

ANNA PAULA BARROS FERREIRA

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA VIA ERK1/2 SOBRE A RESPOSTA
ADIPOGÊNICA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE AGONISTAS DE PPAR γ EM
MACRÓFAGOS E ADIPÓCITOS**

Brasília

2019

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANNA PAULA BARROS FERREIRA

ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA VIA ERK1/2 SOBRE A RESPOSTA
ADIPOGÊNICA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE AGONISTAS DE PPAR γ EM
MACRÓFAGOS E ADIPÓCITOS

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Orientador: Angélica Amorim Amato

Co-orientador: Carine Royer

Brasília

2019

ANNA PAULA BARROS FERREIRA

ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA VIA ERK1/2 SOBRE A RESPOSTA
ADIPOGÊNICA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE AGONISTAS DE PPAR γ EM
MACRÓFAGOS E ADIPÓCITOS

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Aprovado em 11 de julho de 2019

BANCA EXAMINADORA

PROFESSOR FRANCISCO DE ASSIS ROCHA NEVES (Presidente)
Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília

PROFESSORA DOUTORA DJANE BRAZ DUARTE
Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília

PROFESSORA DOUTORA CAROLINE LOURENÇO DE LIMA
Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília

Dedico este trabalho aos meus pais, Eduardo e Bethânia e às minhas avós, Lucy e Socorro que sempre cultivaram em nós os valores da educação e ao Umberto, por ter me incentivado a continuar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua infinita misericórdia em minha vida.

Aos meus pais, que não medem esforços para nos apoiar e nos ajudar a seguirmos nossos sonhos. Obrigada pela educação que me deram.

As minhas avós, pelas orações, pelos incentivos e pelos puxões de orelha.

Aos meus irmãos por me fazerem ser tão forte.

Ao Umberto, por me apoiar, incentivar, compreender e por estar comigo quando mais precisei.

À minha maravilhosa orientadora, Profa Carine, por tudo. Obrigada pela compreensão, pela preocupação, pela ajuda, pela paciência, por acreditar em mim, pelo tratamento maternal.

À querida profa Angélica, pela compreensão, pela ajuda, por tudo!

Aos meus amigos Wanessa e Henrique, pela mão amiga, pelo ombro, pela ajuda, por compartilhar comigo alegrias, preocupações e conquistas, desde a faculdade.

À amiga Ana Carolina, Pibic, você é parte essencial desse trabalho! Obrigada pela ajuda, por compartilhar emoções, alegrias e frustrações.

Aos amigos do Farmol, Cintia, Gleice, Carol, Fernanda, Janice, Hannah, Isadora, Nady, Carol Lourenço. Fazem do Farmol uma família.

Aos técnicos e estagiários do Farmol, por sempre estarem dispostos a ajudar e serem tão prestativos.

Aos professores do Farmol pelos ensinamentos e dedicação ao laboratório.

Aos órgãos de fomento, CNPq e FAP-DF agradeço o financiamento desse trabalho

EPÍGRAFE

Minha maior 'vingança' será educar a todos.

Malala Yousafzai

RESUMO

Introdução: O tecido adiposo produz vários mediadores inflamatórios implicados na fisiopatologia da obesidade. A inflamação associada à obesidade é caracterizada pela produção anormal mediadores inflamatórios, assim como pela infiltração por macrófagos. A obesidade acarreta o aumento da incidência de comorbidades como o diabetes mellitus (DM2). O uso de tiazolidinedionas (TZDs) no tratamento do DM2 está associada a diversos efeitos adversos. Estudos anteriores mostraram que GQ-16 apresentou atividade agonista parcial e específica em PPAR γ , (TZDs) e efeitos semelhantes às TZDs na redução da glicemia e com menor efeito adipogênico. Muitos dos efeitos dos agonistas de PPAR γ são explicados pela alteração da expressão gênica. Contudo, estudos demonstram que os agonistas podem mediar efeitos rápidos e que envolvem uma série de eventos intracelulares. No entanto, ainda não foi explorado se estes mecanismos não-genômicos de agonistas PPAR γ poderiam explicar os efeitos benéficos do agonista parcial do PPAR γ GQ-16. **Objetivo:** Este estudo buscou analisar os efeitos de agonistas total e parcial de PPAR γ sobre a ativação da via ERK1/2 e o envolvimento dessa via na expressão de genes inflamatórios em cultura de macrófagos e inflamatórios (*Tnfa* e *Il6*) e adipogênicos (*Glut4*, *Adpn*, *Ap2*) em cultura de pré-adipócitos. **Métodos:** Macrófagos RAW 264.7 foram cultivados na presença de veículo (DMSO, 0,001%), rosiglitazona (RSG) (10^{-5} M), GQ-16 (10^{-5} M) e na presença ou ausência de estímulo inflamatório LPS (100 ng/mL) ou com a inibidor da MEK 1/2 (U0126 10 μ M). Pré-adipócitos 3T3-L1 foram cultivados até sua confluência. Após 2 dias foram tratados com coquetel indutor da diferenciação adipogênica por mais dois dias, e em seguida, foram tratados com insulina e os diferentes tratamentos por mais 2 dias: veículo (DMSO, 0,001%), RSG (10^{-5} M), GQ-16 (10^{-5} M) na presença ou ausência de inibidor da MEK 1/2. A expressão relativa do RNA mensageiro dos genes inflamatórios e adipogênicos foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). A fosforilação da ERK1/2 foi avaliada por ensaio de *Western blot*. **Resultados:** Em cultura de pré-adipócitos no início da diferenciação ambos agonistas de PPAR γ não alteraram a fosforilação da ERK1/2. Foi possível observar que a RSG apresentou efeito adipogênico maior que o GQ-16, e que pelo menos parte desse efeito se deve a ativação da via da ERK. Quando analisada a expressão relativa do RNAm do gene da *interleucina 6 (Il6)*, ambos os agonistas diminuíram a sua expressão. Em cultura de macrófagos, a fosforilação da ERK1/2 estimulada por LPS foi diminuída pelo tratamentos com os agonistas de PPAR γ . O efeito do LPS na expressão relativa do RNAm de genes inflamatórios foi diminuído quando associado ao agonista total do receptor PPAR γ no entanto, a associação com agonista parcial não alterou tal efeito. **Conclusão:** Pode-se sugerir que o efeito adipogênico maior da RSG em relação ao GQ-16 deve-se em parte ao envolvimento da via da ERK. Ainda, ambos agonistas apresentaram efeito anti-inflamatório, embora o agonista total apresentou maior efeito quando comparado ao agonista parcial. Com estes resultados, este projeto contribuiu para a elucidação do mecanismo de ação do GQ-16, um novo modulador seletivo de PPAR γ .

Palavras chaves: Inflamação; obesidade; ERK1/2; PPAR gamma; GQ-16.

ABSTRACT

Introduction: During the obesity, the adipose tissue produces several inflammatory mediators. Obesity-associated inflammation is characterized by abnormal production of inflammatory mediators, as well as infiltration by macrophages. Obesity increases the incidence of comorbidities as well as diabetes mellitus (DM2). The use of thiazolidinedione drugs (TZDs) in the treatment of DM2 is associated with several adverse effects. Previous studies have shown that GQ-16 presented partial and specific agonist activity at PPAR γ , and effects similar to TZDs in the reduction of blood glucose and with less adipogenic effect. Many of the effects of PPAR agonists are explained by gene expression alteration. However, studies have shown that these agonists can mediate rapid effects that involve a series of intracellular events. However, it has not yet been explored whether these non-genomic mechanisms of PPAR γ agonism could explain the beneficial effects of the partial agonist of PPAR γ GQ-16. **Aim:** This study sought to analyze the effects of total and partial agonists from PPAR γ on the activation of the ERK1/2 pathway and its involvement in the expression of inflammatory genes in macrophage culture and and inflammatory (*Tnfa* and *Il6*) and adipogenic (*Glut4*, *Adpn*, *Ap2*) in pre-adipocyte culture. **Methods:** RAW 264.7 macrophages were cultivated in the presence of a vehicle (DMSO, 0.001%), rosiglitazone (RSG) (10^{-5} M), GQ-16 (10^{-5} M) and in the presence or absence of LPS inflammatory stimulus (100 ng/mL) or with MEK 1/2 inhibitor (U0126). Pre-adipocytes 3T3-L1 were cultivated until their confluence. After 2 days they were treated with a cocktail that induced differentiation for another 2 days, and then they were treated with insulin and the different treatments for another 2 days: vehicle (DMSO, 0.001%), RSG (10^{-5} M), GQ-16 (10^{-5} M) in the presence or absence of a MEK 1/2 inhibitor. The relative expression of the mRNA of inflammatory and adipogenic genes were analyzed by real-time quantitative PCR (RT-PCRq). ERK1/2 phosphorylation was evaluated by a Western blot assay. **Results:** In pre-adipocyte culture at the beginning of differentiation, both agonists of PPAR did not alter the phosphorylation of ERK1/2. It was possible to observe that the RSG had an adipogenic effect greater than the GQ-16, and that at least part of this effect is due to the activation of the ERK pathway. When the relative expression of the mRNA of the interleukin 6 gene (*Il6*) was analyzed, both agonists decreased their expression. In macrophage culture, the phosphorylation of ERK1/2 stimulated by LPS was altered by treatments with PPAR agonists. The effect of LPS on the relative expression of the mRNA of inflammatory genes was reduced when associated with the total agonist of the PPAR receptor, however, the association with partial agonist did not alter this effect. **Conclusion:** It may be suggested that the greater adipogenic effect of GSR in relation to GQ-16 is partly due to the involvement of the ERK pathway. In addition, both agonists had anti-inflammatory effects, although the total agonist had a greater effect when compared to the partial agonist. With these results, this project contributed to the elucidation of the mechanism of action of GQ-16, a new selective modulator of PPAR γ .

Keywords: Inflammation; obesity; ERK1/2; PPAR gamma; GQ-16.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Modulação de macrófagos no tecido adiposo.	18
Figura 2 Efeitos dos ácidos graxos livres em diferentes órgãos.....	20
Figura 3. Ativação do PPAR γ	22
Figura 4. Proposta de transdução de sinal integrada GPR40 e PPAR γ via nas células endoteliais humanas.	26
Figura 5 .Estrutura química da Rosiglitazona e GQ-16.....	30
Figura 6. Ensaio de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1.	35
Figura 7 Efeito do inibidor da MEK1/2 e agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm do gene ap2 em pré-adipócitos 3T3-L1 no início da diferenciação adipogênica.	41
Figura 8 Efeito do inibidor da MEK1/2 e agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm do gene adiponectina (Adpn) em pré-adipócitos 3T3-L1 no início da diferenciação adipogênica.....	42
Figura 9. Efeito do inibidor da MEK1/2 e agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm do gene Glut4, em pré-adipócitos 3T3-L1 no início da diferenciação adipogênica.	43
Figura 10. Efeito do inibidor da MEK1/2 e agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm do gene Il6 em pré-adipócitos 3T3-L1 no início da diferenciação adipogênica.	44
Figura 11.Efeito do inibidor da MEK1/2 e agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm do gene Tnf α em pré-adipócitos 3T3-L1 no início da diferenciação adipogênica.....	45
Figura 12. Efeitos da Rosiglitazona e do GQ-16 na fosforilação da ERK1/2 em pré-adipócitos murinos 3T3-L1 no início da diferenciação adipogênica.	46
Figura 13. Efeito dos agonistas de PPAR γ sobre a expressão relativa do RNAm do gene Il6 induzida por LPS em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7.	48
Figura 14. Efeito dos agonistas de PPAR γ sobre a expressão relativa do RNAm do gene Il6 induzida por LPS em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7.	49
Figura 15. Efeito dos agonistas de PPAR γ sobre a expressão relativa do RNAm do gene Il6 induzida por LPS em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7.	49
Figura 16. Efeito dos agonistas de PPAR γ e LPS na expressão relativa do RNAm do gene IL6 em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7.	50

Figura 17. Efeito dos agonistas de PPAR γ sobre a expressão relativa do RNAm do gene IL6 induzida por LPS em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7.	51
Figura 18 Efeito dos agonistas de PPAR γ sobre a expressão relativa do RNAm do gene IL6 induzida por LPS em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7.	52
Figura 19 Efeito dos agonistas de PPAR γ e LPS na expressão relativa do RNAm do gene Tnf α em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7.	52
Figura 20. Efeito dos agonistas de PPAR γ sobre a expressão relativa do RNAm do gene Tnf α induzida por LPS em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7.	54
Figura 21. Efeito de agonistas de PPAR γ sobre a expressão relativa do RNAm do gene Tnf α alterada por inibidor da MEK1/2 em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7.	57
Figura 22. Efeito de agonistas de PPAR γ e inibidor da MEK1/2 na expressão relativa do RNAm do gene Tnf α estimulada por LPS em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7.	58
Figura 23. Efeito de agonistas de PPAR γ sobre a expressão relativa do RNAm do gene IL6 alterada por inibidor da MEK1/2 em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7.	55
Figura 24. Efeito de agonistas de PPAR γ e inibidor da MEK1/2 na expressão relativa do RNAm do gene Il6 estimulada por LPS em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7.	56
Figura 25 Efeitos de agonistas de PPAR γ e 15 minutos de tratamento com LPS na fosforilação da ERK1/2 em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7.	59
Figura 26 Efeitos de agonistas de PPAR γ e 30 minutos de tratamento com LPS na fosforilação da ERK1/2 em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7.	61
Figura 27 Efeitos de agonistas de PPAR γ e 1 hora de tratamento com LPS na fosforilação da ERK1/2 em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácidos Graxos
AP1	Proteína ativadora 1
C/EBP	Proteína de ligação ao acentuador CCAAT
CDK	Ciclina dependente de quinase
CO ₂	Dióxido de carbono
DM 2	Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EP300	Histona Acetiltransferase p300
ERK	Quinases reguladoras de sinais extracelulares
FABP	Fatty-acid-binding proteins
FE	Fibroblastos embrionários
GPR	Receptor acoplado a proteína G
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
IBMX	Isobutilmetilxantina
IGF-1R	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IKK β	Inibidor do fator nuclear kappa B quinase subunidade beta
<i>IL6</i>	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
INCT	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
INF γ	Interferon Gama
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
LBD	Domínio de ligação do ligante
M1	Macrófago do tipo 1
M2	Macrófago do tipo 2
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MCP1	Proteína quimiotática para monócitos tipo 1
miR-143	MicroRNA-143
NaCl	Cloreto de sódio
NFK β	Fator nuclear kappa subunidade B
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PC-3	Célula de câncer prostático humano

PGC-1 α	Coativador 1 alfa do PPAR γ
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PPAR	Receptor ativado por proliferadores peroxissomais
PPAR β/δ	Receptor beta-delta ativado por proliferador peroxissomal
PPAR α	Receptor alfa ativado por proliferadores peroxissomais
PPAR γ	Receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais
PPRE	Elemento responsivo ao PPAR
RNA	Ácido ribonucleico
RSG	Rosiglitazona
RXR	Receptor do ácido 9-cis retinóico
SFB	Soro Fetal Bovino
SNB	Soro neonatal Bovino
SNC	Sistema nervoso central
SRC-1	Coativador 1 do receptor esteróide
STAT-6	Transdutores de sinal e ativadores da transcrição 6
TFN- α	Fator de necrose tumoral alfa
TLR	Receptores semelhantes a Toll
TUG-891	Agonista de GPR120
TZD	Tiazolidineidionas
U0126	Antagonista de ERK 1/2
VLDL	Lipopoliproteína de densidade muito baixa

Sumário

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Obesidade e Inflamação.....	17
1.2 Inflamação e resistência à insulina.....	19
1.3 Receptor Ativado por Proliferador Peroxissomal (PPAR).....	21
1.4 PPAR γ e adipogênese	22
1.5 PPAR γ e inflamação.....	23
1.6 Efeitos não genômicos de PPAR γ	24
1.7 Agonistas totais de PPAR γ	27
1.8 Agonistas parciais de PPAR γ	29
2 OBJETIVO.....	32
2.1 Objetivos específicos.....	32
3 MÉTODOS	33
3.1 Cultura de Células.....	33
3.2 . Diferenciação e tratamento dos pré-adipócitos 3T3-L1	34
3.3 . Tratamento de macrófagos murinos RAW 264,7	36
3.4 Análise da expressão gênica por RT-PCRq.....	36
3.4.1 Extração de RNA e tratamento com DNase	36
3.4.2 RT-PCRq	37
3.5 Análise por <i>Western blot</i>	39
3.5.1 Lise celular.....	39
3.5.2 Eletroforese e transferência de amostras	39
3.5.3 <i>Western Blott</i>	40
3.5.4 Densitometria das bandas e análise estatística	40
3.6 Análise estatística	40
4 RESULTADOS	41
4.1 Efeitos dos agonistas de PPAR γ em cultura de pré-adipócitos 3T3-L1 no início da diferenciação adipogênica.....	41

4.1.1 Efeito de agonistas de PPAR γ e da via MEK1/2 na expressão relativa do RNAm de genes adipogênicos	41
4.1.2 Efeito de agonistas de PPAR γ e da via MEK1/2 na expressão relativa do RNAm de genes inflamatórios	43
4.1.3 Efeito de agonistas de PPAR γ sobre a fosforilação da ERK1/2	46
4.2 Efeitos dos agonistas de PPAR γ em cultura de macrófagos RAW 264.7	47
4.2.1 Efeito de agonistas de PPAR γ e na expressão relativa do RNAm de genes inflamatórios	47
4.2.2 Efeito da via MEK1/2 na expressão relativa do RNAm de genes inflamatórios em macrófagos tratados com agonistas de PPAR γ	55
4.2.3 Efeito de agonistas de PPAR PPAR γ sobre a fosforilação da ERK1/2	59
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÃO.....	69
7 REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica, de fisiopatologia complexa e não totalmente compreendida. Representa hoje um importante problema de saúde, tanto pelo aumento global de sua incidência, quanto pelas várias condições a ela associadas, tais como *Diabetes Mellitus* Tipo 2 (DM2), dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica (HAS)(1). A obesidade também está fortemente relacionada com a síndrome metabólica, condição esta associada com os estados pró-inflamatórios. A cada uma dessas doenças, por sua vez, associa-se ao aumento dos riscos de aterosclerose e doença cardiovascular (2–4).

