é uma agonista parcial e seletivo do PPAR γ	54
5.3 O GQ-16 não apresenta atividade antagonista em PPAR γ	57
5.4 O GQ-16 se liga ao LBD do PPAR γ com baixa afinidade	60
5.5 O GQ-16 induz padrão proteolítico do PPAR γ semelhante ao induzido pela rosiglitazona	61
5.6 O GQ-16 induz a interação do PPAR γ com o coativador SRC-1	63
5.7. Efeitos do GQ-16 sobre a adipogênese em cultura de células	64
6 DISCUSSÃO	68
6.1 Atividade agonista parcial e específica do GQ-16 em PPAR γ	69
6.2 Base molecular da atividade agonista do GQ-16 em PPAR γ	73
6.3 Atividade agonista do GQ-16 em contexto biológico	76
6.4 Comportamento discordante do GQ-16 em estudos <i>in vitro</i> e em cultura de células	76
6.5 É possível prever a atividade do GQ-16 <i>in vivo</i> ?	78

7 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS	83
ANEXO I	100
PARTE 2 (ANEXO II)	104
Investigação da atividade farmacológica de isoflavonas de soja nos receptores alfa, beta/delta e gama ativados por proliferadores peroxissomais	

LISTA DE SIGLAS

β -gal	- β -galactosidase
AF-1	- função de ativação 1
AF-2	- função de ativação 2
AG	- ácido graxo
AP-1	- proteína ativadora 1
BCL-6	- repressor transcricional 6 de linfoma B
C/EBP	- proteína de ligação ao amplificador CCAAT
DBD	- domínio de ligação ao DNA
DM2	- <i>diabetes mellitus</i> tipo 2
DMSO	- dimetilsulfóxido
DR-1	- repetições diretas da sequência consenso AGGTCA separadas por um único nucleotídeo
DR1-TK-LUC	- construção contendo o gene repórter luciferase dirigido pelo promotor mínimo da quinase de timidina do vírus herpes simples e pela sequência DR-1
FABP	- proteína ligadora de ácidos graxos
FABP-A ou aP2	- proteína adipocitária ligadora de ácidos graxos ou
FNT- α	- fator de necrose tumoral alfa
GAL4	- fator de transcrição de leveduras
GST	- glutationa-S-transferase
GST-SRC-1	- glutationa-S-transferase fusionada ao coativador 1 de receptor esteroideal
HAS	- hipertensão arterial sistêmica
HDAC	- desacetilases de histonas
HDL	- lipoproteína de densidade alta
His-LBD-PPAR γ	- domínio de ligação ao ligante do PPAR γ com cauda polihistidina
HRE	- elementos responsivos a hormônio
IBMX	- isometilbutilxantina
IC	- insuficiência cardíaca

IL-6	- interleucina 6
K_d	- constante de dissociação
K_i	- constante de inibição
LBD	- domínio de ligação ao ligante
LDL	- lipoproteína de densidade baixa
LPL	- lipase lipoprotéica
LXR	- receptor hepático X (<i>liver X receptor</i>)
NCor	- correpressor de receptores nucleares
NFAT	- fator nuclear de células T ativadas
NF-kB	- fator nuclear kapa B
PPAR	- receptor ativado por proliferador peroxissomal
PPAR α	- receptor alfa ativado por proliferador peroxissomal
PPAR γ	- receptor gama ativado por proliferador peroxissomal
PPAR $\beta\delta$	- receptor beta/delta ativado por proliferador peroxissomal
<i>PPARG</i>	- gene que codifica o PPAR γ
PPRE	- elemento responsivo ao PPAR
RN	- receptor nuclear
RXR	- receptor do ácido 9-cis retinóico (<i>retinoid X receptor</i>)
SMTR	- mediador do silenciamento de receptor retinóide X e receptor de hormônio tireoidiano
SRC-1	- coativador 1 de receptor esteroideal (<i>steroid receptor coactivator 1</i>)
STAT	- transdutores de sinal e ativadores da transcrição
TZD	- tiazolidinediona
UAS	- elemento responsivo ao fator de transcrição GAL4 (<i>upstream activating sequence</i>)
VLDL	- lipoproteína de densidade muito baixa

PARTE 1

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE BENZILIDENO- E ACRIDINILIDENO-TIAZOLIDINEDIONAS NO RECEPTOR GAMA ATIVADO POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAS

RESUMO

As tiazolidinedionas (TZDs) melhoram a sensibilidade insulínica e a homeostase da glicose em diversos modelos animais de obesidade e diabetes, e também em humanos. Esses benefícios são atribuídos, em grande parte, aos efeitos antiinflamatórios da ativação do receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR γ). No entanto, a utilização clínica das TZDs é limitada por retenção hídrica, ganho ponderal e adipogênese, e recentemente tem sido relacionada a aumento da mortalidade cardiovascular e perda de massa óssea. O mecanismo desses efeitos não é completamente definido, mas acredita-se que possa envolver ativação suprafisiológica do PPAR γ , e até mesmo ações independentes da ativação do PPAR γ pelas TZDs. Essas limitações aumentaram o interesse pela identificação de ligantes de PPAR γ que mantenham os efeitos antiinflamatórios benéficos da ativação do receptor, sem os efeitos desfavoráveis das TZDs. Acredita-se que a ativação parcial e específica do PPAR γ , assim como sua modulação diferencial em tecidos distintos, possa ser mais efetiva e segura que a ativação completa e não seletiva pelas TZDs. Com o objetivo de identificar novos ligantes de PPAR γ , diversas benzilideno- e acridinilideno-TZDs sintéticas foram investigadas quanto à atividade agonista em PPAR por meio de ensaios de gene repórter em pró-monócitos humanos U-937. Somente o GQ-16 induziu a atividade transcricional do PPAR γ , e apresentou características de agonista parcial do receptor. Esse composto não ativou PPAR α , δ ou RXR α , nem antagonizou a atividade transcricional do PPAR γ induzida pela rosiglitazona. Estudos *in vitro* mostraram que o GQ-16 se ligou diretamente ao domínio de ligação ao ligante do PPAR γ , com menor afinidade que a rosiglitazona e que, em concordância com seu efeito agonista, induziu a interação entre o PPAR γ e o coativador SRC-1. O GQ-16 também foi capaz de induzir a adipogênese em cultura de células, embora em menor intensidade que a rosiglitazona. Esses resultados indicam que o GQ-16 é um agonista parcial e seletivo do PPAR γ e apresenta menor potencial adipogênico, características que o distinguem das TZDs clássicas. As possíveis vantagens dessas características devem ser confirmadas por estudos *in vivo*. Além disso, a definição do modo de ligação do GQ-16 ao PPAR γ por estudos cristalográficos poderia contribuir para melhor compreensão dos determinantes da especificidade da ligação de ligantes entre os diferentes isotipos de PPARs e, assim, para o desenvolvimento de agonistas específicos de PPAR γ , possivelmente com efeitos mais favoráveis que os das TZDs clássicas.

Palavras-chave: receptores ativados por proliferadores peroxissomais. Agonista parcial. GQ-16.

ABSTRACT

Thiazolidinediones (TZDs) can improve whole body insulin sensitivity and ameliorate glucose metabolism in many animal models of obesity and diabetes, and also in humans. These beneficial effects are largely attributed to the anti-inflammatory actions of activated peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). Despite the established therapeutic value of TZDs, their clinical use is limited by fluid retention, weight gain and adipogenesis, and more recently these agents have been associated with increased cardiovascular mortality and bone loss. The mechanisms underlying these deleterious effects are not yet clear, but may be related to supraphysiological activation of PPAR γ , and also to PPAR γ independent actions of TZDs. These concerns have increased the interest for ligands which maintain the beneficial metabolic and anti-inflammatory effects of PPAR γ activation but mitigate the documented unfavorable effects of TZDs. There is evidence that partial and specific activation of PPAR γ , and also its selective modulation in different tissues, might be more effective and safe, in contrast to full and nonspecific activation by TZDs. Aiming to identify novel PPAR γ ligands, several synthetic benzilidene and acridinylidene TZDs were screened for PPAR agonist activity using reporter gene assay in U-937 human pro-monocytes. GQ-16 was the only novel TZD found to have agonist activity on PPAR γ , and displayed features of a partial agonist. It did not activate PPAR α , - δ or RXR α , neither influenced PPAR γ transcriptional activity induced by rosiglitazone. Competition assays showed GQ-16 bound directly to the ligand binding domain of PPAR γ with reduced affinity when compared to rosiglitazone. In support of GQ-16 agonist effect on PPAR γ transcriptional activity, glutathione-S-transferase pull-down experiments showed it induced the interaction between PPAR γ and SRC-1. The adipogenic potential of GQ-16 was less pronounced than that of rosiglitazone. Collectively, these results indicate GQ16 is a partial and specific agonist for PPAR γ with reduced adipogenic potential. These features differentiate this novel compound from TZDs currently used in clinical practice, and its potential therapeutic advantages should be confirmed by *in vivo* studies. In addition, although the exact binding mode of GQ-16 to PPAR γ still requires the resolution of a crystal structure, these results could provide insights into the determinants of ligand binding selectivity between PPAR γ and the other PPAR isotypes, and hence contribute to the development of new PPAR γ -selective ligands with improved specificity and metabolic effects.

Key words: peroxisome proliferator-activated receptors. Partial agonist. GQ-16.

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica, de fisiopatologia complexa e incompletamente compreendida, e representa hoje um importante problema de saúde individual e populacional. Isso decorre não apenas do aumento global de sua incidência, em proporções epidêmicas ¹, mas também das várias condições a ela associadas, incluindo o *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), a dislipidemia e a hipertensão arterial sistêmica (HAS). Cada uma dessas doenças, por sua vez, associa-se a aumento do risco de aterosclerose e doença cardiovascular, as principais causas de mortalidade em vários países ¹.

O DM2 é considerado a doença mais importante associada à obesidade, também por sua elevada frequência e pela morbimortalidade que determina. A prevalência global de DM2 foi estimada em 171 milhões em 2000, e as expectativas são de aumento para 336 milhões de casos em 2030 ². O mecanismo compartilhado entre a obesidade e o DM2, que explica a associação entre essas condições, é a resistência insulínica ³. A maior parte dos indivíduos obesos e com resistência insulínica, contudo, não desenvolve DM2. Para que a obesidade e a resistência insulínica se associem ao DM2, é necessário haver também disfunção de células beta pancreáticas, com conseqüente incapacidade de compensação da resistência insulínica ⁴.

A interação entre obesidade, resistência insulínica e disfunção de células beta tem sido amplamente estudada. A compreensão da base fisiopatológica desses processos representa uma importante fonte de conhecimentos para sua abordagem terapêutica racional e eficaz. Embora haja muito para ser compreendido, essa interação reflete o fato de o tecido adiposo não ser um simples depósito para armazenamento de lipídeos, mas um tecido dinâmico que interage continuamente com outros tecidos críticos para a regulação do metabolismo energético e homeostase da glicose, entre eles fígado, músculo esquelético e centros reguladores do apetite ⁵. Entre os diversos conhecimentos originados do estudo da relação entre tecido adiposo e metabolismo energético, está a identificação dos receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs) como determinantes críticos de integração metabólica dos diversos tecidos ⁵.

Os PPARs são membros da superfamília de receptores nucleares (RN) que atuam como fatores de transcrição regulados por ligantes. São ativados por ácidos graxos (AG) dietéticos e seus metabólitos, e considerados sensores lipídicos capazes de modular processos críticos para a homeostase energética. Três isotipos de PPAR ($-\alpha$, $-\beta/\delta$ e $-\gamma$) são identificados em tecidos de mamíferos e sua importância em condições fisiológicas e patológicas é amplamente reconhecida. A identificação do PPAR α como alvo molecular dos hipolipemiantes da classe dos fibratos, e do PPAR γ como alvo das tiazolidinedionas (TZDs), utilizadas como sensibilizadores insulínicos no tratamento do DM2, aumentou o interesse por esses receptores como potenciais alvos farmacológicos para o tratamento de doenças metabólicas humanas⁵.

A ativação do PPAR γ pelas TZDs melhora a sensibilidade insulínica principalmente no tecido adiposo, e também no músculo esquelético e fígado. Esse efeito não é completamente compreendido, mas parece ser mediado (i) pelo aumento da captação e armazenamento de AG livres pelo tecido adiposo⁶; (ii) pela inibição da secreção de citocinas inflamatórias que induzem resistência insulínica no fígado e músculo esquelético⁷; e (iii) pelo aumento da produção de adiponectina, um produto secretório do adipócito com atividade sensibilizadora de insulina⁸. Há indícios de que as TZDs também apresentem ações independentes da ativação do PPAR γ ⁵.

A utilização clínica das TZDs, no entanto, tem sido associada a retenção hídrica, ganho ponderal e adipogênese e, mais recentemente, a aumento da mortalidade cardiovascular⁹ e perda de massa óssea^{10, 11}. Os mecanismos determinantes do aumento da mortalidade cardiovascular associado a esses agentes não são claros, mas uma possibilidade é que estejam relacionados à especificidade da ativação dos PPARs. O muraglitazar, uma TZD com atividade agonista em PPAR α e $-\gamma$, foi também associado a aumento da incidência de eventos cardiovasculares, entre eles o infarto agudo do miocárdio¹². As TZDs pioglitazona e rosiglitazona, consideradas classicamente agonistas seletivos de PPAR γ ¹³ e utilizadas como sensibilizadores insulínicos, atuam de fato como agonistas dos três isotipos de PPAR^{14, 15}. A perda de massa óssea relacionada ao uso das TZDs também não é completamente compreendida, mas parece estar relacionada ao

direcionamento de células estromais na medula óssea para o comprometimento com a linhagem adipocitária, em detrimento da linhagem osteoblástica ¹⁶.

A ampla utilização clínica das TZDs como sensibilizadores insulínicos e seu impacto negativo sobre o tecido ósseo e, possivelmente, sobre o aparelho cardiovascular apontam para a necessidade de se elucidarem os mecanismos exatos de ação desses compostos, e de se compreenderem melhor os efeitos da ativação do PPAR γ nos diversos tecidos em que é expresso. O estudo do mecanismo molecular envolvido no efeito de diferentes ligantes do receptor representa uma importante estratégia para a ampliação dos conhecimentos sobre a biologia dos PPARs.

A proposta desse estudo foi investigar a atividade agonista de novas benzilideno- e acridinilideno-TZDs sintéticas em PPARs. Entre as várias TZDs sintéticas testadas, apenas uma delas, o GQ-16, apresentou atividade agonista em PPAR γ , e suas propriedades funcionais foram caracterizadas por meio de estudos *in vitro* e em cultura de células.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Superfamília dos receptores nucleares

Os PPARs pertencem à superfamília de RN, que atuam como fatores de transcrição regulados por ligantes. São importantes para praticamente todos os processos fisiológicos de mamíferos, incluindo o crescimento, desenvolvimento, reprodução, resposta imunitária, função vascular, depuração de toxinas e metabolismo energético ¹⁷.

Os RN são definidos por uma organização estrutural comum, caracterizada por domínios funcionais (**figura 2.1**), entre eles a região amino-terminal (domínio A/B), o domínio de ligação ao DNA (DBD, domínio C), a região de dobradiça (*hinge*, domínio D), a região carboxi-terminal ou domínio de ligação ao ligante (LBD, domínio E) e, em alguns RN, o domínio F ¹⁸.

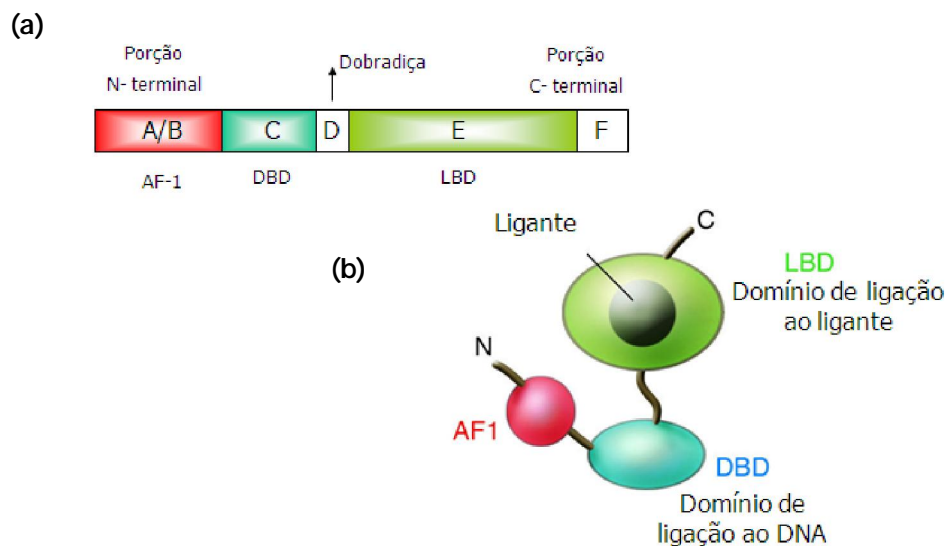


Figura 2.1. Estrutura geral dos receptores nucleares, com a representação dos domínios funcionais. (a) Estrutura primária, com a representação da região amino-terminal (domínio A/B, em que se encontra o domínio função de ativação 1 ou AF-1, implicado na transativação independente do ligante), domínio de ligação ao DNA (DBD, domínio C), região de dobradiça (*hinge*, domínio D), região carboxi-terminal ou domínio de ligação ao ligante (LBD, domínio E), e domínio F. (b) Estrutura secundária, com a representação das regiões amino (N) e carboxi-terminais (C), AF-1, DBD e LBD ¹⁹.

A região amino-terminal contém um domínio de ativação independente do ligante, denominado função de ativação 1 (AF-1), e seu comprimento é altamente variável entre os diversos RN. A região central, ou DBD, é a mais conservada e apresenta dois segmentos estruturais conhecidos como “dedos de zinco”. O DBD determina a ligação do RN a regiões específicas de DNA que contêm a sequência hexanucleotídica AGGTCA, denominadas elementos responsivos ao hormônio (HRE). O domínio D, entre o DBD e o LBD, é uma região menos conservada, que se comporta como uma dobradiça e confere flexibilidade estrutural ao receptor, o que permite que sua dimerização com outro RN e ligação ao DNA ocorram simultaneamente. A região carboxi-terminal ou domínio E contém o LBD, que reconhece ligantes hormonais e não hormonais específicos e determina, assim, a especificidade da resposta aos ligantes²⁰. Essa região é responsável por diversas funções dos RN, a maioria delas induzida por ligantes, como a função de ativação 2 (AF-2), dimerização e interação com cofatores da transcrição¹⁷. Alguns RN contêm também um domínio na extremidade carboxi-terminal, conhecido como domínio F, com estrutura e função não conhecidas¹⁸.

A superfamília de RN, em humanos, é composta por 48 membros²¹, classificados em 3 subgrupos de acordo com a natureza de seus ligantes endógenos e com suas potenciais funções fisiológicas: os receptores endócrinos, receptores órfãos adotados e receptores órfãos verdadeiros¹⁷.

Os receptores endócrinos apresentam alta afinidade por hormônios lipossolúveis e vitaminas, e entre eles estão os receptores de hormônios esteroidais, de hormônio tireoideano e de vitaminas A e D¹⁷. A organização estrutural comum e a homologia de sequência dos RN possibilitaram a identificação de receptores sem ligantes endógenos conhecidos, ou receptores órfãos¹⁸. Com a identificação subsequente de ligantes endógenos para alguns desses receptores, eles passaram a ser conhecidos como receptores órfãos adotados. Esse subgrupo inclui o receptor do ácido 9-cis retinóico (RXR), os PPARs α , β e γ , receptor hepático X (LXR), receptor farsenóide X, receptor pregnano X e os receptores órfãos enigmáticos. Estes últimos são receptores cujo ligante já foi identificado, porém o papel de sua regulação dependente de ligantes para processos fisiológicos não foi definida. Eles incluem o os receptores relacionados ao estrogênio β e γ , receptor órfão relacionado ao retinóide α e β , receptor constitutivo de androstenona, fator

esteroidogênico 1, o receptor hepático homólogo 1 e o fator nuclear hepatocitário 4 α ¹⁷.

O terceiro subgrupo compreende os receptores órfãos verdadeiros, cujo ligante ainda não foi identificado. É possível que não sejam regulados por ligantes, e sim pelo nível de sua própria expressão, por modificações covalentes em sua estrutura, ou ainda pela disponibilidade de correguladores¹⁷.

2.2 Receptores ativados por proliferadores peroxissomais

Os PPARs incluem 3 membros ou isotipos, PPAR α , - β/δ e - γ , cada um codificado por um gene distinto²². Sua denominação é resultado da identificação do primeiro isotipo clonado, o PPAR α , como alvo de compostos xenobióticos que induzem proliferação de peroxissomos hepáticos em roedores²³.

Como outros RN, os PPARs modulam a expressão gênica de três formas clássicas: repressão basal, transativação e transrepressão da transcrição¹⁸.

2.2.1 Regulação transcricional positiva ou transativação dependente de ligante

Os PPARs ativam a expressão gênica como heterodímeros com outro RN, o RXR¹⁷, que pode se formar mesmo na ausência de um ligante²⁴. O heterodímero PPAR-RXR se liga a sequências específicas de DNA localizadas na região regulatória ou promotora de genes-alvo, conhecidas como elementos responsivos ao PPAR (PPREs), e, quando ativado por agonistas, estimula a transcrição gênica²⁵.

Os PPREs conhecidos são repetições diretas da sequência consenso AGGTCA separadas por um único nucleotídeo espaçador, referido como DR-1 (**figura 2.2**)²⁵, e estão presentes em uma ou várias cópias no promotor de genes-alvo²⁴. O PPAR e RXR se ligam à extremidade 5' e 3' do PPRE, respectivamente, e uma pequena sequência de nucleotídeos localizada imediatamente à montante da primeira sequência AGGTCA confere essa polaridade²⁶.

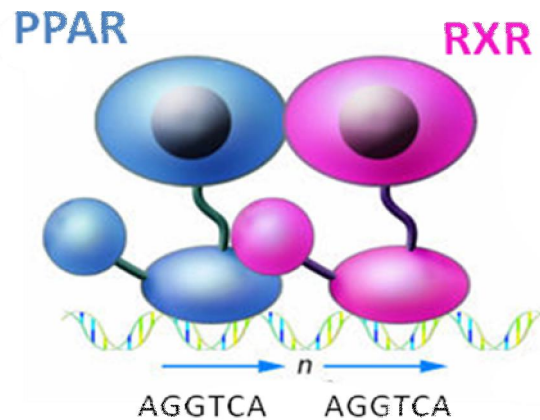


Figura 2.2. Heterodímeros PPAR-RXR se ligam a sequências específicas de DNA no promotor de genes-alvo. Essas sequências, denominadas DR-1, são constituídas de repetições diretas da sequência consenso AGGTCA separadas por um único nucleotídeo espaçador (n)¹⁹.

Não é ainda definido como alvos específicos de cada isotipo de PPAR são regulados, considerando que muitas células expressam mais de um dos três isotipos, e o PPRE é comum a eles. É possível que isso seja resultado de diferenças entre a expressão de cada um deles e do RXR em diferentes células, de diferenças entre suas afinidades por um PPRE em um promotor específico, da presença de correpressores específicos, ou mesmo de características dos ligantes endógenos²².

Na ausência do ligante, o heterodímero PPAR-RXR está constitutivamente ligado ao PPRE, e associado a proteínas correpressoras, como o correpressor de RN (NCoR), o mediador do silenciamento de RXR e receptor de hormônio tireoidiano (SMRT), e as desacetilases de histonas (HDAC). Essas proteínas mantêm a cromatina em sua forma enovelada, o que impede o recrutamento da maquinaria de início da transcrição e resulta em repressão ativa da transcrição gênica, denominada repressão basal²⁷. A ligação de um agonista ao receptor altera sua conformação, e isso permite a dissociação coordenada dos correpressores e a associação com proteínas coativadoras, com atividade de acetilase de histonas. A acetilação de histonas resulta em modificação da estrutura da cromatina, que facilita o recrutamento da maquinaria de transcrição para o promotor do gene-alvo e, assim, o início da transcrição gênica (figura 2.3)²⁸⁻³⁰. Dessa forma, em genes regulados positivamente pelos PPARs, a ligação de agonista total resulta em modificação do estado de repressão basal para a ativação transcricional³¹. A ligação de um

agonista parcial determina interação menos eficaz do heterodímero PPAR-RXR com proteínas coativadoras e, assim, em ativação transcricional menos eficaz³⁰.

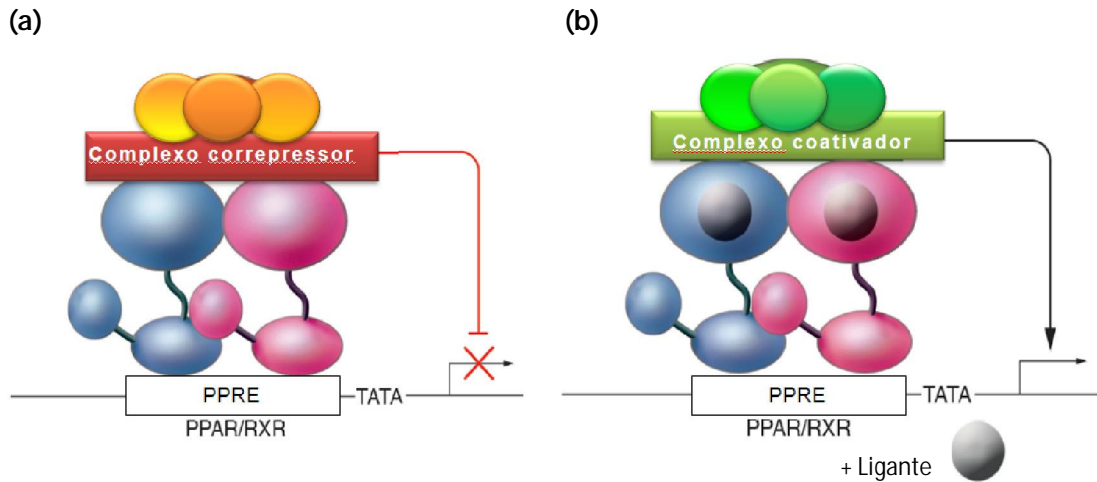


Figura 2.3. Regulação positiva da transcrição gênica, ou transativação dependente do ligante. Na ausência do ligante (a), o heterodímero PPAR-RXR é capaz de se ligar aos elementos responsivos no DNA (RE), recrutar proteínas do complexo corressor e, assim, reprimir a transcrição de genes-alvo. A alteração conformacional do receptor promovida pela ligação do ligante (b) determina dissociação de proteínas corressoras, recrutamento de coativadores, interação com a maquinaria de transcrição basal da célula e, assim, ativação da transcrição de genes regulados positivamente pelo PPAR ativado¹⁹.

Entre os genes regulados positivamente pelos PPARs, incluem-se aqueles envolvidos no controle do metabolismo energético em diversos tecidos, como o tecido adiposo, o músculo esquelético e o fígado²⁸.

2.2.2 Regulação transcricional negativa

Os PPARs também podem influenciar negativamente a expressão gênica, por mecanismos dependentes ou independentes da presença do ligante (figura 2.4).

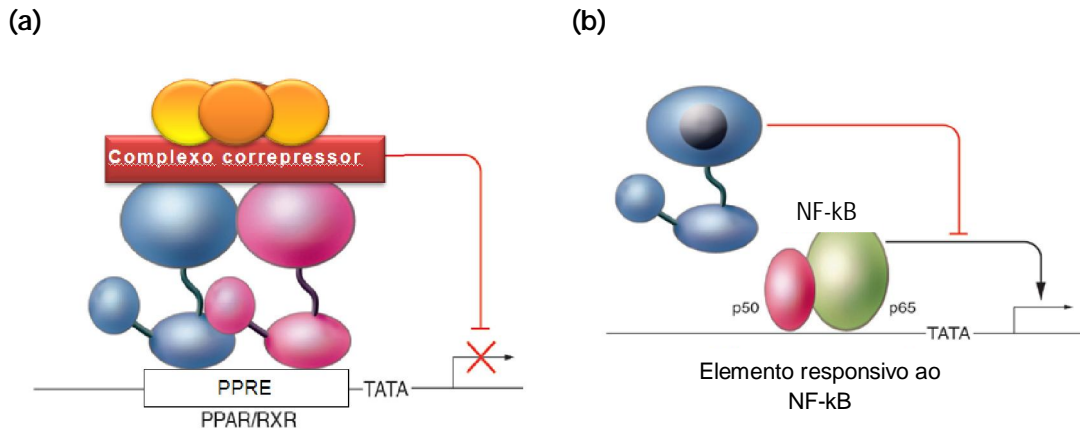


Figura 2.4. Mecanismos de regulação negativa da expressão gênica pelos PPARs. (a) Repressão transcricional ativa na ausência do ligante. (b) Transrepressão dependente ligante, caracterizada pela atividade antagonista do PPAR γ ativado sobre a estimulação da expressão gênica por outros fatores de transcrição, como o fator nuclear kapa B (NF-kB)¹⁹.

A repressão da expressão gênica independente do ligante, ou repressão basal, envolve a ligação dos PPARs aos PPREs no promotor de genes-alvo e a associação de proteínas corpressoras com atividade de desacetilase de histonas, que impedem o recrutamento da maquinaria de início da transcrição para o promotor gênico³¹. Na presença do ligante, como comentado anteriormente, as alterações conformacionais no LBD do receptor resultam em redução de sua afinidade por corressores, interação com coativadores e com a maquinaria de transcrição basal. Assim, o estado de repressão basal é modificado para ativação da transcrição gênica³².

Diferentemente da ativação e da repressão basal da transcrição gênica pelos PPARs, a transrepressão não envolve a ligação direta do receptor a elementos responsivos no DNA³³. Essa atividade dos PPARs não é completamente compreendida²⁸, e diversos mecanismos são propostos para explicá-la, entre eles a inibição da ação de outros fatores de transcrição que estimulam a expressão de genes da resposta inflamatória, como o fator nuclear kB (NF-kB), a proteína ativadora 1 (AP-1), os transdutores de sinal e ativadores da transcrição (STATs) e o fator nuclear de células T ativadas (NFAT). Nesse modelo, a interação direta entre os PPARs ativados e esses fatores de transcrição inibiria sua ligação aos elementos responsivos no promotor de genes-alvo e, assim, resultaria em redução da transcrição desses genes²⁸. A regulação negativa da expressão gênica é a forma

com que os PPARs reprimem a transcrição de genes que codificam proteínas com atividade pró-inflamatória ²⁸, entre eles o gene que codifica o interferon gama, cuja expressão em linfócitos T é reprimida pelo PPAR γ na presença de um agonista ³⁴, e o gene que codifica o fibrinogênio, reprimido em hepatócitos pelo PPAR α ³⁵.

É possível também que a transrepressão seja resultado da competição entre os PPARs e outros fatores de transcrição por coativadores. Esse modelo está fundamentado na observação de que muitos fatores de transcrição envolvidos na ativação da resposta inflamatória requerem coativadores também necessários à modulação da expressão gênica pelos PPARs, e de que esses coativadores estão presentes em quantidades limitadas na célula. No entanto, os dados sugestivos desse mecanismo têm origem em estudos envolvendo ensaios de gene repórter, com utilização de unidades transcricionais artificiais e superexpressão de cofatores, e não são considerados evidência conclusiva de que esse mecanismo ocorra em genes endógenos, no contexto de níveis fisiológicos de correpressores ²⁸.

Há ainda dois outros mecanismos de transrepressão pelos PPARs ativados. Um deles é mediado pelo PPAR β/δ em macrófagos e envolve a associação do receptor com o repressor transcricional 6 de linfoma B (BCL-6). Na ausência do agonista, o PPAR β/δ seqüestra o BCL-6 e inibe sua atividade repressora sobre genes da resposta inflamatória, o que resulta em aumento da expressão desses genes. Na presença do agonista, o PPAR β/δ libera o BCL-6, que se liga a promotores de genes que codificam proteínas com atividade pró-inflamatória, e reprime sua transcrição ³⁶. O outro mecanismo é mediado pelo PPAR γ , também em macrófagos. Sinais inflamatórios estimulam a depuração de complexos repressores em promotores de genes da resposta inflamatória, por reações de ubiquitinação. Entretanto, a modificação conformacional do PPAR γ induzida por um agonista resulta na sumoilação do receptor, o que permite sua ligação a complexos repressores no promotor de genes inflamatórios e compromete a interação desses complexos com enzimas da ubiquitinação. Com a permanência dos complexos correpressores no promotor de genes que codificam proteínas com atividade inflamatória, ocorre a repressão de sua transcrição mesmo em presença de sinais pró-inflamatórios ³⁷.

2.2.3 Características estruturais do domínio de ligação ao ligante

Análises de cristalografia por raios-X indicam que a estrutura tridimensional do LBD dos PPARs é semelhante à de outros RN, e consiste de treze hélices alfa e quatro fitas beta^{22, 32}, que delineiam um bolso (“*pocket*”) de ligação hidrofóbico, em forma de Y, e maior que o de outros RN^{32, 38} (figura 2.5). Essa última característica pode contribuir para a capacidade de os PPARs se ligarem a uma ampla variedade de compostos lipofílicos sintéticos e naturais, com um grupamento acídico³⁸.

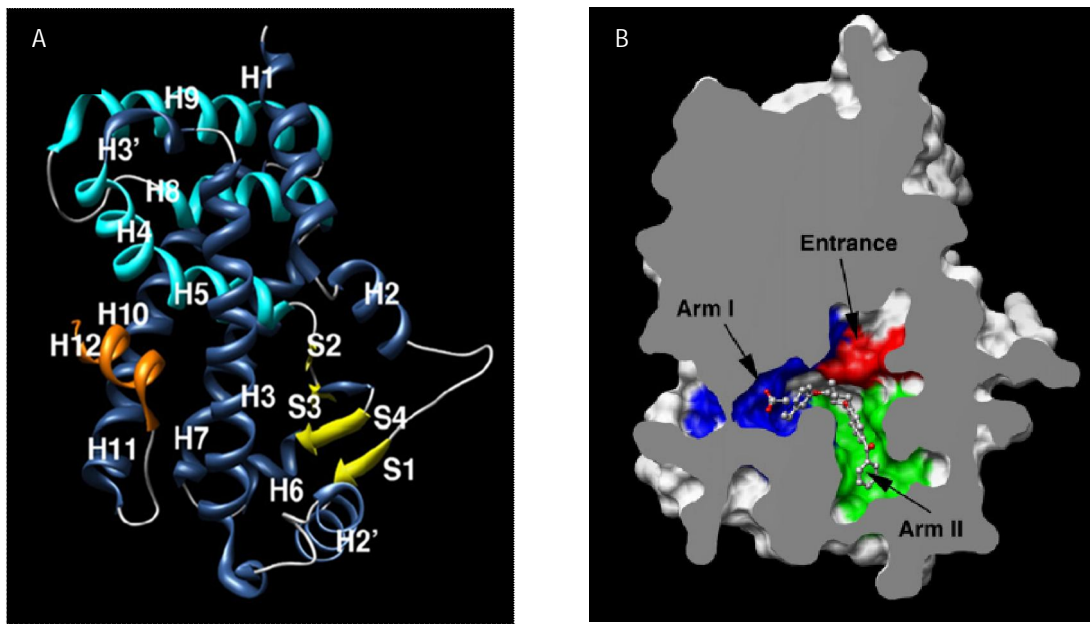


Figura 2.5. Estrutura tridimensional do LBD dos PPARs. (a) Estrutura tridimensional do PPAR α com a representação dos elementos da estrutura secundária. As hélices 4, 5, 8 e 9 são apresentadas na cor verde, a hélice 12 em laranja, as demais hélices em azul e as fitas beta em amarelo. (b) Representação da superfície do PPAR γ complexado a um derivado do ácido indolacético. Corte da proteína ao nível do centro do sítio de ligação para mostrar o formato em Y do bolso de ligação, constituído por uma entrada (*entrance*, em vermelho) que se estende a partir da superfície da proteína e origina duas ramificações (*arm I*, em azul, e *arm II*, em verde)³⁹.

Os bolsos de ligação dos PPARs α e γ são semelhantes e maiores que o do PPAR β/δ ⁴⁰. Essa diferença sugere que o tamanho do bolso de ligação poderia contribuir para a maior especificidade observada para ligantes de PPAR β/δ , e poderia também explicar o fato de um menor número de ligantes de desse isotipo ter sido descrito até o momento²². O bolso de ligação do PPAR α é significativamente mais lipofílico que o dos outros dois isotipos, e essa característica poderia contribuir

também para a especificidade da ligação ao ligante, e talvez explicar a maior capacidade de o PPAR α se ligar a AG saturados mais lipofílicos⁴⁰. Apesar dessas observações, é possível que diferenças em um único aminoácido nos bolsos de ligação dos três isotipos de PPAR sejam os principais determinantes da seletividade de um ligante por um dos isotipos do receptor²².

A hélice 12 do LBD dos PPARs contém a região de transativação dependente de ligante denominada AF-2³⁸, e é estruturalmente dinâmica. A ativação do receptor por um ligante estabiliza o LBD em uma estrutura relativamente compacta e rígida, em que a hélice 12 adquire uma conformação que promove a liberação de correpressores e o recrutamento de coativadores^{22, 41, 42}.

2.2.4 Ligantes endógenos

Uma variedade de compostos lipídicos, como ácidos graxos não saturados, espécimes lipídicos oxidados, eicosanóides e prostaglandinas ativa os PPARs, com baixa afinidade de ligação, na faixa micromolar^{25, 29, 43}. Até o momento, no entanto, não foi identificado um ligante endógeno com alta afinidade e especificidade por cada isotipo de PPAR⁴⁴.

É possível que, diferentemente dos receptores endócrinos clássicos, os PPARs não apresentem um ligante específico fisiologicamente relevante, mas respondam a lipídeos dietéticos e seus metabólitos^{22, 44}, cujos níveis não são regulados por mecanismos simples de retroalimentação negativa²⁹.

Os PPARs são, então, considerados sensores de lipídicos, cuja ativação inicia uma cascata metabólica que mantém a homeostase lipídica por meio do controle da transcrição de genes envolvidos em metabolismo, armazenamento, transporte e depuração de lipídeos²⁹.

Há uma série de vias possíveis de geração de mediadores lipídicos que ativam os PPARs, incluindo a das lipoxigenases, ciclooxigenases, citocromo P450 e lipases^{22, 45}. Diante da diversidade de condições fisiológicas e patológicas capaz de ativá-las, e da variedade de AG e seus metabólitos capaz de ativar os PPARs, tem sido difícil definir a contribuição individual de cada um desses compostos para a

biologia dos PPARs. Essa mesma variedade sugere que os PPARs estejam envolvidos em funções fisiológicas diversas, incluindo metabolismo lipídico e de carboidratos, resposta inflamatória, função vascular, reparo tecidual e diferenciação e proliferação celular, e também em condições patológicas, entre elas dislipidemia, HAS, DM2, inflamação crônica, câncer e aterosclerose ²².

2.2.5 Distribuição tecidual e função fisiológica

Os PPARs são implicados em processos celulares e sistêmicos diversos ²⁵, muito além da estimulação da proliferação de peroxissomos em roedores, processo que deu origem à sua denominação ²². Em concordância com sua variedade de funções fisiológicas, os três isotipos de PPAR apresentam padrões de distribuição tecidual amplos, embora o nível de expressão de cada isotipo seja tecido-específico ⁴⁶. Esses receptores estão envolvidos em processos fisiológicos distintos que, integrados, garantem a coordenação do metabolismo energético ^{5, 44} (figura 2.6).

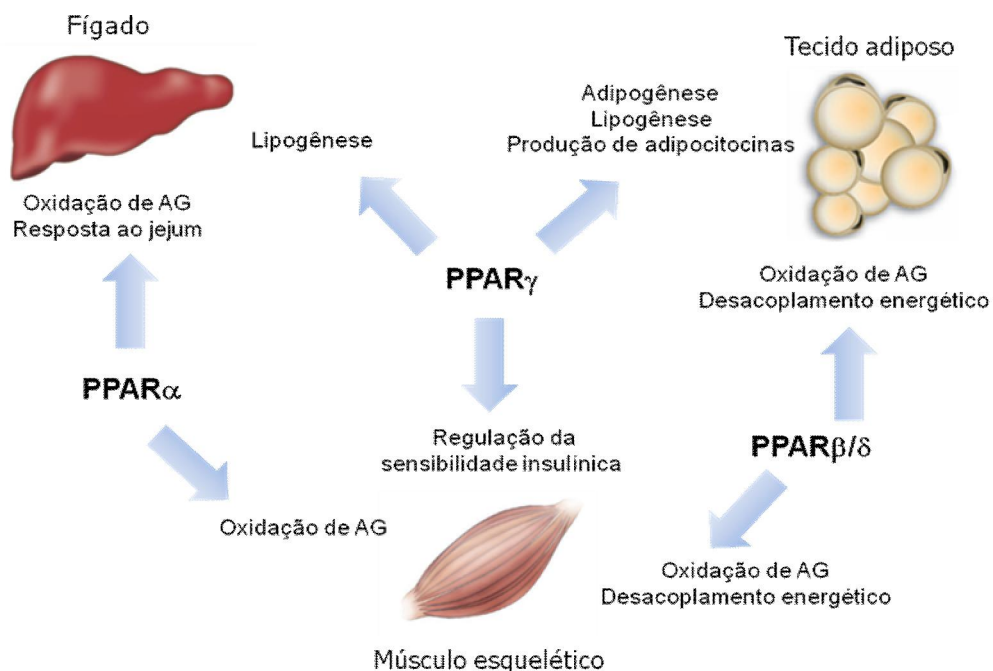


Figura 2.6. Integração metabólica pelos PPARs. Os três isotipos de PPAR regulam a homeostase lipídica e da glicose por meio de suas atividades coordenadas no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo⁵.

2.2.5.1 Receptor alfa ativado por proliferadores peroxissomais

O PPAR α é altamente expresso em tecidos com taxas elevadas de catabolismo de AG e atividade peroxissomal, como fígado, coração, rim, tecido adiposo marrom e intestino²². Apresenta papel crítico para a regulação da homeostase energética, por meio do controle da expressão de genes envolvidos em vias de β -oxidação peroxissomal e mitocondrial, captação de AG, catabolismo de TG e cetogênese²².

A ativação do PPAR α no fígado resulta em oxidação de AG, aumento da gliconeogênese e da cetogênese, processos críticos para a adaptação ao jejum. Durante o jejum prolongado, AG liberados do tecido adiposo e transportados para o fígado ativam o PPAR α que, por sua vez, estimula a oxidação de AG para gerar corpos cetônicos e, assim, uma fonte de energia para os tecidos periféricos⁵. O papel do PPAR α na adaptação ao jejum é reforçado pelo fenótipo de camundongos com deleção do gene que o codifica. Em jejum, esses animais apresentam hipoglicemia, hipocetonemia, hiperlipidemia, hipotermia e deposição de AG no fígado⁴⁷. É possível essa função do PPAR α tenha menor relevância em humanos, considerando a menor expressão do receptor no fígado humano em relação à do roedor⁴⁸, e o fenótipo menos pronunciado de uma variante do PPAR α com efeito dominante negativo em humanos⁴⁹.

O PPAR α também é importante para a regulação do metabolismo de lipoproteínas. Sua ativação resulta em redução da produção de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), aumento do catabolismo de lipoproteínas ricas em TG por aumento da expressão da lipase lipoprotéica (LPL) e aumento da expressão das apolipoproteínas AI e AII, os principais componentes da lipoproteína de alta densidade (HDL)⁵⁰. Acredita-se que esses efeitos favoráveis sobre o metabolismo das lipoproteínas sejam os mecanismos que explicam as ações benéficas de agonistas sintéticos do PPAR α , os fibratos, no tratamento da hipertrigliceridemia⁵.

Em modelos murinos de diabetes e dislipidemia, o catabolismo de AG pela ativação do PPAR α resulta em efeitos metabólicos favoráveis, como redução dos

níveis circulantes de TG, diminuição da deposição de gordura no fígado e músculo esquelético, e melhora a sensibilidade insulínica e da função de células beta pancreáticas. A melhora da sensibilidade insulínica pela ativação do PPAR α é atribuída à redução do conteúdo de lipídeos em tecidos-chave da ação da insulina, em especial o fígado e o músculo esquelético⁵¹. Em estudos *in vivo*, a ativação do receptor também resulta em aumento dos níveis de HDL, por aumento da síntese das apolipoproteínas AI e AII⁵².

O PPAR α também está presente em células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos da parede vascular, e nessas células parece ter efeitos antiinflamatórios e anti-aterogênicos^{50, 53}.

Em concordância com os efeitos do PPAR α observados em estudos *in vitro* e em modelos animais, a ativação do receptor pelos fibratos, utilizados na prática clínica para tratamento de hipertrigliceridemia, resulta em redução das concentrações plasmáticas de TG, em efeitos antiinflamatórios e em proteção cardiovascular⁵⁴. Seu efeito sobre a sensibilidade insulínica em humanos, no entanto, não foi ainda bem caracterizado⁵.

2.2.5.2 Receptor beta/delta ativado por proliferadores peroxissomais

O PPAR β/δ , também conhecido simplesmente como PPAR δ , é o isotipo menos caracterizado de PPAR, por ter sido clonado mais recentemente. Apresenta expressão tecidual ampla, e seus níveis em alguns tecidos dependem de processos como a proliferação e a diferenciação celular²².

Em concordância com sua expressão tecidual ampla, o PPAR β/δ está envolvido em processos fisiológicos diversos, entre eles o desenvolvimento da placenta⁵⁵ e do intestino⁵⁶, reparo tecidual⁵⁵, mielinização⁵⁵, regulação da homeostase energética^{55, 56} e da proliferação, diferenciação e apoptose celulares⁵⁷.

Os conhecimentos a respeito do papel do PPAR β/δ sobre a homeostase energética aumentaram consideravelmente com o estudo de animais transgênicos. Camundongos com deleção do gene que codifica o PPAR β/δ apresentam tendência a obesidade e resistência insulínica, ao passo que com a expressão do PPAR β/δ

constitutivamente ativo no tecido adiposo foi observada proteção contra obesidade, resistência insulínica, esteatose hepática e dislipidemia induzidas por dieta hiperlipídica ⁵⁸. Os estudos com esses modelos animais sugeriram também que os efeitos metabólicos favoráveis da ativação do PPAR β/δ são resultado da indução da expressão de genes envolvidos em oxidação mitocondrial de AG e termogênese adaptativa no tecido adiposo ⁵⁸. A superexpressão do PPAR β/δ no músculo esquelético de camundongos também resulta em proteção contra obesidade, resistência insulínica e dislipidemia induzidas por dieta hiperlipídica ⁵⁹. É observada ainda predominância de fibras de contração lenta na musculatura esquelética e melhora da capacidade aeróbica desses animais ⁵⁹.

Os efeitos de agonistas do PPAR β/δ também sugerem ações metabólicas favoráveis do receptor ativado. Em um modelo murino de obesidade, o tratamento com agonista de PPAR β/δ resultou em proteção contra ganho ponderal e resistência insulínica induzidos por dieta hiperlipídica, atribuídos ao aumento da termogênese e do catabolismo de AG no músculo esquelético ⁵⁸. Efeitos benéficos foram observados também em estudos com primatas, um modelo animal que apresenta maior semelhança com humanos. O tratamento de macacos rhesus obesos com o GW501516, um agonista potente de PPAR β/δ , resultou em redução dos níveis plasmáticos de TG e aumento do colesterol HDL ⁶⁰.

O PPAR β/δ , assim como os outros isotipos de PPAR, é expresso em células da parede vascular e em macrófagos, e sua ativação nesses tipos celulares diminui a expressão de genes que codificam proteínas pró-inflamatórias e apresenta efeito protetor contra aterosclerose em modelos animais ⁵³. Por outro lado, um estudo envolvendo monócitos e macrófagos humanos mostrou, de forma inesperada, que o PPAR β/δ apresenta atividade pró-inflamatória nesses tipos celulares, e que essa atividade foi sinérgica com a de dois potentes estímulos pró-inflamatórios, o fator de necrose tumoral alfa (FNT α) e o lipopolissacarídeo ¹⁵.

2.2.5.3 Receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais

O gene que codifica o PPAR γ origina três RNAs mensageiros, PPAR γ 1, PPAR γ 2 e PPAR γ 3, com diferenças em sua extremidade 5' por utilização de

promotores distintos e clivagem alternativa. O PPAR γ 1 e - γ 3 codificam a mesma proteína, o PPAR γ 1, e o PPAR γ 2 codifica a isoforma PPAR γ 2, que se distingue pela presença de 28 aminoácidos adicionais na extremidade amino-terminal^{43, 61, 62}. A extensão do domínio de ativação independente do ligante torna o PPAR γ 2 um melhor ativador transcricional que o PPAR γ 1⁶³.

Diversos tipos celulares expressam baixos níveis de PPAR γ 1, entre eles adipócitos, pneumócitos, células epiteliais do cólon, bexiga, mama e próstata, células musculares cardíacas e esqueléticas, células vasculares e macrófagos. O PPAR γ 2, em contraste, é expresso seletivamente e em altos níveis no tecido adiposo^{22, 25}.

A) Efeitos metabólicos

O PPAR γ apresenta papel crítico para a diferenciação e manutenção de funções específicas de adipócitos, sendo considerado o efetor de uma cascata transcricional que envolve também membros da família de fatores de transcrição denominados proteínas de ligação ao amplificador CCAAT (C/EBPs)⁶⁴, e que regula a expressão de genes específicos do adipócito^{25, 65}, como aqueles envolvidos em armazenamento lipídico no tecido adiposo branco, e em dissipação de energia no tecido adiposo marrom^{66, 67}.

O metabolismo lipídico está intimamente relacionado ao da glicose, e o PPAR γ representa uma das diversas conexões entre esses eixos metabólicos^{5, 64}. A identificação do PPAR γ , altamente expresso no tecido adiposo, como o alvo molecular dos sensibilizadores insulínicos TZDs¹³ foi uma das primeiras evidências de ligação molecular entre o metabolismo lipídico e de carboidratos, e da importância do receptor para a regulação da homeostase da glicose.

O aumento da sensibilidade insulínica observado com a ativação do PPAR γ parece envolver o remodelamento do tecido adiposo e a melhora de sua função endócrina, embora ainda não seja completamente compreendido.

A ativação do PPAR γ resulta em aprimoramento da capacidade de o tecido adiposo subcutâneo armazenar lipídeos, aumento da massa de tecido adiposo

subcutâneo, e redução ou inalteração do tecido adiposo visceral. O remodelamento do tecido adiposo promove o armazenamento lipídico em depósitos menos sensíveis a hormônios lipolíticos, e sem acesso direto à circulação portal ⁴⁴. Com isso, há diminuição da exposição do fígado e do músculo esquelético a AG e, assim, redução da lipotoxicidade e melhora da resistência insulínica nesses tecidos ⁵.

O aprimoramento da capacidade de armazenamento de lipídeos pela ativação do PPAR γ é resultado do aumento da expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na síntese e armazenamento lipídico, como a proteína ligadora de ácidos graxos adipocitária (FABP-A ou aP2), o receptor de lipoproteínas CD36, a LPL, o transportador 1 de AG, a glicerol quinase, a proteína 1 ligadora do elemento regulador de esterol, e a dessaturase 1 de estearoil-CoA ⁵. A ação coordenada dessas proteínas determina a redistribuição dos lipídeos corporais, com aumento do conteúdo de TG no tecido adiposo subcutâneo, redução da concentração circulante de AG e TG, diminuição do conteúdo de AG no fígado e músculo esquelético e, assim, melhora da ação insulínica nesses tecidos ⁶⁸.

O PPAR γ também influencia a liberação, pelo tecido adiposo visceral, de moléculas capazes de influenciar a sensibilidade insulínica em tecidos à distância. A ativação do receptor inibe a expressão de FNT α e resistina, que induzem resistência insulínica no fígado e músculo esquelético, e estimula a produção de adiponectina, que melhora a sensibilidade insulínica nesses tecidos ⁵. Além disso, a ativação do receptor aumenta a infiltração do tecido adiposo por macrófagos alternativamente ativados, com atividade antiinflamatória, em detrimento dos classicamente ativados, que expressam altos níveis de mediadores pró-inflamatórios ⁶⁹. Os macrófagos alternativamente ativados parecem contribuir também para a diferenciação e o remodelamento do tecido adiposo e, assim, poderiam representar outra forma com que o PPAR γ regula esse processo ⁶⁹. É possível, ainda, que o receptor melhore diretamente a ação da insulina no tecido adiposo, por meio do aumento de expressão de proteínas intracelulares que modulam a via de sinalização insulínica, como a proteína associada ao proto-oncogene c-Cbl (*casitas B-lineage lymphoma*) ⁷⁰.

Esses dados, em conjunto, indicam a importância da atividade do PPAR γ no tecido adiposo para a sensibilidade insulínica no próprio tecido adiposo e também no

fígado e no músculo esquelético. É possível, no entanto, que o PPAR γ expresso nesses outros tecidos também tenha papel na homeostase da glicose. Em modelos murinos de resistência à insulina associada a lipodistrofia, é observada melhora da ação insulínica em resposta às TZDs ainda que na ausência de tecido adiposo funcional ⁷¹, o que sugere o efeito benéfico da atividade do receptor em outros tecidos. Estudos envolvendo deleção seletiva do gene que codifica o PPAR γ (*PPARG*) no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo de camundongos reforçam a possibilidade de a expressão do receptor em outros tecidos ser importante para a homeostase da glicose.

Camundongos transgênicos com deleção seletiva do *PPARG* no fígado apresentam dislipidemia, hiperglicemia, hiperinsulinemia e aumento da adiposidade. Essas alterações são atribuídas à diminuição da captação hepática de triglicerídeos, e indicam que a atividade do PPAR γ no fígado é importante para a homeostase lipídica e para a sensibilidade insulínica ⁷².

A deleção seletiva do *PPARG* no músculo esquelético de camundongos, em que o receptor é expresso em níveis muito baixos, resultou em hiperglicemia e resistência insulínica no próprio músculo esquelético, e também no tecido adiposo e no fígado. O tratamento com TZDs não melhorou a captação de glicose estimulada por insulina, porém melhorou a hiperglicemia, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia desses animais. Esses resultados indicam que, embora a ação das TZDs sobre o tecido adiposo e o fígado seja suficiente para normalizar vários parâmetros metabólicos associados a resistência insulínica, o PPAR γ expresso no músculo esquelético, ainda que em níveis muito baixos, é importante para a homeostase da glicose e é possivelmente um sítio de ação das TZDs ⁷³.

A deleção específica do *PPARG* no tecido adiposo de camundongos, depois que esse tecido é formado, resultou em perda progressiva de gordura corporal, hipertrigliceridemia, resistência hepática à ação da insulina e esteatose hepática. Enquanto algum tecido adiposo ainda foi detectável, esses animais apresentaram sensibilidade insulínica normal no músculo esquelético, e não foram observadas hiperglicemia ou hiperinsulinemia. O tratamento com rosiglitazona reverteu a resistência insulínica no fígado, porém não corrigiu a hipertrigliceridemia. Esses resultados indicam que a disfunção do tecido adiposo resulta em elevação do nível

circulante de TG e em alterações secundárias no fígado, porém não no músculo esquelético, e que o PPAR γ no fígado também pode contribuir para a melhora da sensibilidade insulínica em resposta às TZDs ⁷⁴.

Esses estudos denotam a importância da comunicação intertecidual para a manutenção da homeostase energética. Embora os mecanismos da influência de cada um desses tecidos sobre os outros não sejam compreendidos, possivelmente envolvem a natureza endócrina desses tecidos ⁵.

Uma observação interessante, e que acrescenta complexidade à biologia do PPAR γ , é a de que camundongos com deleção heterozigota do *PPARG* são mais sensíveis à ação da insulina que camundongos selvagens ⁷⁵, e também resistentes a obesidade e resistência insulínica induzidas por dieta hiperlipídica ⁷⁶. As razões para a melhor sensibilidade insulínica em dois estados opostos de atividade do PPAR γ , sua ativação suprafisiológica por um agonista e sua deficiência parcial, não são claras. A ativação suprafisiológica do PPAR γ com rosiglitazona, em modelos animais de obesidade e resistência insulínica, aumenta o conteúdo de TG no tecido adiposo branco, reduz seu conteúdo no fígado e músculo esquelético, e inibe a produção de adipocitocinas indutoras de resistência insulínica. O aparente paradoxo de melhora da sensibilidade insulínica em uma situação de aumento da massa de tecido adiposo é explicado pela melhora da função endócrina e de armazenamento de lipídeos desse tecido. A diminuição da atividade do receptor pela deleção heterozigota do *PPARG*, em contrapartida, reduz a lipogênese e o conteúdo de TG no tecido adiposo, fígado e músculo esquelético, por um mecanismo possivelmente dependente do aumento da produção de leptina, e aumenta a oxidação de AG. Esses efeitos, por sua vez, melhoram a sensibilidade insulínica e simultaneamente evitam o aumento da massa de tecido adiposo ⁷⁷. Dessa forma, por mecanismos diferentes, a ativação do PPAR γ e a perda parcial da função do receptor resultam em aumento da sensibilidade insulínica, e isso poderia explicar a observação de que tanto agonistas quanto antagonistas parciais do receptor apresentam atividade sensibilizadora de insulina ⁷⁸.

O PPAR γ tem também papel importante na adipogênese e homeostase metabólica em humanos ⁴³. Um dos primeiros indícios de relação entre o PPAR γ e o tecido adiposo em humanos foi a identificação de que um polimorfismo do *PPARG*,

caracterizado pela substituição de uma prolina por uma alanina no códon 12 (Pro12Ala) do PPAR γ 2, está associado a peso corporal ⁷⁹, sensibilidade insulínica ⁷⁹ e risco de DM2 ⁸⁰. Em diversas populações, a presença da variante Ala associou-se a proteção contra ganho ponderal e desenvolvimento de DM2, entre indivíduos com peso normal ⁷⁹. Estudos funcionais indicam que a presença da alanina na posição 12 reduz a afinidade do PPAR γ pelo DNA e, assim, sua capacidade de ativar a transcrição de genes-alvo nos adipócitos ⁷⁹. Esse resultado poderia explicar a proteção contra ganho ponderal, e é consistente com os dados de estudos envolvendo modelos animais, em que a perda parcial de função do receptor, por meio de deleção heterozigota do *PPARG*, resulta em melhora da sensibilidade insulínica ⁷⁵.

Em contraste com os efeitos discretos da variante Pro12Ala, mutações heterozigotas raras envolvendo o LBD do PPAR γ , com efeito dominante negativo, são identificadas em pacientes com fenótipo de lipodistrofia parcial, caracterizado por perda da gordura subcutânea localizada nos membros e região glútea, e preservação relativa da gordura abdominal visceral e subcutânea, além de resistência insulínica, DM de início precoce, HAS, esteatose hepática, hipertrigliceridemia, colesterol HDL baixo e, no sexo feminino, síndrome dos ovários policísticos ^{81, 82}. Portadores de mutações heterozigotas que comprometem a ligação do PPAR γ ao DNA também apresentam essas características fenotípicas, atribuídas à capacidade de o receptor mutante ser translocado para o núcleo, interagir com coativadores e, mesmo sem se ligar ao DNA, comprometer a função do receptor normal, codificado pelo alelo não mutante ⁸³.

Mutações que resultam em haploinsuficiência do PPAR γ , ou seja, em que o alelo mutante codifica uma proteína não funcionante, porém que não compromete a função da proteína codificada pelo alelo normal, também se manifestam por lipodistrofia parcial e resistência insulínica ⁸⁴. A interpretação das características fenotípicas associadas à deficiência parcial do receptor, na ausência de efeito dominante negativo da proteína mutada, é complexa quando se consideram os resultados de estudos com animais, que indicam que a deleção heterozigota do *PPARG* está associada a aumento da sensibilidade insulínica. É possível, em

humanos, que mecanismos adicionais estejam envolvidos no desenvolvimento de lipodistrofia e resistência insulínica nessa situação ⁸⁴.

São descritas também em humanos mutações que resultam em ganho de função do PPAR γ , em que o receptor mutado é constitutivamente ativo, e que estão associadas a obesidade extrema ⁸⁵. Camundongos com mutação semelhante e obesidade induzida por dieta hiperlipídica apresentam proteção contra resistência insulínica ⁸⁶.

Esses dados, em conjunto, indicam a importância da ação do PPAR γ para o desenvolvimento e função do tecido adiposo, e para a regulação da homeostase metabólica humana, e sugerem que os distúrbios do metabolismo glicídico e lipídico estejam relacionados à presença de tecido adiposo disfuncional, e não simplesmente ao aumento ou redução da massa de tecido adiposo ⁴⁴.

B) Efeitos vasculares

O PPAR γ é expresso em diversas células da parede vascular, incluindo células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos ¹⁷. Nessas células, sua ativação parece limitar a resposta inflamatória e, especificamente no macrófago, o PPAR γ também modula a homeostase lipídica, por meio do estímulo do transporte reverso de colesterol ⁴³.

Embora a importância do receptor para a biologia vascular seja amplamente reconhecida ⁸⁷, os efeitos cardiovasculares das TZDs em pacientes diabéticos são ainda controversos ⁸⁸, como será comentado posteriormente.

2.3 Ligantes de PPAR e doenças metabólicas humanas: dificuldades e perspectivas

A diversidade de efeitos benéficos dos PPARs sobre a homeostase energética e resposta inflamatória os tornou alvos farmacológicos atraentes no tratamento de doenças metabólicas humanas como o DM2, dislipidemia, obesidade e doenças cardiovasculares ^{89,90}. Agonistas do PPAR α e γ são hoje aprovados para

o tratamento de dislipidemia e DM2, respectivamente, e estudos pré-clínicos sugerem benefícios de agonistas do PPAR β/δ em doenças metabólicas. Apesar de sua importância terapêutica, a ativação dos PPARs está associada a uma variedade de efeitos desfavoráveis, e as preocupações com esses efeitos têm direcionado pesquisas para o desenvolvimento de uma nova geração de ligantes, capazes de manter os efeitos benéficos da ativação do receptor, porém evitar seus efeitos desfavoráveis ⁹¹. Requisitos básicos para o desenvolvimento desses ligantes incluem a compreensão dos mecanismos envolvidos nos efeitos adversos da ativação dos PPARs, e o reconhecimento da diferença entre a ação dos PPARs *in vivo*, em condições fisiológicas e de produção de ligantes naturais, e os efeitos de agonistas sintéticos ²².

2.3.1 Ativação dos PPARs por agonistas sintéticos

2.3.1.1 PPAR α

Agonistas de PPAR α derivados do ácido fibríco são utilizados na prática clínica há algumas décadas, antes mesmo de o receptor ter sido identificado como seu alvo molecular ⁹². São agentes efetivos para o tratamento de dislipidemia, em particular as formas caracterizadas por elevação de lipoproteínas ricas em TG e redução do colesterol HDL, tipicamente associadas ao DM2 e à síndrome metabólica ⁸⁹.

A ativação do PPAR α parece resultar também em efeitos favoráveis sobre o aparelho cardiovascular, independentes de seus efeitos sobre o perfil lipídico. Em modelos animais, são observados efeitos antiinflamatórios e antiateroscleróticos da ativação do receptor ⁹³. Alguns ensaios clínicos sugerem esses benefícios também em humanos. A utilização de fibratos parece reduzir a incidência de eventos cardiovasculares, particularmente em indivíduos com dislipidemia e DM2, grupo com risco elevado de mortalidade por doença cardiovascular ⁹⁴.

Apesar de seus benefícios, alguns efeitos adversos estão relacionados à ativação do PPAR α em humanos, entre eles miopatia e rabdomiólise, elevação da

concentração plasmática de creatinina e homocisteína, colelitíase e distúrbios gastrointestinais. Esses efeitos são raros, porém devem ser considerados relevantes diante da expectativa do desenvolvimento de agonistas mais potentes do receptor ⁸⁹. Em modelos animais, há dados sugestivos de que o PPAR α possa apresentar papel no desenvolvimento de cardiomiopatia. Camundongos com superexpressão do PPAR α restrita ao miocárdio apresentam perfil metabólico semelhante ao observado no DM, caracterizado por aumento da taxa de oxidação de AG e redução da captação e oxidação de glicose, e outras características de cardiomiopatia diabética, como hipertrofia ventricular e disfunção ventricular sistólica ⁹⁵. Além disso, em um modelo murino de cardiomiopatia, o tratamento com fenofibrato resultou em piora da função cardíaca ⁹⁶. Não está definido, contudo, se esses efeitos estão associados à proliferação peroxissomal induzida pelo PPAR α , observada exclusivamente em roedores, e não em humanos. Entretanto, ainda que não haja evidências conclusivas de cardiotoxicidade com o uso de fibratos na prática clínica, a monitoração da função cardíaca pode ser importante em pacientes tratados com esses agentes ⁵⁰.

2.3.1.2 PPAR β/δ

O desenvolvimento de agonistas do PPAR β/δ é mais recente, e sua avaliação encontra-se em fase pré-clínica. Em modelos animais de obesidade, resistência insulínica e dislipidemia, a ativação seletiva do PPAR β/δ melhora o perfil lipídico e promove o transporte reverso de colesterol ⁹⁷, e em macacos obesos foram observados aumento do nível plasmático de colesterol HDL e redução dos níveis de TG, VLDL e insulina ⁶⁰. Esses resultados indicam que agonistas desse isotipo de PPAR poderiam ser úteis para o tratamento de dislipidemia e aterosclerose relacionadas à obesidade e resistência insulínica ²².

Em razão dos efeitos favoráveis da ativação do PPAR β/δ sobre o colesterol HDL e, assim, potencialmente sobre a aterogênese, ligantes desse isotipo de PPAR têm sido intensamente estudados. O efeito desses ligantes foi avaliado em estudos clínicos de curta duração envolvendo pacientes com obesidade central e dislipidemia, e foram observados bons resultados sobre parâmetros relacionados à

síndrome metabólica ⁹⁸. Os agonistas de PPAR β/δ , no entanto, não foram extensivamente avaliados quanto à sua segurança ²².

2.3.1.3 PPAR γ

Agonistas de PPAR γ da classe das TZDs são utilizados como sensibilizadores insulínicos no tratamento do DM2, e foram avaliados como terapia para outras condições associadas a resistência insulínica, incluindo doença hepática gordurosa não alcoólica, síndrome dos ovários policísticos e lipodistrofias, com bons resultados ⁹⁹. Estudos com modelos animais ¹⁰⁰ e com humanos ¹⁰¹ também indicam seu potencial antiaterogênico.

Embora estejam entre os antidiabéticos orais mais potentes ^{99, 102}, a utilização das TZDs está associada a diversos efeitos adversos ^{89, 102} que podem ser ligante-específicos, ou então efeitos de classe ⁸⁹. O efeito adverso melhor caracterizado como ligante-específico é a hepatotoxicidade idiosincrática observada com o uso da troglitazona, que motivou a suspensão de sua comercialização. Efeitos de classe, comuns a todas as TZDs, incluem ganho ponderal por aumento da adiposidade, edema, hemodiluição e expansão do volume plasmático ^{44, 89}, com insuficiência cardíaca (IC) em até 15% dos pacientes ⁴³. Outros efeitos adversos possíveis da utilização das TZDs para o tratamento de doenças crônicas não são conhecidos, e recentemente esses fármacos foram associados a aumento do risco de eventos cardiovasculares e perda de massa óssea ⁴³.