O excesso de peso e a obesidade são definidos como acúmulo anormal ou excessivo de gordura que apresenta um risco para a saúde. O método padronizado mundialmente para medição da obesidade é o índice de massa corporal (IMC), que pode ser calculado pela fórmula abaixo (1). IMC igual ou superior a 25 é considerado sobrepeso. A pessoa com IMC de 30 ou mais é geralmente considerada obesa (5).

$$\frac{\text{Peso (quilograma)}}{\text{Altura}^2 \text{ (metro)}}$$

Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2016, cerca de 39% da população mundial estava acima do peso (6). No Brasil, entre 2006 e 2016 o índice de pessoas obesas aumentou cerca de 60% e doenças como diabetes e hipertensão também tiveram sua incidência aumentada (7).

O tecido adiposo não é 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 (8). Nesse sentido, sabe-se hoje que o tecido adiposo produz vários mediadores inflamatórios implicados na fisiopatologia da obesidade (6).

1.1 OBESIDADE E INFLAMAÇÃO

A obesidade é caracterizada pela ativação de um processo inflamatório em diferentes tecidos metabolicamente ativos, dentre eles estão o tecido adiposo, fígado e células do sistema imunológico(10). A inflamação associada à obesidade é caracterizada pela produção anormal de citocinas e outros mediadores inflamatórios como interleucina-6 (*IL6*), fator de necrose tumoral α (*TNF α*) e quimiocinas, e a ativação de vias de sinalização inflamatórias nas células adiposas que contribuem para o desenvolvimento da resistência à insulina (1,9,11–13).

Outra importante característica que ocorre no tecido adiposo durante a obesidade é a sua infiltração por células T e macrófagos. Estas são células plásticas, pois sofrem mudança fenotípica, também chamada de polarização de macrófagos, indo do estado anti-inflamatório (M2) para uma forma com efeitos inflamatórios (M1) e vice-versa, através de sinais específicos (14–17,3,18). Embora a função destas células no metabolismo sistêmico não esteja clara, acredita-se que sua presença no tecido adiposo contribua para o surgimento e manutenção da resposta inflamatória associada à obesidade (9).

Ainda, essas citocinas inflamatórias interagem em sinais que regulam o apetite, inibindo a saciedade, o que leva ao acúmulo de ácidos graxos (AG), favorecendo a hipertrofia de adipócitos que pode culminar na morte destas células e consequentemente liberação de citocinas para o espaço extracelular, recrutando mais células pró-inflamatórias dando continuidade ao ciclo de obesidade e inflamação (15). A associação entre a morte do adipócito e a resposta inflamatória é evidenciada, morfológicamente, pela presença de macrófagos M1 que circundam os adipócitos mortos para formar estruturas semelhantes a coroas, ou *crown-like*(16) (figura 1).

Com isso, sabe-se que o tecido adiposo na condição obesa, apresenta infiltração de macrófagos M1 e estudos demonstraram que múltiplas vias sinalizadoras são ativadas durante a hipertrofia dos adipócitos e a ativação dessas vias culmina no aumento da proteína quimiotática para monócitos-1 (MCP-1), o que aumenta a proporção de macrófagos de 10 para aproximadamente 40% do total de células presentes neste tecido (17).

Estudos comprovam que a relação entre macrófagos e adipócitos é crucial no desenvolvimento da obesidade, sendo que a perda de peso diminui a infiltração de macrófagos e a expressão de fatores inflamatórios no tecido adiposo (18).

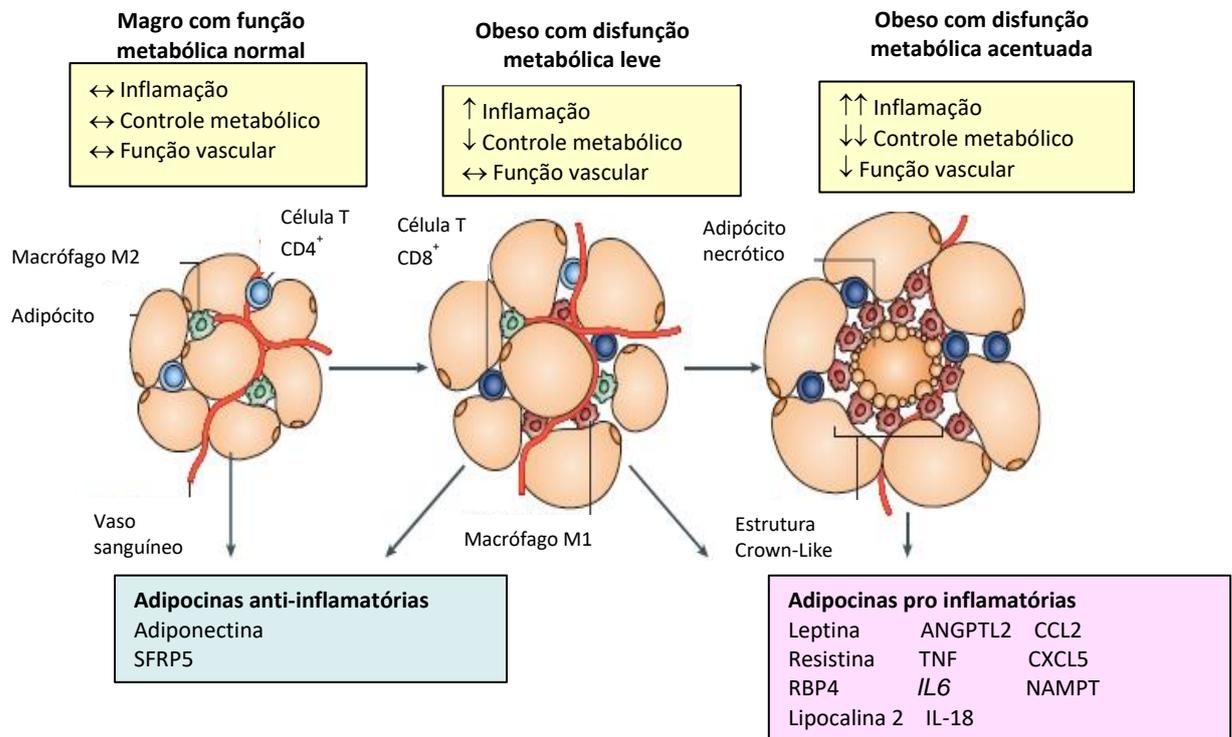


Figura 1 Modulação de macrófagos no tecido adiposo. O tecido adiposo representado em três classificações estruturais e funcionais: magro com função metabólica normal, obeso com disfunção metabólica leve e obeso com disfunção metabólica completa. À medida que a obesidade se desenvolve, os adipócitos sofrem hipertrofia devido ao aumento do armazenamento de triglicerídeos. Macrófagos no tecido adiposo magro expressam marcadores de um estado M2 ou alternativamente ativado, enquanto a obesidade leva ao recrutamento e acúmulo de M1 ou macrófagos classicamente ativados, bem como células T, no tecido adiposo. Adipocinas anti-inflamatórias, incluindo adiponectina e SFRP5, são preferencialmente produzidas por tecido adiposo magro. Em estados de obesidade, o tecido adiposo gera grandes quantidades de fatores pró-inflamatórios. Tecido adiposo metabolicamente disfuncional pode estar associado a níveis mais elevados de necrose adipocitária, e macrófagos M1 estão dispostos ao redor de adipócitos mortos em estruturas tipo coroa (*crown-like*). Adaptado de (3).

1.2 INFLAMAÇÃO E RESISTÊNCIA À INSULINA

A resistência à insulina é caracterizada pela manutenção de altas concentrações plasmáticas de insulina. A insulina é um hormônio polipeptídeo com uma importante função reguladora no metabolismo que, a nível do sistema nervoso central (SNC) é caracterizada por produzir uma sensação de saciedade, aumentar o gasto energético e regular a ação da leptina, um hormônio regulador do apetite, produzido principalmente no tecido adiposo, branco e, em menor grau, na placenta, estômago e células do sistema imune (19). A resistência à insulina ou a hipersulinemia promove em diferentes tecidos a ação lipogênica favorecendo a obesidade abdominal, a produção hepática de triglicérides e a liberação de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e conseqüentemente a dislipidemia. (20)

O trabalho desenvolvido por Lumeng e colaboradores (2007) (21) mostrou que os macrófagos alteram os níveis do transportador de glicose *glut*, assim como inibem a ação da insulina em adipócitos. Já entre os fatores que podem inibir a infiltração de macrófagos para o tecido adiposo está o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) (22).

Ainda, a hipertrofia de adipócitos e infiltração de macrófagos predominantemente do tipo M1 induzem resistência à insulina através da secreção de citocinas pró-inflamatórias IL6, MCP-1 e principalmente o TNF α que favorecem o acúmulo de lipídios por diminuir a sensibilidade ou inibir os receptores de insulina tornando-se um dos principais elos entre vias inflamatórias e resistência insulínica (17,23). Já os macrófagos M2 sustentam a sensibilidade à insulina por secretar IL-10 (24).

A produção hepática de triglicérides sobrecarrega as vias de oxidação e armazenamento e os metabólitos destes ácidos graxos livres podem ativar serinas quinase, incluindo duas das mais potentes cascatas pró-inflamatórias: I κ B quinase (IKK) e quinase c-Jun N-terminal (JNK) e assim inibir a função insulínica (25). Os ácidos graxos livres também podem se ligar ao complexo receptores semelhantes a toll 4 (TLR-4) presente nos adipócitos e macrófagos, e assim ativar proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e o fator nuclear kappa B (NF κ B), iniciando uma potente resposta inflamatória em cadeia (26) (Figura 2).

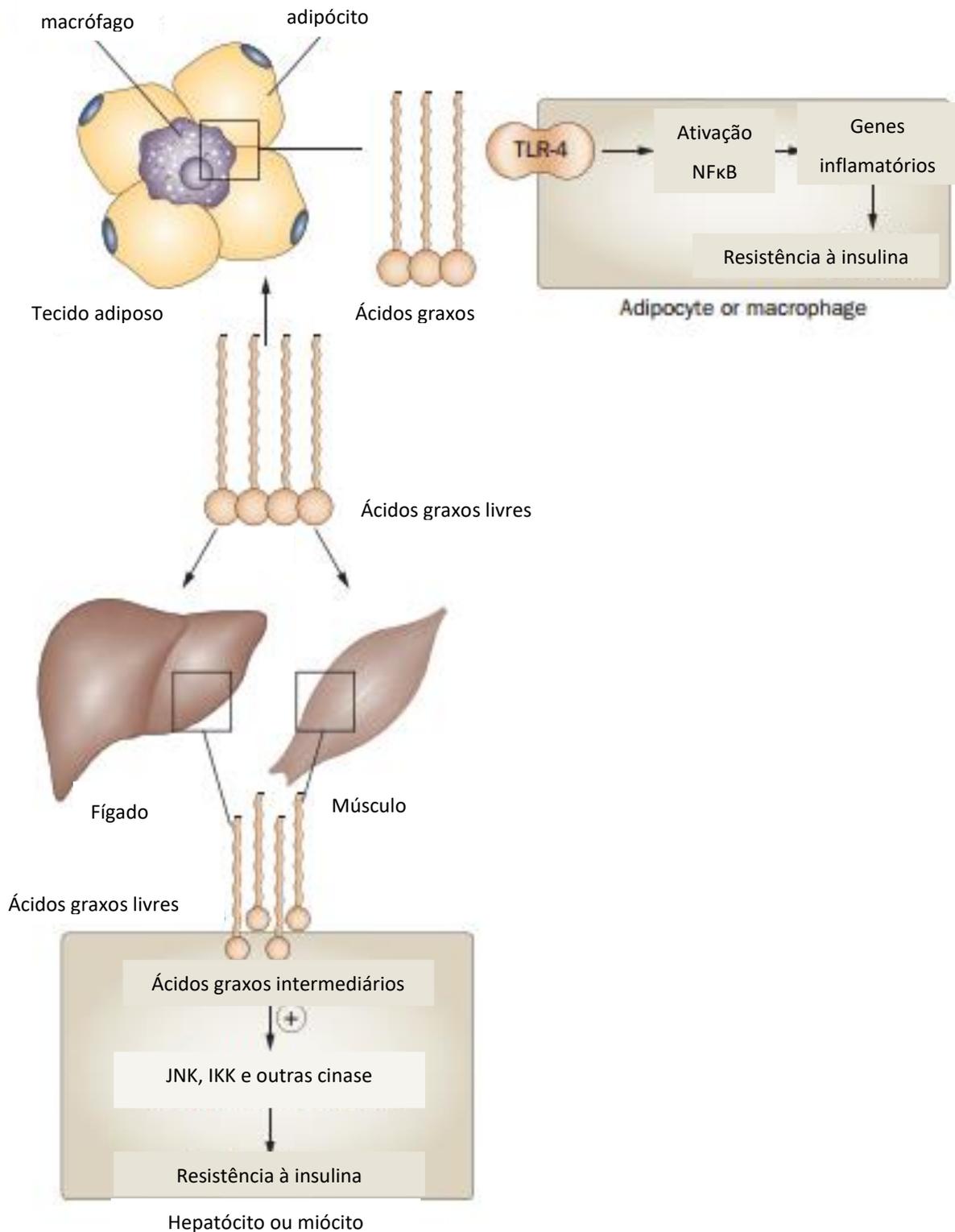


Figura 2 Efeitos dos ácidos graxos livres em diferentes órgãos.(25) Acúmulo de ácidos graxos livres saturam a capacidade oxidativa e de armazenamento de hepatócitos e miócitos, resultando em acúmulo de ácidos graxos intermediários. Os ácidos graxos livres também podem ligar ao TLR-4, que está presente em macrófagos e adipócitos. Em interação com TLR-4, ácidos graxos livres induzem a ativação e expressão de uma matriz de genes inflamatórios, alguns dos quais prejudicam a sinalização de insulina. Adaptado de (25).

1.3 RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADOR PEROXISSOMAL (PPAR)

Entre os diversos conhecimentos originados do estudo da relação entre tecido adiposo, metabolismo energético e inflamação está a identificação dos PPARs como determinantes críticos de integração metabólica de diversos tecidos (8). Os PPARs fazem parte da superfamília de receptores nucleares (RN) ativados por ligantes que atuam na regulação da transcrição gênica (27). Este receptor possui 3 isoformas PPAR α , PPAR- β/δ e PPAR γ , os quais desempenham diferentes funções no metabolismo energético. O PPAR α é expresso principalmente no fígado, coração e músculo esquelético, e possui um papel fundamental na regulação do catabolismo de ácidos graxos por meio do aumento de genes que codificam enzimas na via de oxidação β (28–31), o PPAR- β/δ é expresso em todo o corpo regulando o gasto energético e o PPAR γ é expresso majoritariamente no fígado, no músculo, coração, ossos e no tecido adiposo, o PPAR γ regula o armazenamento de energia, (8).

Eles são ativados por ligantes sintéticos ou endógenos e, após ativação, formam heterodímeros com o receptor X retinóide (RXR) e se ligam às sequências específicas de reconhecimento, chamados elementos responsivos do receptor ativado por proliferadores peroxissomais (PPRE), na região reguladora gênica dos genes-alvo, levando à transcrição gênica (figura 3) (32).

À semelhança dos demais receptores nucleares (RN), os PPARs podem regular a expressão gênica por meio de três mecanismos básicos, onde o ligante pode ou não estar presente. São eles: repressão basal, transativação e transrepressão (33).

A repressão basal corresponde à ligação constitutiva do heterodímero PPAR-RXR ao PPRE, na ausência de ligante com o recrutamento de proteínas corpressoras, como o corpressor de RN (NOCR) e as desacetilases de histonas (HDAC). Essas proteínas mantêm a cromatina em sua forma enovelada, impedindo, assim, as atividades da maquinaria transcricional e dos complexos coativadores, resultando em uma repressão ativa da expressão gênica (34).