É importante ressaltar que há dados sugestivos de que alguns dos efeitos benéficos e também desfavoráveis das TZDs sejam independentes da ativação do PPAR γ . Entre os efeitos benéficos atribuídos a mecanismos independentes do receptor, incluem-se a regulação negativa da expressão de genes que codificam proteínas pró-inflamatórias, como o FNT α e a interleucina 6 (IL-6) ¹⁰³. Recentemente, foi observado que a pioglitazona se liga a uma proteína na membrana externa da mitocôndria, denominada mitoNEET, implicada na regulação da cadeia transportadora de elétrons, metabolismo do ferro e fosforilação oxidativa. O papel dessa proteína sobre a homeostase energética, ou como mediadora dos efeitos das TZDs, no entanto, ainda não é conhecido ¹⁰⁴.

2.3.1.4 Tiazolidinedionas, ganho ponderal e adipogênese

Ganho ponderal é observado com a utilização de todas as TZDs, tanto em modelos animais quanto em estudos clínicos. Parte dele é relacionada à retenção hídrica induzida por esses fármacos ⁸⁹, porém também estão envolvidos o aumento da adipogênese e a redistribuição do tecido adiposo, com aumento do tecido adiposo subcutâneo e redução ou inalteração do visceral ¹⁰⁵.

O aumento da massa gordurosa corporal total relacionado às TZDs, no entanto, não é considerado deletério, uma vez que a redução da massa de tecido adiposo visceral tem impacto metabólico favorável por redução da resistência insulínica e do estado pró-inflamatório a ela associado ¹⁰⁶. É questionável, contudo, se o aumento da adipogênese e redistribuição da gordura corporal induzidos pelas TZDs sejam necessários para seus efeitos antidiabéticos. A modulação, pelo PPAR γ , da comunicação entre o tecido adiposo e outros tecidos críticos para a homeostase energética parece ser mais importante para o aumento da sensibilidade insulínica. A ativação do receptor induz a expressão de adiponectina, um potente sensibilizador insulínico endógeno, e reduz a expressão de produtos secretórios do adipócito que comprometem a ação da insulina em outros tecidos, entre eles a resistina, o FNT α e a IL-6 ⁸⁹. Há evidências de que moduladores seletivos da atividade do receptor sejam capazes de dissociar os efeitos do PPAR γ sobre a adipogênese daqueles sobre a sensibilidade insulínica, o que poderia, clinicamente, resultar em efeitos antidiabéticos na ausência de aumento da gordura corporal total ⁷⁸.

2.3.1.5 Tiazolidinedionas e aparelho cardiovascular

A utilização clínica das TZDs está associada a uma série de efeitos cardiovasculares desfavoráveis, e em uma metanálise recente foi observado aumento do risco de infarto do miocárdio relacionado ao uso da rosiglitazona ⁹.

A) Retenção hídrica e insuficiência cardíaca

A retenção hídrica observada com a utilização das TZDs é resultado do aumento da reabsorção renal de sódio e água, por vias dependentes de PPAR γ no néfron ¹⁰⁷. Entretanto, seus mecanismos exatos são ainda controversos e vias adicionais, independentes do receptor, podem também estar envolvidas ⁸⁹.

Edema periférico é observado em 10 a 15% dos pacientes, sobretudo naqueles em uso de insulina. O aumento da pressão luminal na microvasculatura, secundário à retenção hídrica, parece ser o principal mecanismo, porém efeitos diretos das TZDs sobre o endotélio, com aumento da permeabilidade vascular, também têm sido implicados ¹⁰⁸.

Diversos estudos clínicos indicam aumento da incidência de IC entre pacientes tratados com TZDs ¹⁰⁹, e esse efeito adverso é atribuído à retenção hídrica relacionada a esses agentes. Não há evidência de toxicidade cardíaca direta das TZDs ¹¹⁰. De fato, estudos com animais indicam efeitos benéficos da ação direta do PPAR γ no coração em modelos variados de lesão cardíaca ^{111, 112}, e ensaios clínicos indicam tendência de melhora da função cardíaca com o uso prolongado de TZDs ¹¹⁰.

A retenção hídrica é, assim, um efeito adverso limitante das TZDs, e esse aspecto deve ser considerado crítico para o desenvolvimento de novos ligantes de PPAR γ ⁸⁹.

B) Eventos cardiovasculares

As alterações metabólicas observadas com a ativação do PPAR γ , como aumento da sensibilidade insulínica, redução da glicemia e da concentração circulante de AG livres não esterificados, assim como a melhora da função endócrina do tecido adiposo, apresentam impacto positivo sobre a função vascular ⁸⁷.

Há evidências também de que o PPAR γ esteja diretamente implicado na biologia vascular, e que participe de processos importantes para o desenvolvimento e progressão de aterosclerose ⁸⁷. O receptor é expresso em macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas na parede vascular normal ¹¹³ e em lesões ateroscleróticas ¹¹⁴, e foi inicialmente relacionado à aterosclerose pela identificação de que é ativado por derivados de LDL, e está envolvido na regulação da captação e efluxo de lipídeos por macrófagos e na regulação da formação de células espumosas na parede vascular ¹¹⁵.

A ativação do PPAR γ em macrófagos da parede vascular regula positivamente a expressão do receptor “*scavenger*” (SR) CD36, responsável pela captação de LDL ¹¹⁶, e promove a diferenciação de macrófagos em células espumosas em cultura ¹¹⁷. O PPAR γ também induz a expressão do LXR α , um RN que estimula a expressão do transportador ABCA1 (“*ATP-binding cassette A1*”), responsável pelo o efluxo de colesterol no macrófago ¹¹⁸. Além disso, inibe a expressão do SR classe A, um transportador de membrana envolvido na captação de colesterol ¹¹⁹. Uma hipótese unificadora diante desses efeitos aparentemente divergentes do PPAR γ é a de que o aumento da captação e do efluxo de colesterol nos macrófagos da parede vascular com a ativação do receptor teria como resultado final redução de acúmulo do LDL oxidado na parede vascular e, assim, efeitos antiaterogênicos ¹²⁰.

É possível também que os efeitos benéficos do PPAR γ sobre a parede vascular ocorram por mecanismos independentes do metabolismo lipídico local. No macrófago, o receptor inibe a expressão de genes que codificam proteínas com atividade pró-inflamatória ¹¹⁵, e recentemente foi identificado como um regulador-chave da polarização dessas células em macrófagos ativadas alternativamente, com papel antiinflamatório, em detrimento de macrófagos ativados classicamente, que produzem citocinas pró-inflamatórias e radicais livres de oxigênio ¹²¹. Outros tipos celulares na parede vascular parecem também mediar os efeitos antiaterogênicos da ativação do PPAR γ , o que reforça sua complexidade ⁸⁷.

O potencial antiaterogênico de agonistas de PPAR γ tem sido sugerido em estudos com modelos animais de aterosclerose ^{100, 122}, e também em ensaios clínicos envolvendo o tratamento de pacientes diabéticos com TZDs ¹²³. Nos estudos

com animais, o efeito antiaterogênico de ligantes de PPAR γ é observado mesmo em presença de deficiência insulínica, e parece ser resultado de melhora da função endotelial, redução da proliferação e migração de células musculares lisas, redução da produção de citocinas por macrófagos e efluxo de colesterol. Esses resultados indicam proteção vascular pela ativação do PPAR γ independentemente da redução da insulinemia, e são consistentes com efeitos vasculares diretos do receptor ¹⁰⁰.

Não está claro, contudo, quais desses efeitos benéficos de agonistas do PPAR γ sobre a vasculatura são dependentes e quais são independentes do receptor, uma vez que ligantes sintéticos (TZDs) e endógenos (15-desoxi- $\Delta^{12,14}$ prostaglandina J₂) apresentam efeitos independentes do PPAR γ , entre eles a regulação negativa da expressão dos genes que codificam o FNT α e a IL-6 ¹⁰³.

Apesar de estudos *in vitro*, com modelos animais e até mesmo em humanos indicarem efeitos favoráveis de agonistas do PPAR γ sobre a função vascular, os efeitos cardiovasculares das TZDs tornaram-se alvo de intensa discussão. Em uma metanálise recente, o tratamento com rosiglitazona foi associado a aumento do risco de infarto do miocárdio e mortalidade por causas cardiovasculares ⁹. Um estudo semelhante mostrou também aumento da incidência de infarto do miocárdio associado à rosiglitazona, embora não tenha sido observado aumento do risco de mortalidade cardiovascular ¹²⁴. Ainda que as limitações de metanálises sejam inquestionáveis, e que o aumento do risco de eventos cardiovasculares graves não tenha sido confirmado por uma análise interina de um estudo prospectivo para investigação da influência da rosiglitazona sobre eventos e mortalidade cardiovasculares ¹²⁵, esses resultados devem ser valorizados, sobretudo quando se considera que o impacto cardiovascular negativo foi observado em pacientes com DM2, uma condição que por si só representa um fator de risco para doença cardiovascular.

Os mecanismos determinantes do aumento do risco de infarto do miocárdio associado às TZDs não são conhecidos. É possível que esse seja um efeito específico da rosiglitazona e, portanto, não represente efeito de classe. No estudo PROactive, o tratamento com pioglitazona foi associado a redução do risco combinado de infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e mortalidade em 16%, entre pacientes diabéticos de alto risco cardiovascular ¹²⁶. Além disso, em

uma metanálise recente, foi observado que a pioglitazona reduziu a mortalidade por doença cardiovascular, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral ¹²⁷.

As razões para os efeitos distintos das duas TZDs, rosiglitazona e pioglitazona, também não estão definidas. A utilização da pioglitazona é associada a redução da concentração plasmática TG e colesterol LDL, aumento do colesterol HDL, e aumento do tamanho das partículas de colesterol LDL quando comparada à da rosiglitazona ¹²⁸. Essas diferenças poderiam explicar pelo menos em parte suas influências cardiovasculares distintas, embora a rapidez com que os eventos cardiovasculares desfavoráveis foram observados nos estudos clínicos com rosiglitazona torne improvável que somente modificações do perfil lipídico estejam implicadas nessas diferenças. Para compreender melhor os mecanismos envolvidos nos efeitos cardiovasculares desfavoráveis das TZDs e a possível diferença entre a rosiglitazona e a pioglitazona, é importante identificar se há diferenças entre os efeitos vasculares e miocárdicos de cada uma delas, e, ainda, se o efeito da rosiglitazona é dependente da ativação do PPAR γ ⁸⁷.

2.3.1.6 Tiazolidinedionas e homeostase esquelética

Estudos clínicos observacionais indicam que o DM2 está associado a aumento da fragilidade esquelética, embora os pacientes frequentemente apresentem aumento do índice de massa corporal, considerado fator protetor ósseo, e densidade mineral óssea normal ou elevada ¹²⁹. A ativação do PPAR γ pelas TZDs, no tratamento da doença, também vem sendo associada a comprometimento da saúde esquelética, e por isso os efeitos de agonistas do receptor sobre a homeostase esquelética vêm sendo extensamente investigados.

O PPAR γ é expresso em células mesenquimais progenitoras da medula óssea ¹³⁰, osteoblastos ¹³¹ e em precursores hematopoiéticos de osteoclastos ¹³².

Osteoblastos e os adipócitos têm origem da mesma célula mesenquimal progenitora, e estudos *in vitro* sugerem que agonistas do PPAR γ promovem, na medula óssea, adipogênese em detrimento da osteoblastogênese, com o potencial

de redução da formação óssea ¹³⁰. É possível também que a ativação do receptor nos osteoblastos induza a apoptose de osteoblastos ¹³³.

Estudos com modelos animais confirmam o impacto negativo da ativação do PPAR γ sobre o osteoblasto. Em camundongos, o tratamento com TZDs associa-se a comprometimento da diferenciação de células progenitoras em osteoblastos ¹³⁴, redução da densidade mineral óssea e comprometimento da microarquitetura óssea, além de aumento da adiposidade na medula óssea ¹³⁴. Em contrapartida, camundongos com deleção heterozigota do *PPARG* apresentam aumento da massa óssea e da osteoblastogênese, e remodelação óssea normal, o que reforça o papel antiosteogênico do PPAR γ ¹³⁵.

Há indícios de que as ações pró-adipogênicas e antiosteoblastogênicas do PPAR γ ativado sejam mediadas por vias moleculares distintas, e que possam ser moduladas diferentemente, de acordo com a natureza do ligante ¹³⁶. A netoglitazona, um modulador seletivo do receptor, induziu a adipogênese e inibiu a osteoblastogênese *in vitro* de forma menos eficaz que a rosiglitazona. *In vivo*, esse ligante apresentou efeito sensibilizador insulínico e pró-adipogênico sem interferir com a diferenciação de células mesenquimais progenitoras da medula óssea em osteoblastos ¹³⁷.

O efeito de agonistas do PPAR γ sobre os osteoclastos é ainda pouco conhecido. Estudos *in vitro* sugerem que a ativação do receptor reduza a osteoclastogênese ¹³⁸. A deleção seletiva e homozigota do *PPARG* em osteoclastos de camundongos resultou em comprometimento da diferenciação de osteoclastos, redução da remodelação óssea e aumento da massa e densidade mineral ósseas. Nesse mesmo estudo, o tratamento de camundongos selvagens com rosiglitazona aumentou a diferenciação de osteoclastos. Esses resultados sugerem que o PPAR γ seja um importante modulador da diferenciação de precursores hematopoiéticos em osteoclastos, e de sua função de remodelação óssea ¹³⁹.

A utilização das TZDs também tem sido associada a impacto negativo sobre a homeostase esquelética em humanos. Esse efeito é observado com a pioglitazona e com a rosiglitazona e tem, portanto, sido considerado um efeito de classe das TZDs. O Estudo de Saúde ABC (*Health ABC Study*), um estudo observacional prospectivo

com duração de quatro anos, que incluiu indivíduos norte-americanos com média de idade de 73 anos, mostrou perda óssea acelerada em diversos sítios esqueléticos entre mulheres diabéticas tratadas com TZDs ¹⁴⁰. Em um estudo observacional retrospectivo, envolvendo 32 homens diabéticos, o tratamento com rosiglitazona durante 16 semanas foi associado a perda óssea acelerada ¹⁴¹. Um ensaio clínico randomizado, em que foram incluídas mulheres saudáveis no período pós-menopausa, mostrou que o uso da rosiglitazona durante 14 semanas resultou em redução dos marcadores de formação óssea e da densidade mineral óssea, sem alteração dos marcadores de reabsorção óssea ¹¹. Esses resultados sugerem o impacto negativo e de curto prazo das TZDs em doses clinicamente relevantes, e indicam um padrão de alteração do metabolismo ósseo caracterizado por redução da formação óssea sem comprometimento da reabsorção, consistente com resultados de estudos *in vitro* e em modelos animais.

Esses dados reforçam o impacto deletério da ativação do PPAR γ sobre a homeostase esquelética ¹⁴², e sugerem que abordagens farmacológicas favoráveis em relação à homeostase da glicose e esquelética tendo como alvo o PPAR γ seriam aquelas capazes de manter os efeitos favoráveis de sensibilização insulínica, sem apresentar os efeitos adversos sobre a massa óssea observados com a ativação do receptor ⁴³.

2.3.1.7 Ativação dos PPARs e carcinogênese

O efeito de agonistas de PPAR sobre a carcinogênese é ainda bastante controverso ⁴³. A ativação do PPAR α em roedores está associada a proliferação peroxissomal, hepatomegalia e carcinoma hepatocelular ¹⁴³. Esse efeito, entretanto, é específico para essa espécie, e em primatas não humanos e humanos não há evidências de que ligantes de PPAR α apresentam potencial carcinogênico ¹⁴⁴. O efeito da ativação do PPAR β/δ e $-\gamma$ sobre a carcinogênese, no entanto, é um assunto bastante discutido.

As ações do PPAR β/δ sobre o desenvolvimento de neoplasias ainda não foram extensamente avaliadas ²². Em camundongos com mutação inativadora do gene de supressão tumoral APC (*adenomatous polyposis coli*), com predisposição a

polipose intestinal, o tratamento com um agonista de PPAR β/δ resultou em aumento do número e tamanho de pólipos intestinais, embora não tenha sido determinado se esse efeito foi dependente do receptor ¹⁴⁵. Outro estudo envolvendo camundongos com deleção heterozigota do *APC*, e com ou sem deleção do gene que codifica o PPAR β/δ , mostrou que o tratamento com um agonista do PPAR β/δ reduziu o número de pólipos colônicos na presença do receptor, porém não em animais com deleção do gene que o codifica ¹⁴⁶. O papel do receptor e de seus agonistas não está, portanto, definido.

O efeito da ativação do PPAR γ sobre desenvolvimento de tumores também não é conhecido. Estudos *in vitro* indicam que agonistas do PPAR γ apresentam efeito antiproliferativo ¹⁴⁷. Estudos *in vivo* sugerem a participação do PPAR γ no desenvolvimento de tumores em diferentes tecidos de roedores, embora seja discutido se o seu papel é protetor contra carcinogênese, ou promotor do desenvolvimento de tumores ¹⁴⁸. Não está claro também se a influência de agonistas do receptor sobre a tumorigênese ocorra por mecanismos dependentes ou independentes do PPAR γ ¹⁴⁷. Outro ponto de questionamento é se o efeito observado em modelos animais, em sua maioria de roedores, ocorreria também em humanos ¹⁴⁹, uma vez que estudos clínicos de fase IV não evidenciaram potencial tumorigênico de agonistas de PPAR γ em humanos ⁸⁹.

Diante de dados insuficientes para descartar a possibilidade de carcinogênese em humanos, o FDA (*Food and Drug Administration*) recomenda que ensaios clínicos com ligantes de PPAR e com duração superior a 6 meses sejam precedidos de estudos de carcinogenicidade em roedores com duração mínima de 2 anos ¹⁵⁰.

2.3.1.8 Novos ligantes de PPAR

A capacidade de cada um dos isotipos de PPAR modular diferentes vias metabólicas que, integradas, regulam a homeostase energética e a resposta inflamatória, assim como a semelhança estrutural entre os PPARs, têm aumentado o interesse pelo desenvolvimento de agonistas capazes de ativar simultaneamente o PPAR α , e $-\gamma$, ou simultaneamente os três isotipos de PPAR, com o objetivo de se

combinarem os efeitos favoráveis de cada um deles ¹⁵¹. Outra perspectiva, originada da ampliação dos conhecimentos sobre farmacologia dos PPARs, é o desenvolvimento de ligantes capazes de modular a atividade dos PPARs de forma específica e tecido-seletiva ¹⁵¹.

A) Agonistas duplos e panagonistas de PPAR

As estratégias iniciais de desenvolvimento de ligantes de PPAR estavam direcionadas a compostos que atuassem como agonistas potentes e específicos de um dos três isotipos do receptor ¹⁵². Com o aumento dos conhecimentos sobre a função dos PPARs, aumentou o interesse por ligantes que pudessem ativar mais de um dos três isotipos simultaneamente, como uma estratégia para se combinarem os efeitos benéficos da ação dos diferentes isotipos de PPAR e, assim, serem obtidos efeitos terapêuticos mais amplos, particularmente para o tratamento da hiperglicemia e da dislipidemia no DM2 ¹⁵². Com isso, muitos esforços foram direcionados ao desenvolvimento de agonistas duplos de PPAR α e $-\gamma$, e de agonistas simultâneos de PPAR α , $-\beta/\delta$ e $-\gamma$, ou panagonistas de PPARs ⁸⁹, com o reconhecimento da dificuldade em determinar que razão de atividade agonista de cada um dos isotipos resultaria em efetividade terapêutica ótima, e da possibilidade de efeitos sinérgicos ou antagonistas sobre a eficácia ou toxicidade da ativação de cada um dos isotipos de PPAR ¹⁵³.

Até o momento, foram desenvolvidos alguns agonistas duplos de PPAR α e $-\gamma$, com efeitos hipolipemiante e anti-hiperglicemiante em modelos animais comparáveis aos de agonistas seletivos de PPAR α e $-\gamma$. Dois deles, o muraglitazar e o tesaglitazar, foram avaliados também em ensaios clínicos de fase III envolvendo pacientes com DM2 ^{154, 155}. O muraglitazar apresentou atividade sensibilizadora insulínica e hipolipemiante promissora ¹⁵⁴, e foi o primeiro agonista duplo a ser considerado para aprovação pelo FDA. Entretanto, após a divulgação dos resultados de uma metanálise em que sua utilização foi associada a aumento do risco de eventos cardiovasculares, a decisão do FDA foi reconsiderada, e a sua utilização descontinuada ¹². O tesaglitazar também apresentou atividade anti-hiperglicemiante e hipolipemiante em ensaios clínicos, porém os estudos com esse composto foram

descontinuados por preocupações relacionadas ao aumento do nível sérico de creatinina ¹⁵⁵. Outros agonistas duplos de PPAR α e γ foram descontinuados ainda em estudos pré-clínicos, diante de resultados de avaliação toxicológica de longo prazo em animais ⁸⁹.

Grande parte dos compostos descontinuada após os resultados de estudos pré-clínicos ou de ensaios clínicos compartilha alguns efeitos adversos. Entretanto, a razão para a descontinuação foi sempre composto-específica, e com isso é difícil assegurar que os efeitos adversos que motivaram sua descontinuação tenham sido relacionados à ativação do PPAR γ , α ou de ambos, ou devidos a efeitos independentes da ativação de PPARs ⁸⁹. Embora não possa ser excluído efeito tóxico sinérgico da ativação dos dois isotipos, é possível que esses efeitos estejam relacionados à superativação do PPAR γ . A maioria dos agonistas duplos apresenta maior afinidade pelo PPAR γ e se comporta como agonista completo desse isotipo de PPAR quando comparada ao composto referência rosiglitazona. Sua afinidade pelo PPAR α é menor, e é observada indução de cerca de 50% da ativação transcricional máxima observada com o fenofibrato ⁸⁹.

B) Moduladores seletivos do PPAR γ

O envolvimento do PPAR γ em diversos processos fisiológicos, em particular o metabolismo lipídico e a resposta inflamatória, tornou o desenvolvimento de agonistas desse receptor uma estratégia promissora para o tratamento de doenças metabólicas humanas. Essas mesmas características, em conjunto com o amplo padrão de expressão do PPAR γ , no entanto, também representam desvantagens, uma vez que a ativação suprafisiológica do receptor por agonistas poderia aumentar o risco de efeitos adversos em tecidos ou tipos celulares não envolvidos nessas doenças ¹⁵⁶. De fato, diversos efeitos adversos são descritos em associação com a utilização das TZDs.

Uma estratégia para reduzir os efeitos adversos associados à ativação ampla do PPAR γ é o desenvolvimento de ligantes capazes de regular diferentemente os genes relacionados aos efeitos benéficos do receptor sobre a homeostase energética e os genes relacionados aos efeitos adversos, ou seja, ligantes que

mantêm atividade sensibilizadora de insulina, porém sem os efeitos adversos observados com a utilização de agonistas completos do receptor ⁸⁹.

Compostos com esse perfil de ação, ou moduladores seletivos do PPAR γ , tipicamente combinam propriedades funcionais de um agonista parcial do receptor e a capacidade de recrutar distintamente determinados corre reguladores. O resultado disso é a modulação da expressão gênica de forma tecido- e promotor-específica, e a discriminação entre os efeitos benéficos e adversos da ativação do PPAR γ ¹⁵⁷.

Entre os vários compostos descritos como moduladores seletivos do PPAR γ , somente alguns foram bem caracterizados do ponto de vista molecular ⁸⁹, e apresentaram efeitos sensibilizadores insulínicos *in vivo* comparáveis aos da rosiglitazona, sem resultar em ganho ponderal ¹⁵⁸. O metaglidaseen foi o primeiro modulador seletivo de PPAR γ estudado em humanos. Os resultados dos estudos de fase II foram divulgados em 2005, e incluíram melhora de parâmetros metabólicos sem os efeitos adversos de retenção hídrica e ganho ponderal ⁸⁹.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade farmacológica de benzilideno- e acridinilideno-tiazolidinedionas no receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a atividade agonista do GQ-16 nos PPAR α , - β/δ e - γ e no RXR α .
- Investigar a atividade antagonista do GQ-16 no PPAR γ .
- Determinar a afinidade do GQ-16 pelo PPAR γ .
- Investigar a conformação do LBD do PPAR γ na presença do GQ-16.
- Investigar a influência do GQ-16 sobre a interação do PPAR γ com o coativador 1 de receptor esteroideal (SRC-1).
- Investigar o potencial adipogênico do GQ-16.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O GQ-16 e os outros compostos sintéticos testados foram cedidos pelo Prof. Ivan da Rocha Pitta (Universidade Federal de Pernambuco), e a síntese do GQ-16 foi previamente descrita ¹⁵⁹. A rosiglitazona foi obtida da *Cayman Chemicals* (Ann Arbor, MI). O bezafibrato, ácido retinóico 9-cis, troglitazona, pioglitazona, isometilbutilxantina, dexametasona, insulina e óleo vermelho O foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO). A [³H]rosiglitazona foi obtida da *American Radiolabeled Chemicals* (St. Louis, MO). Os anticorpos anti-FABP-A e anti-GAPDH foram obtidos da *Santa Cruz Biotechnology* (Santa Cruz, CA).

4.2 Plasmídeos

Para os ensaios de gene repórter, foram utilizados os plasmídeos de expressão de RN (pcDNA3-PPAR α , pcDNA3-PPAR β/δ , e pcDNA3-PPAR γ e o pCMX-RXR α), e a construção contendo o gene repórter da luciferase dirigido pelo promotor mínimo (sequência -32 a +45) da quinase de timidina (TK) do vírus herpes simples e pela sequência DR-1 (DR1-TK-Luc). Foram utilizados também o plasmídeo contendo um receptor quimérico constituído pelo LBD do PPAR γ fusionado ao DBD do fator de transcrição de leveduras GAL4 (LBD-PPAR γ /DBD-GAL4) e o plasmídeo contendo o gene repórter da luciferase dirigido pelo promotor mínimo do adenovírus E1b e por uma sequência com cinco sítios de ligação do GAL4 (UAS_{5x}-Luc), cuja construção foi descrita anteriormente ¹⁶⁰.

Foi também utilizado o plasmídeo de normalização pCMV- β galactosidase (pCMV- β gal), que contém o gene que codifica a enzima β -galactosidase dirigido pelo promotor do vírus *Simian 40*, com atividade constitutiva ¹⁶¹.

Para a expressão do LBD-PPAR γ em bactérias, como uma proteína fusionada a cauda polihistidina, foi utilizado o plasmídeo pET28a-His-LBD-PPAR γ . Os detalhes de sua construção foram descritos anteriormente ¹⁶².

Para a expressão de proteínas de fusão com glutathione S-transferase (GST) em bactérias, foram utilizados os plasmídeos pGEX (Pharmacia Upjohn®) e pGEX-SRC-1 (381-882), contendo os genes que codificam a proteína GST e a proteína de fusão GST-SRC-1, respectivamente. A construção desses plasmídeos foi previamente descrita ¹⁶³.

4.3 Cultura de células

Pró-monócitos humanos U-937, obtidos do Centro de Cultura de Células da Universidade da Califórnia em São Francisco, foram cultivados em meio de cultura RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640, contendo 2 mM de glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino, em garrafas de 75 cm² (Corning®)

Pré-adipócitos murinos 3T3-L1 foram cultivados em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) contendo 2 mM de glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro neonatal bovino, em placas para cultura de tecidos de 25 cm² (Corning®). Células mesenquimais murinas C3H10T1/2 foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) contendo 2 mM de glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino, em placas para cultura de tecidos de 25 cm² (Corning®). Os pré-adipócitos 3T3-L1 e as células mesenquimais C3H10T1/2 foram gentilmente cedidos pelo Dr. Keith Yamamoto (Universidade da Califórnia em São Francisco).

Todas as culturas celulares foram mantidas em incubadoras a 37°C e com 5% de CO₂.

4.4 Ensaios de transativação (transfecção transitória e ensaio de gene repórter)

A atividade transcricional dos PPARs e do RXR α em resposta a diferentes tratamentos foi avaliada por meio de ensaio do gene repórter luciferase em cultura de células de mamíferos.

O ensaio de gene repórter é uma técnica de biologia molecular empregada com o objetivo de se estudar, em uma célula ou organismo, a atividade de um promotor ou a expressão de um gene de interesse, por meio de sua ligação ao um gene repórter.

Para investigar a atividade transcricional de RNs, especificamente, o ensaio consistiu na introdução, ou transfecção, de DNA plasmidial contendo o gene repórter da luciferase e de DNA plasmidial contendo a sequência que codifica os PPARs, o receptor quimérico DBD-GA4/LBD-PPAR γ e o RXR α em pró-monócitos U-937, seguida de tratamento com ligantes. No plasmídeo repórter, o gene da luciferase foi dirigido pela sequência DR1, que constitui o elemento responsivo aos PPARs e RXR α , ou por uma sequência com cinco sítios de ligação do GAL4. No plasmídeo de expressão dos RN, a sequência que codifica os PPARs e o RXR α foi dirigida por um promotor constitutivamente ativo em células de mamíferos. Com esse procedimento, espera-se a expressão dos RN nas células transfectadas e, na presença de um ligante que atue como agonista, o aumento de sua atividade transcricional. Considerando que o gene repórter da luciferase é dirigido por um promotor contendo o elemento responsivo aos RN de interesse, a avaliação da expressão da enzima luciferase representa a medida da atividade transcricional do receptor.

O método de transfecção empregado foi o de eletroporação, que consiste na aplicação de pulsos de correntes elétricas a uma suspensão de células, com geração de poros nas membranas plasmática e nuclear e, assim, entrada do DNA plasmidial de interesse.

As células U-937 foram coletadas por meio de centrifugação (3000 x *g* por 4 minutos), e ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo cálcio, dextrose e os plasmídeos de interesse, seguindo a proporção de 10⁷ células/0,5 mL. A suspensão de células e plasmídeos foi então transferida para

uma cuveta de eletroporação (Bio-Rad®), e eletroporada com um gerador de pulsos (Bio-Rad®, 300 mV e 950 μ F). Em seguida, foi acrescentado meio de cultura à suspensão de células, que foi então transferida para placas de cultura de células de 12 poços (Corning®). As células foram tratadas com os compostos de interesse ou seu veículo (controle), e mantidas a 37° C e 5% CO₂ durante 24 horas. Depois desse período, foram coletadas por meio de centrifugação (14000 x g , por 2 minutos), e lisadas com 150 μ L de tampão de lise (Promega®). A atividade da luciferase foi determinada pela adição da luciferina, o substrato da luciferase, ao lisado celular, de acordo com as instruções do fabricante (Promega®).

A luciferase catalisa a conversão da luciferina em oxiluciferina, e essa reação resulta em emissão de luz, quantificada em um luminômetro (Turner®), que fornece resultados em unidades relativas de luz. A taxa de ativação do RN em resposta a determinado tratamento foi calculada pela divisão entre o valor de unidades relativas de luz obtido para amostras submetidas ao tratamento em questão pelo valor de unidades relativas de luz obtido para amostras submetidas ao seu veículo (controle).

A atividade da β -galactosidase (β -gal) foi determinada pela adição do substrato quimioluminescente LumiGAL (Lumigen®) ao lisado celular, de acordo com as instruções do fabricante. A β -galactosidase cliva uma unidade galactosídeo desse substrato, resultando em um intermediário moderadamente estável, cuja decomposição gera quimioluminescência, quantificada em um luminômetro (Turner®), que fornece resultados em unidades relativas de luz. Como a maioria das células de mamíferos em cultura expressa níveis muito baixos de β -galactosidase, e a expressão do gene que a codifica no plasmídeo transfectado é dirigida por um promotor com atividade constitutiva, a atividade enzimática detectada é função da expressão do DNA plasmidial, ou seja, da eficiência do procedimento de transfecção. Assim, a leitura da atividade da β -galactosidase da maneira descrita representa um controle da eficiência da transfecção, e permite normalizar a leitura da atividade da luciferase entre as diferentes transfecções.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos 3 vezes.

4.5 Ensaio de ligação

O LBD do PPAR γ humano foi expresso em bactérias (*Escherichia coli*, cepa BL21) como uma proteína de fusão contendo cauda polihistidina (His-LBD-hPPAR γ). Após o período de expressão, o lisado bacteriano foi preparado por métodos padrão, e as proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade por metal, com o uso de resina de cobalto (Clonotech®). A eficiência da expressão e purificação foi analisada por eletroforese do produto de purificação em gel de poliacrilamida desnaturante, seguida de coloração do gel por solução de nitrato de prata (figura 4.1).

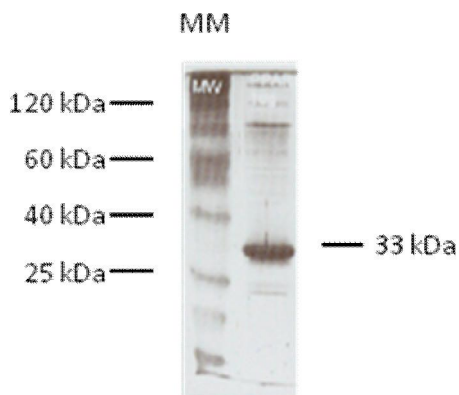


Figura 4.1. Análise da expressão e purificação da proteína recombinante His-LBD-hPPAR γ . A expressão da proteína foi induzida em *E. coli* (cepa BL21), e sua purificação foi realizada por cromatografia de afinidade por cobalto. O material purificado foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, seguida de coloração por solução de nitrato de prata. A seta lateral indica a massa molecular da banda identificada no gel, identificada pelo marcador de massa molecular *BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder* (Invitrogen®). MM: marcador de massa molecular.