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

transcrição (35). A regulação negativa é conhecida como transrepressão e pode ocorrer por mecanismos distintos que são conhecidos como (36):

- *Tethering*: ocorre quando a ativação da PPAR resulta no sequestro de fatores de transcrição, inibindo a expressão de seus genes-alvo.
- *Squelching*: os PPARs podem sequestrar cofatores necessários para a atividade transcrricional.
- *Inverse squelching*: quando ocorre a dissociação de co-repressores de complexos PPAR-RXR ativados.

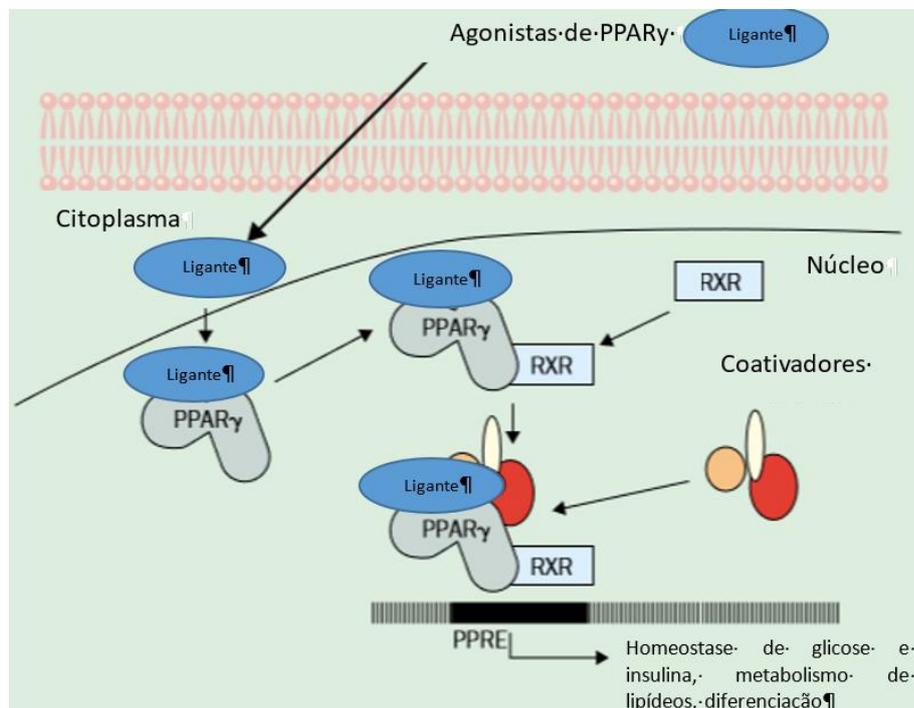


Figura 3. Ativação do PPAR γ . Depois de se ligar ao seu ligante, PPAR γ forma heterodímeros com RXR no núcleo, onde ligam-se a sequências específicas de elementos responsivos (PPRE) do PPAR para regular a transcrição dos genes alvo, responsáveis por controlar a homeostase de insulina e glicose, metabolismo de lipídeos e diferenciação celular. Adaptado de (152)

1.4 PPAR γ E ADIPOGÊNESE

O gene que codifica o PPAR γ origina três RNAs mensageiros, PPAR γ 1, PPAR γ 2 e PPAR γ 3. O PPAR γ 1 e - γ 3 codificam a mesma proteína, o PPAR γ 1, e o PPAR γ 2 codifica a isoforma PPAR γ 2, que se distingue pela presença de 28 aminoácidos adicionais na extremidade amino-terminal (37). 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 (38,39).

Vários estudos demonstram que o PPAR γ está envolvido em processos fisiológicos que incluem adipogênese, metabolismo da glicose e inflamação, além disso, em estudos prévios, este receptor também apresentou importante função na regulação do ciclo celular por inibir o crescimento e induzir a diferenciação de adipócitos, monócitos e macrófagos (40–42).

A adipogênese é o processo de diferenciação de células tronco embrionárias em células mesenquimais multipotentes (MSCs) que ao receber estímulos específicos se diferenciam em pré-adipócitos que vão se diferenciar em adipócitos pela ação de vários fatores de transcrição, entre eles o PPAR γ (43). Além dessa atividade adipogênica, o PPAR γ também é importante no metabolismo lipídico e regula os genes que participam da liberação, transporte e armazenamento de ácidos graxos como a lipoproteína lipase (LPL) e o transportador de ácidos graxos CD36, além da proteína de ligação de ácidos graxos 4 (FABP4; *ap2*), acil-CoA sintase (44–47).

Estudos mostraram que em camundongos *knockout* para PPAR γ não houve desenvolvimento de tecido adiposo e *in vitro* a ablação do gene do PPAR γ interrompeu a diferenciação de adipócitos (48,49). Fibroblastos embrionários (FE) PPAR γ ^{-/-} não foram capazes de se diferenciar em adipócitos, mas após a expressão de PPAR γ pela transferência gênica mediada por retrovírus restaurou a capacidade das células FE deficientes de PPAR γ se diferenciarem em adipócitos (50).

1.5 PPAR γ E INFLAMAÇÃO

O PPAR γ está presente em macrófagos e sua expressão é induzida rapidamente após a diferenciação de monócitos em macrófagos (51,52). PPAR γ possui propriedades anti-inflamatórias por modular negativamente os fatores de transcrição NF κ B, STAT (transdutor de sinal e ativador da transcrição) e AP-1 (proteína ativadora) (53). A transrepressão do PPAR γ pode ocorrer pela SUMOilação do receptor estimulado pelo agonista mantendo o complexo correpressor no elemento de resposta ao NF κ B de genes inflamatórios (54). Este receptor ainda reprime a ativação da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), o que faz com que os fatores de transcrição sejam mantidos sem fosforilação e, conseqüentemente, inativos

(55). Além disso, a ativação do PPAR γ pode exercer atividade anti-inflamatória em macrófagos, uma vez que estimula a mudança fenotípica destas células para fenótipo M2 (56).

Diversos estudos demonstram a atividade anti-inflamatória do PPAR γ em diferentes células e tecidos. Em células T, os ativadores PPAR γ reduzem a síntese de citocinas, incluindo IFN γ e TNF α , e exercem efeitos antiproliferativos. (57,58) A rosiglitazona, agonista total de PPAR γ demonstrou efeito protetor em lesões locais em camundongos num modelo de inflamação intestinal induzido por isquemia-Reperfusão, enquanto lesões mais graves foram observadas em camundongos com deficiência de PPAR γ (59). Em modelo experimental de hepatite, o pré-tratamento com o ligante endógeno 15dPGJ2 de PPAR γ levou à diminuição da regulação dos processos inflamatórios (60).

1.6 EFEITOS NÃO GENÔMICOS DE AGONISTAS DE PPAR γ

Efeitos não genômicos refere-se às ações dos ligantes de PPAR γ que não são mediadas pela atividade transcricional do PPAR γ . Parte dos efeitos dos agonistas de PPAR γ são explicados pela alteração da expressão gênica. Contudo, vários estudos demonstram que agonistas de PPAR γ podem mediar efeitos rápidos e que desencadeiam uma série de eventos intracelulares que influenciam na homeostasia da glicose e lipídeos, na regulação de vias sinalizadoras citoplasmáticas, na translocação de receptores PPAR γ e, também, na modulação da ação pró-inflamatória (52,61–63). Estes efeitos podem ser mediados via PPAR γ ou mediados por outras vias que independem deste receptor (52,61,62,64–68)

Estudos envolvendo as ações não-genômicas de agonistas de PPAR γ sobre a atividade anti-inflamatória das TZDs foram desenvolvidos. von Knethen e colaboradores (2007) demonstraram a presença de PPAR γ na região nuclear e citoplasmática de macrófagos RAW 264-7 (52). O uso do antagonista de PPAR γ PGF2 α não foi capaz de reverter o efeito anti-inflamatório induzido pela pioglitazona, a qual inibiu a adesão da interleucina 1 β dependente de monócitos às células endoteliais da veia umbilical humana, evidenciando assim um exemplo de efeito de agonista de PPAR γ independente do receptor (69,70).

A regulação de vias sinalizadoras citoplasmáticas por agonistas de PPAR γ já foi estudada em diversos tipos celulares. Foi demonstrado que a rosiglitazona altera a fosforilação da ERK1/2 (quinase extracelular regulada por sinal 1/2) bem como com a atividade da PI3K (fosfatidilinositol 3-quinases) induzida por IGF-1 (Fator de crescimento Insulina-1) em células de câncer adrenocortical humano e em células de câncer prostático humano PC3, diminuindo a atividade de ambas as vias sinalizadoras (62,71). Por outro lado, em células da musculatura lisa vascular, agonista de PPAR γ no tempo de 15 minutos estimulou a fosforilação da ERK1/2, com envolvimento da PI3K e com isso aumentou a expressão do gene *c-fos* nestas células (72). Em contrapartida, estudos já demonstraram que a rosiglitazona é capaz de inibir a via da ERK1/2 através de uma ação rápida que é dependente do receptor (73,74).

Outros estudos demonstraram que agonistas de PPAR γ como a troglitazona e a ciglitazona, podem se ligar e ativar o receptor 40 acoplado à proteína G (GPR40) (65,68,75–78), um receptor de membrana associado com a secreção de ácido graxo livre e insulina induzida por glicose (79,80), e foi visto que essa via de sinalização pode induzir a rápida ativação da ERK, MAPK p38 e JNK (68,76).

Wang et al (2015) concluíram que o receptor 40 acoplado a proteína G (GPR40) e PPAR γ podem atuar juntos, como uma via de transdução de dois receptores integrados, pois a rosiglitazona também foi capaz de se ligar ao GPR40 e otimizou a propagação do sinal nuclear do PPAR γ em célula do endotélio humano, propondo assim que o GPR40 atua de maneira aditiva ou sinérgica aos efeitos genômicos do PPAR γ (81) (figura 4).

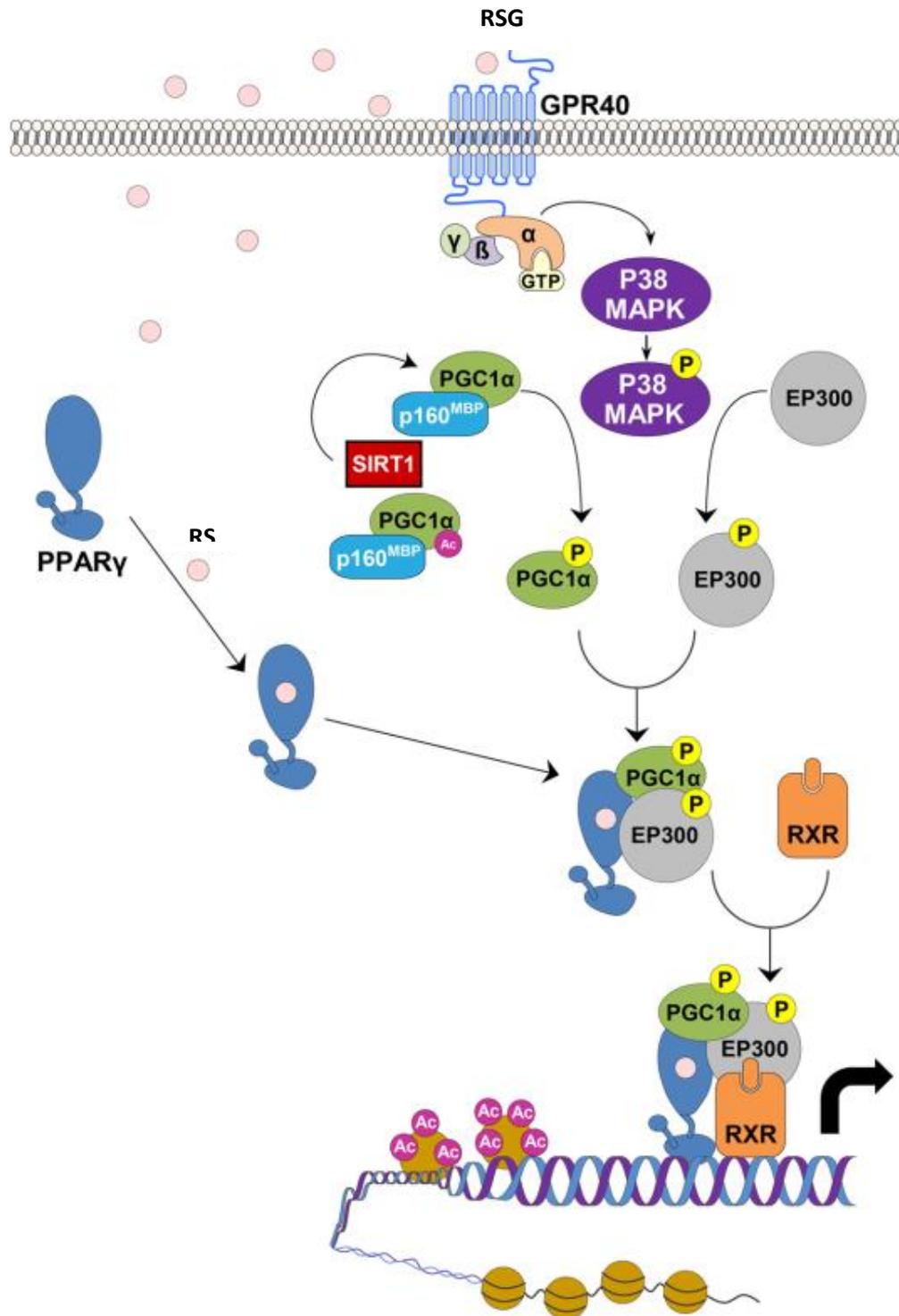


Figura 4. Proposta de transdução de sinal integrada GPR40 e PPAR γ nas células endoteliais humanas(81). Além da via clássica da ativação do PPAR γ , mostrada anteriormente, aqui, rosiglitazona e outros ligantes de PPAR também se ligam e ativam o GPR40 na superfície celular, levando a fosforilação da p38/MAPK, e por conseguinte, ativam tanto do co-ativador da expressão gênica (PGC1 α) como a histona acetiltransferase EP300. A fosforilação libera o seu repressor p160MBP e leva a uma alteração conformacional, permitindo que o PGC1 seja acoplado com a PPAR γ e recrutar o recém-ativado EP300. Assim, o complexo PPAR γ ativado heterodimeriza com o receptor X retinóide, que se liga aos elementos de resposta do proliferador peroxissomal, induzindo a transcrição de genes-alvo. Adaptado de (81).

A função da via ERK1/2 na regulação da adipogênese é controversa. Por exemplo, a ativação dessa via nos estágios finais da adipogênese bloqueia a expressão de genes adipogênicos, enquanto que a ativação no início da adipogênese pode, por outro lado, promover a diferenciação ao ativar fatores de transcrição operando para iniciar a expressão de PPAR γ e C/EBP α (proteína alfa de ligação a potenciação / CCAAT) (82–84). Devido a isso, o presente estudo utilizou culturas de pré-adipócitos no início da diferenciação adipogênica

A expressão relativa do RNAm de genes inflamatórios também foi estudada no início da adipogênese uma vez que o tecido adiposo de indivíduos obesos é caracterizado por um grau de inflamação crônica subclínica (17,85). Pré-adipócitos e adipócitos nesse estado secretam adipocinas pró-inflamatórias como *Il6* e *Tnfa*, que induzem resistência à insulina e hiperglicemia (86–88). Por isso, neste estudo investigou-se a ação de agonistas de PPAR γ na expressão de genes pró-inflamatórios e se a via MEK/ERK poderia estar envolvida.

1.7 AGONISTAS TOTAIS DE PPAR γ

O PPAR γ pode ser ativado por compostos naturais ou sintéticos. Uma variedade de compostos lipídicos endógenos, como ácidos graxos não saturados, eicosanóides e prostaglandinas ativam os PPARs, com baixa afinidade de ligação, na faixa micromolar. Dentre eles, o principal ligante endógeno é o metabólito da prostaglandina 15-deoxi Δ 12-14-prostaglandina-J2 (15d-PGJ2) (38,89–91). Entre os ligantes sintéticos do PPAR γ , estão os sensibilizadores insulínicos tiazolidinedionas (TZDs) como a pioglitazona, rosiglitazona e troglitazona que funcionam como agonistas totais deste receptor (37,92,93).

Agonistas de PPAR γ da classe das TZDs foram utilizados como sensibilizadores insulínicos no tratamento do DM2, e foram avaliados como terapia para outras condições associadas à resistência insulínica, incluindo doença hepática gordurosa não alcoólica, síndrome dos ovários policísticos e lipodistrofias, com bons resultados (94). 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 ácidos graxos livres pelo tecido adiposo (95); (ii)

pela inibição da secreção de citocinas inflamatórias que induzem resistência insulínica no fígado e músculo esquelético (96); e (iii) pelo aumento da produção de adiponectina, um produto secretório do adipócito com atividade sensibilizadora de insulina (97).

Embora os efeitos anti-hiperglicemiante e anti-inflamatório das TZDs sejam bem estabelecidos, sua utilização tem sido associada a diversos efeitos adversos, dentre os quais retenção hídrica, ganho ponderal e adipogênese, ao aumento da mortalidade cardiovascular, a perda de massa óssea e, recentemente, ao aumento da incidência do câncer de bexiga (98–102). Por isso, em 2010, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária suspendeu o registro de comercialização da rosiglitazona e a pioglitazona é utilizada com cautela, não sendo o fármaco de primeira escolha para o tratamento de DM2 (103).