O ensaio de ligação foi realizado com a proteína recombinante His-LBD-PPAR γ e o radioligante [3 H]rosiglitazona (atividade específica 50 Ci/mmol) na ausência (experimentos de saturação) ou presença (experimentos de competição) do ligante não radiomarcado, em tampão contendo Tris (10 mmol/L, pH 8), cloreto de potássio (50 mmol/L) e ditiotretitol (10 mmol/L), pH 7,4, em um volume final de 100 μ L.

Os experimentos de saturação foram realizados com concentrações crescentes de [3 H]rosiglitazona (1 a 160 nM), e as reações foram conduzidas a 22°C,

durante 45 minutos. Para os experimentos de competição, foram utilizadas [³H]rosiglitazona (40 nM) e concentrações crescentes de rosiglitazona e GQ-16 não radiomarcados. As reações foram conduzidas a 4°C durante 24 horas (incubação com o radioligante durante as primeiras 12 horas, seguida de adição dos competidores não radiomarcados, e incubação por mais 12 horas).

O radioligante ligado ao receptor foi separado do radioligante livre em colunas Sephadex G-25 de 1 mL, equilibradas com Tris (25 mmol/L, pH 7,4), cloreto de potássio (75 mmol/L), glicerol (15%), Triton X-100 (0,05%) e EDTA (0,5 mmol/L). A radioatividade da [³H]rosiglitazona foi determinada em um contador beta de cintilação líquida (Perkin-Elmer®). A leitura foi obtida como contagens por minuto, e os dados apresentados em valores absolutos, no caso dos experimentos de saturação, ou em valores percentuais relativos ao veículo (controle), nos experimentos de competição.

A constante de dissociação (K_d) da [³H]rosiglitazona foi determinada a partir dos experimentos de saturação (**figura 4.2**), com a utilização do programa GraphPad Prism versão 4.0 para Windows. O valor obtido, de 33 nM, foi utilizado para determinar a concentração de radioligante utilizada nos experimentos de competição.

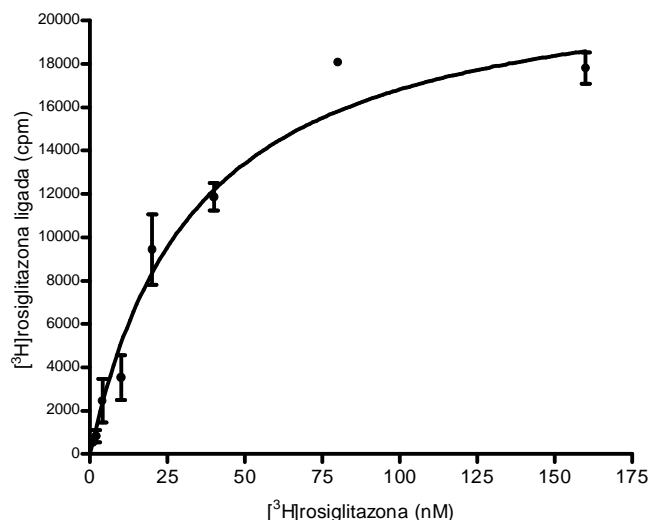


Figura 4.2. Ensaio de ligação ao PPAR γ . Curva de saturação do LBD- PPAR γ pela [³H]rosiglitazona. Dados expressos média \pm EPM da radioatividade, em contagens por minuto, da [³H]rosiglitazona ligada, de 2 experimentos independentes. O K_d da rosiglitazona radiomarcada foi calculado com a utilização do programa GraphPad Prism versão 4.0 para Windows, e seu valor foi de 33,98 nM.

A partir dos experimentos de competição, foi determinada a concentração de rosiglitazona ou de GQ-16 não radiomarcados necessária para inibir em 50% a ligação da [³H]rosiglitazona ao PPAR γ (IC₅₀), utilizando também o programa GraphPad Prism versão 4.0 para Windows. A partir do valor do IC₅₀ obtido para os ligantes não radiomarcados, foi calculada a constante de inibição (K_i), pela equação de Cheng e Prusoff ¹⁶⁴. A constante de inibição é a medida da afinidade de um inibidor competitivo pelo receptor. Nesses ensaios, o ligante é considerado um inibidor competitivo porque sua afinidade pelo receptor é determinada por sua capacidade de competir com um ligante radiomarcado pela ocupação do receptor, ou seja, por um ensaio de competição.

4.6 Ensaio de proteção contra digestão por protease

O domínio de ligação ao ligante (LBD) do PPAR γ humano foi expresso em bactérias (*Escherichia coli*, cepa BL21) como uma proteína recombinante contendo cauda de polihistidina (His-LBD-PPAR γ), e purificado por cromatografia de afinidade por cobalto.

A proteína recombinante foi incubada com rosiglitazona, GQ-16, ambos os compostos ou com veículo (DMSO) em tampão contendo Tris (10 mmol/L, pH 8,0), cloreto de potássio (50 mmol/L) e ditiotreitol (10 mmol/L), pH 7,4, durante 30 minutos a 22°C. Em seguida, foi incubada com água destilada ou tripsina (100 μ g/mL, solubilizada em água destilada) durante 10, 30 ou 60 minutos, a 22°C. A reação de digestão foi interrompida pela adição de tampão de amostra desnaturante e aquecimento a 95°C durante 5 minutos. O padrão proteolítico do LBD da proteína foi então analisado por eletroforese em gel de poliácridamida desnaturante, seguido de coloração do gel pelo corante de proteínas azul de Comassie (*Comassie blue*).

4.7 Ensaio de interação proteína-proteína (ensaio "GST pull-down")

O ensaio "GST pull-down" é utilizado para identificar interações entre duas proteínas *in vitro*, uma delas marcada por meio de sua fusão à glutathiona-S-

transferase (GST), considerada a isca, que irá capturar e “puxar” (“*pull-down*”) a outra, considerada a presa, se houver interação entre elas. Nesse estudo, foi avaliada a interação entre o coativador SRC-1, marcado por meio de sua fusão à GST (GST-SRC-1), e o PPAR γ , marcado com [35 S]metionina.

Para a fusão da proteína isca à proteína GST, o gene que codifica a GST foi incorporado a um vetor de expressão em conjunto com o gene que codifica a proteína isca, no caso o coativador SRC-1. A expressão desses genes foi induzida em bactérias (*Escherichia coli*, cepa BL21) a partir do promotor do vetor, o que gerou a proteína de fusão GST-SRC-1. Como a proteína GST apresenta alta afinidade por glutatona, seu substrato, a proteína de fusão GST-SRC-1 foi purificada por cromatografia por afinidade a glutatona acoplada a esferas de sefarose. As esferas de sefarose são pesadas, e permitem que o produto da purificação seja lavado e precipitado.

O PPAR γ foi sintetizado pelo método de transcrição e tradução *in vitro* em lisado de reticulócitos de coelho (sistema de transcrição e tradução acopladas TNT T7-Quick, Promega®), como uma proteína marcada com [35 S]metionina ([35 S]PPAR γ). A eficiência da síntese foi analisada eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, seguida de autorradiografia (figura 4.3).

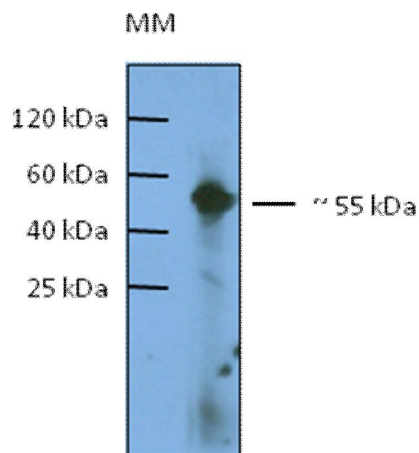


Figura 4.3. Avaliação da síntese *in vitro* do PPAR γ marcado com [35 S]metionina, com a utilização do sistema de transcrição e tradução acopladas *TNT T7-Quick* (Promega®). O produto da síntese foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, seguida de autorradiografia. Na parte lateral direita da figura está indicada a massa molecular da banda visualizada (55 kDa), segundo o marcador de massa molecular *Low Range* (BioRad®), que corresponde àquela do PPAR γ .

A interação *in vitro* entre o coativador SRC-1 e o PPAR γ foi avaliada pela incubação da proteína de fusão GST-SRC-1 com a proteína radiomarcada [35 S]PPAR γ , na presença de ligantes ou seu veículo (controle), durante 120 minutos, a 4°C, em tampão contendo TST 1X, 0,1% de Triton X-100, 0,1% de NP-40, 1 mM de ditioneitol, 0,5mM de PMSF, e coquetel de inibidores de protease (Sigma®) 1:1000. Em seguida, o material incubado foi centrifugado, de forma a precipitar a proteína de fusão acoplada às esferas de sefarose (GST-SRC-1) e a proteína radiomarcada eventualmente ligada a ela. O material precipitado foi lavado 2 vezes com o mesmo tampão utilizado para a reação, para eliminação de proteínas não ligadas, e então analisado em gel de poliacrilamida com SDS seguido de autorradiografia. A visualização de bandas no filme radiográfico indica que a proteína radiomarcada foi precipitada em conjunto com a proteína de fusão, por ter havido interação entre elas.

4.8 Ensaio de diferenciação de adipócitos

O processo de adipogênese é avaliado com o estudo de alguns tipos celulares que podem ser induzidos, em cultura, a diferenciar-se em adipócitos. O primeiro e melhor caracterizado modelo de adipogênese é a linhagem celular 3T3-L1, uma subcepa da linhagem 3T3 do camundongo *Swiss*, comprometida com a diferenciação adipocitária ¹⁶⁵. Os pré-adipócitos 3T3-L1, cultivados em condições habituais, apresentam a morfologia de fibroblastos. Entretanto, quando tratados com uma combinação de dexametasona, isobutilmetilxantina (IBMX) e insulina, adotam o formato arredondado, e em cinco dias iniciam acúmulo de lipídeos, que aparecem como gotículas intracelulares. Cada componente dessa combinação ativa vias celulares específicas, importantes para a diferenciação adipocitária. A dexametasona ativa o fator de transcrição C/EBP β , e a IBMX inibe fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos, o que resulta em aumento dos níveis intracelulares de AMPc e ativação do fator de transcrição C/EBP δ . O C/EBP β e o C/EBP δ , por sua vez, induzem a transcrição do C/EBP α e do PPAR γ . A insulina contribui para a diferenciação de adipócitos por ativar a expressão de genes específicos desse tipo celular, como o que codifica a sintase de AG, a proteína ligadora de AG (FABP), a leptina e a adiponectina (figura 4.4) ⁶⁶.

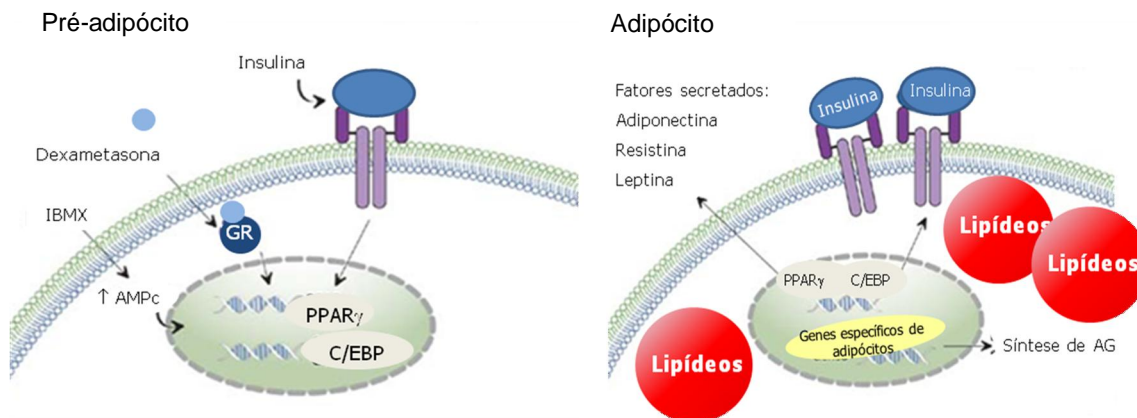


Figura 4.4. Controle transcricional da adipogênese. A diferenciação de adipócitos implica a ativação de diversos fatores transcricionais, expressos sequencialmente. O C/EBP β e o δ são detectados inicialmente, seguidos do PPAR γ que, por sua vez, ativa o C/EBP α . Por um mecanismo de retroalimentação positiva, o C/EBP α aumenta a expressão do PPAR γ para manter o estado diferenciado dos adipócitos. Todos esses fatores de transcrição contribuem para a expressão de genes que caracterizam o adipócito diferenciado⁶⁶.

A linhagem de células mesenquimais C3H10T1/2 foi isolada de embriões de camundongos C3H com 14 a 17 dias, e apresenta morfologia de fibroblastos em cultura. Essa linhagem é funcionalmente semelhante a células tronco mesenquimais, e também pode ser induzida a diferenciar-se em adipócitos em resposta ao tratamento com a combinação de dexametasona, IMBX e insulina¹⁶⁶.

Células 3T3-L1 e C3H10T1/2 foram cultivadas em placas de 100 mm ou placas de 12 poços para cultura de células (Corning®) até sua confluência. Dois dias depois, foram tratadas com 0,5 nM de IMBX, 1 μ g/mL de insulina e 1 μ M de dexametasona durante mais dois dias, para a indução da diferenciação. Em seguida, foram tratadas com 1 μ g/mL de insulina durante 2 dias e, depois disso, somente com meio de cultura por mais 4 dias. Em todo o período de cultivo, foram submetidas a tratamentos com ligantes ou seu veículo (controle). A adipogênese foi avaliada pela coloração com o corante de lipídeos neutros óleo vermelho O (figura 4.5), e pela expressão da proteína FABP adipocitária, um marcador específico de adipócitos diferenciados.

4.8.1 Coloração por óleo vermelho O

Células 3T3-L1 e C3H10T1/2 foram lavadas com tampão PBS três vezes e fixadas com formalina a 10% (v/v) em tampão PBS, durante 1 hora. Após a fixação, foram lavadas duas vezes com tampão PBS, e então coradas com solução de óleo vermelho O (0,3% em isopropanol 60%) durante 10 minutos. Após a coloração, foram lavadas em água corrente, e então fotografadas com magnificação de 20 X

167.

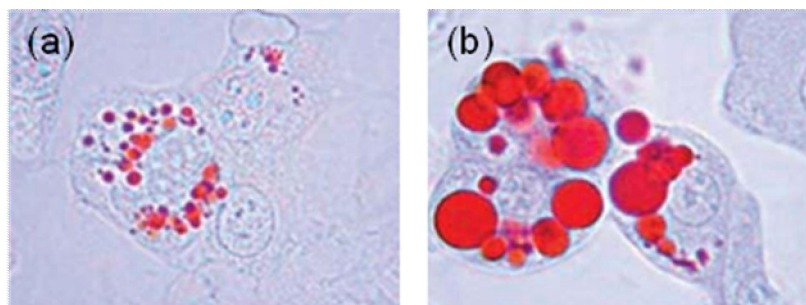


Figura 4.5. Coloração de lipídeos intracelulares pelo óleo vermelho O em pré-adipócitos 3T3-L1 (a) não diferenciados e (b) diferenciados pela indução com a combinação IBMX, dexametasona e insulina.

4.8.2 Análise por *western blotting*

Células 3T3-L1 e C3H10T1/2 foram coletadas por método mecânico, e lisadas com tampão Nonidet NP40 durante 30 minutos a 4°C. O lisado foi centrifugado para remoção de material insolúvel (15000 x *g*, 20 minutos), e o sobrenadante foi coletado. As concentrações de proteína no lisado celular foram avaliadas pelo método de Bradford. A mesma quantidade de proteína (40 µg) foi desnaturada por aquecimento em tampão de amostra Laemmli contendo mercaptoetanol, analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, e transferida eletroforéticamente, em sistema semi-seco, para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF, Millipore®). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de leite em pó desnatado a 5% em tampão TBS-T (10mM de Tris-base, 150 mM de NaCl e 0,1% de Tween 20), durante 1 hora, em temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo primário, em solução bloqueadora 1%, durante 12 horas, a 4°C, e em seguida com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluição 1:4000), também em solução bloqueadora 1%,

durante 1 hora, em temperatura ambiente. As proteínas marcadas com os anticorpos foram visualizadas por quimioluminescência e autorradiografia (sistema de detecção ECL, Amersham®). Os anticorpos primários utilizados foram (i) IgG anti-FABP-A ou aP2, diluição 1:500, espécie cabra (sc-18661) e (ii) IgG anti-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), diluição 1: 1000, espécie camundongo (sc-47724). Os anticorpos secundários utilizados foram IgG de burro anti-cabra (sc-2020) e IgG de cabra anti-camundongo (sc-2005), ambos acoplados à peroxidase. Todos os anticorpos foram obtidos da companhia Santa Cruz Biotechnology®.

4.9 Análise estatística

Os resultados dos ensaios de gene repórter foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) da taxa de ativação da transcrição dos grupos tratados com ligantes, em relação ao grupo tratado com veículo (controle). O teste estatístico empregado foi a análise de variância (ANOVA), seguida da comparação múltipla de Newman-Keuls, utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 4.0 para Windows. O critério de significância para todas as análises foi o valor $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1. Investigação da atividade de benzilideno- e acridinilideno-tiazolidinedionas sintéticas em PPAR γ

Diversos compostos sintéticos derivados da 5-benzilideno-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona e da 3-benzil-5-acridinilideno-tiazolidina-2,4-diona foram investigados quanto à atividade agonista em PPAR γ , por meio de ensaios de gene repórter em pró-monócitos humanos U-937. Somente um deles, o GQ-16 (5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-thiazolidina-2,4-diona), induziu a atividade transcricional do receptor (figura 5.1).

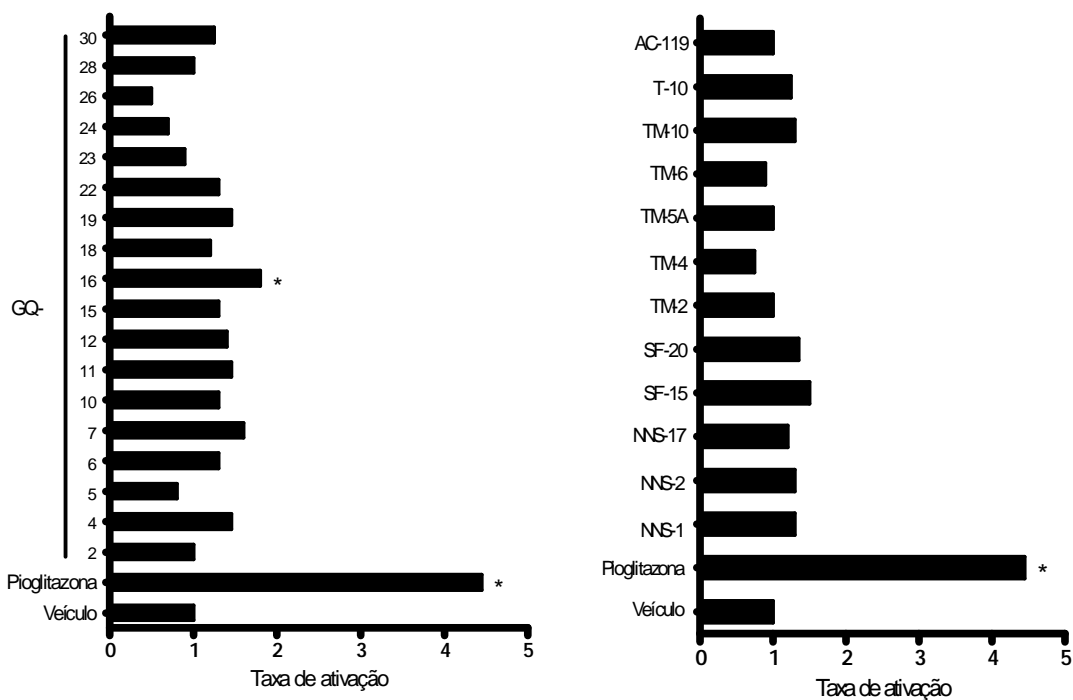


Figura 5.1. Investigação da atividade agonista de benzilideno- e acridinilideno-TZDs em PPAR γ . Somente o GQ-16 induziu a atividade transcricional do receptor. Células U-937 cotransfectadas com o vetor de expressão do PPAR γ e o repórter DR-1-TK-LUC, e tratadas com ligantes (AC-119 10^{-6} M, demais ligantes 10^{-5} M) ou seu veículo durante 24 horas. Dados expressos como média da taxa de ativação da transcrição em relação ao veículo (controle), de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. * significativamente diferente ($p < 0,05$) do veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação de Newman-Keuls. Pio, pioglitazona (controle positivo).

A estrutura química do GQ-16 e das TZDs clássicas troglitazona, pioglitazona e rosiglitazona está apresentada na figura 5.2.

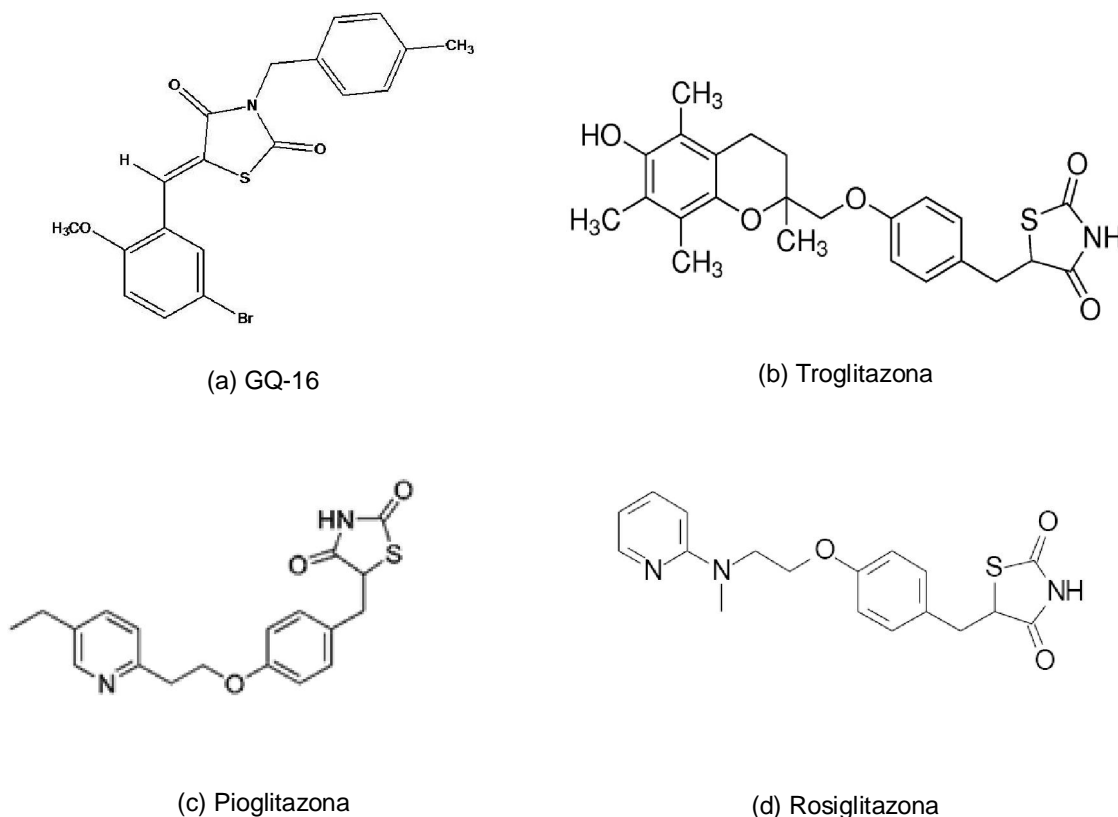


Figura 5.2. Estrutura química do GQ-16 (a), troglitazona (b), pioglitazona (c) e rosiglitazona (d).

A nomenclatura e a estrutura químicas das outras benzilideno- e acridinilideno-TZDs investigadas é apresentada no anexo I.

5.2 O GQ-16 é uma agonista parcial e seletivo do PPAR γ

Para caracterizar o GQ-16 como agonista de PPAR γ , pró-monócitos humanos U-937 foram cotransfectados com o vetor de expressão do PPAR γ e da β -galactosidase, e o vetor repórter luciferase responsivo a PPAR (DR1-TK-LUC), e tratados com concentrações crescentes de GQ-16, até a concentração máxima em que o composto foi solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO, veículo).

O GQ-16 ativou o PPAR γ de forma concentração-dependente, com EC₅₀ de 6,01 μ M, em contraste com a ativação do receptor pelo agonista total rosiglitazona com EC₅₀ de 0,71 μ M. A atividade máxima do GQ-16 foi de 50% daquela observada com a rosiglitazona (figura 5.3).

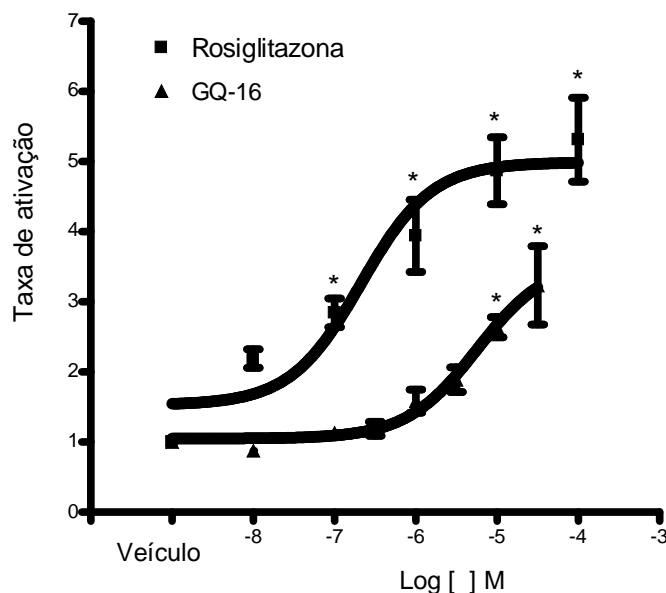


Figura 5.3. Ativação dose-dependente do PPAR γ pelo GQ-16. Células U-937 cotransfectadas com o vetor de expressão do PPAR γ , o repórter DR-1-TK-LUC e o vetor de expressão do controle interno β -gal, tratadas com rosiglitazona ou GQ-16 em concentrações crescentes durante 24 horas e em seguida coletadas para determinação da atividade de luciferase e β -gal. Os valores da atividade de luciferase foram normalizados para os valores do controle β -gal. A concentração máxima em que o GQ-16 foi solúvel em DMSO foi de $3,16 \times 10^{-5}$ M. Dados expressos como média \pm EPM da taxa de ativação da transcrição em relação ao veículo DMSO, de 5 experimentos independentes realizados em triplicata. * significativamente diferente ($p < 0,05$) do veículo (controle), por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação de Newman-Keuls.

As TZDs são classicamente descritas como agonistas específicos do PPAR γ ¹³. Há, contudo, dados sugestivos de que possam ativar outros isotipos de PPAR. Foi observado que a rosiglitazona e a pioglitazona ativam o PPAR β/δ , com potência e eficácia inferiores às de agonistas completos, porém ainda em concentrações clinicamente relevantes¹⁵, e que a pioglitazona ativa o PPAR α , também nas concentrações em que apresenta efeitos anti-hiperglicemiantes¹⁶⁸.

Para determinar se o GQ-16 apresentava especificidade para PPAR γ , células U-937 foram cotransfectadas com o vetor de expressão do PPAR α ou $-\delta$, com o

vetor da β -galactosidase e com o vetor repórter luciferase responsivo a PPAR (DR1-TK-LUC). Diferentemente da rosiglitazona na concentração de 100 μ M (10^{-4} M), o GQ-16 não induziu a atividade transcricional dos outros isotipos de PPAR (figura 5.4).

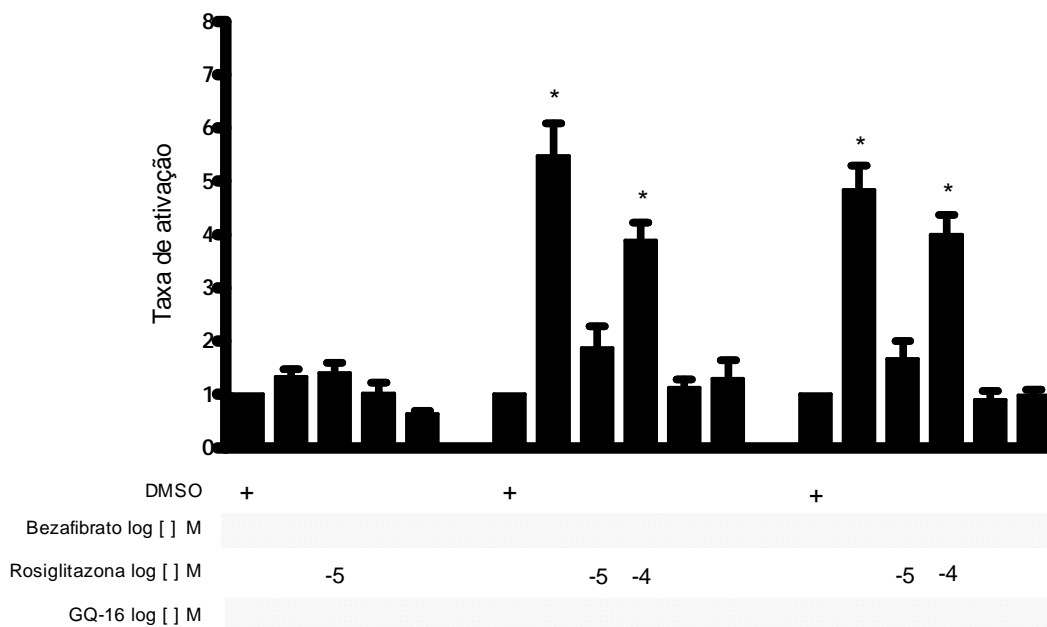


Figura 5.4. O GQ-16 não induz a atividade transcricional do PPAR α ou β/δ . Células U-937 cotransfectadas com os vetores de expressão do PPAR α e do β/δ , o repórter DR-1-TK-LUC e o vetor de expressão do controle interno β -gal, tratadas com bezafibrato, rosiglitazona ou GQ-16 durante 24 horas e em seguida coletadas para determinação da atividade de luciferase e β -gal. Os valores da atividade de luciferase foram normalizados para os valores do controle β -gal. Dados expressos como média \pm EPM da taxa de ativação da transcrição em relação ao veículo DMSO, de 5 experimentos independentes realizados em triplicata. * significativamente diferente ($p < 0,05$) do veículo (DMSO), por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação de Newman-Keuls.

O PPAR forma um heterodímero permissivo com o RXR, o que significa que a atividade transcricional do complexo PPAR-RXR pode ser regulada pela ligação de um agonista ao PPAR, ao RXR ou a ambos ⁴⁵. Assim, a ligação de um agonista ao RXR é uma forma alternativa de ativação do heterodímero PPAR-RXR. Uma vez que pró-monócitos U-937 expressam RXR ¹⁶⁹, foi considerada a possibilidade de a ativação da transcrição do gene repórter luciferase dirigido por um promotor contendo um PPRE, observada com o tratamento com GQ-16, ter sido mediada pela ligação do composto ao RXR. Para investigar essa possibilidade, células U-937 foram cotransfectadas com o vetor de expressão do RXR α , com o vetor da β -

galactosidase e com o vetor repórter luciferase responsivo a PPAR (DR1-TK-LUC). Diferentemente do ácido 9-cis retinóico, o GQ-16 não induziu a atividade transcricional do RXR α (figura 5.5).

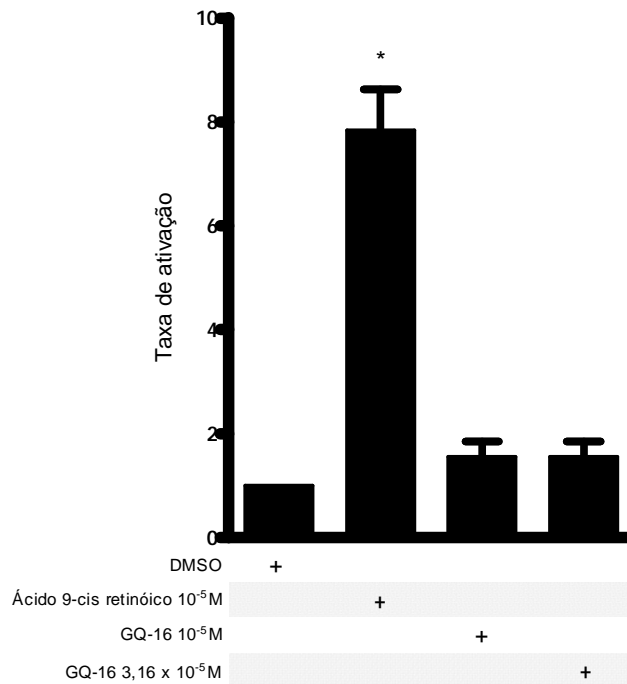


Figura 5.5. O GQ-16 não induz a atividade transcricional do RXR α . Células U-937 cotransfectadas com os vetores de expressão do RXR α , o repórter DR-1-TK-LUC e o vetor de expressão do controle interno β -gal, tratadas ácido 9-cis retinóico ou GQ-16 durante 24 horas e, em seguida, coletadas para determinação da atividade de luciferase e β -gal. Os valores da atividade de luciferase foram normalizados para os valores do controle β -gal. Dados expressos como média \pm EPM da taxa de ativação da transcrição em relação ao veículo DMSO, de 5 experimentos independentes realizados em triplicata. * significativamente diferente ($p < 0,05$) do veículo (DMSO), por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação de Newman-Keuls.