Uma vez que os fármacos dessa classe agem para restaurar a glicemia a níveis fisiológicos, elevando a sensibilidade à insulina dos tecidos-alvo sem o risco de causar hipoglicemia, a maioria dos efeitos do tratamento com TZD é impulsionada pela indução da diferenciação adipocitária, aumentando assim o número de transportadores de glicose como o GLUT4, e induzindo genes lipogênicos como *Ap2* e *Cd36* ou seja, o mecanismo de ação das TZDs envolve a regulação da expressão de um conjunto de genes-alvo associados ao metabolismo de glicose e lipídios, secreção de adipocinas e reações inflamatórias em tecidos-alvo (104,105).

Os mecanismos determinantes do aumento da mortalidade cardiovascular associada a esses agentes não são claros. Uma possibilidade é que estejam relacionados à especificidade da ativação dos PPARs. As TZDs pioglitazona e rosiglitazona, consideradas classicamente agonistas seletivos de PPAR γ e utilizadas como sensibilizadores insulínicos, atuam de fato como agonistas dos três isotipos de PPAR (106).

Uma estratégia para reduzir os efeitos adversos associados à ampla ativação do PPAR γ é o desenvolvimento de ligantes capazes de regular diferentemente os efeitos benéficos do receptor sobre a homeostase energética e os efeitos 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 (107).

1.8 AGONISTAS PARCIAIS DE PPAR γ

Compostos que tendem a ativar o PPAR γ em menor intensidade do que as TZDs agem ativando parcialmente o PPAR parciais ou modulando seletivamente este receptor, como os moduladores seletivos de PPAR (SPPARMs) (108). SPPARMs foram desenvolvidos para otimizar as assinaturas de expressão gênica com o objetivo de gerar efeitos metabólicos benéficos, reduzindo os efeitos colaterais indesejados (109).

Diferentes estudos contribuíram para compreender melhor o mecanismo de ação de agonistas parciais. Um deles, desenvolvido por Choi et al (2010), mostrou que a fosforilação na Ser-273 do PPAR γ está ligada à obesidade e à resistência à insulina possivelmente por desregular um subconjunto de genes-alvo de PPAR γ , como a adiponectina. Também sugeriu que tanto os TZDs como os agonistas parciais com efeitos antidiabéticos melhoram a sensibilidade à insulina principalmente por meio da inibição dessa fosforilação (110). Em outro estudo que teve como objetivo o desenvolvimento de um novo ligante de PPAR γ , o qual exibiu atividade antidiabética em camundongos e ainda sem os efeitos colaterais relacionados ao TZD como ganho de peso e edema, sugeriu que a eficácia deste composto está relacionada com a fosforilação da Ser-273 pela Cdk5 (ciclina-proteína quinase 5) (110,111).

Outros autores também mostraram o efeito benéfico de outros agonistas parciais de PPAR γ na sensibilidade insulínica, sem efeitos colaterais clássicos como ganho de peso ocasionado por agonistas totais deste receptor nuclear (112,113).

Recentemente foi demonstrado que o GQ-177 atua como um agonista parcial PPAR γ que melhora a resistência à insulina associada à obesidade e a dislipidemia com efeitos ateroprotetores em camundongos LDLr(-/-) (114).

A busca por moduladores seletivos do PPAR γ levou ao desenvolvimento de vários compostos sintéticos benzilideno e acridinilideno-tiazolidinedionas ligantes de PPAR (INCT para Inovação Farmacêutica), como o GQ-16 (figura 5).

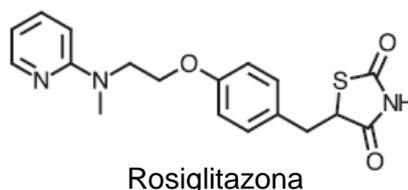
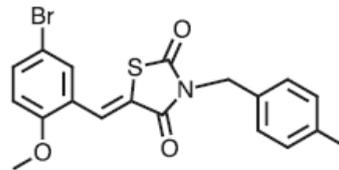


Figura 5 .Estrutura química da Rosiglitazona e GQ-16. Adaptado de (111).

Estudos realizados no Laboratório de Farmacologia Molecular mostraram a



GQ-16

atividade agonista do GQ-16 (benzilideno-tiazolidinediona) em PPAR γ de pró-monócitos humanos U-937 onde foi mostrado que esse composto, diferentemente das TZDs clássicas, apresentou atividade agonista parcial e específica em PPAR γ , pois competiu pela ligação ao LBD (domínio de ligação ao ligante) do PPAR γ , e induziu a interação entre o PPAR γ e o coativador SRC-1 (coativador de receptor esteróide-1). Ainda, a interação do GQ-16 com o PPAR γ produziu uma modificação conformacional do receptor de forma diferente da rosiglitazona (111).

O GQ-16 também apresentou potencial adipogênico em cultura de células, ao aumentar a expressão da proteína ligadora de AG adipocitária (FABP), um marcador específico de adipócitos diferenciados, no entanto esse efeito foi inferior ao observado com o tratamento da rosiglitazona (111). Estudos *in vivo* evidenciaram também melhora da tolerância à glicose e da sensibilidade insulínica em modelo murino de obesidade, resistência insulínica além de diminuir o ganho de peso, níveis de glicose no sangue e acúmulo de triglicerídeo hepático (111,115).

Esse novo composto sintético, GQ-16, mostrou resultados promissores nos estudos realizados até o momento. Suas características de agonismo parcial/modulador seletivo e específico do PPAR γ , sua capacidade de diminuir a fosforilação de PPAR γ tem menor poder adipogênico que a rosiglitazona e seus efeitos *in vivo* sugerem seu potencial terapêutico nas doenças metabólicas relacionadas à obesidade, DM2 e inflamação crônica (111,115).

Ainda, o GQ-16 mostrou-se capaz de reprimir alguns genes ligados a processos inflamatórios e a adesão celular, como *orm2* (orosomucoide 2), *IgalS9* (Galectina 9) e *VCam1* (molécula de adesão celular vascular 1 e *hspb1*, uma proteína de choque térmico que tem papel citoprotetor a citocinas pró-inflamatórias, como o *Tnfa* (116).

No entanto, algumas questões ainda necessitam melhor esclarecimento. Entre elas, qual o mecanismo pelo qual o GQ-16 melhora a sensibilidade à insulina sem promover alguns dos efeitos colaterais como ganho de peso? Ainda, os efeitos benéficos do GQ-16 se estenderiam também aos efeitos anti-inflamatórios dos agonistas totais de PPAR γ ? O GQ-16 poderia influenciar a atividade de macrófagos que afeta o desenvolvimento da resistência à insulina? Ainda, não se sabe explicar o mecanismo pelo qual o agonista parcial de PPAR γ , GQ-16, apresentar menor efeito adipogênico quando comparado ao agonista total rosiglitazona. Poderia a via da ERK1/2 ser ativada de forma diferencial por esses agonistas?

Já foi visto que o GQ-16 apresenta menor capacidade de induzir a expressão de genes adipogênicos em relação ao agonista total de PPAR γ , RSG em cultura de adipócitos no final da diferenciação (116), porém a atividade do GQ-16, no início da adipogênese ainda não foi explorada bem como as vias envolvidas nesse efeito. A hipótese é de que esse ligante possa regular de forma distinta e favoravelmente a expressão de genes ligados à obesidade, por isso, o presente estudo procurou estudar quais os genes adipogênicos ambos agonistas poderiam induzir no início da diferenciação e ainda se a via da ERK1/2 está envolvida neste processo. É importante compreender os mecanismos moleculares que levam ao recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo, o que pode prevenir a inflamação induzida pela obesidade e a resistência à insulina. É relevante também, entender os fatores envolvidos na adipogênese.

2 OBJETIVO

Estudar os efeitos dos agonistas de PPAR γ sobre a resposta inflamatória de macrófagos e seu papel no início da diferenciação de pré-adipócitos e os fatores que influenciam.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do GQ-16 e rosiglitazona na expressão de genes adipogênicos e inflamatórios em cultura de pré-adipócitos;
- Investigar o envolvimento da via de sinalização da ERK1/2 na expressão de genes inflamatórios e adipogênicos em cultura de pré-adipócitos;
- Verificar o envolvimento da via de sinalização da ERK1/2 no início da diferenciação de adipócitos;
- Padronizar o protocolo de tratamento dos macrófagos com os agonistas de PPAR γ e o estímulo inflamatório;
- Analisar os efeitos do GQ-16 e rosiglitazona na expressão de genes inflamatórios em cultura de macrófagos;
- Estudar o envolvimento da via de sinalização da ERK1/2 na expressão de genes inflamatórios modulada por GQ-16 e rosiglitazona em cultura de macrófagos;
- Investigar a modulação da fosforilação da via de sinalização da ERK1/2 por GQ-16 e rosiglitazona na ausência ou presença do estímulo inflamatório.

3 MÉTODOS

Neste trabalho, foram utilizadas culturas de adipócitos no início da diferenciação (diferenciação induzida em cultura) e macrófagos. Buscou-se a padronização dos métodos experimentais com pré-tratamento da cultura celular com agonistas de PPAR γ ou estímulo inflamatório (LPS) em diferentes tempos. Foi verificada a ação rápida de agonistas de PPAR γ nas culturas celulares. Para verificar o possível *crosstalk* entre vias extra nucleares com a alteração da expressão gênica, inibidor da MEK1/2 (U0126) foi utilizado juntamente com os agonistas de PPAR γ . Em seguida a expressão de genes adipogênicos e inflamatórios foi analisada. A seguir, são detalhados os procedimentos em cada uma das etapas.

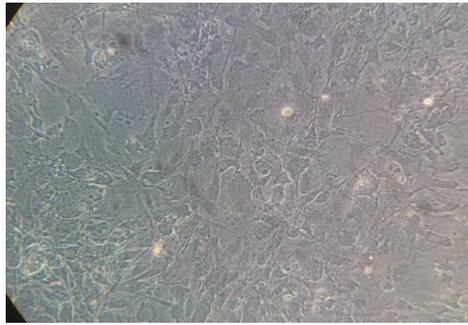
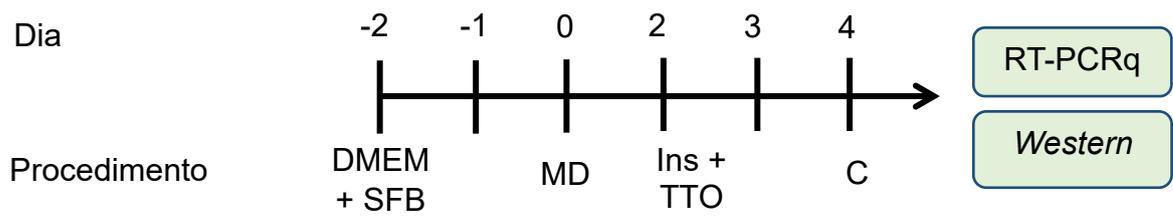
3.1 CULTURA DE CÉLULAS.

Macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contendo 2 nM de glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 μ g/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB), em placas para cultura de células (Corning®). Pré-adipócitos 3T3-L1 foram mantidos em meio de cultura DMEM contendo 2 nM de glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 μ g/mL de estreptomicina e 10% de soro neonatal bovino, em placas para cultura de células (Corning®). As culturas celulares foram mantidas em incubadoras a 37°C e com 5% de CO₂.

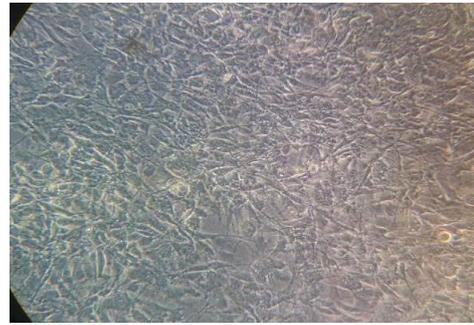
As células foram tratadas com o agonista parcial de PPAR γ GQ-16 que foi cedido pelo Professor Ivan da Rocha Pitta (Universidade Federal de Pernambuco, síntese descrita em Mourão, 2005 (117) e com o agonista total rosiglitazona (*American Radiolabeled Chemicals*, cat. 71740). Os agonistas foram utilizados em concentrações de 10⁻⁵ M em conformidade com estudos prévios do Laboratório de Farmacologia Molecular (111). Ensaios de viabilidade celular foram realizados, os quais demonstraram que tanto rosiglitazona quanto GQ-16, nessa concentração, não causaram efeito sobre a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 e portanto não sendo tóxicos para a célula (118).

3.2 . DIFERENCIAÇÃO E TRATAMENTO DOS PRÉ-ADIPÓCITOS 3T3-L1

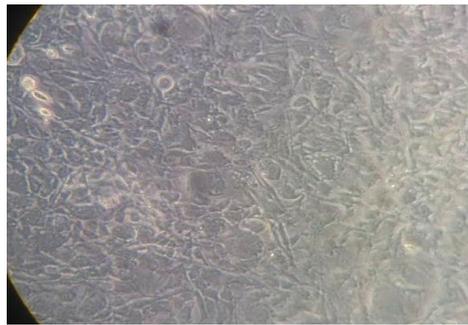
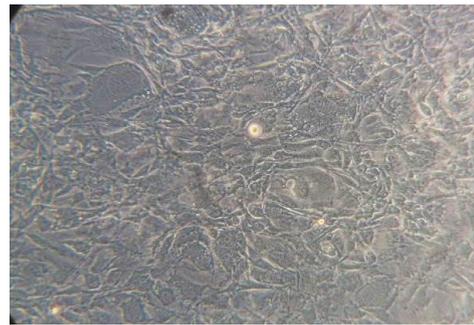
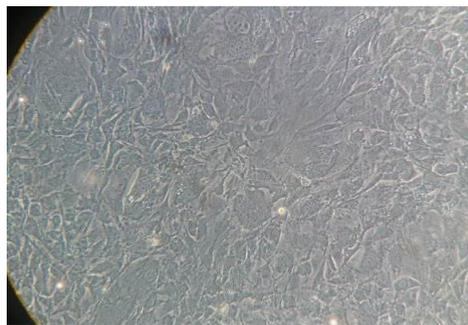
Para o modelo de adipogênese em cultura, utilizamos a linhagem celular de pré-adipócitos 3T3-L1 (119). As células 3T3-L1 tem morfologia de fibroblasto, e quando tratadas com isobutilmetilxantina (IBMX) (Sigma-Aldrich®), dexametasona (Sigma-Aldrich®) e altas concentrações de insulina (Sigma-Aldrich®) na presença de soro fetal bovino são diferenciadas em adipócitos (120). Neste estudo, as células 3T3-L1 foram plaqueadas em placas de 6 poços e após a confluência (D-2), trocou-se o meio com soro neonatal bovino (SNB) para meio SFB e foi mantido assim por 2 dias. No D0, foi adicionado o meio diferenciador contendo 0,5 nM de IBMX, 1 µg/mL de insulina e 1 µM de dexametasona também durante 2 dias, para rápida diferenciação e em seguida, no D2, mantidas somente com insulina e os tratamentos com DMSO 0,001% (veículo), rosiglitazona (RSG 10^{-5} M), GQ-16 (10^{-5} M), ou U0126 (10 µM) 30 minutos antes de RSG e GQ-16. No D4, as células foram coletadas para os experimentos de expressão gênica e *western blot* (Figura 6)



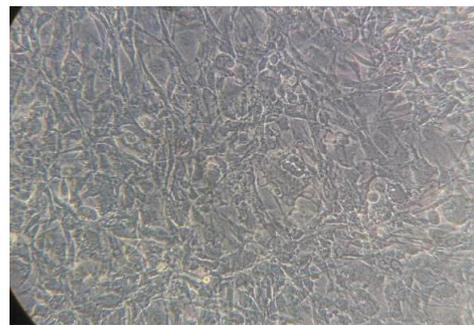
1) Não diferenciado



2) Veículo (DMSO 0,001%)

3) Rosiglitazona (10^{-5} M)4) GQ-16 (10^{-5} M)

5) U0126 + Rosiglitazona



6) U0126 + GQ-16

Figura 6. Ensaio de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1. Dois dias após confluência (D0), células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com 1 μ M de dexametasona, 0,5 mM de IBMX, e 10 μ g/mL de insulina por dois dias (D2), tratadas com 1 μ g/mL de insulina junto aos tratamentos por mais dois dias quando então foram colhidas (D4). 1) Células sem meio diferenciador; 2) Veículo (DMSO 0,001%); 3) Rosiglitazona (10^{-5} M); 4) GQ-16 (10^{-5} M); 5) U0126 (10uM) + Rosiglitazona; e 6) U0126 (10uM) + GQ-16. U0126 foi adicionado trinta minutos antes dos agonistas de PPAR γ rosiglitazona e GQ-16.