Esses resultados indicam, portanto, que o GQ-16 é um agonista parcial e específico do PPAR γ em pró-monócitos humanos U-937, características que o distinguem da rosiglitazona.

5.3 O GQ-16 não apresenta atividade antagonista em PPAR γ

Ligantes com atividade agonista parcial são capazes, em concentrações elevadas, de deslocar agonistas completos do receptor e antagonizar seu efeito.

Para testar a atividade antagonista do GQ-16 em PPAR γ , células U-937 foram cotransfectadas com o vetor de expressão do PPAR γ e da β -galactosidase e um vetor repórter luciferase responsivo a PPAR (DR1-TK-LUC), e tratadas com concentrações crescentes de GQ-16, na presença de uma concentração saturante de rosiglitazona (10 μ M).

O GQ-16 não antagonizou a ativação transcricional do receptor induzida pela rosiglitazona em pró-monócitos U-937 (figura 5.6), e foi observado efeito aditivo dos dois ligantes, embora não significativo. Esses resultados caracterizam um comportamento não esperado diante dos resultados anteriores, que indicaram a atividade agonista parcial do GQ-16 em PPAR γ .

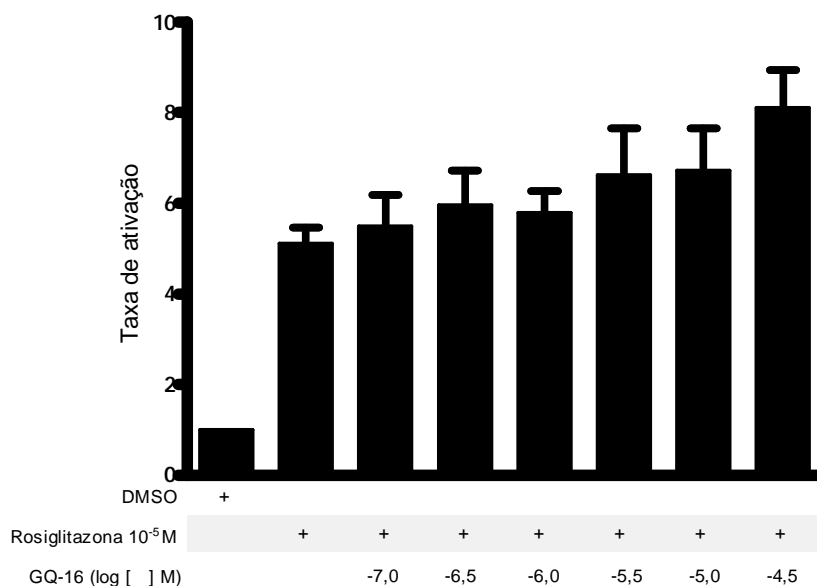


Figura 5.6. O GQ-16 não antagoniza a atividade transcricional do PPAR γ induzida pela rosiglitazona. Células U-937 cotransfectadas com o vetor de expressão do PPAR γ , o repórter DR-1-TK-Luc e o vetor de expressão do controle interno β -gal, cotratadas com uma concentração saturante de rosiglitazona (10 μ M) e concentrações crescentes de GQ-16 durante 24 horas e, em seguida, coletadas para determinação da atividade de luciferase e β -gal. Os valores da atividade de luciferase foram normalizados para os valores do controle β -gal. Dados expressos como média \pm EPM da taxa de ativação da transcrição em relação ao veículo DMSO, de 5 experimentos independentes realizados em triplicata, análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação de Newman-Keuls.

Considerando que pró-monócitos U-937 expressam outros isotipos de PPAR e que esses receptores são ativados pela rosiglitazona¹⁵, é possível que a ausência

de atividade antagonista do GQ-16 nesse ensaio tenha sido resultado da transcrição do gene repórter luciferase mediada pela ativação do PPAR α e - β/δ endógenos na presença de rosiglitazona. Assim, a expressão final do gene repórter luciferase seria o resultado de sua indução pelo PPAR γ transfectado, ativado pelo GQ-16, e pelo PPAR α e - β/δ endógenos ativados pela rosiglitazona.

Para investigar essa possibilidade, foram utilizados, nos ensaios de transativação, o vetor quimérico contendo o LBD do PPAR γ fusionado ao DBD do fator de transcrição de leveduras GAL4 e um plasmídeo contendo a sequência do repórter luciferase dirigida pelo elemento responsivo ao GAL4 (GAL-Luc). O fator de transcrição GAL é exclusivo de leveduras e, assim, não é ativado por receptores endógenos de células de mamíferos e permite avaliar o efeito de ligantes sobre o LBD do PPAR γ isoladamente.

O GQ-16 induziu a atividade transcricional do receptor quimérico LBD-PPAR γ /DBD-GA4 também como um agonista parcial, com eficácia de aproximadamente 30% daquela apresentada pela rosiglitazona. Também nesse contexto, o GQ-16 não antagonizou a ativação do LBD-PPAR γ pela rosiglitazona. Foi observado também aumento não significativo da indução da atividade transcricional do receptor quimérico pela rosiglitazona na presença do GQ-16, com desvio da curva concentração-resposta à rosiglitazona para a esquerda na presença do GQ-16 (figura 5.7).

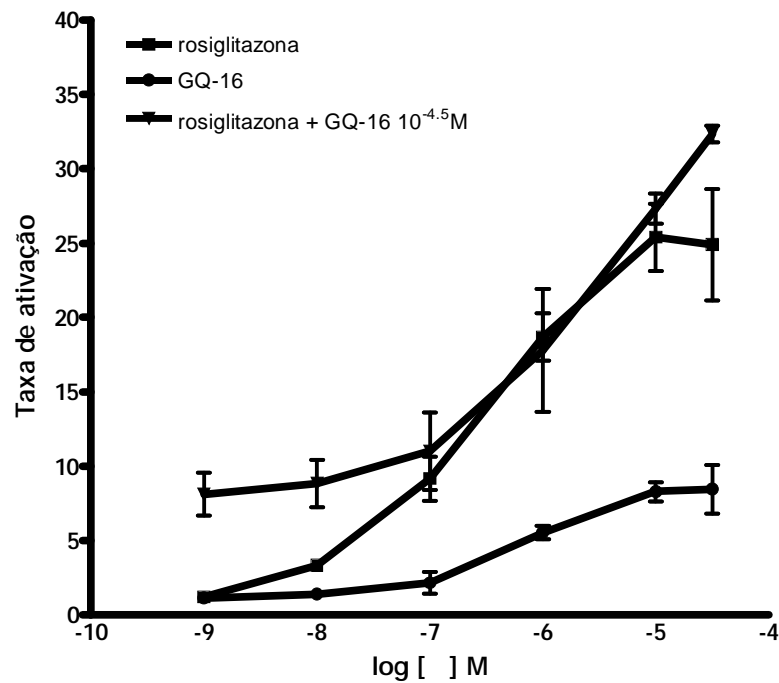


Figura 5.7. O GQ-16 não antagoniza a atividade transcricional do PPAR γ induzida pela rosigitazona. Células U-937 cotransfectadas com o vetor quimérico LBD-PPAR γ /DBD-GAL4 e o repórter GAL-Luc, e tratadas com concentrações crescentes de rosigitazona ou GQ-16, ou com concentrações crescentes de rosigitazona na presença de GQ-16 ($10^{-4.5}$ M) durante 24 horas e, em seguida, coletadas para determinação da atividade de luciferase. Dados expressos como média \pm EPM da taxa de ativação da transcrição em relação ao veículo DMSO, de 3 experimentos independentes realizados em triplicata, análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação de Newman-Keuls.

5.4 O GQ-16 se liga ao LBD do PPAR γ com baixa afinidade

Para determinar se a atividade transcricional do PPAR γ induzida pelo GQ-16 ocorre por meio de sua interação direta com o LBD do receptor, foi realizado ensaio de competição com rosigitazona marcada com trítio ($[^3\text{H}]$ rosigitazona).

Esse ensaio quantificou a capacidade de deslocamento da $[^3\text{H}]$ rosigitazona (40 nM) pelo GQ-16 e pela rosigitazona não radiomarcados. O K_i obtido para a rosigitazona foi de 2,2 nM. O GQ-16 competiu com a $[^3\text{H}]$ rosigitazona pela ligação ao PPAR γ , porém sua afinidade pelo receptor foi menor, e o K_i obtido para esse composto foi de 160 nM (figura 5.8).

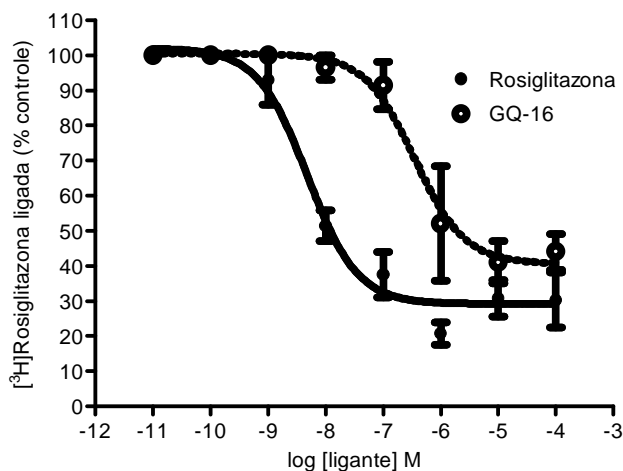


Figura 5.8. Afinidade do GQ-16 pelo PPAR γ . Curvas de deslocamento da [3 H]rosiglitazona do LBD-PPAR γ pela rosiglitazona e GQ-16 não marcados. O GQ-16 e a rosiglitazona competiram pela ligação ao LBD do PPAR γ , e deslocaram o ligante radiomarcado. Dados expressos como média \pm EPM do percentual de [3 H]rosiglitazona ligada em relação ao controle (não tratado com ligante não radiomarcado), de 6 experimentos independentes. O IC $_{50}$ dos dois ligantes não marcados foi calculado utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.0 para Windows, e o K_i foi estimado pela equação de Cheng e Prusoff¹⁶⁴.

Esses achados indicam que o GQ-16 é capaz de interagir diretamente com o LBD do PPAR γ e deslocar o ligante radiomarcado com eficácia comparável à da rosiglitazona, porém o caracterizam como um ligante de baixa afinidade pelo receptor.

5.5 O GQ-16 induz padrão proteolítico do PPAR γ semelhante ao induzido pela rosiglitazona

A ligação de agonistas ao LBD de receptores nucleares (RN) determina alterações conformacionais críticas para a ativação transcricional por esses receptores¹⁷⁰. Essas alterações se refletem em modificação da acessibilidade de sítios proteolíticos na superfície do receptor e, com isso, em aumento da resistência do LBD do receptor à digestão por proteases. Assim, o ensaio de proteção contra digestão por proteases é um dos instrumentos utilizados para estudar alterações conformacionais do PPAR γ na presença de ligantes.

Para investigar a influência do GQ-16 sobre a digestão do PPAR γ por tripsina, o LBD do receptor foi incubado com veículo ou concentrações saturantes de GQ-16, rosiglitazona ou ambos os compostos, e em seguida incubado com tripsina por diferentes períodos de tempo. A incubação com tripsina na ausência de ligantes resultou em digestão completa do LBD do receptor após 60 minutos. A presença do GQ-16 resultou em um padrão proteolítico distinto, caracterizado pela presença de um fragmento de aproximadamente 25 kDa resistente à digestão após incubação com tripsina durante 60 minutos. A rosiglitazona, utilizada como controle positivo, resultou em padrão de digestão semelhante ao observado com o GQ-16 (figura 5.9).

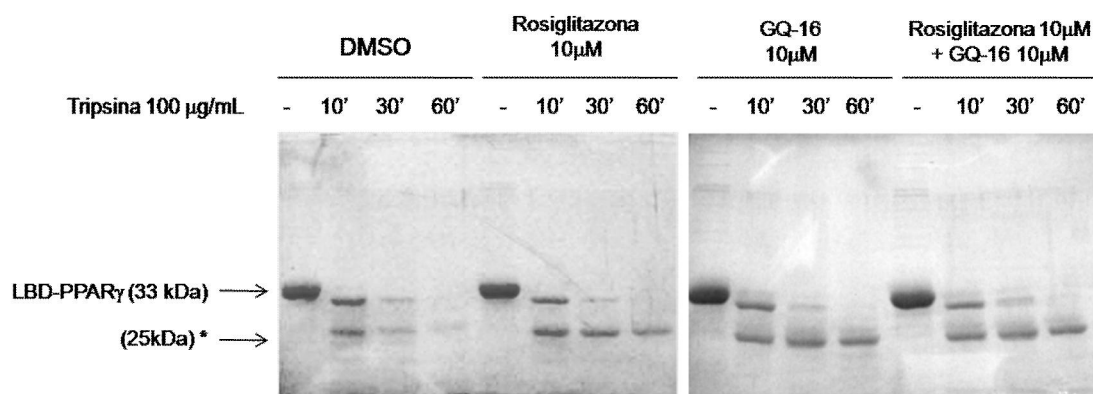


Figura 5.9. O GQ-16 altera a conformação do LBD do PPAR γ de forma semelhante ao agonista completo rosiglitazona. A proteína recombinante his-LBD-hPPAR γ foi incubada com rosiglitazona, GQ-16, ambos os compostos ou veículo (DMSO 0,1%), e em seguida com tripsina (100 μ g.mL) durante 10, 30 ou 60 minutos. Os padrões proteolíticos do LBD do PPAR γ foram analisados por gel de poliacrilamida desnaturante e coloração por azul de Comassie. Notar que o fragmento de 25 kDa foi mais bem protegido contra digestão por tripsina na presença de GQ-16, rosiglitazona ou ambos os compostos.

Esses resultados sugerem que o GQ-16 é capaz de modificar a acessibilidade de sítios proteolíticos na superfície do PPAR γ e, assim, que se liga diretamente ao receptor e induz alteração conformacional de seu LBD.

5.6 O GQ-16 induz a interação do PPAR γ com o coativador SRC-1

A ligação de um agonista ao LBD do PPAR γ resulta em alteração conformacional do receptor, que promove a dissociação de complexos contendo correpressores e o recrutamento de complexos contendo coativadores. Isso permite a interação do receptor com a maquinaria de transcrição basal da célula e, assim, a ativação da expressão de genes regulados positivamente pelo PPAR γ .

Para investigar a base molecular da atividade agonista do GQ-16 observada nos ensaios de transativação, foi avaliada a interação entre o coativador SRC-1 e o PPAR γ induzida pelo GQ-16, por ensaio de interação proteína-proteína (GST “*pull-down assay*”).

Na ausência de agonistas, o PPAR γ não interagiu com o coativador SRC-1. A TZD troglitazona induziu a interação do receptor com o coativador. O GQ-16 também foi capaz de induzir essa interação, em concordância com seu efeito agonista sobre a atividade transcricional do receptor. Além disso, não antagonizou a interação entre o PPAR γ e o SRC-1 induzida pela troglitazona (**figura 5.10**).

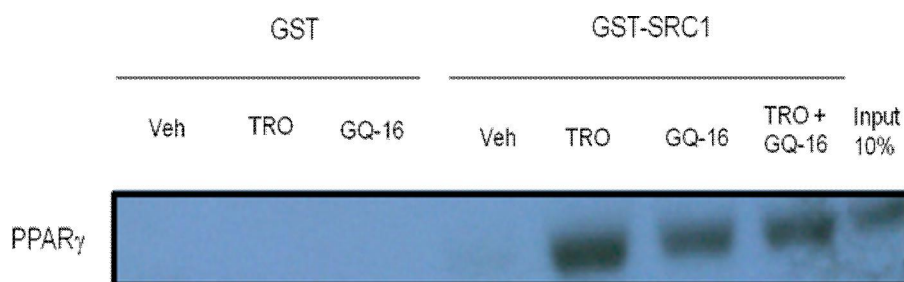


Figura 5.10. O GQ-16 promove a interação direta do PPAR γ com o coativador SRC-1. Ligação do ^{35}S -PPAR γ ao GST-SRC-1 na ausência (Veh) ou presença de troglitazona 10 μM (TRO) ou GQ-16 10 μM . O input corresponde a 10% da quantidade de ^{35}S -PPAR γ utilizada na reação do ensaio GST “*pull-down*”.

Esse resultado indica que o GQ-16 promove a interação entre o PPAR γ e o coativador SRC-1, e sugere que a atividade agonista observada em ensaios de gene

repórter poderia ser devida à sua ligação ao LBD do PPAR γ e aumento da afinidade do receptor por coativadores.

5.7. Efeitos do GQ-16 sobre a adipogênese em cultura de células

Em seguida, a atividade agonista do GQ-16 em PPAR γ foi avaliada também em um contexto biológico, representado pela diferenciação, em cultura, de pré-adipócitos ou células mesenquimais em adipócitos.

O PPAR γ é um regulador-chave da adipogênese *in vitro*¹⁶⁶, e a observação de que camundongos com deleção do *PPARG* não apresentam desenvolvimento do tecido adiposo, e que alguns tipos de lipodistrofia em humanos são determinados por mutações do *PPARG*, evidenciam o papel crítico do receptor na diferenciação e função de adipócitos também *in vivo*⁶⁵.

Para investigar se o GQ-16 influencia a adipogênese dependente de PPAR γ , pré-adipócitos 3T3-L1 foram induzidos a se diferenciar com meio de cultura contendo IBMX, dexametasona e insulina durante dois dias, e tratados com rosiglitazona, GQ-16 ou ambos, durante o período total de oito dias. A avaliação da diferenciação em adipócitos com o corante de lipídeos óleo vermelho O mostrou que o GQ-16 induziu o acúmulo intracelular de lipídeos de forma comparável à rosiglitazona (**figura 5.11.a**). O tratamento com rosiglitazona ou GQ-16 também aumentou a expressão do marcador de diferenciação de adipócitos FABP-A ou aP2 (**figura 5.11.b**). Além disso, o GQ-16 não antagonizou a adipogênese induzida pela rosiglitazona.

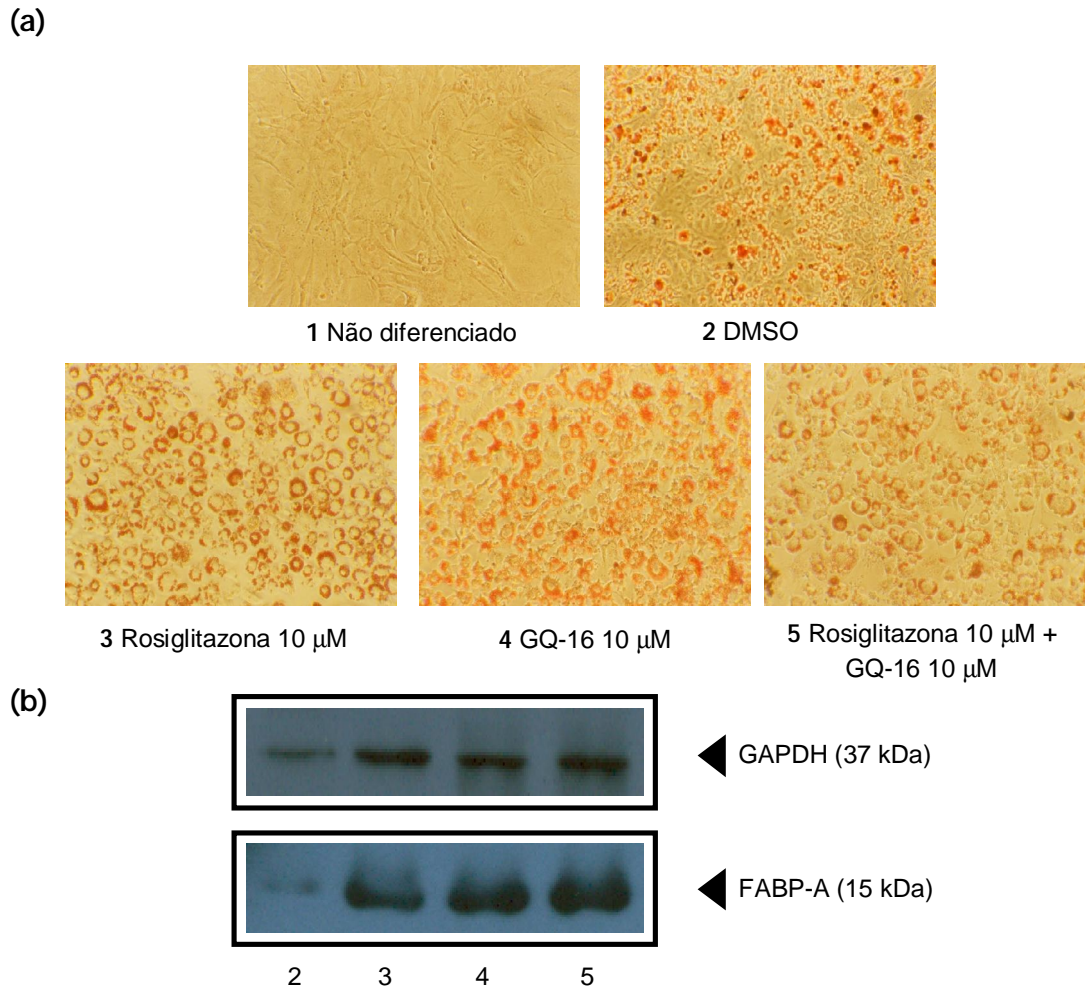


Figura 5.11. Efeito do GQ-16 sobre a adipogênese de pré-adipócitos 3T3-L1. Dois dias após confluência, células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com 1 µM de dexametasona, 0,5 mM de IBMX, e 1 µg/mL de insulina por dois dias, tratadas com 1 µg/mL de insulina por mais dois dias, e cultivadas por mais quatro dias. Durante o período de cultivo, foram tratadas com diferentes ligantes ou DMSO (controle), e depois disso (a) coradas com óleo vermelho O e observadas por microscopia (aumento de 20X), ou (b) lisadas para a avaliação da expressão de FABP-A (aP2) e GAPDH por *western blotting* (1 DMI e DMSO, 2 DMI e rosiglitazona 10 µM, 3 DMI e GQ-16 10 µM, 4 DMI e rosiglitazona + GQ-16 10 µM).

Os pré-adipócitos 3T3-L1 induzidos com a combinação de IBMX, dexametasona e insulina, porém não tratados com agonistas sintéticos de PPAR γ , foram capazes de acumular lipídeos e expressar o marcador de diferenciação FABP-A (figura 5.11). Essa combinação é considerada um potente estímulo indutor de diferenciação adipocitária *in vitro*¹⁷¹, e possivelmente não represente o modelo ideal para a avaliação do efeito de agonistas sintéticos de PPAR γ .

Para testar o efeito do GQ-16 em condições menos potentes de indução de adipogênese, e talvez mais consistentes com as do ambiente extracelular *in vivo*¹⁷¹, os pré-adipócitos 3T3-L1 foram induzidos a se diferenciar somente dexametasona, como previamente descrito¹⁷². Com esse modelo de indução, foi observado acúmulo lipídico discreto na ausência de ligantes de PPAR γ , inferior ao observado em células induzidas com a combinação IBMX, dexametasona e insulina. A adição de rosiglitazona aumentou o acúmulo lipídico intracelular, o que indica que em condições menos potentes de indução de adipogênese o efeito da adição do agonista sintético do PPAR γ foi mais claramente observado. O GQ-16 também induziu acúmulo lipídico, embora de forma menos pronunciada que a rosiglitazona, e não pareceu antagonizar o efeito da rosiglitazona (figura 5.12).

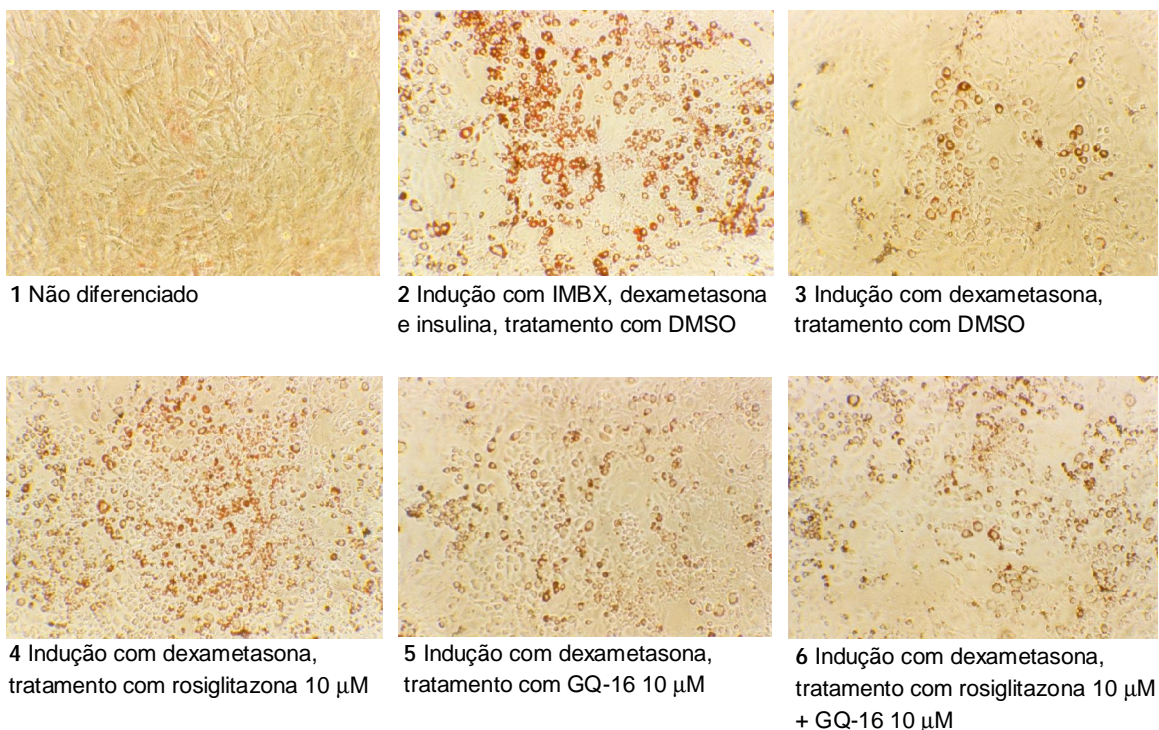
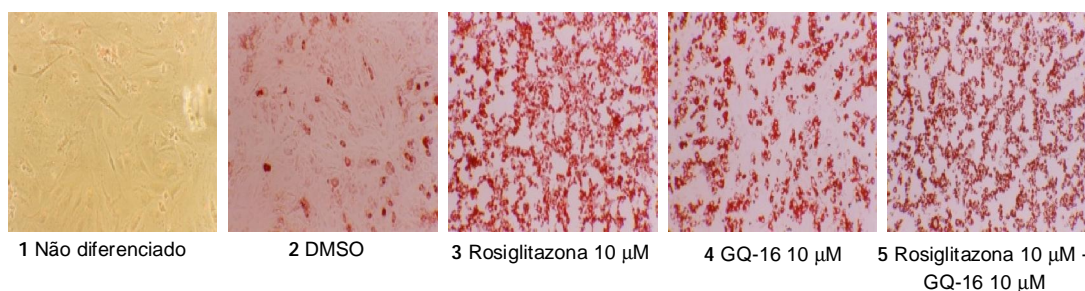


Figura 5.12. Efeito do GQ-16 sobre a adipogênese de pré-adipócitos 3T3-L1. Dois dias após confluência, células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciarem em adipócitos com dexametasona 1 μ M, e cultivadas por mais seis dias. Durante o período, foram tratadas com diferentes ligantes ou DMSO (controle), e depois disso coradas com óleo vermelho O e observadas por microscopia (aumento de 20X).

A adipogênese foi investigada também em células mesenquimais murinas C3H10T1/2 induzidas a diferenciar-se em adipócitos com a exposição à combinação IBMX, dexametasona e insulina. Nesse modelo, o tratamento com rosiglitazona aumentou consideravelmente o acúmulo intracelular de lipídeos (**figura 5.13a**), assim como a expressão do marcador de diferenciação de adipócitos FABP-A (**figura 5.13b**), em relação ao tratamento com veículo (DMSO). Assim, também nesse modelo houve uma resposta positiva da adipogênese à ativação do PPAR γ por agonistas sintéticos. O GQ-16 também foi capaz de aumentar o acúmulo intracelular de lipídeos e a expressão da FABP-A, embora em menor intensidade que a rosiglitazona, e não antagonizou o efeito da rosiglitazona (**figura 5.13**).

(a)



(b)

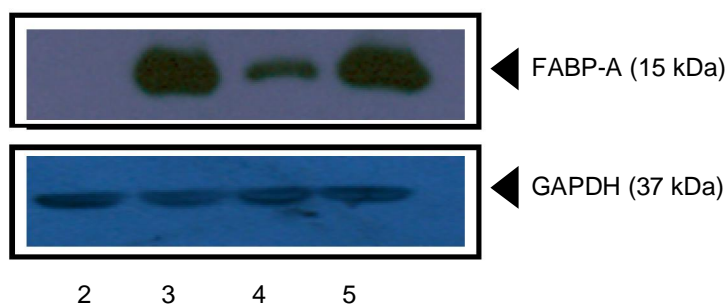


Figura 5.13. Efeito do GQ-16 sobre a adipogênese de células mesenquimais C3H10T1/2. Dois dias após confluência, células mesenquimais C3H10T1/2 foram induzidas a se diferenciarem em adipócitos com 1 μ M de dexametasona, 0,5mM de IBMX e 1 μ g/mL de insulina por dois dias, tratadas com 1 μ g/mL de insulina por mais dois dias e cultivadas por mais quatro dias. Durante o período de cultivo, foram tratadas com diferentes ligantes ou DMSO (controle) e em seguida (a) coradas com óleo vermelho O e observadas em microscopia (aumento de 20X), ou (b) lisadas para a avaliação da expressão de FABP-A (aP2) e GAPDH por *western blotting* (1 Não diferenciados, 2 DMI e DMSO, 3 DMI e rosiglitazona 10 μ M, 4 DMI e GQ-16 10 μ M, 5 DMI e rosiglitazona + GQ-16 10 μ M).

6 DISCUSSÃO

Os efeitos benéficos das TZDs sobre a sensibilidade insulínica e homeostase da glicose são bem documentados em modelos animais de obesidade e resistência insulínica, e também em humanos ⁵. Dois compostos dessa classe, a pioglitazona e a rosiglitazona, são amplamente utilizados como sensibilizadores insulínicos no tratamento do DM2 ⁹⁹.

A identificação do PPAR γ como o alvo molecular das TZDs foi uma das primeiras evidências do papel desse receptor na homeostase energética ⁵. Hoje o PPAR γ , assim como os dois outros isotipos, PPAR α e $-\beta/\delta$, são implicados em uma variedade de processos fisiológicos, e também no desenvolvimento de doenças crônicas, como obesidade, DM2, aterosclerose e câncer ³⁰.

Esses aspectos tornaram o PPAR γ um alvo farmacológico atraente, e um dos principais focos de pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de fármacos para o tratamento de doenças metabólicas e inflamatórias crônicas ⁸⁹. Os diversos efeitos benéficos dos agonistas do PPAR γ , no entanto, são acompanhados de uma série de efeitos desfavoráveis. A utilização clínica das TZDs está associada a retenção hídrica, ganho ponderal e adipogênese, e recentemente tem sido relacionada a aumento da mortalidade cardiovascular e a perda de massa óssea ⁸⁹.

As limitações do uso das TZDs aumentaram o interesse pela identificação de ligantes de PPAR γ que mantenham os efeitos benéficos da ativação do receptor sobre a sensibilidade insulínica, sem apresentar os efeitos desfavoráveis das TZDs. A ampliação dos conhecimentos a respeito da biologia do PPAR γ tem contribuído para responder aos questionamentos sobre como o receptor poderia ser mais bem explorado com finalidade terapêutica ⁹¹. Hoje há evidências de que a ativação parcial e específica do PPAR γ ^{15, 152} e sua modulação diferencial em tecidos distintos ⁹¹ possam ser mais efetivas e seguras, em contraste com a atividade agonista completa e não seletiva das TZDs clássicas ¹⁵.

6.1 Atividade agonista parcial e específica do GQ-16 em PPAR γ

Os resultados desse trabalho indicaram que o GQ-16 é um agonista parcial e específico do PPAR γ .

Nos ensaios de transativação em pró-monócitos humanos U-937, o GQ-16 ativou o PPAR γ de forma concentração-dependente, e a resposta máxima promovida por esse composto foi de aproximadamente 50% daquela observada com o agonista completo rosiglitazona, o que caracteriza o GQ-16 como um agonista parcial do receptor.

O comportamento agonista parcial dessa benzilideno-TZD a distingue das TZDs clássicas, que apresentam atividade agonista completa em PPAR γ ^{13, 173}. Embora a base molecular da atividade agonista parcial de ligantes de RN não esteja definida, é possível que seja resultado de conformação do receptor com menor afinidade por coativadores ¹⁷⁴, ou que envolva outros mecanismos, ainda não caracterizados, relacionados ao contexto celular e ao promotor gênico ¹⁷⁵.

As TZDs utilizadas na prática clínica como sensibilizadores insulínicos, pioglitazona e rosiglitazona, foram inicialmente consideradas agonistas específicos do PPAR γ ¹³. Entretanto, há dados sugestivos de que esses compostos representem, de fato, panagonistas de PPAR.