3.3 . TRATAMENTO DE MACRÓFAGOS MURINOS RAW 264,7

Após atingida a confluência, a cultura de macrófagos murinos RAW 264,7 foi plaqueada numa quantidade de 5×10^5 células/poço, em placa de 6 poços. Nos ensaios de expressão gênica, os macrófagos foram tratados por 6 e 24 horas com o veículo (DMSO 0,001%), RSG (10^{-5} M) e GQ-16 (10^{-5} M), na presença ou ausência do estímulo inflamatório com lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL) da *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma Aldrich), utilizando 2 modelos experimentais. No primeiro, foi feito um pré-tratamento por 1 hora com LPS em seguida adicionado os agonistas de PPAR γ . Em outro desenho experiemetal os macrófagos foram pré-tratados com o GQ-16 e a rosiglitazona por 1 hora e então adicionado o LPS. Quando a via da MEK1/2 foi inibida utilizando-se U0126 (10 μ M), o inibidor foi adicionado 30 minutos antes dos tratamentos. Para os experimentos de *western blot*, as células foram incubadas com os agonistas por 30 minutos e em seguida, adicionado o LPS por 15, 30 ou 60 minutos. O tempo de tratamento foi estipulado com base em ensaios realizados para padronização do experimento em que foi feito uma curva de tempo entre 5 a 60 minutos (121).

3.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCRq

3.4.1 Extração de RNA e tratamento com DNase

A extração do RNA de pré-adipócitos no início da diferenciação adipogênica e das células RAW 264.7 após os tratamentos foi feita utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante. Em suma, aspirou-se o meio de cultura das células os poços foram lavados 2 vezes com PBS e mantidas sobre o gelo. Acrescentou-se 1 mL de TRIzol® a cada poço da placa de 6 poços, seguido de homogeneização com a ponteira, afim de retirar todas as células do poço. Em seguida, a suspensão de células em TRIzol® foi transferida para tubos de 1,5 mL do tipo eppendorf® e mantidas acodicionadas em temperatura de -80 °C até o procedimento

de extração. Para a extração do RNA total, as suspensões de células foram descongeladas em gelo e posteriormente mantidas em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, para remoção de restos celulares, que se depositaram no fundo do tubo, como não formou pellet visível em todas as células, não foi aspirado o sobrenadante e adicionou-se 200 µL de clorofórmio (Sigma Aldrich®) e agitou-se em vortex e logo em seguida deixou-se descansar por 3 minutos em temperatura ambiente. Após este período houve outra centrifugação a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C, para a separação de fases.

Formaram 3 fases no tubo e a parte superior, que contém o RNA total, foi transferida para novos tubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 500 µL de isopropanol (J.T.Baker®) para precipitação do RNA. Os tubos foram mantidos durante 10 minutos em temperatura ambiente e então centrifugados a 14000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Nesta fase formou-se *pellet* visível, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* formado foi lavado com etanol (J.T.Baker®) a 75% (v/v) com temperatura entre 2 a 8 °C (temperatura de geladeira), novamente centrifugado a 9000 rpm por 5 minutos a 4°C. Os tubos foram vertidos em gaze estéril até a secagem e ressuspendido entre 10 a 30 µL de água milli-Q estéril tratada com 0,1% (v/v) de dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma Aldrich). A concentração de RNA e a pureza das amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences), com 1 µL das amostras. A quantificação foi realizada no comprimento de onda de 260 nm e expressa em µg/µL.

Para certificar de que não haveria possíveis contaminações por DNA genômico, o RNA total extraído foi tratado com 1 unidade/µL de DNase I (Sigma Aldrich), por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a enzima foi inativada adicionando-se um tampão de inativação contendo EDTA (50mM) e aquecimento a 70°C em termociclador, por 10 minutos, de acordo com as especificações do fabricante.

3.4.2 RT-PCRq

A avaliação da expressão gênica foi realizada por meio de PCR quantitativa em tempo real, utilizando o kit Power SYBR Green RNAto CT 1-Step (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Este método consiste em

fluoróforos que se intercalam na dupla fita de DNA que ao serem excitados pela luz, emitem fluorescência com intensidade proporcional à quantidade do produto de amplificação e representada por Ct (*cycle threshold* / ciclo limiar). Como controle interno, foi utilizada a expressão da gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase (GAPDH). A quantificação relativa dos RNA mensageiros foi feita por meio do método de comparação de Ct ou $\Delta\Delta Ct$, utilizando-se a fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (122).

Os reagentes foram adicionados em uma placa de 96 poços, específica para PCR em tempo real e colocada em um termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A programação do termociclador para a reação de amplificação foi (i) desnaturação inicial (10 minutos a 94°C); (ii) 40 ciclos de amplificação (desnaturação: 15 segundos, 94°C; anelamento e amplificação: 1 minuto, 60°C) e (iii) curva de desnaturação ou *melting* com o objetivo de avaliar a especificidade da reação de PCR.

Tabela 1- Sequência dos *primers* utilizados para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real.

Gene¹	Sequência do oligonucleotídeo (5'-3')
<i>Ap2</i>	Forward: 5'- ACACCGAGATTTCTTCAAAGT-3' Reverse: 5'-CCATCTAGGGTTATGATGCTCTTCA-3'
<i>Adpn</i>	Forward: 5'-GCACTGGCAAGTTCTACTGCAA-3' Reverse: 5'-GTCGGTGAAGAGAACGGCCTTGT-3'
<i>Glut4,</i>	Forward: 5'-TCATTGTCGGCATGGGTTT-3' Reverse: 5'-CGGCAAATAGAAGGAAGACGTA-3'
<i>Il6</i>	Forward: 5'-TAGTCCTCCCTACCCCAATTTCC-3' Reverse: 5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'
<i>Gapdh</i>	Forward: 5'-AAGGGCTCATGACCACAGTC-3' Reverse: 5'-CAGGGATGATGTTCTGGGCA-3'
<i>Tnfa</i>	Forward: 5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3' Reverse: 5-GCTACGACGTGGGCTACAG-3'

¹ Identificação do primer pelo gene correspondente F: primer forward; R: primer reverse.

3.5 ANÁLISE POR WESTERN BLOT

3.5.1 Lise celular

A cultura de células foi lavada com solução de PBS 1x (*phosphate-buffered saline* 1x) a 4°C e então adicionado tampão de lise gelado (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, glicerol 10%, TritonX-100 1%, MgCl₂ 1,5 mM, EGTA 1 mM, pH7,5) contendo inibidores de proteases (Sigma-Aldrich P8340) que foi diluído 100x e inibidores de fosfatases (Na₃VO₄ 2 Mm e Na₄P₂O₇ 10 mM). As células aderentes foram removidas com o auxílio de um raspador de células de plástico e, em seguida, transferidas para tubos cônicos de 1,5 mL com auxílio de seringa de 3 mL e agulha 25x7, seguido de repetidas homogeneizações, para completa lisa das células nos tubos. Cada tubo foi deixado em banho de gelo por 30 minutos e, posteriormente, as células foram centrifugadas a 12000 RPM por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado em freezer a -80°C e o *pellet* descartado e a determinação da concentração de proteínas foi realizada por método de Bradford.

3.5.2 Eletroforese e transferência de amostras

A mesma quantidade de proteína (20µg) foi desnaturada por aquecimento (95 a 100°C por 5 minutos) em tampão de amostra Laemmli contendo mercaptoetanol (Tris 150 mM, glicerol 20 %, BME 1%, SDS 4% e azul de bromofenol 0,001%). As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida 37,5:1) 10% e corridas em tampão (Tris 250 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%), a 100V, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos, a temperatura ambiente. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para a membrana de PVDF (poro de 0,45 µm, Immobilon P, Millipore) na presença do tampão (Tris 250 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) utilizando-se o aparelho de transferência (Trans-blot cell, Bio Rad Laboratories), a 24V, por 1 hora e 30 minutos, a temperatura ambiente.

3.5.3 Western Blott

As membranas foram 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), por 2 horas, a temperatura ambiente. Após esse período, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com o anticorpo primário. Como anticorpos primários foram utilizados o anticorpo que reconhece a forma total da ERK1/2 p44/42 (diluição 1:1000) ou o anticorpo policlonal de coelho contra a forma fosforilada da ERK1/2 que detecta níveis endógenos de p44 e p42 (Thr202/Tyr204) (diluição 1:1000) em tampão de bloqueio, por 16 horas, a 4°C, sob agitação. Após esse período, as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos com TBS-T e incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase diluído 1:4000 em solução de leite em pó desnatado a 1% em tampão TBS-T, por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes de 5 minutos com TBS-T. O produto final da reação foi revelado com o reagente ECL e quimioluminescência em fotodocumentador (Amersham Imager 600, GE).

3.5.4 Densitometria das bandas e análise estatística

O *software* usado para quantificação das bandas foi o ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA), disponível no sítio do *National Institute of Health* (NIH).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa GraphPad Prism 8. Os resultados serão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e comparados por ANOVA seguido pós-teste de Tukey. O critério de significância para todas as análises será o valor $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITOS DOS AGONISTAS DE PPAR γ EM CULTURA DE PRÉ-ADIPÓCITOS 3T3-L1 NO INÍCIO DA DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA

4.1.1 Efeito de agonistas de PPAR γ e da via MEK1/2 na expressão relativa do RNAm de genes adipogênicos

A figura 7 mostra a expressão relativa do RNAm do gene *Ap2* em cultura de pré-adipócitos 3T3-L1 após o tratamento com os agonistas total e parcial de PPAR γ rosiglitazona (RSG) e GQ-16, respectivamente, bem como o efeito do pré-tratamento com inibidor da via MEK1/2 U0126.

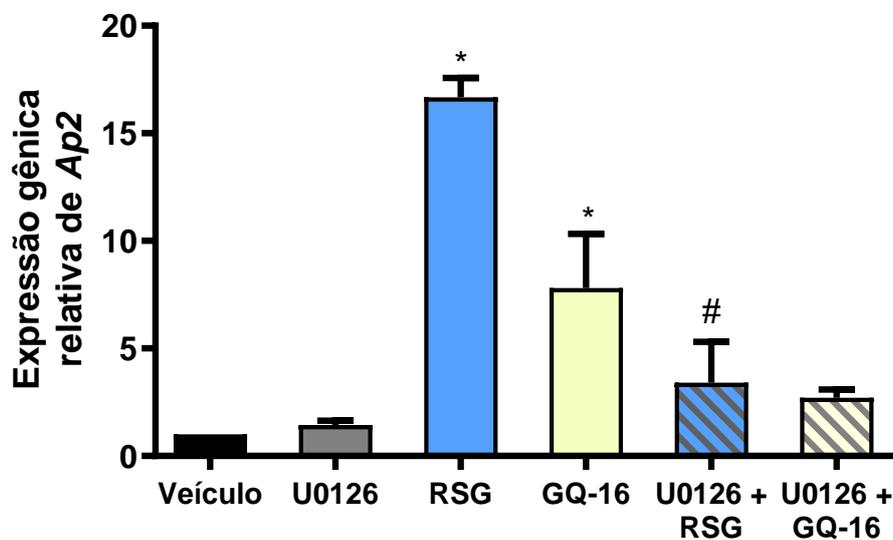


Figura 7 Efeito do inibidor da MEK1/2 e agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm do gene *Ap2* em pré-adipócitos 3T3-L1 no início da diferenciação adipogênica. Dois dias após sua confluência (D0), os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados com coquetel indutor de diferenciação por mais dois dias (D2). Após o início da diferenciação, as células foram tratadas em meio com insulina com inibidor da MEK1/2 (U0126, 10 μ M) por 30 minutos e então com veículo (DMSO 0,001%), rosiglitazona (RSG, 10⁻⁵M), GQ-16 (10⁻⁵M) por mais 48 horas. Passadas as 48 horas (D4), as células foram colhidas para extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do gene *Ap2* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente (n=6), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey. * p < 0,05 vs veículo; # p < 0,05 vs RSG.

Observamos que, ainda no início da diferenciação, a rosiglitazona aumentou significativamente a expressão gênica do *Ap2*. O GQ-16 também estimulou a expressão, porém de forma mais discreta. Quando adicionado o inibidor da MEK1/2 houve diminuição considerável da expressão do gene pela rosiglitazona. A diminuição do efeito estimulatório do GQ-16 pelo U0126 não foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Assim, estes resultados sugerem que este efeito do agonista total de PPAR γ sobre a expressão do gene *Ap2* é mediado pela ERK.

Quando analisado o gene adipogênico adiponectina (*Adpn*), observou-se que a RSG estimulou significativamente a expressão relativa do RNAm deste gene, a via da MEK1/2 mostrou-se envolvida nesse efeito. O GQ-16 também estimulou a expressão relativa do RNAm do mesmo gene, porém em menor grau em relação à RSG. Ainda, a inibição da MEK1/2 não alterou o efeito do agonista parcial (figura 8).

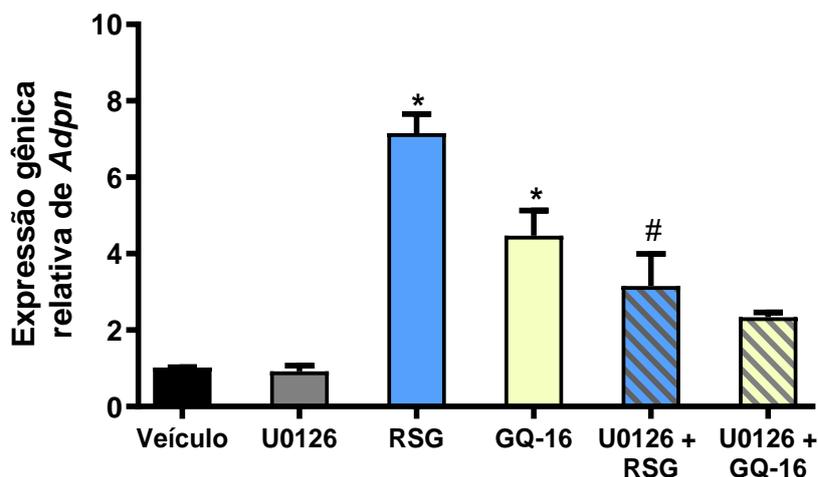


Figura 8 Efeito do inibidor da MEK1/2 e agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm do gene adiponectina (*Adpn*) em pré-adipócitos 3T3-L1 no início da diferenciação adipogênica. Dois dias após sua confluência (D0), os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados com coquetel indutor de diferenciação por mais dois dias (D2). Após o início da diferenciação, as células foram tratadas em meio com insulina com inibidor da MEK1/2 (U0126, 10 μ M) por 30 minutos e então com veículo (DMSO 0,001%), rosiglitazona (RSG, 10⁻⁵M), GQ-16 (10⁻⁵M) por mais 48 horas. Passadas as 48 horas (D4), as células foram colhidas para extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do gene *Adpn* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente (n=6), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey. * $p < 0,05$ vs veículo; # $p < 0,05$ vs RSG.

A figura 9 mostra o efeito dos agonistas de PPAR γ sobre a expressão relativa do RNAm do gene adipogênico *Glut4*, também em pré-adipócitos, na presença de rosiglitazona e GQ-16, e como observado nos genes adipogênicos apresentados anteriormente, a rosiglitazona aumentou a expressão gênica do *Glut4*. O GQ-16 não

teve efeito. Na presença do U0126, o efeito da rosiglitazona sobre a expressão gênica diminui pela metade enquanto no GQ-16 não houve alteração.

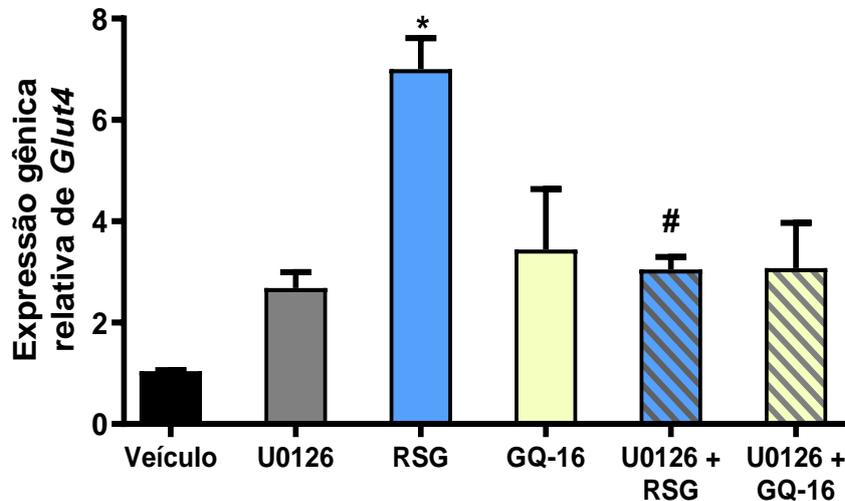


Figura 9. Efeito do inibidor da MEK1/2 e agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm do gene *Glut4*, em pré-adipócitos 3T3-L1 no início da diferenciação adipogênica. Dois dias após sua confluência (D0), os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados com coquetel indutor de diferenciação por mais dois dias (D2). Após o início da diferenciação, as células foram tratadas em meio com insulina com inibidor da MEK1/2 (U0126, 10 μ M) por 30 minutos e então com veículo (DMSO 0,001%), rosiglitazona (RSG, 10⁻⁵M), GQ-16 (10⁻⁵M) por mais 48 horas. Passadas as 48 horas (D4), as células foram colhidas para extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do gene *Glut4*, foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente (n=6), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey. * p < 0,05 vs veículo; # p < 0,05 vs RSG.