Em estudos *in vitro*, foi observado que a pioglitazona é um agonista parcial do PPAR α ^{14, 168}, e essa atividade é considerada o mecanismo de redução da concentração plasmática de TG e aumento da concentração de colesterol HDL verificados em modelos animais ¹⁶⁸ e em estudos clínicos com essa TZD ¹⁷⁶. A rosiglitazona também ativa o PPAR α *in vitro* ¹⁴. Embora essa atividade seja observada em concentrações clinicamente relevantes, não há dados sugestivos da ativação desse isotipo de PPAR em estudos *in vivo*. A pioglitazona e a rosiglitazona também apresentam atividade agonista parcial em PPAR β/δ *in vitro* ^{14, 15}.

O efeito protetor de agonistas dos PPARs em condições inflamatórias crônicas como resistência insulínica e aterosclerose são atribuídos, em grande parte, às ações antiinflamatórias desses receptores ⁵. De fato, é bem documentada a

inibição da resposta inflamatória na parede vascular mediada pela ativação do PPAR α pelos fibratos ¹⁷⁷, e o aumento da sensibilidade insulínica conseqüente à supressão da produção de citocinas por adipócitos e macrófagos residentes no tecido adiposo com a ativação do PPAR γ pelas TZDs ¹²⁰.

Apesar dos efeitos favoráveis de agonistas de PPAR sobre a resposta inflamatória, estudos clínicos recentes indicam aumento do risco de infarto do miocárdio e mortalidade cardiovascular com a utilização da TZD rosiglitazona ⁹. Efeitos cardiovasculares desfavoráveis também foram observados em ensaios clínicos com o muraglitazar, um agonista duplo de PPAR α e $-\gamma$ ¹². Considerando que os benefícios vasculares de agonistas de PPARs são atribuídos à atividade antiinflamatória desses receptores, a identificação desses efeitos desfavoráveis motivou esforços para melhor compreensão do papel de cada isotipo de PPAR na resposta inflamatória, e melhor caracterização dos efeitos de agonistas desses receptores ¹⁵. Nesse contexto, um estudo envolvendo monócitos e macrófagos humanos em cultura confirmou os efeitos antiinflamatórios do PPAR α e $-\gamma$, e mostrou que o PPAR β/δ , de forma inesperada, regula positivamente a resposta inflamatória nessas células, e atua de forma sinérgica com outros estímulos pró-inflamatórios ¹⁵. Nesse mesmo estudo, foi observada atividade pró-inflamatória das TZDs em macrófagos e monócitos, mediada pela ativação do PPAR β/δ , em concentrações na faixa terapêutica ¹⁵. Esse último achado sugere que os efeitos cardiovasculares adversos observados com o uso da rosiglitazona poderiam ser mediados por ações independentes da ativação do PPAR γ e, assim, que ligantes específicos de PPAR γ poderiam ser mais seguros para o tratamento de doenças metabólicas crônicas ¹⁵.

Nesse estudo, foi confirmada a atividade agonista parcial da rosiglitazona em PPAR α e $-\beta/\delta$, e não foi observada indução da atividade transcricional desses isotipos de PPAR pelo GQ-16, o que sugere sua atividade agonista específica em PPAR γ , e o diferencia das TZDs clássicas.

Agonistas parciais apresentam, caracteristicamente, a capacidade de antagonizar o efeito de um agonista completo. Assim, foi avaliada a capacidade de o GQ-16 atenuar a atividade transcricional do PPAR γ induzida pelo agonista completo rosiglitazona. Em ensaios de gene repórter, o GQ-16 não antagonizou a atividade transcricional do PPAR γ induzida por uma concentração saturante de rosiglitazona.

Foi observado, inclusive, efeito aditivo dos dois compostos sobre a transcrição do gene repórter luciferase, embora não significativo.

Considerando que pró-monócitos U-937 expressam PPAR α e $-\beta/\delta$ ¹⁵, e que esses receptores são ativados pela rosiglitazona¹⁵, é possível que a ausência de atividade antagonista do GQ-16 nesse ensaio tenha sido resultado da transcrição do gene repórter luciferase mediada pela ativação do PPAR α e $-\beta/\delta$ endógenos na presença de rosiglitazona. Assim, a expressão final do gene repórter luciferase seria o resultado de sua indução pelo PPAR γ transfectado, ativado pelo GQ-16, e pelo PPAR α e $-\beta/\delta$ endógenos ativados pela rosiglitazona.

Para investigar essa possibilidade, foram utilizados nos ensaios de transativação o vetor quimérico contendo o LBD do PPAR γ fusionado ao DBD do fator de transcrição de leveduras GAL4 e um plasmídeo contendo a sequência do repórter luciferase dirigida pelo elemento responsivo ao GAL4 (GAL-Luc). Uma vez que o fator de transcrição GAL4 é exclusivo de leveduras e, assim, seu elemento responsivo não é influenciado por receptores endógenos de células de mamíferos, a utilização do receptor quimérico permitiu avaliar isoladamente a resposta transcricional resultante da ativação do LBD do PPAR γ pelos ligantes.

A ativação máxima do receptor quimérico pelo GQ-16 foi de aproximadamente 30% daquela induzida pela rosiglitazona, discretamente inferior à obtida nos experimentos com o PPAR γ selvagem, em que o composto ativou o receptor com eficácia de 50% daquela observada com a rosiglitazona. Diferenças de comportamento em ensaios de gene repórter com o PPAR γ selvagem ou com receptores quiméricos contendo o LBD-PPAR γ foram observadas previamente com outros ligantes¹⁷⁸ e, embora não sejam completamente compreendidas, uma especulação é a presença de coativadores que se ligam ao DBD do receptor¹⁷⁹ e que poderiam, assim, explicar a maior eficácia de ligantes na presença do PPAR γ selvagem, com o DBD preservado¹⁷⁸. É possível também que essas diferenças sejam devidas à interação intramolecular dos domínios estruturais do PPAR γ , que parece influenciar a ligação de ligantes ao LBD e, assim, a atividade transcricional do receptor em resposta a ligantes¹⁸⁰.

Na presença do receptor quimérico, o GQ-16 também não antagonizou a ativação do LBD-PPAR γ pela rosiglitazona e foi observado aumento não esperado da indução da atividade transcricional do receptor quimérico pela rosiglitazona na presença do GQ-16. A ausência do efeito antagonista e, principalmente, o efeito aditivo do GQ-16 sobre a indução da atividade transcricional do PPAR γ pela rosiglitazona, poderiam ser explicados pela ligação do GQ-16 a um segundo sítio no LBD do PPAR γ , diferente do sítio de ligação da rosiglitazona, que permitiria a ativação simultânea do receptor pelo GQ-16 e pela rosiglitazona, e efeito aditivo sobre o recrutamento de coativadores e atividade transcricional do receptor.

Rocchi *et al.* identificaram um ligante de PPAR γ estruturalmente diferente das TZDs e dos ligantes baseados em L-tirosina descritos previamente¹⁸¹. Esse ligante, denominado FMOC-L-Leucina (N-[9-fluorenilmetiloxilcarbonil]-levo-leucina), foi caracterizado como um agonista parcial e específico do receptor por ensaios de gene repórter e, como o GQ-16, não antagonizou a atividade transcricional do PPAR γ induzida pela rosiglitazona¹⁸².

A ligação do FMOC-L-Leucina ao LBD do PPAR γ foi investigada por espectrometria de massa com ionização por impacto de elétrons (*electrospray ionization mass spectrometry*), que permite determinar a massa molecular de complexos protéicos não covalentes, e os resultados sugeriram a ligação de duas moléculas do ligante ao receptor simultaneamente¹⁸². Em condições experimentais semelhantes, houve indícios de ligação de somente uma molécula de rosiglitazona ao LBD do PPAR γ ¹⁸². Embora os autores não tenham caracterizado um segundo sítio de ligação no LBD do receptor, esses resultados indicam a possibilidade de o PPAR γ acomodar dois ligantes simultaneamente, seja no bolso de ligação já estabelecido, constituído pelas hélices 2, 3, 4, 5, 10, 11 e 12, e pelas fitas beta 3 e 4³⁹, seja pela ligação de um ligante a esse bolso de ligação e de outro a um segundo sítio no LBD. Estudos estruturais são necessários para esclarecer se ocorre ligação do GQ-16 a um segundo sítio no LBD do PPAR γ .

A ocupação simultânea do LBD do PPAR γ por dois ligantes poderia ser sugerida também por ensaios bioquímicos, entre eles experimentos de saturação com a utilização, em conjunto, de GQ-16 e rosiglitazona radiomarcados, e ensaios de recrutamento de coativadores. Por meio desses ensaios, foi sugerida a ocupação

simultânea do LBD do LXR por um agonista sintético e pela glicose e é possível, então, que outros RN apresentem também um segundo sítio de ligação no LBD ¹⁸³. Entretanto, o GQ-16 radiomarcado ainda não é disponível. Além disso, presença de um segundo sítio de ligação no LBD do PPAR γ poderia ser mais bem definida com a resolução da estrutura cristalográfica do LBD do receptor ligado ao GQ-16.

6.2 Base molecular da atividade agonista do GQ-16 em PPAR γ

Para investigar os mecanismos da atividade agonista do GQ-16 em PPAR γ , foram realizados ensaios de competição com rosiglitazona radiomarcada, o ensaio de proteção contra digestão por protease e o ensaio de interação do receptor com o coativador SRC-1.

Os ensaios de competição utilizando a proteína de fusão His-LBD-hPPAR γ indicaram que o GQ-16 se ligou diretamente ao LBD do PPAR γ , foi capaz de competir pela ligação ao receptor e deslocar a rosiglitazona radiomarcada de forma concentração-dependente. Sua afinidade pelo LBD do PPAR γ , no entanto, foi menor que a da rosiglitazona.

A base física para a ativação de um RN por agonistas parece ser a estabilização do complexo ligante-receptor em uma conformação que possa interagir com proteínas coativadoras com maior afinidade ^{184, 185}. Esses multímeros então interagem com a maquinaria de transcrição da célula de modo a aumentar a taxa de início da transcrição. A ligação de um agonista resulta na indução de uma conformação compacta do LBD, mais resistente à digestão por protease quando comparada com o receptor não ligado ⁴⁰. Foi demonstrado previamente que concentrações saturantes de tiazolidinedionas induzem alteração da conformação do PPAR γ , evidenciada pela geração de um fragmento resistente à digestão por protease ¹⁷³, de forma semelhante ao que foi observado previamente para outros RN.

O padrão de proteção do LBD do PPAR γ contra digestão por tripsina na presença do GQ-16 foi semelhante ao observado em presença do agonista completo rosiglitazona, e comparável ao padrão descrito por estudos prévios ^{173, 186}, em que o padrão típico de proteção contra proteases na presença de agonistas foi caracterizado pela observação de um fragmento de 27 kDa resistente à digestão enzimática. Esse resultado sugere que o GQ-16 se liga diretamente ao receptor, e que sua ligação induz alteração conformacional do LBD do PPAR γ típica de um agonista, mais compacta que a do receptor não ligado. Essa conformação confere ao PPAR γ resistência contra digestão por protease, de forma análoga ao observado com agonistas de outros RN ¹⁷⁵.

A base molecular da atividade de agonistas parciais e moduladores seletivos de PPAR γ não é completamente compreendida. Há dados sugestivos de que esses ligantes possam produzir conformações diferentes do receptor em relação aos agonistas completos ¹⁸⁷, e que isso resulte em interação diferencial com coativadores e, assim, em padrões distintos de expressão gênica. É possível, então, que ligantes que não estabilizem o receptor em sua conformação considerada completamente ativa poderiam ser detectados como agonistas parciais ou moduladores seletivos em ensaios funcionais envolvendo culturas de células ⁷⁸. Assim, uma possibilidade para explicar o comportamento agonista parcial do GQ-16 em PPAR γ seria a indução de conformação distinta do LBD do receptor em relação ao agonista completo. Uma conformação distinta do PPAR γ ligado ao GQ-16 poderia justificar também a ausência da atividade antagonista desse composto observada nos ensaios com cultura de células. A avaliação da conformação do LBD do PPAR γ pelo ensaio de proteção contra tripsina, no entanto, sugeriu que o GQ-16 induz alteração conformacional semelhante ao agonista completo rosiglitazona.

Alguns ligantes de PPAR γ caracterizados por estudos funcionais como agonistas parciais e moduladores seletivos do receptor foram também avaliados em ensaios de proteção contra protease, entre eles o irbersartan ¹⁸⁸, PAT5A ¹⁸⁹, L-764406 ¹⁹⁰ e FMOC-L-Leucina ¹⁸². Em todos os casos, foi observado padrão de digestão semelhante ao do agonista completo. É possível que as diferenças de conformação responsáveis pela atividade agonista parcial e moduladora seletiva de ligantes de PPAR γ sejam muito sutis para detecção por esse ensaio. Essas

diferenças, no entanto, podem ser caracterizadas por estudos cristalográficos¹⁸⁷. Esses estudos poderiam também esclarecer a possibilidade de a ausência efeito antagonista de agonistas parciais do PPAR γ , como é o caso do FMOC-L-Leucina e do GQ-16, ser devida à ligação de ligantes a um segundo sítio no LBD e, assim, indução de conformação distinta, que estabilizasse a conformação ativa clássica induzida pelo agonista completo.

A regulação da transcrição gênica pelo PPAR γ envolve sua interação com uma variedade de correguladores. A alteração conformacional do receptor desencadeada pela ligação de um agonista resulta em novas superfícies de interação proteína-proteína, o que permite dissociação de correpressores, interação com coativadores e ativação da expressão gênica, por um mecanismo que envolve modificações na estrutura da cromatina e contato com a maquinaria de início da transcrição⁴⁵. As diferenças entre agonistas completos e parciais do PPAR γ são atribuídas à menor capacidade de os agonistas parciais induzirem o recrutamento de coativadores.

A atividade agonista parcial do GQ-16 em PPAR γ poderia, então, ser mediada por uma alteração conformacional do receptor que resultasse em interação limitada com coativadores. Até o momento, foi investigada a influência desse composto sobre a interação entre o PPAR γ e o coativador SRC-1. Consistentemente com sua capacidade de ativar o receptor em ensaios de gene repórter, o GQ-16 induziu a interação do PPAR γ com o SRC-1. Essa interação foi comparável àquela promovida pelo agonista completo troglitazona, diferentemente do que seria esperado para um composto com atividade agonista parcial.

Esses resultados levantam a questão de como um composto que regula a expressão gênica dependente de PPAR γ como um agonista parcial é capaz de promover o recrutamento de um coativador de maneira comparável a um agonista completo. Uma possibilidade seria a de o GQ-16 reduzir a afinidade do PPAR γ por outros coativadores não avaliados nesse estudo. Assim, o resultado final da ligação do GQ-16 ao PPAR γ seria o recrutamento de menos proteínas do complexo coativador, e menor atividade transcricional do receptor. Outra possível explicação

para esse resultado é que a utilização de concentrações elevadas dos dois ligantes (10 μ M) tenha dificultado a observação de diferenças entre eles.

É possível também que o GQ-16 se comporte como um agonista completo em condições experimentais diferentes das estudadas, que avaliem os efeitos do PPAR γ em tipos celulares e genes distintos.

6.3 Atividade agonista do GQ-16 em contexto biológico

As TZDs pioglitazona e rosiglitazona, agonistas completos do PPAR γ , são capazes de aumentar a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos¹³, uma ação considerada pelo menos em parte responsável por seus efeitos desfavoráveis de adipogênese e ganho ponderal⁸⁹.

Nesse trabalho, a diferenciação de adipócitos foi estudada em dois tipos celulares, pré-adipócitos 3T3-L1 e células mesenquimais C3H10T1/2.

O GQ-16 foi capaz de aumentar a adipogênese em dois modelos de indução de diferenciação de adipócitos claramente influenciados pela presença de um ligante sintético de PPAR γ , os pré-adipócitos 3T3-L1 induzidos com dexametasona, e as células mesenquimais C3H10T1/2 induzidas com a combinação IMBX, dexametasona e insulina. Nos dois casos, foi observado menor acúmulo intracelular de lipídeos em células tratadas com GQ-16 em relação às tratadas com rosiglitazona. Em células C3H10T1/2, também foi observada menor expressão do marcador de diferenciação FABP-A em resposta ao tratamento com GQ-16.

Em nenhum modelo estudado foi observada atividade antagonista do GQ-16 sobre a adipogênese estimulada pela rosiglitazona, em concordância com os resultados dos ensaios de gene repórter.

6.4 Comportamento discordante do GQ-16 em estudos *in vitro* e em cultura de células

Os resultados indicaram comportamento discordante do GQ-16 em estudos *in vitro* e em cultura de células. No ensaio de competição, O GQ-16 deslocou

completamente a [³H]rosiglitazona do LBD do PPAR γ , embora tenha apresentado menor afinidade pelo receptor que a rosiglitazona. No ensaio de interação proteína-proteína (“*GST pull-down*”), induziu a interação do receptor com o coativador SRC-1 de forma comparável à troglitazona. Nas mesmas concentrações utilizadas nos estudos *in vitro*, apresentou efeito agonista parcial nos ensaios de transativação em pró-monócitos U-937, e nos experimentos de adipogênese com pré-adipócitos 3T3-L1 induzidos com dexametasona, e com células mesenquimais C3H10T1/2.

A menor afinidade do PPAR γ ligado ao GQ-16 por outros coativadores não estudados poderia explicar sua atividade agonista parcial observada nos ensaios celulares, porém não explicaria como um agonista parcial, capaz de se ligar ao LBD do PPAR γ nos ensaios de competição e deslocar o ligante radiomarcado, não antagonizou os efeitos de um agonista completo, como foi sugerido pelos ensaios de gene repórter e confirmado nos ensaios de adipogênese.

Além da influência do GQ-16 sobre a afinidade do PPAR γ por outros corretores, é possível que outros fatores também estejam envolvidos na resposta à ativação do receptor por esse ligante no contexto celular, entre eles a modulação da atividade do PPAR γ por modificações pós-traducionais como fosforilação^{191, 192} e sumoilação¹⁹¹, específicas de acordo com o tipo celular. A sequência do promotor de genes-alvo pode também influenciar as alterações conformacionais induzidas pela ligação de um ligante e, assim, a interação do receptor com corretores¹⁵⁶.

Outra possibilidade para explicar as divergências do comportamento do GQ-16 nos estudos *in vitro* e em cultura de células seria o processo de transporte desse ligante para o núcleo. A sinalização por compostos lipídicos, entre eles os ligantes de PPARs, requer a cooperação desses receptores com uma família de proteínas ligadoras de AG (FABP), que interagem com esses receptores por meio de ligações não covalentes, e os transportam entre compartimentos celulares e para o núcleo¹⁹³.

A visão que se tem hoje é a de que AG e outros ligantes de PPAR captados pela célula sejam ligados por uma FABP no citoplasma para seu transporte até o núcleo. No núcleo, o complexo formado pela FABP e o AG, ou um ligante sintético

de PPAR, se liga ao receptor por interações específicas proteína-proteína, ou seja, para cada isotipo de RN que atua como sensor de lipídeos há uma FABP específica¹⁹⁴. Os detalhes desse processo não são claros, mas há indícios de que o transporte para o núcleo e a interação com o PPAR envolvam mecanismos independentes do ligante, mas também sejam modulado pelo próprio ligante¹⁹⁵. Considerando esse último aspecto, as propriedades funcionais de um ligante, no contexto celular, poderiam ser influenciadas por sua interação com a FABP e modulação de seu transporte até o núcleo. Assim, as características da interação do GQ-16 com a FABP no citoplasma (a FABP-A, no caso do PPAR γ) poderiam explicar as diferenças de seu comportamento em estudos *in vitro* e em cultura de células. Essas diferenças poderiam justificar a incapacidade de o GQ-16 antagonizar o efeito da rosiglitazona, sugerida pelos resultados dos ensaios de gene repórter e de diferenciação de adipócitos.

6.5 É possível prever a atividade do GQ-16 *in vivo*?

Os estudos com animais transgênicos, a observação de características fenotípicas de polimorfismos ou mutações do *PPARG* em humanos e, também, as propriedades farmacológicas de ligantes de PPAR γ têm fornecido dados a respeito de um espectro de atividade do receptor, desde a ausência de atividade, situação em que são observados lipodistrofia e resistência insulínica extrema, passando pela atividade parcial, até a atividade total ou mesmo aumentada, condição em que é observada obesidade, porém com aumento da sensibilidade insulínica¹⁵². Esses dados, embora não tenham elucidado o papel do receptor em condições fisiológicas e patológicas, sugerem que a ativação parcial do PPAR γ seja a melhor estratégia para redução da resistência insulínica sem aumento da adipogênese¹⁹⁶.

De fato, embora diversos estudos correlacionem a ativação transcricional promovida por ligantes de PPAR γ *in vitro* com seus efeitos antidiabéticos *in vivo*, muitos compostos com atividade agonista parcial apresentam efeitos sensibilizadores insulínicos potentes¹⁵², entre eles a TZD PAT5A¹⁸⁹ e o ligante derivado de L-tirosina FMOC-L-leucina¹⁸². A base molecular dos efeitos dos agonistas parciais não está elucidada, mas pode envolver a desrepressão de um

conjunto de genes metabolicamente importantes, e não necessariamente a ativação de sua transcrição⁷⁷, ou mesmo o antagonismo ao efeito de ligantes endógenos de PPAR e, assim, manutenção de baixos níveis de atividade do receptor¹⁵⁶.

Uma característica interessante dos ligantes de PPAR γ descritos como agonistas parciais do receptor é a sua capacidade de regular a expressão gênica dependente de PPAR γ de forma diferente dos agonistas completos, em particular sua capacidade de modular a expressão de genes necessários aos efeitos sensibilizadores insulínicos da ativação do receptor, sem influenciar genes envolvidos em adipogênese ou retenção hídrica¹⁵⁶. Essa atividade originou o conceito de modulação seletiva do PPAR γ , e parece ser resultado da indução de alterações conformacionais distintas do receptor por esses ligantes, com a criação de diferentes superfícies de interação com correguladores da transcrição e, assim, modificação da afinidade do receptor por correguladores e indução de diferentes respostas do PPAR γ ¹⁵⁶. A modulação seletiva da atividade do receptor, de acordo com o contexto celular, é considerada hoje a base molecular da atividade benéfica *in vivo* de alguns ligantes de PPAR γ e representa uma forma promissora de abordagem farmacológica desses receptores. A **tabela 6.1** apresenta os resultados de estudos *in vivo* e as propriedades funcionais de alguns ligantes de PPAR γ caracterizados como agonistas parciais do receptor.

Tabela 6.1. Propriedades funcionais e efeitos *in vivo* de alguns ligantes de PPAR γ caracterizados como agonistas parciais.

Composto	Indução seletiva de genes-alvo	Indução de adipogênese <i>in vitro</i>	Efeitos <i>in vivo</i> (modelo)
nTZDpa ⁷⁸	Sim	Sim	↓ insulinemia e glicemia ↓ leptinemia ↓ ganho ponderal (camundongos, dieta hiperlipídica)
Halofenato ¹⁵⁸	Sim	Não	↓ insulinemia e glicemia (camundongos <i>ob/ob</i> e ratos Zucker <i>fa/fa</i>)
FMOC-L-Leucina ¹⁸²	Não avaliado	Sim	↑ tolerância à glicose (camundongos e submetidos a dieta padrão ou dieta hiperlipídica)
		< rosiglitazona	↓ insulinemia e glicemia ↔ peso (camundongos <i>db/db</i>)
PA-082 ¹⁹⁷	Sim	Discreta	Não avaliados
PAT5A ¹⁸⁹	Sim	Sim	↓ insulinemia e glicemia ↓ ganho ponderal (camundongos <i>ob/ob</i> e <i>db/db</i>)
FK614 ^{198, 199 200}	Sim	Sim	↓ insulinemia e glicemia ~ rosiglitazona (camundongos <i>ob/ob</i> e <i>db/db</i>)
			↓ trigliceridemia (camundongos selvagens)
KR-62980 ²⁰¹	Sim	Sim	↓ insulinemia e glicemia < rosiglitazona ↓ ganho ponderal (camundongos, dieta hiperlipídica)
M5 ²⁰²	Sim	Não avaliado	↓ glicemia ↓ resistência insulínica (HOMA) ↓ retenção hídrica (camundongos <i>db/db</i> ratos Zucker <i>fa/fa</i>)

HOMA IR: índice de resistência insulínica (*homeostasis model assessment*)

Considerando que agonistas parciais do PPAR γ tenham sido em geral caracterizados também como moduladores seletivos do receptor, ainda que os efeitos do GQ-16 sobre a expressão gênica em diferentes tecidos não tenham sido avaliados é possível que a atividade agonista parcial da benzilideno-TZD GQ-16 em PPAR γ se traduza em efeitos sensibilizadores insulínicos *in vivo*, e em menor indução da adipogênese.

Outra característica que distingue o GQ-16 das TZDs clássicas é sua atividade seletiva em PPAR γ . Embora muitos efeitos benéficos das TZDs, em especial da pioglitazona, sejam atribuídos à ativação do PPAR α , há dados sugestivos de que a alguns de seus efeitos adversos sejam mediados pela ativação de PPAR β/δ , considerando que em culturas de monócitos e macrófagos humanos foi observada atividade pró-inflamatória das TZDs clássicas, mediada pela ativação do PPAR β/δ ¹⁵. É possível, então, que a seletividade do GQ-16 pelo PPAR γ se traduza também em benefícios *in vivo*. As vantagens teóricas dessas características do GQ-16, no entanto, devem ser confirmadas por estudos *in vivo*. Além disso, a resolução da estrutura cristalográfica do PPAR γ ligado ao GQ-16 poderia contribuir para melhor compreensão dos determinantes de seletividade da ligação de ligantes ao PPAR γ e, assim, para o desenvolvimento de novos ligantes com maior especificidade pelo receptor.

7 CONCLUSÃO

- Entre os compostos sintéticos testados, a benzilideno-TZD GQ-16 induziu a atividade transcricional do PPAR γ de forma significativa.
- O GQ-16 apresentou atividade agonista parcial em PPAR γ .
- O GQ-16 não apresentou atividade agonista nos PPAR α e $-\beta/\delta$ e no RXR α .
- O GQ-16 não antagonizou a atividade transcricional do PPAR γ induzida pelo agonista completo rosiglitazona.
- O GQ-16 se ligou diretamente ao LBD do PPAR γ , porém com menor afinidade que o agonista completo rosiglitazona.
- A conformação do LBD do PPAR γ ligado ao GQ-16 foi semelhante à observada com o agonista completo rosiglitazona no ensaio de proteção contra digestão por protease.
- O GQ-16 induziu a interação entre o PPAR γ e o SRC-1 de forma comparável ao agonista completo troglitazona.
- O GQ-16 apresentou potencial adipogênico em cultura semelhante ao do agonista completo rosiglitazona em células 3T3-L1 induzidas a diferenciar-se com insulina, dexametasona e IMBX, e inferior ao do agonista completo rosiglitazona em células 3T3-L1 induzidas a diferenciar-se com dexametasona, e em células C3H10T1/2 induzidas a diferenciar-se com insulina, dexametasona e IMBX.

REFERÊNCIAS

1. Obesity: preventing and managing the global epidemic. World Health Organisation. 2000:16-37.
2. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004 May;27(5):1047-53.
3. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988 Dec;37(12):1595-607.
4. Kahn SE. Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Sep;86(9):4047-58.
5. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*. 2004 Apr;10(4):355-61.
6. Oakes ND, Thalen PG, Jacinto SM, Ljung B. Thiazolidinediones increase plasma-adipose tissue FFA exchange capacity and enhance insulin-mediated control of systemic FFA availability. *Diabetes*. 2001 May;50(5):1158-65.
7. Miles PD, Romeo OM, Higo K, Cohen A, Rafaat K, Olefsky JM. TNF-alpha-induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone. *Diabetes*. 1997 Nov;46(11):1678-83.
8. Combs TP, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang WJ, Zhang BB, et al. Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology*. 2002 Mar;143(3):998-1007.
9. Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*. 2007 Jun 14;356(24):2457-71.
10. Grey A. Skeletal consequences of thiazolidinedione therapy. *Osteoporos Int*. 2008 Feb;19(2):129-37.
11. Grey A, Bolland M, Gamble G, Wattie D, Horne A, Davidson J, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone decreases bone formation and bone mineral density in healthy postmenopausal women: a randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Apr;92(4):1305-10.
12. Nissen SE, Wolski K, Topol EJ. Effect of muraglitazar on death and major adverse cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2005 Nov 23;294(20):2581-6.
13. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-

- activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* 1995 Jun 2;270(22):12953-6.
14. Sakamoto J, Kimura H, Moriyama S, Odaka H, Momose Y, Sugiyama Y, et al. Activation of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtypes by pioglitazone. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Nov 30;278(3):704-11.
 15. Hall JM, McDonnell DP. The molecular mechanisms underlying the proinflammatory actions of thiazolidinediones in human macrophages. *Mol Endocrinol.* 2007 Aug;21(8):1756-68.
 16. Rzonca SO, Suva LJ, Gaddy D, Montague DC, Lecka-Czernik B. Bone is a target for the antidiabetic compound rosiglitazone. *Endocrinology.* 2004 Jan;145(1):401-6.
 17. Sonoda J, Pei L, Evans RM. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Lett.* 2008 Jan 9;582(1):2-9.
 18. Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H, Laudet V. The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci.* 2003 Feb 15;116(Pt 4):585-6.
 19. Glass CK. Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 2006 Mar;116(3):556-60.
 20. Olefsky JM. Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem.* 2001 Oct 5;276(40):36863-4.
 21. Robinson-Rechavi M, Carpentier AS, Duffraisse M, Laudet V. How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet.* 2001 Oct;17(10):554-6.
 22. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev.* 2006 Dec;58(4):726-41.
 23. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 1990 Oct 18;347(6294):645-50.
 24. Feige JN, Gelman L, Tudor C, Engelborghs Y, Wahli W, Desvergne B. Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *J Biol Chem.* 2005 May 6;280(18):17880-90.
 25. Rosen ED, Spiegelman BM. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem.* 2001 Oct 12;276(41):37731-4.
 26. A IJ, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem.* 1997 Aug 8;272(32):20108-17.

27. Rosenfeld MG, Lunyak VV, Glass CK. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev.* 2006 Jun 1;20(11):1405-28.
28. Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug;1771(8):926-35.
29. Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science.* 2001 Nov 30;294(5548):1866-70.
30. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med.* 2002;53:409-35.
31. Dowell P, Ishmael JE, Avram D, Peterson VJ, Nevriy DJ, Leid M. Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacting protein. *J Biol Chem.* 1999 May 28;274(22):15901-7.
32. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature.* 1998 Sep 10;395(6698):137-43.
33. Pascual G, Glass CK. Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends Endocrinol Metab.* 2006 Oct;17(8):321-7.
34. Cunard R, Eto Y, Muljadi JT, Glass CK, Kelly CJ, Ricote M. Repression of IFN-gamma expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Immunol.* 2004 Jun 15;172(12):7530-6.
35. Gervois P, Vu-Dac N, Kleemann R, Kockx M, Dubois G, Laine B, et al. Negative regulation of human fibrinogen gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists via inhibition of CCAAT box/enhancer-binding protein beta. *J Biol Chem.* 2001 Sep 7;276(36):33471-7.
36. Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM, et al. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science.* 2003 Oct 17;302(5644):453-7.
37. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature.* 2005 Sep 29;437(7059):759-63.
38. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, et al. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell.* 1999 Mar;3(3):397-403.
39. Zoete V, Grosdidier A, Michielin O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug;1771(8):915-25.

40. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Plunket KD, Moore LB, Collins JL, et al. Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):13919-24.
41. Li Y, Lambert MH, Xu HE. Activation of nuclear receptors: a perspective from structural genomics. *Structure*. 2003 Jul;11(7):741-6.
42. McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*. 2002 Feb 22;108(4):465-74.
43. Heikkinen S, Auwerx J, Argmann CA. PPARgamma in human and mouse physiology. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1771(8):999-1013.
44. Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest*. 2006 Mar;116(3):581-9.
45. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. 1999 Oct;20(5):649-88.
46. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jul 19;91(15):7355-9.
47. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*. 1999 Jun;103(11):1489-98.
48. Palmer CN, Hsu MH, Griffin KJ, Raucy JL, Johnson EF. Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver. *Mol Pharmacol*. 1998 Jan;53(1):14-22.
49. Gervois P, Torra IP, Chinetti G, Grotzinger T, Dubois G, Fruchart JC, et al. A truncated human peroxisome proliferator-activated receptor alpha splice variant with dominant negative activity. *Mol Endocrinol*. 1999 Sep;13(9):1535-49.
50. Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest*. 2006 Mar;116(3):571-80.
51. Kim H, Haluzik M, Asghar Z, Yau D, Joseph JW, Fernandez AM, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist treatment in a transgenic model of type 2 diabetes reverses the lipotoxic state and improves glucose homeostasis. *Diabetes*. 2003 Jul;52(7):1770-8.
52. Linton MF, Fazio S. Re-emergence of fibrates in the management of dyslipidemia and cardiovascular risk. *Curr Atheroscler Rep*. 2000 Jan;2(1):29-35.