Esses resultados mostram que a RSG tem efeito adipogênico no início da diferenciação de pré-adipócitos e esse efeito é pelo menos, em parte, devido a ativação da via da MAPK. O GQ-16, embora também tenha apresentado efeito adipogênico, foi menor quando comparado ao efeito da RSG e sugerindo não envolver essa via de sinalização.

4.1.2 Efeito de agonistas de PPAR γ e da via MEK1/2 na expressão relativa do RNAm de genes inflamatórios

A secreção de citocinas inflamatórias pelo tecido adiposo pode ser mediada tanto pelos macrófagos que são recrutados, quanto pelos próprios adipócitos (3,18).

Por isso, nesse estudo também se verificou a expressão relativa do RNAm de genes inflamatórios em adipócitos.

Os agonistas de PPAR γ , tanto rosiglitazona quanto GQ-16, diminuíram significativamente a expressão relativa do RNAm da *IL6* quando comparado ao veículo, demonstrando um efeito anti-inflamatório em células comprometidas com a adipogênese. Esse efeito não foi alterado pela adição de U0126, significativamente (Figura 11).

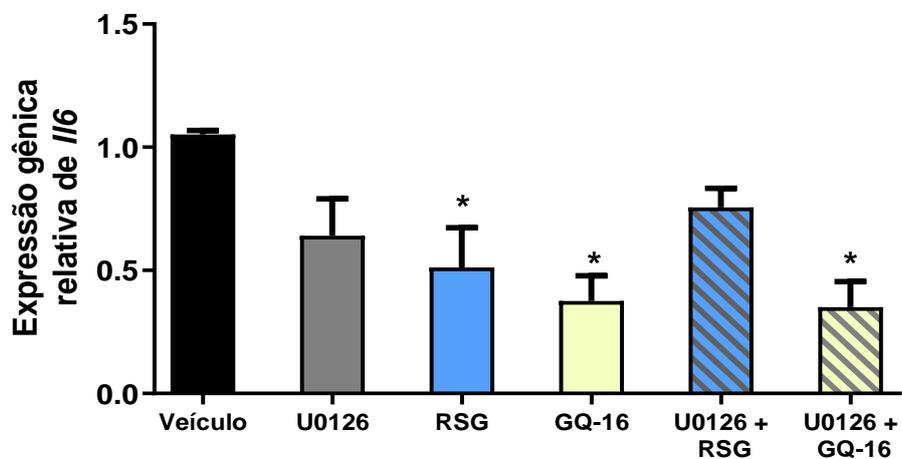


Figura 10. Efeito do inibidor da MEK1/2 e agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm do gene *IL6* em pré-adipócitos 3T3-L1 no início da diferenciação adipogênica. Dois dias após sua confluência (D0), os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados com coquetel indutor de diferenciação por mais dois dias (D2). Após o início da diferenciação, as células foram tratadas em meio com insulina com inibidor da MEK1/2 (U0126, 10 μ M) por 30 minutos e então com veículo (DMSO 0,001%), rosiglitazona (RSG, 10⁻⁵M), GQ-16 (10⁻⁵M) por mais 48 horas. Passadas as 48 horas (D4), as células foram colhidas para extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do gene *IL6* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente (n=6), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tu key. * p < 0,05 vs veículo.

Já a expressão relativa do RNAm do gene *Tnfa* não foi alterada por nenhum tratamento no início da diferenciação adipogênica (Figura 12).

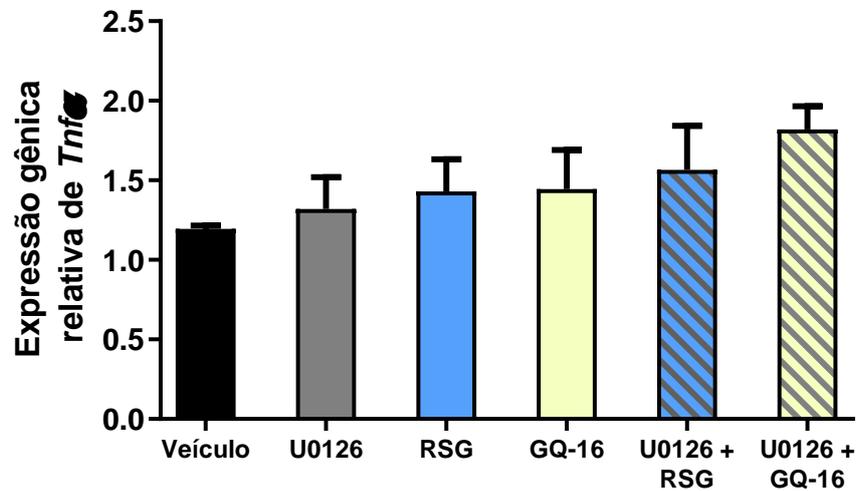


Figura 11. Efeito do inibidor da MEK1/2 e agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm do gene *Tnfa* em pré-adipócitos 3T3-L1 no início da diferenciação adipogênica. Dois dias após sua confluência (D0), os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados com coquetel indutor de diferenciação por mais dois dias (D2). Após o início da diferenciação, as células foram tratadas em meio com insulina com inibidor da MEK1/2 (U0126, 10 μ M) por 30 minutos e então com veículo (DMSO 0,001%), rosiglitazona (RSG, 10⁻⁵M), GQ-16 (10⁻⁵M) por mais 48 horas. Passadas as 48 horas (D4), as células foram colhidas para extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do gene *Tnfa* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente (n=6), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey.

4.1.3 Efeito de agonistas de PPAR γ sobre a fosforilação da ERK1/2

Foi possível observar que o tratamento com o agonista total (RSG) e o agonista parcial (GQ-16) de PPAR γ não alterou a fosforilação da ERK1/2, como pode ser visto na figura 12 no início da diferenciação adipogênica. O inibidor da MEK1/2, U0126, como já era esperado, diminuiu significativamente a fosforilação da ERK1/2 quando comparado ao controle. O mesmo foi observado quando as células foram tratadas com os agonistas de PPAR γ na presença do U0126, principalmente na presença do agonista parcial.

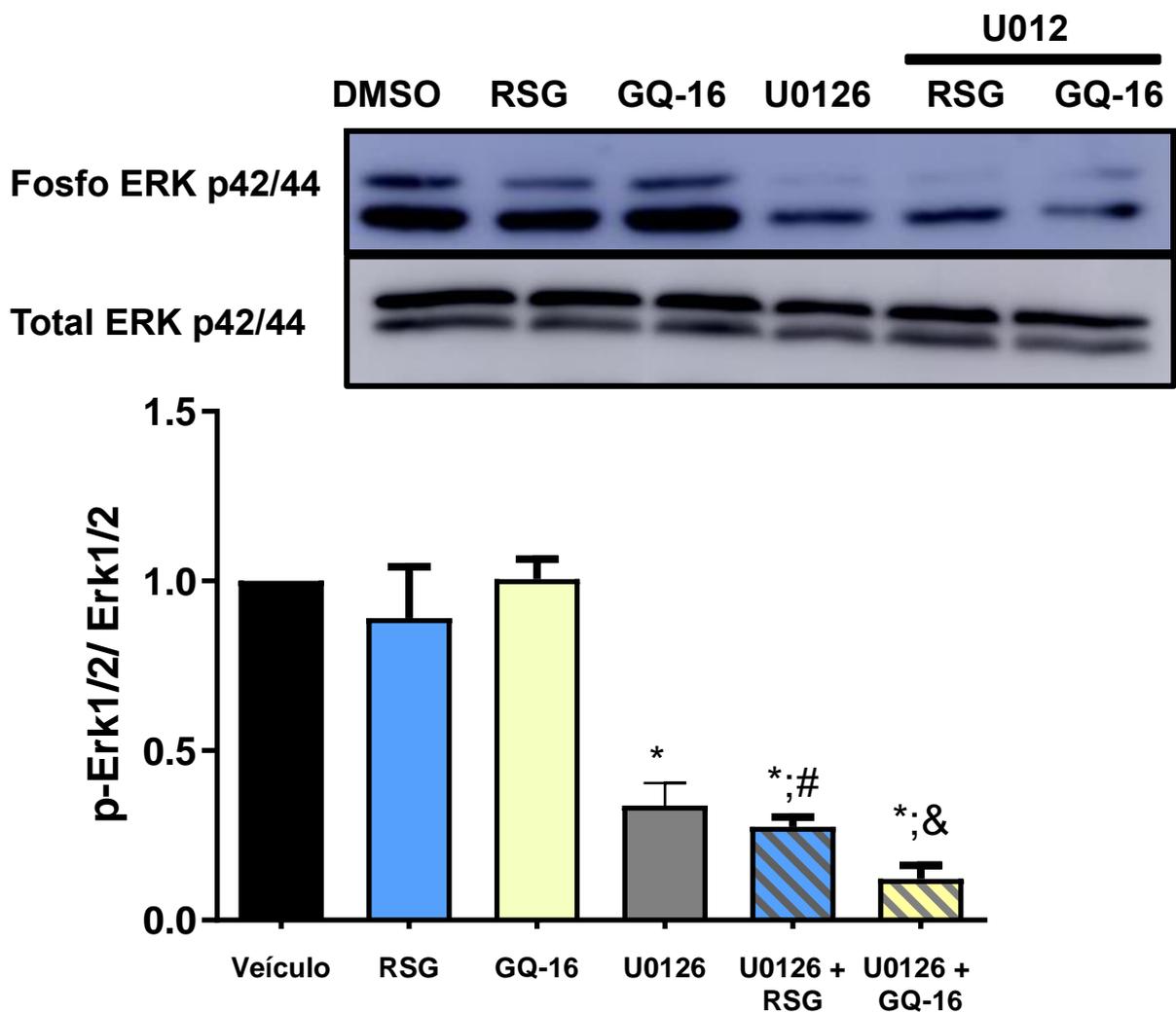


Figura 12. Efeitos da Rosiglitazona e do GQ-16 na fosforilação da ERK1/2 em pré-adipócitos murinos 3T3-L1 no início da diferenciação adipogênica. Dois dias após sua confluência (D0), os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados com coquetel indutor de diferenciação por mais dois dias (D2). Após o início da diferenciação, as células foram tratadas em meio com insulina com inibidor da MEK1/2 (U0126, 10 μ M) por 30 minutos e então com veículo (DMSO 0,001%), rosiglitazona (10⁻⁵M), GQ-16 (10⁻⁵M) por mais 48 horas. Passadas as 48 horas (D4), as células foram colhidas e a proteína ERK1/2 foi detectada por Western blot. O imunoensaio foi realizado com os anticorpos anti-fosfo ERK1/2 (forma fosforilada da ERK1/2) (autoradiograma representativo, painel superior) ou anti-ERK1/2 (forma total da ERK1/2) (autoradiograma representativo, painel inferior). Análise densitométrica foi realizada dos

resultados obtidos dos autoradiogramas, normalizados pela expressão da ERK1/2 total e expressos em relação ao controle. Dados de experimentos realizados de forma independente (n=5), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey. * p < 0,05 vs veículo; # p < 0,05 vs rosiglitazona; & p < 0,05 vs GQ-16.

Os resultados da expressão gênica demonstram que o agonista completo de PPAR γ RSG tem efeito adipogênico mesmo no início da diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 e esse efeito é, pelo menos em parte, devido a ativação da via da MAPK. O agonista parcial GQ-16 também apresentou efeito adipogênico, no entanto, esse efeito foi menor ao do agonista total RSG, e parece não envolver essa via de sinalização. Além disso, ambos agonistas apresentaram efeito anti-inflamatório em pré-adipócitos no início da diferenciação.

4.2 EFEITOS DOS AGONISTAS DE PPAR γ EM CULTURA DE MACRÓFAGOS RAW 264.7

Neste estudo buscou-se avaliar o efeito do agonista parcial do PPAR γ , GQ-16 na expressão das citocinas pró-inflamatórias *Tnf- α* e *Il6*. Além disso, estudou-se o envolvimento da via MEK/ERK na expressão dessas citocinas. As culturas de células utilizadas para verificar a expressão relativa do RNAm de genes pró-inflamatórios foram estimuladas com LPS na concentração 100 ng/mL baseada em estudos prévios com o intuito de simular o estado inflamatório de um paciente obeso (123,124). Já os experimentos que analisaram a fosforilação da ERK1/2, os agonistas de PPAR γ foram adicionados antes do estímulo inflamatório para verificar se tais agonistas conseguiriam inibir o estímulo do LPS.

4.2.1 Efeito de agonistas de PPAR γ e na expressão relativa do RNAm de genes inflamatórios

A expressão do RNAm do gene *Il6* foi analisada em 6 e 24 horas de tratamentos. Seguiu-se 2 modelos de tratamento: 1) com os agonistas total e parcial de PPAR γ , previamente estimuladas com LPS por 1 hora ou; 2) pré-tratadas com os agonistas de PPAR γ po 1 h e posteriormente adicionado o LPS.

A expressão relativa do RNAm do gene da *IL6* após 6 horas de tratamento com agonistas de PPAR γ mostrou que não houve alteração na expressão do referido gene por parte dos agonistas de PPAR γ sozinhos, como observado na figura 13. Como esperado o LPS aumentou em cerca de 200 vezes a expressão relativa do RNAm do *IL6* em relação ao controle.

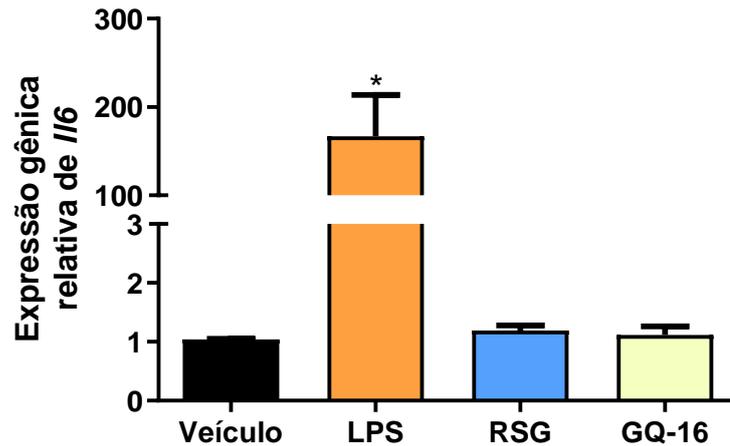


Figura 13. Efeito dos agonistas de PPAR γ sobre a expressão relativa do RNAm do gene *IL6* induzida por LPS em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com o veículo (DMSO 0,001%), rosiglitazona (RSG, 10^{-5} M), GQ-16 (10^{-5} M) ou LPS (100 ng/mL). Após 6 horas as células foram colhidas para extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do gene *IL6* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente ($n=5$), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey. * $p < 0,05$ vs veículo.

Quando analisado o efeito dos agonistas sobre o prévio estímulo inflamatório do LPS a rosiglitazona não teve ação e o GQ-16 aumentou de maneira significativa a expressão do gene inflamatório, o que não era esperado (figura 14).

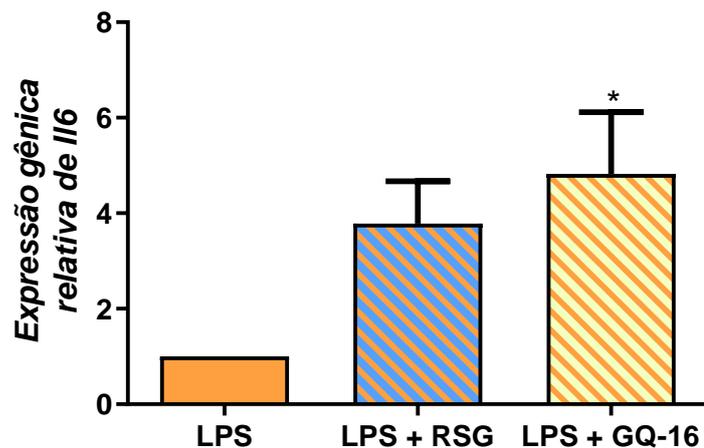


Figura 14. Efeito dos agonistas de PPAR γ sobre a expressão relativa do RNAm do gene *IL6* induzida por LPS em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com LPS (100 ng/mL) e após uma hora foi adicionado rosiglitazona (RSG, 10^{-5} M) ou GQ-16 (10^{-5} M). Após 6 horas as células foram colhidas para extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do gene *IL6* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente (n=5), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey. * $p < 0,05$ vs LPS.

O pré-tratamento dos macrófagos com rosiglitazona ou GQ-16 por 1 hora e em seguida, a estimulação inflamatória com LPS, não alterou significativamente a expressão relativa do RNAm do *IL6* (figura 15) comparando-se ao LPS.