53. Li AC, Palinski W. Peroxisome proliferator-activated receptors: how their effects on macrophages can lead to the development of a new drug therapy against atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2006;46:1-39.
54. Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2005 May;26(5):244-51.
55. Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, et al. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol.* 2000 Jul;20(14):5119-28.
56. Barak Y, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, et al. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan 8;99(1):303-8.
57. Barish GD, Narkar VA, Evans RM. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2006 Mar;116(3):590-7.
58. Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell.* 2003 Apr 18;113(2):159-70.
59. Wang YX, Zhang CL, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR, et al. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol.* 2004 Oct;2(10):e294.
60. Oliver WR, Jr., Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Apr 24;98(9):5306-11.
61. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 1994 May 15;8(10):1224-34.
62. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem.* 1997 Jul 25;272(30):18779-89.
63. Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS. Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J Biol Chem.* 1997 Aug 8;272(32):20230-5.
64. Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, et al. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell.* 1999 Feb;3(2):151-8.

65. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell*. 1999 Oct;4(4):611-7.
66. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*. 2000 Jun 1;14(11):1293-307.
67. Imai T, Takakuwa R, Marchand S, Dentz E, Bornert JM, Messaddeq N, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 30;101(13):4543-7.
68. Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Steppan CM, Lazar MA. A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat Med*. 2002 Oct;8(10):1122-8.
69. Stienstra R, Duval C, Keshtkar S, van der Laak J, Kersten S, Muller M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation promotes infiltration of alternatively activated macrophages into adipose tissue. *J Biol Chem*. 2008 Aug 15;283(33):22620-7.
70. Ribon V, Johnson JH, Camp HS, Saltiel AR. Thiazolidinediones and insulin resistance: peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation stimulates expression of the CAP gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 8;95(25):14751-6.
71. Burant CF, Sreenan S, Hirano K, Tai TA, Lohmiller J, Lukens J, et al. Troglitazone action is independent of adipose tissue. *J Clin Invest*. 1997 Dec 1;100(11):2900-8.
72. Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem*. 2003 Sep 5;278(36):34268-76.
73. Hevener AL, He W, Barak Y, Le J, Bandyopadhyay G, Olson P, et al. Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. *Nat Med*. 2003 Dec;9(12):1491-7.
74. He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, et al. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Dec 23;100(26):15712-7.
75. Miles PD, Barak Y, He W, Evans RM, Olefsky JM. Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. *J Clin Invest*. 2000 Feb;105(3):287-92.
76. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell*. 1999 Oct;4(4):597-609.

77. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, et al. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem*. 2001 Nov 2;276(44):41245-54.
78. Berger JP, Petro AE, Macnaul KL, Kelly LJ, Zhang BB, Richards K, et al. Distinct properties and advantages of a novel peroxisome proliferator-activated protein [gamma] selective modulator. *Mol Endocrinol*. 2003 Apr;17(4):662-76.
79. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, et al. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet*. 1998 Nov;20(3):284-7.
80. Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, et al. The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2000 Sep;26(1):76-80.
81. Agarwal AK, Garg A. A novel heterozygous mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in a patient with familial partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jan;87(1):408-11.
82. Hegele RA, Cao H, Frankowski C, Mathews ST, Leff T. PPARG F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. *Diabetes*. 2002 Dec;51(12):3586-90.
83. Agostini M, Schoenmakers E, Mitchell C, Szatmari I, Savage D, Smith A, et al. Non-DNA binding, dominant-negative, human PPARgamma mutations cause lipodystrophic insulin resistance. *Cell Metab*. 2006 Oct;4(4):303-11.
84. Francis GA, Li G, Casey R, Wang J, Cao H, Leff T, et al. Peroxisomal proliferator activated receptor-gamma deficiency in a Canadian kindred with familial partial lipodystrophy type 3 (FPLD3). *BMC Med Genet*. 2006;7:3.
85. Ristow M, Muller-Wieland D, Pfeiffer A, Krone W, Kahn CR. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N Engl J Med*. 1998 Oct 1;339(14):953-9.
86. Rangwala SM, Rhoades B, Shapiro JS, Rich AS, Kim JK, Shulman GI, et al. Genetic modulation of PPARgamma phosphorylation regulates insulin sensitivity. *Dev Cell*. 2003 Oct;5(4):657-63.
87. Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effects in the vasculature. *Circ Res*. 2008 Feb 15;102(3):283-94.
88. Krall RL. Cardiovascular safety of rosiglitazone. *Lancet*. 2007 Jun 16;369(9578):1995-6.

89. Rubenstrunk A, Hanf R, Hum DW, Fruchart JC, Staels B. Safety issues and prospects for future generations of PPAR modulators. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1771(8):1065-81.
90. Staels B, Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes*. 2005 Aug;54(8):2460-70.
91. Shearer BG, Billin AN. The next generation of PPAR drugs: do we have the tools to find them? *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1771(8):1082-93.
92. Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, Dallongeville J, Fruchart JC, Staels B, et al. Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Clin Invest*. 1995 Aug;96(2):741-50.
93. Marx N, Duez H, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res*. 2004 May 14;94(9):1168-78.
94. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Nelson DB, Elam MB, Schaefer EJ, et al. Diabetes, plasma insulin, and cardiovascular disease: subgroup analysis from the Department of Veterans Affairs high-density lipoprotein intervention trial (VA-HIT). *Arch Intern Med*. 2002 Dec 9-23;162(22):2597-604.
95. Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ, Bennett MJ, Kovacs A, et al. The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 2002 Jan;109(1):121-30.
96. Vikramadithyan RK, Hirata K, Yagyu H, Hu Y, Augustus A, Homma S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists modulate heart function in transgenic mice with lipotoxic cardiomyopathy. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 May;313(2):586-93.
97. Leibowitz MD, Fievet C, Hennuyer N, Peinado-Onsurbe J, Duez H, Bergera J, et al. Activation of PPARdelta alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Lett*. 2000 May 19;473(3):333-6.
98. Riserus U, Sprecher D, Johnson T, Olson E, Hirschberg S, Liu A, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)delta promotes reversal of multiple metabolic abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men. *Diabetes*. 2008 Feb;57(2):332-9.
99. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med*. 2004 Sep 9;351(11):1106-18.
100. Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest*. 2000 Aug;106(4):523-31.
101. Pfutzner A, Marx N, Lubben G, Langenfeld M, Walcher D, Konrad T, et al. Improvement of cardiovascular risk markers by pioglitazone is independent from

glycemic control: results from the pioneer study. *J Am Coll Cardiol.* 2005 Jun 21;45(12):1925-31.

102. Yki-Jarvinen H. The PROactive study: some answers, many questions. *Lancet.* 2005 Oct 8;366(9493):1241-2.

103. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med.* 2001 Jan;7(1):48-52.

104. Wiley SE, Murphy AN, Ross SA, van der Geer P, Dixon JE. MitoNEET is an iron-containing outer mitochondrial membrane protein that regulates oxidative capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 27;104(13):5318-23.

105. Kelly IE, Han TS, Walsh K, Lean ME. Effects of a thiazolidinedione compound on body fat and fat distribution of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 1999 Feb;22(2):288-93.

106. Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Mahankali S, Hardies J, Cusi K, et al. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jun;87(6):2784-91.

107. Guan Y, Hao C, Cha DR, Rao R, Lu W, Kohan DE, et al. Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPARgamma stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption. *Nat Med.* 2005 Aug;11(8):861-6.

108. Buchanan TA, Meehan WP, Jeng YY, Yang D, Chan TM, Nadler JL, et al. Blood pressure lowering by pioglitazone. Evidence for a direct vascular effect. *J Clin Invest.* 1995 Jul;96(1):354-60.

109. Gerstein HC, Yusuf S, Bosch J, Pogue J, Sheridan P, Dinccag N, et al. Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2006 Sep 23;368(9541):1096-105.

110. St John Sutton M, Rendell M, Dandona P, Dole JF, Murphy K, Patwardhan R, et al. A comparison of the effects of rosiglitazone and glyburide on cardiovascular function and glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2002 Nov;25(11):2058-64.

111. Yue TI TL, Chen J, Bao W, Narayanan PK, Brill A, Jiang W, et al. In vivo myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Circulation.* 2001 Nov 20;104(21):2588-94.

112. Asakawa M, Takano H, Nagai T, Uozumi H, Hasegawa H, Kubota N, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma plays a critical role in inhibition of cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *Circulation.* 2002 Mar 12;105(10):1240-6.

113. Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol*. 2000 Mar;129(5):823-34.
114. Marx N, Sukhova G, Murphy C, Libby P, Plutzky J. Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma(PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am J Pathol*. 1998 Jul;153(1):17-23.
115. Szeles L, Torocsik D, Nagy L. PPARgamma in immunity and inflammation: cell types and diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1771(8):1014-30.
116. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*. 1998 Apr 17;93(2):229-40.
117. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 1998 Apr 17;93(2):241-52.
118. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, et al. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell*. 2001 Jan;7(1):161-71.
119. Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, Randow F, Andersson LP, Altshuler D, et al. The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med*. 2001 Jan;7(1):41-7.
120. Zhang L, Chawla A. Role of PPARgamma in macrophage biology and atherosclerosis. *Trends Endocrinol Metab*. 2004 Dec;15(10):500-5.
121. Bouhlel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dievart R, Brozek J, Haulon S, et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab*. 2007 Aug;6(2):137-43.
122. Li AC, Binder CJ, Gutierrez A, Brown KK, Plotkin CR, Pattison JW, et al. Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J Clin Invest*. 2004 Dec;114(11):1564-76.
123. Minamikawa J, Tanaka S, Yamauchi M, Inoue D, Koshiyama H. Potent inhibitory effect of troglitazone on carotid arterial wall thickness in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 May;83(5):1818-20.
124. Singh S, Loke YK, Furberg CD. Long-term risk of cardiovascular events with rosiglitazone: a meta-analysis. *JAMA*. 2007 Sep 12;298(10):1189-95.
125. Home PD, Pocock SJ, Beck-Nielsen H, Gomis R, Hanefeld M, Jones NP, et al. Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes--an interim analysis. *N Engl J Med*. 2007 Jul 5;357(1):28-38.

126. Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2005 Oct 8;366(9493):1279-89.
127. Lincoff AM, Wolski K, Nicholls SJ, Nissen SE. Pioglitazone and risk of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized trials. *JAMA*. 2007 Sep 12;298(10):1180-8.
128. Goldberg RB, Kendall DM, Deeg MA, Buse JB, Zagar AJ, Pinaire JA, et al. A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care*. 2005 Jul;28(7):1547-54.
129. Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes--a meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2007 Apr;18(4):427-44.
130. Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA, Rodriguez BR, Kliwer SA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation by thiazolidinediones induces adipogenesis in bone marrow stromal cells. *Mol Pharmacol*. 1996 Nov;50(5):1087-94.
131. Johnson TE, Vogel R, Rutledge SJ, Rodan G, Schmidt A. Thiazolidinedione effects on glucocorticoid receptor-mediated gene transcription and differentiation in osteoblastic cells. *Endocrinology*. 1999 Jul;140(7):3245-54.
132. Mbalaviele G, Abu-Amer Y, Meng A, Jaiswal R, Beck S, Pittenger MF, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathway inhibits osteoclast differentiation. *J Biol Chem*. 2000 May 12;275(19):14388-93.
133. Kim SH, Yoo CI, Kim HT, Park JY, Kwon CH, Kim YK. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) induces cell death through MAPK-dependent mechanism in osteoblastic cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006 Sep 1;215(2):198-207.
134. Ali AA, Weinstein RS, Stewart SA, Parfitt AM, Manolagas SC, Jilka RL. Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrinology*. 2005 Mar;146(3):1226-35.
135. Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung UI, Kubota N, et al. PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest*. 2004 Mar;113(6):846-55.
136. Lecka-Czernik B, Moerman EJ, Grant DF, Lehmann JM, Manolagas SC, Jilka RL. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 2002 Jun;143(6):2376-84.

137. Lazarenko OP, Rzonca SO, Suva LJ, Lecka-Czernik B. Netoglitazone is a PPAR-gamma ligand with selective effects on bone and fat. *Bone*. 2006 Jan;38(1):74-84.
138. Chan BY, Gartland A, Wilson PJ, Buckley KA, Dillon JP, Fraser WD, et al. PPAR agonists modulate human osteoclast formation and activity in vitro. *Bone*. 2007 Jan;40(1):149-59.
139. Wan Y, Chong LW, Evans RM. PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. *Nat Med*. 2007 Dec;13(12):1496-503.
140. Schwartz AV, Sellmeyer DE, Vittinghoff E, Palermo L, Lecka-Czernik B, Feingold KR, et al. Thiazolidinedione use and bone loss in older diabetic adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Sep;91(9):3349-54.
141. Yaturu S, Bryant B, Jain SK. Thiazolidinedione treatment decreases bone mineral density in type 2 diabetic men. *Diabetes Care*. 2007 Jun;30(6):1574-6.
142. Wahli W. PPAR gamma: ally and foe in bone metabolism. *Cell Metab*. 2008 Mar;7(3):188-90.
143. Hays T, Rusyn I, Burns AM, Kennett MJ, Ward JM, Gonzalez FJ, et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) in bezafibrate-induced hepatocarcinogenesis and cholestasis. *Carcinogenesis*. 2005 Jan;26(1):219-27.
144. Peters JM, Cattley RC, Gonzalez FJ. Role of PPAR alpha in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643. *Carcinogenesis*. 1997 Nov;18(11):2029-33.
145. Gupta RA, Wang D, Katkuri S, Wang H, Dey SK, DuBois RN. Activation of nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor-delta accelerates intestinal adenoma growth. *Nat Med*. 2004 Mar;10(3):245-7.
146. Marin HE, Peraza MA, Billin AN, Willson TM, Ward JM, Kennett MJ, et al. Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta inhibits colon carcinogenesis. *Cancer Res*. 2006 Apr 15;66(8):4394-401.
147. Rumi MA, Ishihara S, Kazumori H, Kadowaki Y, Kinoshita Y. Can PPAR gamma ligands be used in cancer therapy? *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2004 Nov;4(6):465-77.
148. Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jan;4(1):61-70.
149. Cohen SM. Effects of PPARgamma and combined agonists on the urinary tract of rats and other species. *Toxicol Sci*. 2005 Oct;87(2):322-7.
150. El-Hage J. Clinical and Preclinical Safety Assessments for PPAR Agonists. In www.fda.gov. 2006.

151. Gervois P, Fruchart JC, Staels B. Drug Insight: mechanisms of action and therapeutic applications for agonists of peroxisome proliferator-activated receptors. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007 Feb;3(2):145-56.
152. Knouff C, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma calls for activation in moderation: lessons from genetics and pharmacology. *Endocr Rev.* 2004 Dec;25(6):899-918.
153. Akiyama TE, Meinke PT, Berger JP. PPAR ligands: potential therapies for metabolic syndrome. *Curr Diab Rep.* 2005 Feb;5(1):45-52.
154. Buse JB, Rubin CJ, Frederich R, Viraswami-Appanna K, Lin KC, Montoro R, et al. Muraglitazar, a dual (alpha/gamma) PPAR activator: a randomized, double-blind, placebo-controlled, 24-week monotherapy trial in adult patients with type 2 diabetes. *Clin Ther.* 2005 Aug;27(8):1181-95.
155. Goke B, Gause-Nilsson I, Persson A. The effects of tesaglitazar as add-on treatment to metformin in patients with poorly controlled type 2 diabetes. *Diab Vasc Dis Res.* 2007 Sep;4(3):204-13.
156. Gelman L, Feige JN, Desvergne B. Molecular basis of selective PPARgamma modulation for the treatment of Type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug;1771(8):1094-107.
157. Powell E, Kuhn P, Xu W. Nuclear Receptor Cofactors in PPARgamma-Mediated Adipogenesis and Adipocyte Energy Metabolism. *PPAR Res.* 2007;2007:53843.
158. Allen T, Zhang F, Moodie SA, Clemens LE, Smith A, Gregoire F, et al. Halofenate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator with antidiabetic activity. *Diabetes.* 2006 Sep;55(9):2523-33.
159. Mourao RH, Silva TG, Soares AL, Vieira ES, Santos JN, Lima MC, et al. Synthesis and biological activity of novel acridinylidene and benzylidene thiazolidinediones. *Eur J Med Chem.* 2005 Nov;40(11):1129-33.
160. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell.* 1995 Dec 1;83(5):803-12.
161. Sambrook JFEF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 1989;3:17.48-17.51.
162. Ambrosio AL, Dias SM, Polikarpov I, Zurier RB, Burstein SH, Garratt RC. Ajulemic acid, a synthetic nonpsychoactive cannabinoid acid, bound to the ligand binding domain of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem.* 2007 Jun 22;282(25):18625-33.
163. Ribeiro RC, Feng W, Wagner RL, Costa CH, Pereira AC, Apriletti JW, et al. Definition of the surface in the thyroid hormone receptor ligand binding domain for

association as homodimers and heterodimers with retinoid X receptor. *J Biol Chem.* 2001 May 4;276(18):14987-95.

164. Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* 1973 Dec 1;22(23):3099-108.

165. Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell.* 1974 Oct;3(2):127-33.

166. Otto TC, Lane MD. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2005 Jul-Aug;40(4):229-42.

167. Janderova L, McNeil M, Murrell AN, Mynatt RL, Smith SR. Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis. *Obes Res.* 2003 Jan;11(1):65-74.

168. Orasanu G, Ziouzenkova O, Devchand PR, Nehra V, Hamdy O, Horton ES, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone represses inflammation in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner in vitro and in vivo in mice. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Sep 2;52(10):869-81.

169. Brown TR, Stonehouse TJ, Branch JS, Brickell PM, Katz DR. Stable transfection of U937 cells with sense or antisense RXR-alpha cDNA suggests a role for RXR-alpha in the control of monoblastic differentiation induced by retinoic acid and vitamin D. *Exp Cell Res.* 1997 Oct 10;236(1):94-102.

170. Allan GF, Leng X, Tsai SY, Weigel NL, Edwards DP, Tsai MJ, et al. Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation. *J Biol Chem.* 1992 Sep 25;267(27):19513-20.

171. Mueller E, Drori S, Aiyer A, Yie J, Sarraf P, Chen H, et al. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms. *J Biol Chem.* 2002 Nov 1;277(44):41925-30.

172. Pantoja C, Huff JT, Yamamoto KR. Glucocorticoid signaling defines a novel commitment state during adipogenesis in vitro. *Mol Biol Cell.* 2008 Oct;19(10):4032-41.

173. Berger J, Bailey P, Biswas C, Cullinan CA, Doebber TW, Hayes NS, et al. Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma: binding and activation correlate with antidiabetic actions in db/db mice. *Endocrinology.* 1996 Oct;137(10):4189-95.

174. Pike AC, Brzozowski AM, Hubbard RE, Bonn T, Thorsell AG, Engstrom O, et al. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J.* 1999 Sep 1;18(17):4608-18.

175. McDonnell DP, Clemm DL, Hermann T, Goldman ME, Pike JW. Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Mol Endocrinol*. 1995 Jun;9(6):659-69.
176. Herz M, Johns D, Reviriego J, Grossman LD, Godin C, Duran S, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial of the effects of pioglitazone on glycemic control and dyslipidemia in oral antihyperglycemic medication-naive patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther*. 2003 Apr;25(4):1074-95.
177. Calkin AC, Allen TJ. Diabetes mellitus-associated atherosclerosis: mechanisms involved and potential for pharmacological invention. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2006;6(1):15-40.
178. Reginato MJ, Bailey ST, Krakow SL, Minami C, Ishii S, Tanaka H, et al. A potent antidiabetic thiazolidinedione with unique peroxisome proliferator-activated receptor gamma-activating properties. *J Biol Chem*. 1998 Dec 4;273(49):32679-84.
179. Blanco JC, Minucci S, Lu J, Yang XJ, Walker KK, Chen H, et al. The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev*. 1998 Jun 1;12(11):1638-51.
180. Shao D, Rangwala SM, Bailey ST, Krakow SL, Reginato MJ, Lazar MA. Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature*. 1998 Nov 26;396(6709):377-80.
181. Henke BR, Blanchard SG, Brackeen MF, Brown KK, Cobb JE, Collins JL, et al. N-(2-Benzoylphenyl)-L-tyrosine PPARgamma agonists. 1. Discovery of a novel series of potent antihyperglycemic and antihyperlipidemic agents. *J Med Chem*. 1998 Dec 3;41(25):5020-36.
182. Rocchi S, Picard F, Vamecq J, Gelman L, Potier N, Zeyer D, et al. A unique PPARgamma ligand with potent insulin-sensitizing yet weak adipogenic activity. *Mol Cell*. 2001 Oct;8(4):737-47.
183. Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, Molteni V, et al. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature*. 2007 Jan 11;445(7124):219-23.
184. McKenna NJ, O'Malley BW. From ligand to response: generating diversity in nuclear receptor coregulator function. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2000 Nov 30;74(5):351-6.
185. Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev*. 1999 Apr;9(2):140-7.
186. Elbrecht A, Chen Y, Cullinan CA, Hayes N, Leibowitz M, Moller DE, et al. Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Jul 16;224(2):431-7.

187. Oberfield JL, Collins JL, Holmes CP, Goreham DM, Cooper JP, Cobb JE, et al. A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May 25;96(11):6102-6.
188. Schupp M, Clemenz M, Gineste R, Witt H, Janke J, Helleboid S, et al. Molecular characterization of new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulators with angiotensin receptor blocking activity. *Diabetes*. 2005 Dec;54(12):3442-52.
189. Misra P, Chakrabarti R, Vikramadithyan RK, Bolusu G, Juluri S, Hiriyani J, et al. PAT5A: a partial agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a potent antidiabetic thiazolidinedione yet weakly adipogenic. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Aug;306(2):763-71.
190. Elbrecht A, Chen Y, Adams A, Berger J, Griffin P, Klatt T, et al. L-764406 is a partial agonist of human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. The role of Cys313 in ligand binding. *J Biol Chem*. 1999 Mar 19;274(12):7913-22.
191. Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res*. 2006 Mar;45(2):120-59.
192. Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Kinase signaling cascades that modulate peroxisome proliferator-activated receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 2005 Apr;17(2):216-22.
193. Zimmerman AW, Veerkamp JH. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2002 Jul;59(7):1096-116.
194. Wolfrum C, Borrmann CM, Borchers T, Spener F. Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 27;98(5):2323-8.
195. Adida A, Spener F. Adipocyte-type fatty acid-binding protein as inter-compartmental shuttle for peroxisome proliferator activated receptor gamma agonists in cultured cell. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Feb;1761(2):172-81.
196. Argmann CA, Cock TA, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: the more the merrier? *Eur J Clin Invest*. 2005 Feb;35(2):82-92; discussion 80.
197. Burgermeister E, Schnoebelen A, Flament A, Benz J, Stihle M, Gsell B, et al. A novel partial agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) recruits PPARgamma-coactivator-1alpha, prevents triglyceride accumulation, and potentiates insulin signaling in vitro. *Mol Endocrinol*. 2006 Apr;20(4):809-30.

198. Fujimura T, Kimura C, Oe T, Takata Y, Sakuma H, Aramori I, et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator with distinct fat cell regulation properties. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Aug;318(2):863-71.
199. Fujimura T, Sakuma H, Konishi S, Oe T, Hosogai N, Kimura C, et al. FK614, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator, induces differential transactivation through a unique ligand-specific interaction with transcriptional coactivators. *J Pharmacol Sci*. 2005 Dec;99(4):342-52.
200. Minoura H, Takeshita S, Ita M, Hirosumi J, Mabuchi M, Kawamura I, et al. Pharmacological characteristics of a novel nonthiazolidinedione insulin sensitizer, FK614. *Eur J Pharmacol*. 2004 Jun 28;494(2-3):273-81.
201. Kim KR, Lee JH, Kim SJ, Rhee SD, Jung WH, Yang SD, et al. KR-62980: a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist with weak adipogenic effects. *Biochem Pharmacol*. 2006 Aug 14;72(4):446-54.
202. Chang CH, McNamara LA, Wu MS, Muise ES, Tan Y, Wood HB, et al. A novel selective peroxisome proliferator-activator receptor-gamma modulator-SPPARgammaM5 improves insulin sensitivity with diminished adverse cardiovascular effects. *Eur J Pharmacol*. 2008 Apr 14;584(1):192-201.

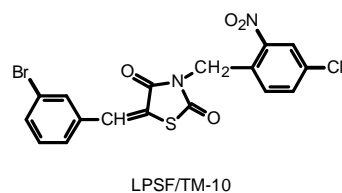
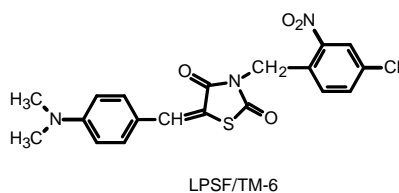
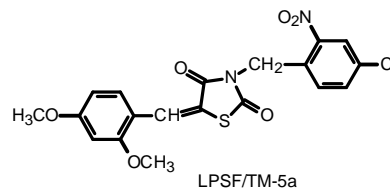
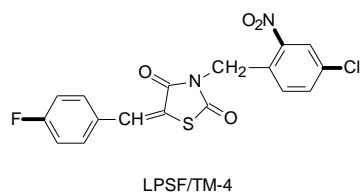
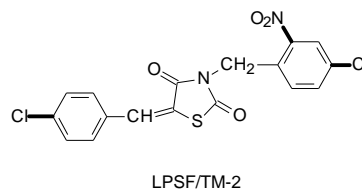
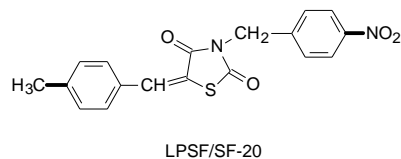
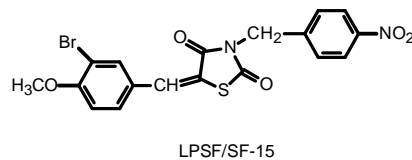
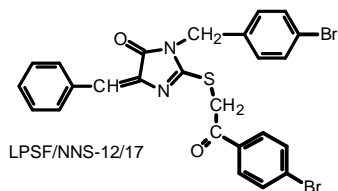
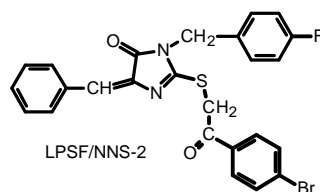
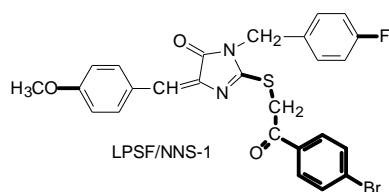
ANEXO I

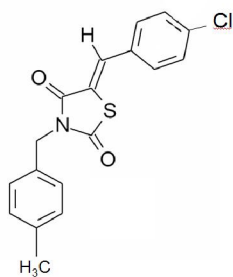
Nomenclatura química das benzilideno- e acridinilideno-TZDs investigadas quanto à atividade agonista em PPAR γ por ensaios de gene repórter.

Composto	Nomenclatura química
NNS-1	5-(4-metoxi-benzilideno)-2[2-(4-bromo-fenil)-2-oxo-etilsulfanil]-3-(4-fluor-benzil)-imidazolidin-4-ona
NNS-2	5-benzilideno-2[2-(4-bromo-fenil)-2-oxo-etilsulfanil]-3-(4-fluor-benzil)-imidazolidin-4-ona
NNS-17	5-benzilideno-2[2-(4-bromo-fenil)-2-oxo-etilsulfanil]-3-(4-bromo-benzil)-imidazolidin-4-ona
SF-15	5-(3-bromo-4-metóxi-benzilideno)-3-(4-nitro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona
SF-20	3-(4-nitro-benzil)-5-(4-metóxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
TM-2	3-(4-cloro-2-nitro-benzil)-5-(4-cloro-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
TM-4	3-(4-cloro-2-nitro-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
TM-5a	3-(4-cloro-2-nitro-benzil)-5-(2,4-dimetóxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
TM-6	3-(4-cloro-2-nitro-benzil)-5-(4-dimetilamino-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
TM-10	3-(4-cloro-2-nitro-benzil)-5-(3-bromo-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
GQ-2,	5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona
GQ-4	5-(2-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona
GQ-5	3-(4-metil-benzil)-5-(4-metóxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona
GQ-6	5-(2,4-dimetóxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona
GQ-7	5-(3-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona
GQ-10	5-(4-dimetilamino-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona
GQ-11	5-(3-indol-3-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona
GQ-12,	5-(4-benzilóxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona
GQ-15	5-(4-fluor-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona
GQ-19	5-(4-nitro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona
GQ-18	5-(3,4-dicloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona
GQ-22,	5-(3-bromo-4-metóxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona
GQ-23	5-(4-dimetilamino-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona
GQ-24,	5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-fenil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona
GQ-26	3-(4-fenil-benzil)-5-(4-metóxi-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona

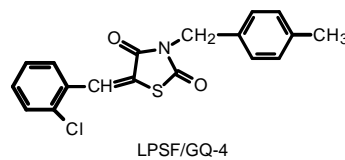
GQ-28	3-(4-fenil-benzil)-5-(indol-3-il-metileno)-tiazolidina-2,4-diona
GQ-30	5-(5-bromo-2-metóxi-benzilideno)-3-(4-fenil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona
PT-10	1-(4-cloro-benzil)-4-[(4-cloro-fenil)-hidrazono]-5-tioxi-imidazolidin-2-ona ↔ 1-(4-cloro-benzil)-4-(4-cloro-fenilazo)-5-tioxi-imidazolidin-2-ona
AC-119	5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-cloro-benzil)-4-tioxi-tiazolidin-2-ona

Estrutura química das benzilideno- e acridinilideno-TZDs investigadas quanto à atividade agonista em PPAR γ por ensaios de gene repórter.

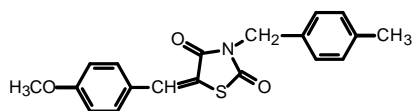




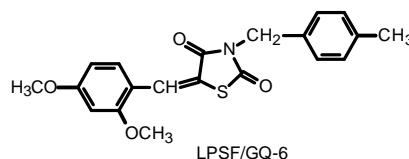
LFSF/GQ-2



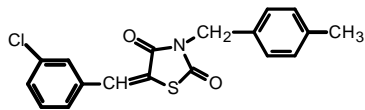
LPSF/GQ-4



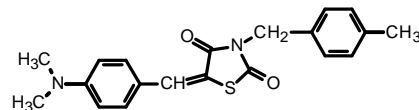
LPSF/GQ-5



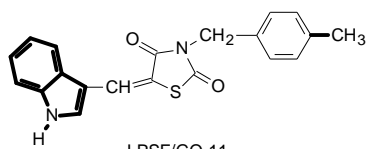
LPSF/GQ-6



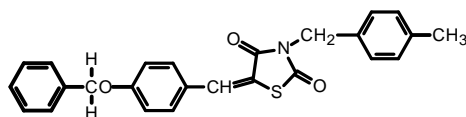
LPSF/GQ-7



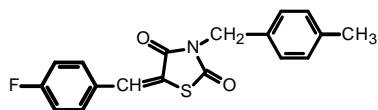
LPSF/GQ-10



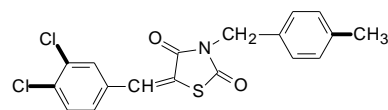
LPSF/GQ-11



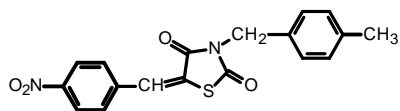
LPSF/GQ-12



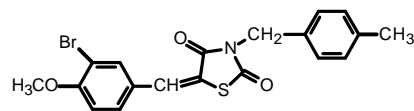
LPSF/GQ-15



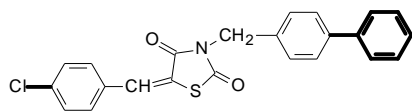
LPSF/GQ-18



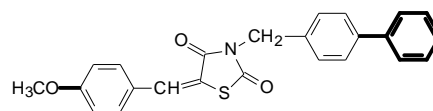
LPSF/GQ-19



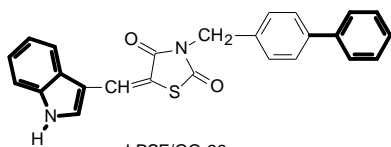
LPSF/GQ-22



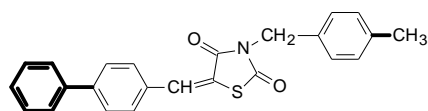
LPSF/GQ-24



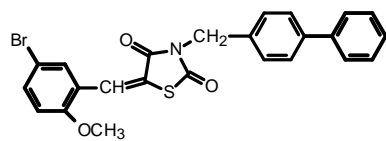
LPSF/GQ-26



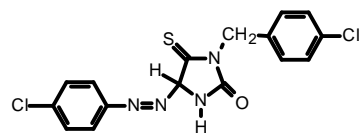
LPSF/GQ-28



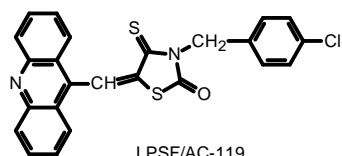
LPSF/GQ-23



LPSF/GQ-30



LPSF/PT-10



LPSF/AC-119

PARTE 2 (ANEXO II)

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE ISOFLAVONAS DE
SOJA NOS RECEPTORES ALFA, BETA/DELTA E GAMA ATIVADOS POR
PROLIFERADORES PEROXISSOMAIIS**

Effects of a methanolic fraction of soybean seed on the transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptors

Vanessa S. Carrara ¹, Angélica A. Amato ², Francisco de Assis R. Neves ², Roberto B. Bazotte ¹, José M. G. Mandarino ³, Celso V. Nakamura ¹, Benedito P.D. Filho ¹, Diogenes A. G. Cortez ¹

¹ Department of Pharmacy and Pharmacology, State University of Maringá, PR, 870200-900, Brazil

² Molecular Pharmacology Laboratory, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasília, DF, 870200-900, Brazil

³ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Londrina, PR, 86001-970, Brazil

To whom correspondence should be addressed: Department of Pharmacy and Pharmacology, State University of Maringá 87020-900, Maringá, PR, Brazil Fax: 55-44-3261-4999 Phn: 55-44-3261-4876 E-mail address: dagcortez@uem.br

Abstract

Dietary soy has been extensively shown to favorably affect blood levels of lipids and glucose in many animal models of obesity and insulin resistance, and clinical studies also suggest its beneficial effects in humans. However, the specific components of soy and the mechanisms underlying these effects remain to be defined. Although estrogen receptor has been widely implicated in the protective actions of isoflavones, the possibility that other nuclear receptors might mediate these actions is being increasingly recognized. In order to determine whether soybean isoflavones could influence peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) transcriptional activity, we investigated the agonist effects of a methanolic fraction obtained from soybean seed and soybean seed coat with hypocotyl on PPAR α , PPAR β/δ and PPAR γ . These fractions were rich in isoflavones (daidzin, glycitin, genistin, malonyldaidzin, malonylglycitin, malonylgenistin, daidzein, glycitein and genistein) determined by HPLC analysis and had no evidence of genetically modified material containing the gene CP4 EPSPS. Reporter gene assays in human promonocytic cell line U-937 showed activation of transcriptional activity on PPAR α ($P < 0.001$) and PPAR β/δ ($P < 0.05$), but no effect on PPAR γ . Activation of PPAR α is consistent with the documented lipid-lowering activity of soy isoflavones *in vivo*, but further studies are needed to determine the physiological significance of PPAR β/δ activation.