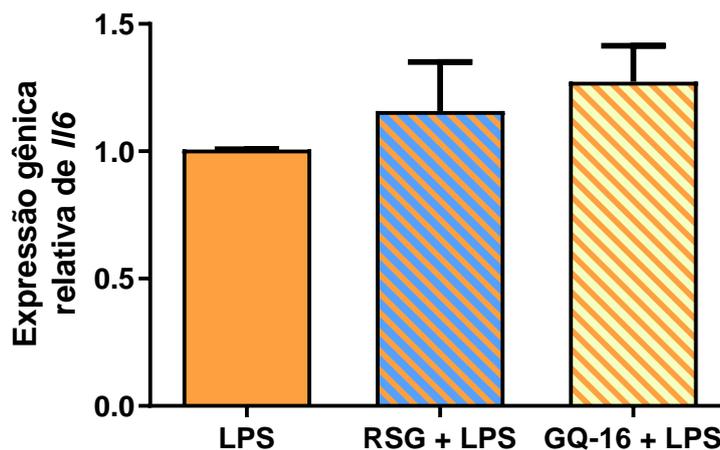


Figura 15. Efeito dos agonistas de PPAR γ sobre a expressão relativa do RNAm do gene *IL6* induzida por LPS em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com rosiglitazona (RSG, 10^{-5} M) ou GQ-16 (10^{-5} M) e após uma hora foi adicionado LPS (100 ng/mL). Após 6 horas as células foram colhidas para extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do gene *IL6* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente (n=4), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey.

Aumentando o tempo de tratamento para 24 horas, rosiglitazona e GQ-16 sozinhos continuaram não apresentando efeito sobre a expressão relativa do RNAm de *I/6* quando comparado ao veículo (figura 16). O LPS aumentou aproximadamente 700 vezes a expressão deste gene inflamatório.

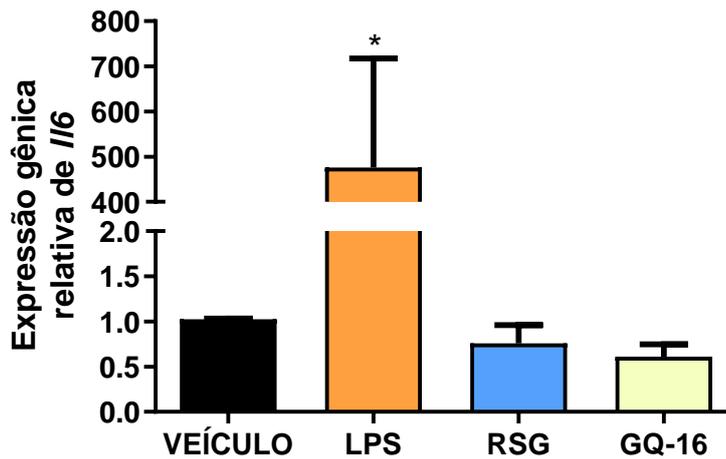


Figura 16. Efeito dos agonistas de PPAR γ e LPS na expressão relativa do RNAm do gene *I/6* em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com o veículo (DMSO, 0,001%), rosiglitazona (RSG, 10^{-5} M), GQ-16 (10^{-5} M) ou LPS (100 ng/mL) por 24 horas. Em seguida as células foram colhidas para extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do gene *I/6* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente (n=4), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey. * $p < 0,05$ vs veículo.

A rosiglitazona reduziu o efeito do estímulo inflamatório do LPS na linhagem de macrófagos RAW 264.7, pré-tratadas com LPS por 1 hora e mantidas com os agonistas por 24 horas de tratamento, porém GQ-16 não teve ação, como demonstrado na figura 17.

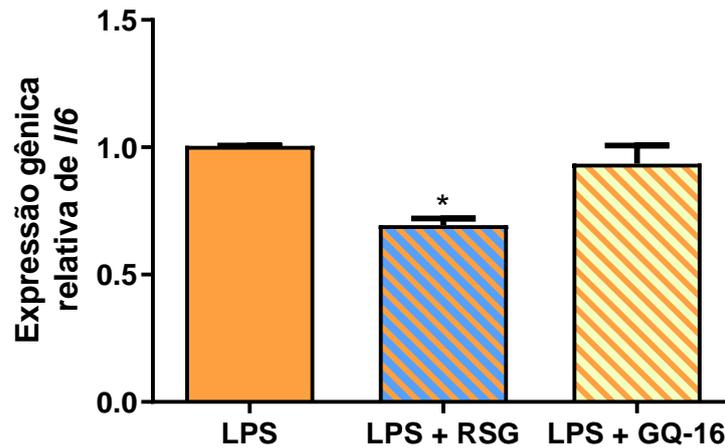


Figura 17. Efeito dos agonistas de PPAR γ sobre a expressão relativa do RNAm do gene *IL6* induzida por LPS em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com LPS (100 ng/mL) e após uma hora foi adicionado rosiglitazona (RSG, 10^{-5} M) ou GQ-16 (10^{-5} M). Após 24 horas as células foram colhidas para extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do gene *IL6* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente (n=4), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey. * $p < 0,05$ vs LPS.

Quando adicionados previamente os agonistas total e parcial não foi observado efeito sobre a estimulação com LPS no gene *IL6*, como observado na figura 18.

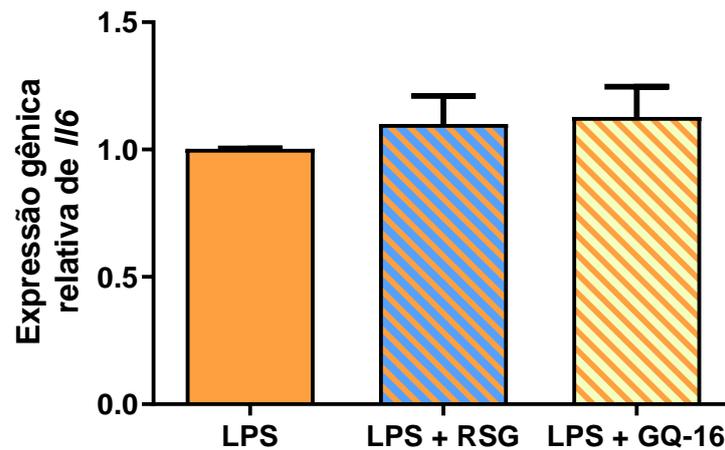


Figura 18 Efeito dos agonistas de PPAR γ sobre a expressão relativa do RNAm do gene *IL6* induzida por LPS em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com rosiglitazona (RSG, 10^{-5} M) ou GQ-16 (10^{-5} M) e após uma hora foi adicionado LPS (100 ng/mL). Após 24 horas as células foram colhidas para extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do gene *IL6* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente (n=5), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey. $p < 0,05$.

Com base nestes resultados obtidos dos diferentes tempos de tratamento, chegou-se a conclusão de que o tempo de 24 horas e a prévia exposição das células RAW 264.7 ao LPS seria o melhor protocolo para dar seguimento aos experimentos subsequentes. Assim, os tratamentos com rosiglitazona e GQ-16 sozinhos, após 24 h, não tiveram efeito na expressão relativa do RNAm do *Tnfa* e o tratamento com LPS aumentou a expressão deste gene, como esperado (Figura 19).

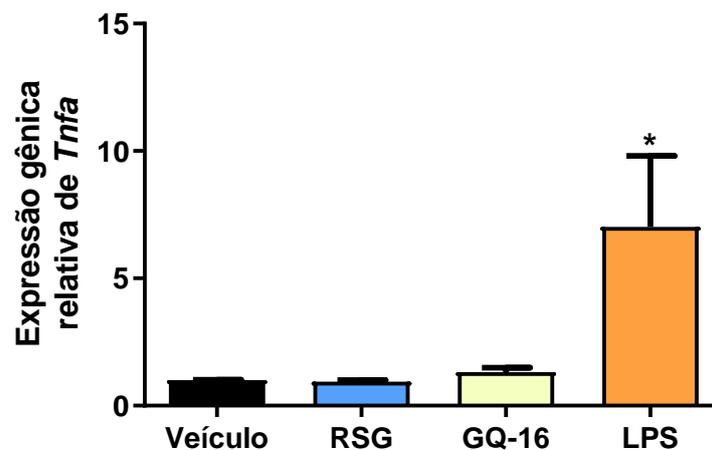


Figura 19 Efeito dos agonistas de PPAR γ e LPS na expressão relativa do RNAm do gene *Tnfa* em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com o veículo (DMSO, 0,001%), rosiglitazona (RSG, 10^{-5} M), GQ-16 (10^{-5} M) ou LPS (100

ng/mL) por 24 horas. Em seguida as células foram colhidas para extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do gene *Tnfa* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente (n=6), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey. * $p < 0,05$ vs veículo.

A figura 20 mostra o efeito de agonistas de PPAR γ sobre a expressão do referido gene estimulada por LPS por 1 hora, antes dos agonistas de PPAR γ , somente a rosiglitazona diminuiu a expressão relativa do RNAm do gene inflamatório, sugerindo um efeito anti-inflamatório em macrófago ativado.

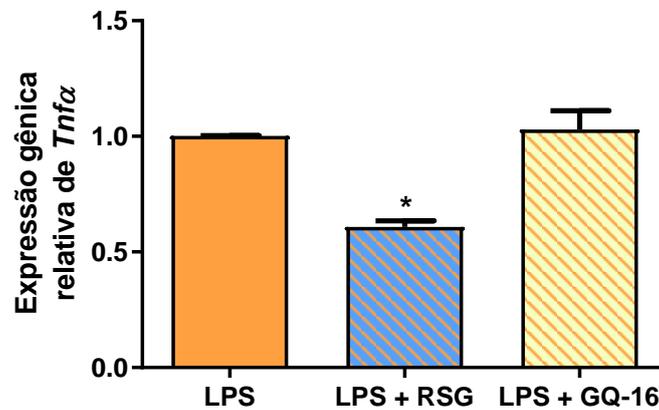


Figura 20. Efeito dos agonistas de PPAR γ sobre a expressão relativa do RNAm do gene *Tnfa* induzida por LPS em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com LPS (100 ng/mL) e após uma hora foi adicionado rosiglitazona (RSG, 10^{-5} M) ou GQ-16 (10^{-5} M). Após 24 horas as células foram colhidas para extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do gene *Tnfa* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente (n=6), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey. * $p < 0,05$ vs LPS.

4.2.2 Efeito da via MEK1/2 na expressão relativa do RNAm de genes inflamatórios em macrófagos tratados com agonistas de PPAR γ

A inibição da MEK1/2 não alterou significativamente a expressão relativa do RNAm do gene *Il6* (Figura 23).

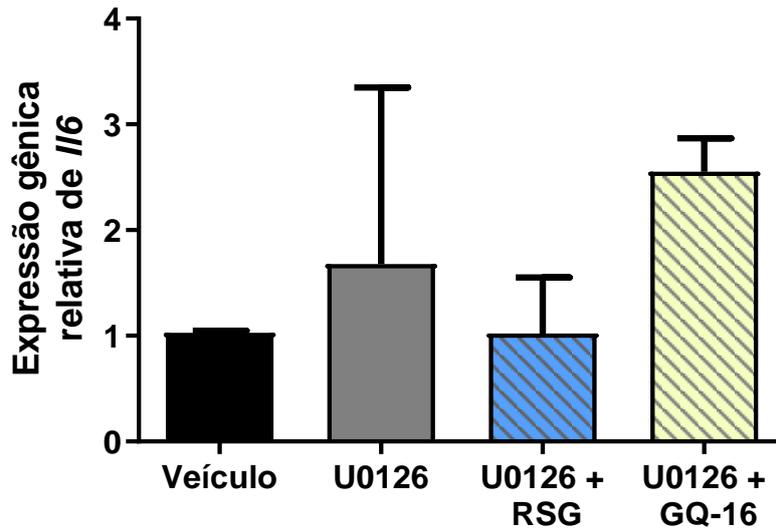


Figura 21. Efeito de agonistas de PPAR γ sobre a expressão relativa do RNAm do gene *Il6* alterada por inibidor da MEK1/2 em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com veículo (DMSO 0,001%), U0126 (10 μ M) e após 30 minutos foi ou não adicionado rosiglitazona (RSG 10⁻⁵M) ou GQ-16 (10⁻⁵M). Após 24 horas as células foram colhidas para extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do gene *Il6* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente (n=6), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey.

No entanto, na presença do estímulo inflamatório LPS, a inibição da via da ERK aumentou a expressão relativa do RNAm de *Il6* quando comparada ao estímulo inflamatório sozinho (Figura 24).

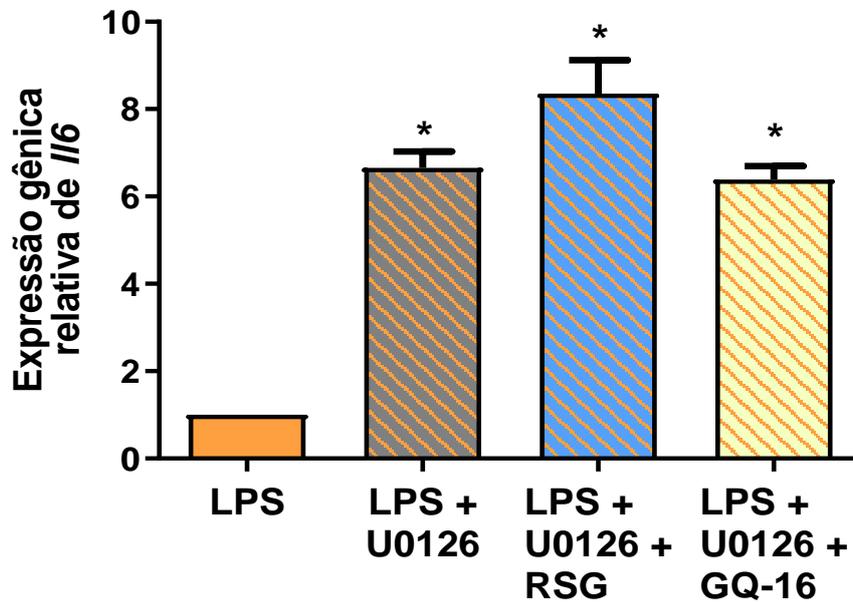


Figura 22. Efeito de agonistas de PPAR γ e inibidor da MEK1/2 na expressão relativa do RNAm do gene *Il6* estimulada por LPS em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com inibidor da MEK1/2 (U0126 10 μ M) por 30 minutos e então adicionado o LPS (100 ng/mL) 1 hora antes da adição dos agonistas de PPAR γ (rosiglitazona, RSG, e GQ-16, 10⁻⁵M). Após 24 horas as células foram colhidas para extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do gene *Il6* foi analisado por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente (n=6), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey. * p < 0,05 vs LPS.

Verificou-se também o envolvimento da via MEK1/2 na expressão gênica relativa do RNAm do gene *Tnfa*. A inibição da MEK1/2, através do uso do inibidor U0126, diminuiu a expressão relativa do RNAm do gene *Tnfa*. Esse efeito do U0126 não foi alterado pela adição de agonistas de PPAR γ (Figura 21).

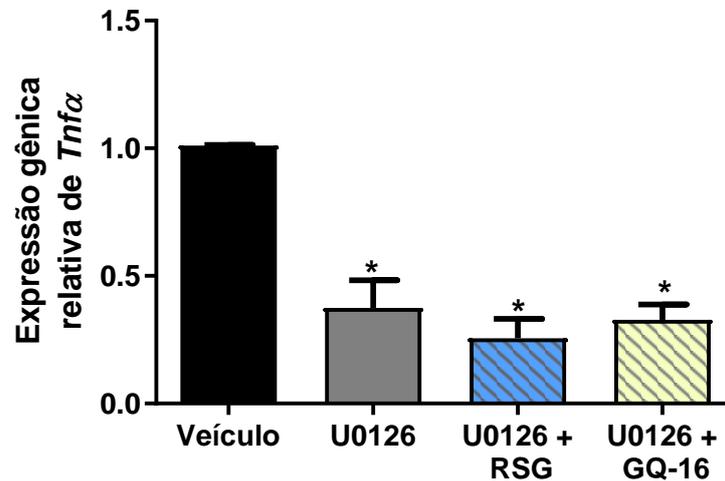


Figura 23. Efeito de agonistas de PPAR γ sobre a expressão relativa do RNAm do gene *Tnfa* alterada por inibidor da MEK1/2 em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. Efeito de agonistas de PPAR γ sobre a expressão relativa do RNAm do gene *Tnfa* alterada por inibidor da MEK1/2 em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com veículo (DMSO 0,001%), U0126 (10 μ M) e após 30 minutos foi ou não adicionado rosiglitazona (RSG, 10⁻⁵M) ou GQ-16 (10⁻⁵M). Após 24 horas as células foram colhidas para extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do gene *Tnfa* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente (n=6), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey. * p < 0,05 vs veículo.

Não houve alteração do efeito estimulatório do LPS na expressão relativa do mRNA do *Tnfa* quando houve a inibição da MEK1/2 (Figura 22), mesmo com o tratamento de agonistas de PPAR γ .