Keywords: Isoflavones; Nuclear receptors; Soybean; PPAR ; PPAR ; PPAR β/δ .

Running title: Effect of the methanolic fractions of soybean seed on PPAR receptors

Introduction

Dietary soy has been shown to improve serum lipid levels, glycemic control and atherosclerosis in many animal models of obesity and insulin resistance (1). Clinical studies have also suggested the lipid lowering effects of soy protein consumption in humans (2). However, the specific components of soy and the mechanisms underlying these beneficial effects are still a matter of controversy and remain to be elucidated (1).

Dietary soy components include protein, lipids, fiber and phytochemicals such as isoflavones, which have been identified as bioactive agents and widely recognized as estrogen receptor agonists or phytoestrogens (3,4). Although this activity has been implicated in the atheroprotective effects of isoflavones, it is being increasingly accepted that these phytochemicals might activate other nuclear receptors regulating lipid metabolism, such as liver X receptor, farnesoid X receptor and peroxisome-proliferator activated receptor (PPARs) (1).

PPARs are members of the nuclear hormone receptor superfamily of ligand-activated transcription factors and regulate the expression of target genes involved in several physiological processes (5). Three receptor subtypes have been identified in mammals, namely PPAR α , PPAR β/δ and PPAR γ , with overlapping tissue distribution and functions. PPAR α is expressed in high levels in the liver, kidney and heart, PPAR γ is largely expressed in adipose tissue and PPAR β/δ is ubiquitously expressed (6).

PPAR α controls the transcription of many genes involved in the catabolism of lipids, and this explains its hypolipidemic effects (7). Activation of PPAR γ increases insulin sensitivity and seems a favorable approach to treat insulin resistance associated with type 2 diabetes (8). In contrast with PPAR α and PPAR γ , the physiological role of PPAR β/δ is not fully known (9). It has been suggested that the anti-inflammatory, antidiabetic and hypolipidemic effects of soy isoflavones may be mediated by activation of PPAR α and PPAR γ (10-12). However, little is known about the possibility of activation of PPAR β/δ with soy isoflavones. Therefore, in this study

we investigated whether the methanolic fractions of soybean rich in isoflavones could activate PPAR β/δ .

Materials and Methods

1. Materials

Soybean seed and soybean seed coat with hypocotyl fragments were obtained from the COAMO Company (PR, Brazil) in October of 2005. Soybean seed coat with hypocotyl fragments were obtained as an industrial residue resulting from oil extraction of the seed. Isoflavones standards were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and Fuji Co. (Japan). Human promonocyte U937 cells were obtained from Cells Culture Facility (University of California, San Francisco, CA, USA). RPMI-1640 medium was obtained from GIBCO (Grand Island, NY, USA). Lyses buffer and kit for testing luciferase activity were purchased from Promega (Madison, WI, USA). Bezafibrate and troglitazone were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), and rosiglitazone was purchased from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI). The expression vectors for PPAR α , PPAR β/δ and PPAR γ and the plasmid containing the luciferase reporter driven by a PPAR-responsive element were kindly provided by J. Magae (Japan), and their construction has been previously described (13).

2. Analysis transgenic soy

Genetically modified herbicide-tolerant soy varieties contain the CP4 EPSPS gene that encodes 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* spp. strain CP4. This gene confers resistance to herbicides containing glyphosate. The presence of transgenic soybean was investigated using the Trait Crop and Grain Testing kit from Strategic Diagnostics Inc (Newark, Delaware, USA), as recommended by the manufacturer. Conventional non-genetically modified soybean seed and soybean seed containing the EPSPS gene were used as negative and positive controls, respectively. Transgenic grains were provided by Monsanto

Company. These tests were authorized by the National Technical Commission for Biosafety (Certificate of Quality on Biosafety - CQB n°0002/96) and carried out in Embrapa Soybean (Londrina, Brazil).

3. Extraction of isoflavones from soybean

1 kg of frozen soybean seed (E1) and soybean seed coat with hypocotyl fragments (E2) were triturated and macerated with 12 L of hexane during twenty days and filtered. The obtained residues E1 (702 g) and E2 (969 g) was macerated with ethanol:water (3:2 v/v) during seven days and filtered. The solvent from the extracts obtained was evaporated in reduced pressure and lyophilized yielded 160.6 and 194.0 g of ethanol extracts E1 and E2 respectively. The ethanol extracts were mixed in 90 mL of methanol and centrifuged. The methanol fractions were evaporated to afford 48.0 and 26.7 g of methanol fraction of E1 and E2 respectively.

4. High performance liquid chromatography

Extraction of isoflavones from both methanolic fractions (100 mg) was carried out using hydroethanolic solution 70% (w/w) containing acetic acid (0.1 %) at room temperature. Every 15 minutes, tubes containing the samples were shake and after one hour the extracts (1.5 mL) were centrifuged at 14 000 rpm for 15 min at 5°C. The supernatant was then filtered (0.45 µm) and 20 µL of each sample were used for HPLC analysis.

HPLC analysis of isoflavones was performed on ODS C18 column (YMC Pack ODS-AM 250 x 0.4 mm i.d., 5.0 µm particle size) in a Waters 2690 HPLC system with an auto sampler and a photodiode array detector (Waters 996). The wave length was adjusted at 260 nm. A binary gradient solvent system was employed. The mobile phases were: a) acidified methanol (0.025% trifluoroacetic acid - TFA) and b) acidified Milli-Q water (0.025% TFA). Initial condition of the gradient was 20% of solvent A system, reaching 100% A after 40 min, and then returning to 20% A at 45 min and maintaining this condition until 60 min. The flow rate was 1 mL/min, with column temperature at 25° C. Isoflavones were adequately separated within 60 min.

Separated compounds were identified by comparison of retention times and UV spectra with isoflavones standards (glycoside and aglycon forms). Isoflavones were quantified using external standardization method (peak areas), and molar extinction coefficient for malonyl and acetyl forms (14).

5. Cell culture and transient transfection assays

Human promonocytic U-937 cells were maintained and sub cultured in RPMI-1640 medium (Invitrogen®) supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (50 UI/mL) and streptomycin (50 µg/mL), at 37°C and 5% CO₂. For transient transfection assays cells were collected by centrifugation and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) containing calcium and dextrose (1.5 mL x 10⁷ cells/0.5 mL PBS), and then cotransfected with the expression vectors for PPAR α , - β/δ or - γ (1,5 µg) and a PPAR- responsive luciferase reporter vector (DR1-TK-Luc) by electroporation using a gene pulser (Bio-Rad®) under 300 mV and 950 µF. Electroporated cells were then transferred to fresh RPMI-1640 medium and plated in 12-well dishes (1 mL/well) and treated in triplicates with the methanolic fraction of soybeans containing isoflavones (200, 400, 800 and 1600 µg/mL), bezafibrate (positive control for PPAR α and - β/δ transcriptional activity), troglitazone or rosiglitazone (positive control for PPAR γ transcriptional activity) or vehicle. After 24 h, cells were collected by centrifugation, lysed by the addition of 150 µL 1 x lyses buffer (Promega®) and assayed for luciferase activity using a Luciferase Assay Kit from Promega® and a luminometer (PerkinElmer®). Fold activation of the luciferase reporter driven by the PPAR-responsive element was determined by the ratio of luciferase activity obtained in cell samples treated with the different compounds by luciferase activity obtained in cell samples treated with vehicle. All experiments were performed at least three times in triplicate.

6. Statistical analysis

Transient transfection assays results were presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical significance was determined by analysis of

variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls multiple comparison test, using the software GraphPad Prism for Windows (version 3.0). A P value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

1. Analysis of transgenic soy

Genetically modified soy containing CP4 EPSPS gene was not detected in any of the samples (data not shown).

2. Analysis of the methanolic fractions of the soybean seed and soybean seed coat with hypocotyl (HPLC-UV analysis)

The methanolic fractions of soybean seed and soybean seed coat and hypocotyl were analyzed for isoflavone composition by HPLC (Figure 1) using standard compounds for comparison, and showed different concentrations of isoflavones (Table 1).

3. Effect of increasing concentrations of a methanolic extract rich in conjugated and unconjugated soybean isoflavones on PPAR α transcriptional activity

Dose-response analysis revealed that the methanolic fraction from soybean seed induced the transcriptional activity of PPAR α , with activation comparable to that seen with bezafibrate 10⁻⁴M at 1600 μ g/mL (Fig 2A). Similar results were obtained with the methanolic fraction from soybean seed coat with hypocotyl (Fig 2B).

4. Effect of increasing concentrations of a methanolic extract rich in conjugated and unconjugated soybean isoflavones on PPAR γ transcriptional activity.

No activation of PPAR γ by the methanolic fraction from soybean seed was detected with any of the concentrations tested (Fig 3A), neither with the methanolic fraction from soybean seed coat with hypocotyl (Fig 3B).

5. Effect of increasing concentrations of a methanolic extract rich in conjugated and unconjugated soybean isoflavones on PPAR β/δ transcriptional activity

Dose-response analysis revealed that the methanolic fraction from soybean seed activated PPAR β/δ , and the activation at 1600 $\mu\text{g/mL}$ was comparable to that of bezafibrate 10 $\text{-}4\text{M}$ (Fig 4A). Similar results were obtained with the methanolic fraction from soybean seed coat with hypocotyl (Fig 4B).

Discussion

The well established beneficial effects of dietary soy on lipid metabolism and insulin sensitivity have been recently attributed to the activation of PPAR α and PPAR γ , respectively, by soy isoflavones (1,8,10). However, little is known about the possibility that isoflavones activate PPAR β/δ , which plays a critical role in the regulation of metabolic homeostasis, and also in cardiac lipid metabolism (15,16), fetal development (17), inhibition of human cancer cell lines growth (18), protection against liver toxicity (19), modulation of inflammation (6,20).

In this study a methanolic fraction from soybean seed and soybean seed coat with hypocotyl rich in conjugated soybean isoflavones was used to address the potential of PPAR β/δ activation by these phytochemicals. For comparative purposes their effect on PPAR α and PPAR γ was also investigated.

Our results indicated that the methanolic fractions rich in conjugated soybean isoflavones induced PPAR α and β/δ transcriptional activity. It is not surprising that the methanolic fractions rich in isoflavones from soybean seed and soybean seed coat with hypocotyl activate PPAR α , since this effect has been previously demonstrated in several other studies (10,12,15,22). Unexpectedly, however, these fractions did not induce PPAR γ transcriptional activity. A possible explanation for this result is that the main soybean isoflavones genistein, daidzein and glycitein were detected in fairly small amounts (Table 1) in the fractions studied and therefore the effect on PPAR γ transcriptional activity was most likely minimal. Another possible explanation could be variations in the concentrations of isoflavones due to the extraction method, genetic and/or environmental factors (23-28).

Interestingly, the methanolic fractions rich in conjugated and unconjugated soybean isoflavones used in this study activated PPAR β/δ . To the authors' knowledge this is the first evidence suggesting that isoflavones activate this PPAR isotype.

The effects of the methanolic fraction from soybean seed and soybean seed coat with hypocotyl on PPAR α and PPAR β/δ transcriptional activity were similar although their composition in general terms was different. It is possible that the similar effects on both PPAR isoforms could be due to comparable concentrations of the isoflavones genistein and daidzein in the methanolic fractions of seed and seed coat with hypocotyl. Further studies will indicate which soy isoflavone activates PPAR α and PPAR β/δ .

Taken together, our results are consistent with animal and clinical studies addressing the potential of isoflavones as lipid-lowering (8,10,11) and anti-inflammatory agents (12), and it can be expected that the methanolic extract from soybean seed or seed coat with hypocotyl should promote lipid-lowering and anti-inflammatory effects.

Moreover, the observation that methanolic extract from soybean seed and from seed coat with hypocotyl activates PPAR α and PPAR β/δ but did not induce PPAR γ transcriptional activity is very important in view of the potential hepatotoxicity of PPAR γ agonists. Furthermore the possibility that the anti-inflammatory effects of

soy isoflavones (12) could be mediated by PPAR β/δ receptors (6) must be considered. However, future *in vivo* studies will be necessary to elucidate the physiological significance of activation of both PPAR α and PPAR β/δ . Finally, these results indicate that further efforts to investigate the role of PPAR β/δ in the beneficial effects of soy isoflavones are warranted.

Acknowledgments

The authors are grateful to C.E Oliveira and S.C Oliveira for their technical assistance during the experiments. Research supported by CNPq.

References

1. Ricketts ML, Moore DD, Banz WJ, Mezei O, Shay NF. Molecular mechanisms of action of the soy isoflavones includes activation of promiscuous nuclear receptors. A review. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 321-330.
2. Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med* 1995; 333: 276-282.
3. Obst JM, Seamark RF. Hormone studies on ewes grazing an oestrogenic (Yarloop clover) pasture during the reproductive cycle. *Aust J Biol Sci* 1975; 28: 279-290.
4. Wanda GJ, Starcke S, Zierau O, Njamen D, Richter T, Vollmer G. Estrogenic activity of griffonianone C, an isoflavone from the root seed coats with hypocotyl of *Millettia griffoniana*: regulation of the expression of estrogen responsive genes in uterus and liver of ovariectomized rats. *Planta Med* 2007; 73: 512-518.
5. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 2001; 81: 1269-1304.
6. Kilgore KS, Billin AN. PPAR β/δ ligands as modulators of the inflammatory response. *Curr Opin Investig Drugs* 2008; 9: 463-469.
7. Mandard S, Müller M, Kersten, S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 393-416.

8. Davis J, Higginbotham A, O'Connor T, Moustaid-Moussa N, Tebbe A, Kim YC, et al., Soy protein and isoflavones influence adiposity and development of metabolic syndrome in the obese male ZDF rat. *Ann Nutr Metab* 2007; 51: 42-52.
9. Shearer BG, Steger DJ, Way JM, Stanley TB, Lobe DC, Grillot DA, Iannone MA, Lazar MA, Willson TM, Billin AN. Identification and characterization of a selective peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (NR1C2) antagonist. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 523-529.
10. Mezei O, Banz WJ, Steger RW, Peluso MR, Winters TA, Shay N. Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *J Nutr* 2003; 133: 1238-1243.
11. Mezei O, Li Y, Mullen E, Ross-Viola JS, Shay NF. Dietary isoflavone supplementation modulates lipid metabolism via PPARalpha-dependent and -independent mechanisms. *Physiol Genomics* 2006; 26: 8-14.
12. Chacko BK, Chandler RT, D'Alessandro TL, Mundhekar A, Khoo, N.K., Botting, et al., Anti-inflammatory effects of isoflavones are dependent on flow and human endothelial cell PPARgamma. *J Nutr* 2007; 137: 351-356.
13. Forman, B. M. Tontonoz, P; Chen, J; Brun, RP; Spiegelman, BM; Evans, RM. 15-Dexoy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPARg. *Cell* 1995; 83: 803-812.
14. Berhow MA. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: Buslig, B. S., Manthey, J. A. (ed.). *Flavonoids in the living cell*. *Adv Experim Med Biol* 2002; 505: 61-76.
15. Gilde AJ, Lee KA, Willemsen PH, Chinetti G, Leij, F.R., Vusse, G.J., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circ Res* 2003; 92: 518-524.
16. Sheng L, Ye P, Liu YX, Han CG, Zhang ZY. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta activation improves angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in vitro. *Clin Exp Hypertens* 2008; 30,109-119.

17. Rees WD, McNeil CJ, Maloney CA. The roles of PPARs in the fetal origins of Metabolic Health and Disease. *PPAR Res* 2008; 459030.
18. Girroir EE, Hollingshead HE, Billin AN, Willson TM, Robertson GP, Sharma AK, et al., Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) ligands inhibit growth of UACC903 and MCF7 human cancer cell lines. *Toxicology* 2008; 243, 236-243.
19. Shan W, Nicol CJ, Ito S, Bility MT, Kennett MJ, Ward et al., Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta protects against chemically induced liver toxicity in mice. *Hepatology* 2008; 47, 225-235.
20. Man MQ, Barish GD, Schmutz M, Crumrine D, Barak Y, Chang S, et al., Deficiency of PPARbeta/delta in the epidermis results in defective cutaneous permeability barrier homeostasis and increased inflammation. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 370-377
21. Mensink M, Hesselink MK, Russell AP, Schaart G, Sels JP, Schrauwen P. Improved skeletal muscle oxidative enzyme activity and restoration of PGC-1 alpha and PPAR beta/delta gene expression upon rosiglitazone treatment in obese patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Obes* 2007; 1302-1310.
22. Kim S, Shin HJ, Kim SY, Kim JH, Lee YS, Kim DH, et al., Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPAR alpha. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 220: 51-58.
23. Kudou S, Fleury Y, Welti D, Magnolato D, Uchida T, Kitamura K, et al., Malonyl isoflavone glycosides in soybean seed (*Glycine max* Merrill). *Agric Biol Chem* 1991; 55: 2227-2233.
24. Carrão-Panizzi MC, Kitamura K, Beleia AD, Oliveira MCN. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. *Pesq Agrop Bras* 1999; 34:1788-1795.
25. Ho HM, Chen RY, Leung LK, Chan F, Huang Y, Chen ZY. Difference in flavonoid and isoflavone profile between soybean and soy leaf. *Biomed Pharmacother* 2002; 56, 289-295.

26. Murphy PA, Barua K, Hauck CC. Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods. *J Chromatogr B* 2002; 777, 129-138.
27. Carrão-Panizzi MC, Favoni SPG, Kikuchi A. Extraction time for isoflavone determination. *Braz Arch Biol Technol* 2002; 45: 515-518.
28. Nielsen IL, Williamson G. Review of the factors affecting bioavailability of soy isoflavones in humans. *Nutr Cancer* 2007; 57: 1-10.

Table 1. Concentrations of isoflavones (mg/100g) in the methanolic fraction of soybean seed and soybean seed coat and hypocotyl.

	Soybean seed	Soybean seed coat and hypocotyl
1. Daidzin	145.67 ± 3.14	393.78 ± 5.39
2. Glycitin	47.69 ± 1.86	149.41 ± 1.52
3. Genistin	147.54 ± 5.54	296.14 ± 4.14
4. Malonyldaidzin	276.54 ± 4.21	152.29 ± 3.38
5. Malonylglycitin	105.73 ± 1.17	89.11 ± 3.94
6. Malonylgenistin	466.54 ± 7.37	161.80 ± 2.82
7. Daidzein	57.73 ± 1.26	86.64 ± 0.93
8. Glycitein	22.61 ± 0.36	33.92 ± 1.08
9. Genistein	75.04 ± 1.6	55.84 ± 0.82
Total Isoflavones	1345.09	1418.93

Data represent mg of isoflavones in 100 g of the methanolic fraction of soybean seed or soybean seed coat and hypocotyl ± standard deviation of three determinations.

Figure 1

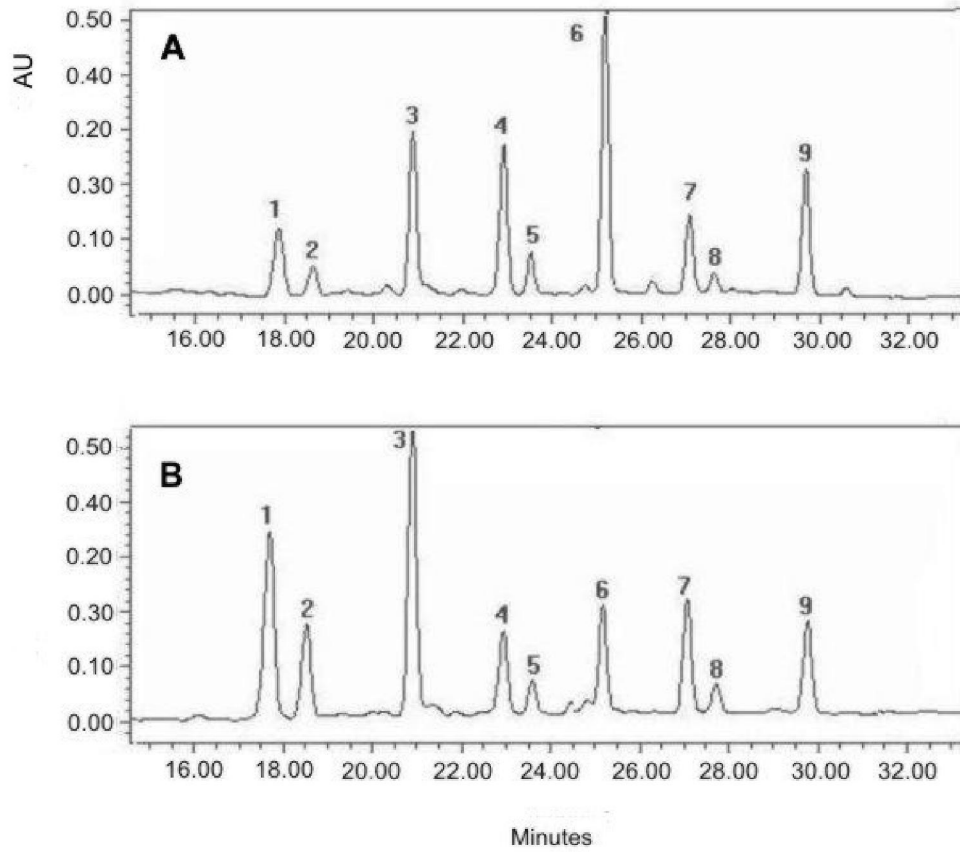
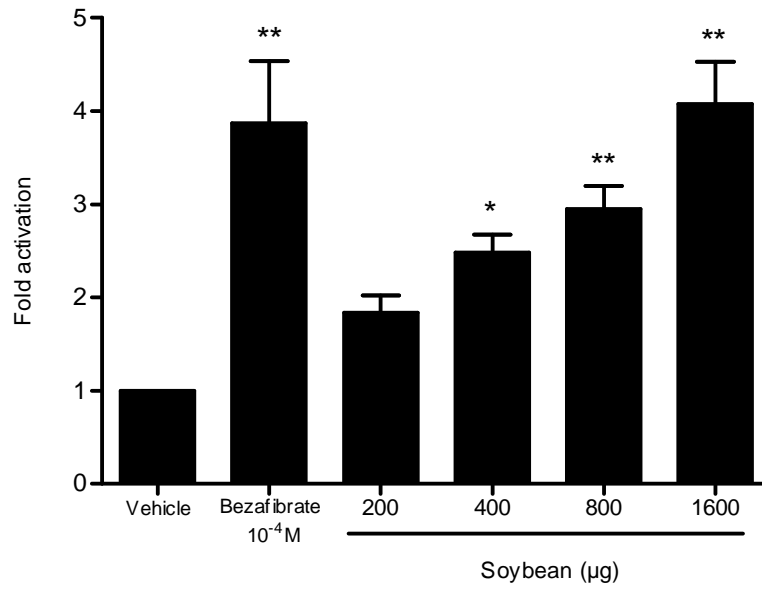


Figure 2

A



B

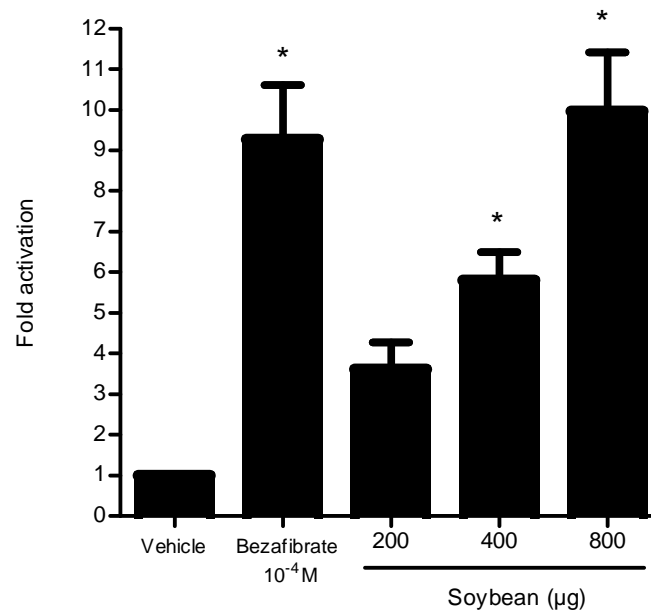
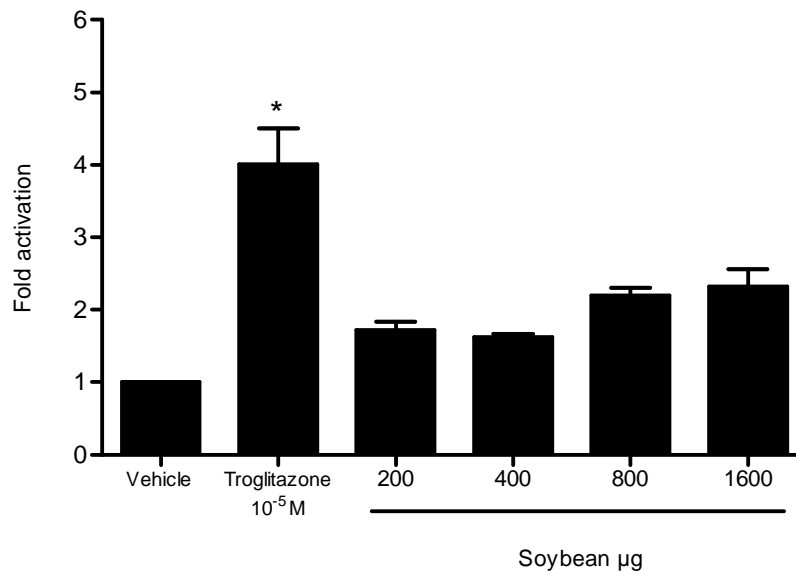


Figure 3

A



B

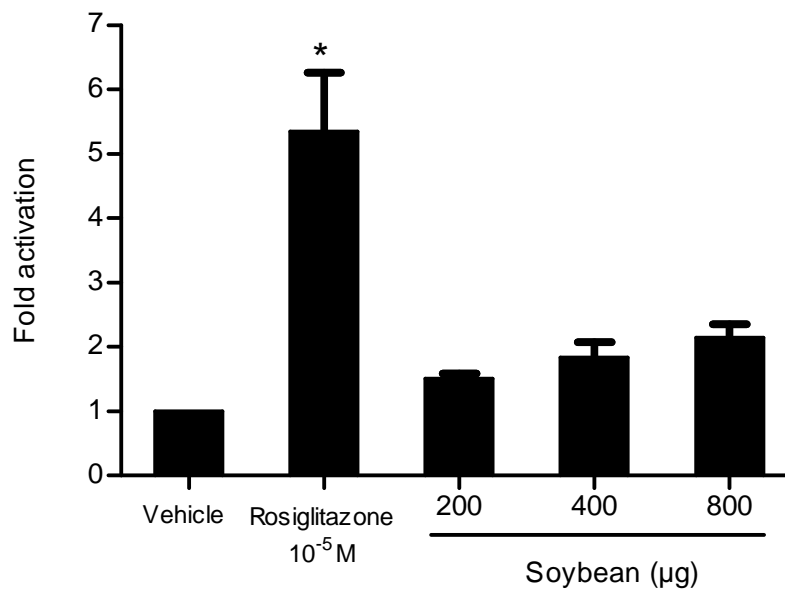
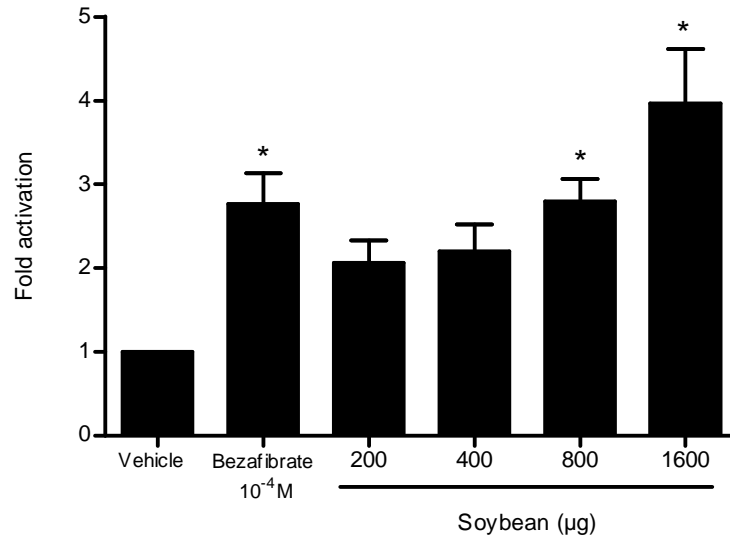


Figure 4

A



B

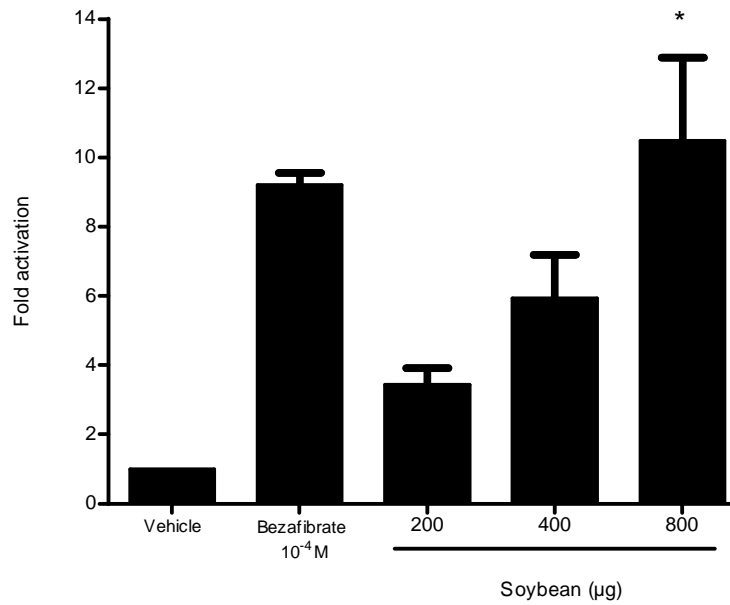


Figure legends

Figure 1. Chromatographic profile of the methanolic fractions of soybean seed (A) and soybean seed coat with hypocotyl (B). Compounds are: 1, daidzin; 2, glycitin; 3, genistin; 4, malonyldaidzin; 5, malonylglycitin; 6, malonylgenistin; 7, daidzein; 8, glycitein; 9, genistein.

Figure 2. Effect of vehicle (ethanol:DMSO), bezafibrate (10^{-4} M) or increasing amounts of methanolic fraction from soybean seed (Panel A) or soybean seed coats with hypocotyl (Panel B) on the activation of PPAR α . U937 cells were cotransfected with the expression vector for PPAR α receptor and a luciferase reporter and then treated with vehicle (DMSO/Ethanol 1:1), bezafibrate or increasing amounts of methanolic fraction of soybean seed or soybean seed coats during 24 h and assayed for luciferase activity. Values were expressed as mean \pm EPM. * P < 0.01 *vs.* vehicle. ** P < 0.001 *vs.* vehicle by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test.

Figure 3. Effect of vehicle (ethanol:DMSO), troglitazone (Troglit) or rosiglitazone (Rosi) 10^{-5} M, or increasing amounts of methanolic fraction from soybean seed (Panel A) or soybean seed coats with hypocotyl (Panel B) on the activation of PPAR γ . U937 cells were cotransfected with the expression vector for PPAR γ receptor and a luciferase reporter and then treated with vehicle (DMSO/Ethanol 1:1), troglitazone or increasing amounts of methanolic fraction of soybean seed or soybean seed coats during 24 h and assayed for luciferase activity. Values were expressed as mean \pm EPM. * P < 0.01 *vs.* vehicle. ** P < 0.001 *vs.* vehicle by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test.

Figure 4. Effect of vehicle (ethanol:DMSO), bezafibrate (10^{-4} M) or increasing amounts of methanolic fraction from soybean seed (Panel A) or soybean seed coats with hypocotyl (Panel B) on the activation of PPAR δ . U937 cells were cotransfected with the expression vector for PPAR δ receptor and a luciferase reporter and then treated with vehicle (DMSO/Ethanol 1:1), bezafibrate or increasing amounts of methanolic fraction of soybean seed or soybean seed coats during 24 h and assayed for luciferase activity. Values were expressed as mean \pm EPM. * P < 0.05 *vs.* vehicle by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test.