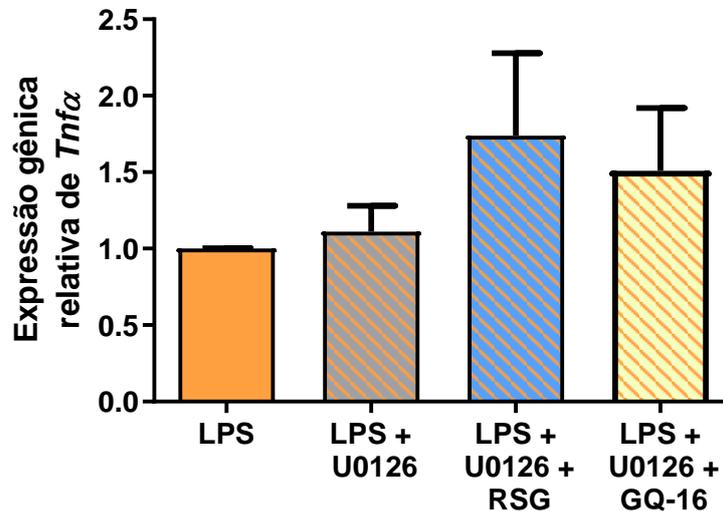


Figura 24. Efeito de agonistas de PPAR γ e inibidor da MEK1/2 na expressão relativa do RNAm do gene *Tnfa* estimulada por LPS em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com inibidor da MEK1/2 (U0126 10 μ M) por 30 minutos e então adicionado o LPS (100 ng/mL) 1 hora antes da adição dos agonistas de PPAR γ (rosiglitazona, RSG, e GQ-16, 10⁻⁵M). Após 24 horas as células foram colhidas para extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do gene *Tnf- α* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente (n=6), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey. $p < 0,05$.

Esses resultados sugerem que a via da MAPK está envolvida na regulação da expressão relativa do RNAm do gene *Tnfa* em macrófagos RAW 264,7 na ausência de estímulo inflamatório. Tal envolvimento não foi observado na presença do LPS. Ainda, embora o agonista total de PPAR γ RSG tenha efeito anti-inflamatório por diminuir a expressão do referido gene, a via da ERK não se mostrou envolvida.

4.2.3 Efeito de agonistas de PPAR γ sobre a fosforilação da ERK1/2

A figura 25 mostra o efeito dos agonistas de PPAR γ , RSG e GQ-16, e de 15 minutos de tratamento com LPS na fosforilação da ERK1/2 em cultura de macrófagos RAW 264.7. Observou-se que nem o agonista total nem o agonista parcial, em 30 minutos de tratamento, tiveram efeito sobre a fosforilação da ERK1/2. Já o estímulo inflamatório LPS aumentou a fosforilação da ERK1/2 em 15 minutos de tratamento em cerca de 3 vezes mais quando comparado ao veículo (Figura 25A). Para investigar se seria possível bloquear o efeito do LPS sobre a fosforilação da ERK, a cultura de macrófagos RAW 264.7 foi pré-tratada com agonistas de PPAR γ e então adicionado o LPS por 15 minutos. Ambos agonistas apresentaram efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na redução do efeito do LPS sobre a fosforilação da ERK (Figura 25B).

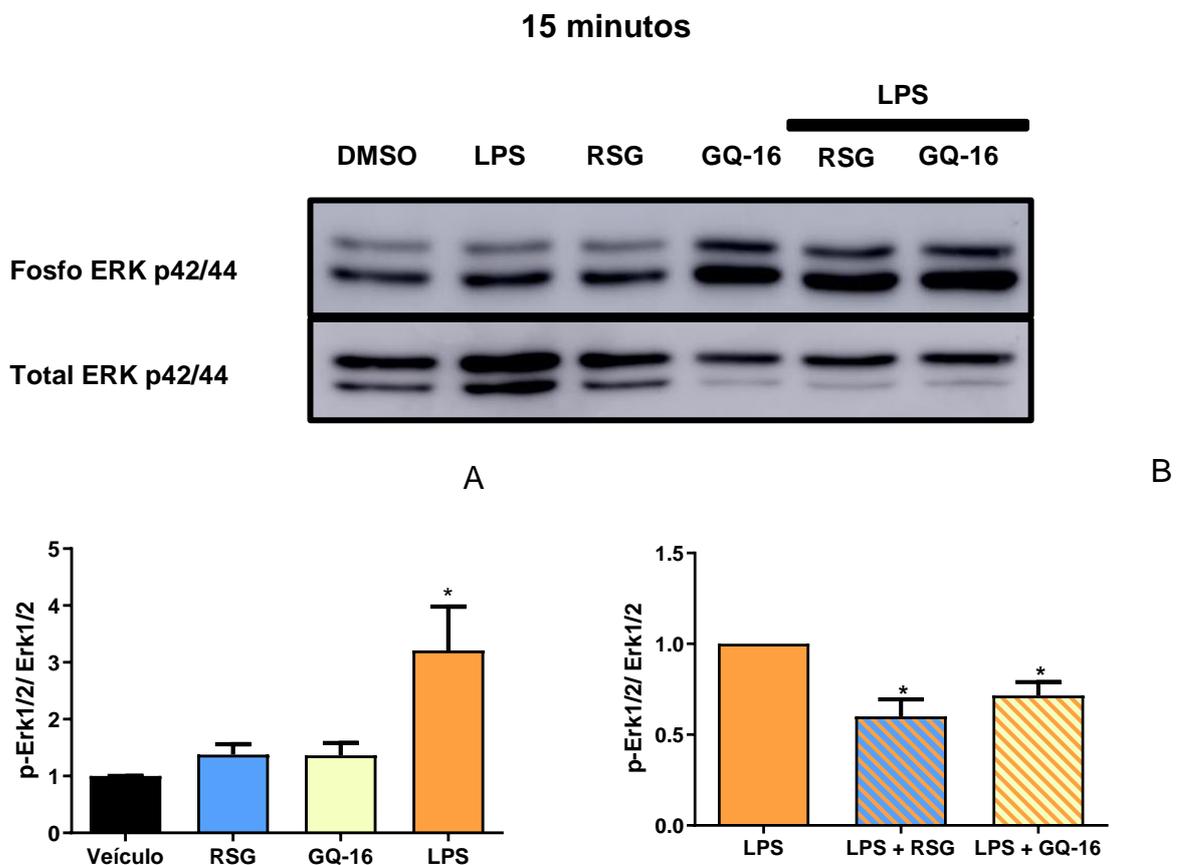


Figura 25 Efeitos de agonistas de PPAR γ e 15 minutos de tratamento com LPS na fosforilação da ERK1/2 em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. A) Linhagem de

macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com o veículo (DMSO 0,001%), rosiglitazona (RSG, 10^{-5} M), GQ-16 (10^{-5} M) por 30 minutos ou LPS (100 ng/mL) por 15 minutos. B) Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com rosiglitazona (RSG, 10^{-5} M) ou GQ-16 (10^{-5} M) por 30 minutos e então o LPS (100 ng/mL) adicionado por mais 15 minutos. Em seguida, as células foram colhidas e a proteína ERK1//2 foi detectada por Western blot. O imunoenensaio foi realizado com os anticorpos anti-fosfo ERK1/2 (forma fosforilada da ERK1/2) (autoradiograma representativo, painel superior) ou anti-ERK1/2 (forma total da ERK1/2) (autoradiograma representativo, painel inferior). Análise densitométrica foi realizada dos resultados obtidos dos autoradiogramas, normalizados pela expressão da ERK1/2 total e expressos em relação ao controle. Dados de experimentos realizados de forma independente (n=9), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey. * $p < 0,05$ vs veículo.

O tratamento por 30 minutos com LPS também apresentou efeito estimulatório sobre a fosforilação da ERK1/2 em macrófagos RAW 264.7 (Figura 26A). Entretanto, o pré-tratamento com os agonistas de PPAR γ não teve efeito sobre o estímulo LPS (Figura 26B).

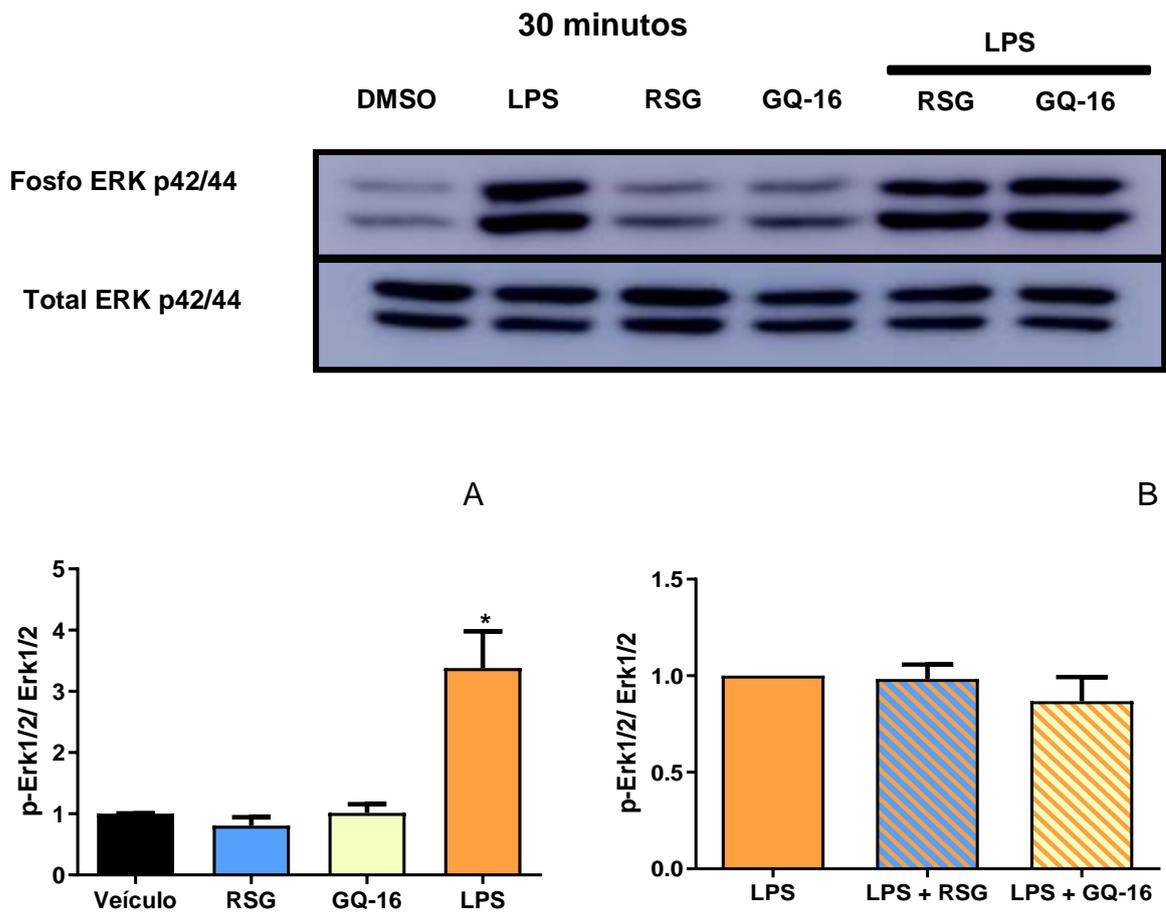


Figura 26 Efeitos de agonistas de PPAR γ e 30 minutos de tratamento com LPS na fosforilação da ERK1/2 em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. A) Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com o veículo (DMSO 0,001%), rosiglitazona (RSG, 10⁻⁵M), GQ-16 (10⁻⁵M) por 30 minutos ou LPS (100 ng/mL) por 30 minutos. B) Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com rosiglitazona (RSG, 10⁻⁵M) ou GQ-16 (10⁻⁵M) por 30 minutos e então o LPS (100 ng/mL) adicionado por mais 30 minutos. Em seguida, as células foram colhidas e a proteína ERK1/2 foi detectada por Western blot. O imunoenensaio foi realizado com os anticorpos anti-fosfo ERK1/2 (forma fosforilada da ERK1/2) (autoradiograma representativo, painel superior) ou anti-ERK1/2 (forma total da ERK1/2) (autoradiograma representativo, painel inferior). Análise densitométrica foi realizada dos resultados obtidos dos autoradiogramas, normalizados pela expressão da ERK1/2 total e expressos em relação ao controle. Dados de experimentos realizados de forma independente (n=4), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey. * p < 0,05 vs veículo.

Uma hora de tratamento com LPS mostrou efeito estimulatório sobre a fosforilação da ERK1/2 (Figura 27A). O agonista total de PPAR γ diminuiu o efeito estimulatório do LPS de maneira significativa. O GQ-16 no entanto, não mostrou efeito (Figura 27B).

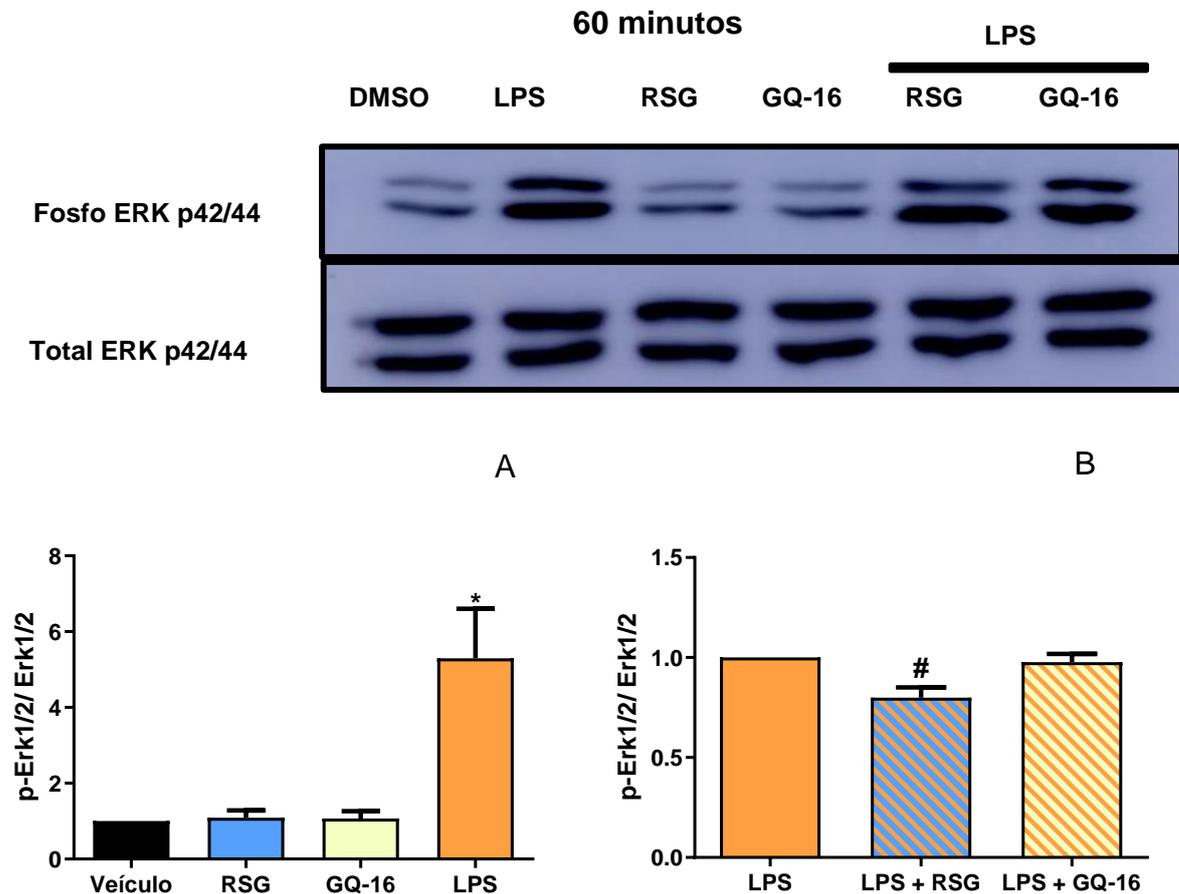


Figura 27 Efeitos de agonistas de PPAR γ e 60 minutos de tratamento com LPS na fosforilação da ERK1/2 em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. A) Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram tratados com o veículo (DMSO 0,001%), rosiglitazona (RSG, 10-5M), GQ-16 (10-5M) por 30 minutos ou LPS (100 ng/mL) por 1 hora. Em seguida, as células foram colhidas e a proteína ERK1/2 foi detectada por Western blot. O imunoenensaio foi realizado com os anticorpos anti-fosfo ERK1/2 (forma fosforilada da ERK1/2) (autoradiograma representativo, painel superior) ou anti-ERK1/2 (forma total da ERK1/2) (autoradiograma representativo, painel inferior). Análise densitométrica foi realizada dos resultados obtidos dos autoradiogramas, normalizados pela expressão da ERK1/2 total e expressos em relação ao controle. Dados de experimentos realizados de forma independente (n=4), expressos como média da expressão relativa \pm EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey. * p < 0,05 vs veículo; # p < 0,05 vs LPS.

5 DISCUSSÃO

Obesidade é um fator de risco significativo para doenças metabólicas dentre elas DM tipo 2 (1,3). Entre os alvos farmacológicos utilizados na terapêutica do DM tipo 2, estão os agonistas de PPAR γ (94). Este receptor está implicado em várias funções no organismo dentre as quais o metabolismo de glicose e adipogênese (40,42).

Os efeitos benéficos de agonistas de PPAR γ , como as TZDs, sobre a sensibilidade insulínica e homeostase da glicose são bem documentados em modelos animais de obesidade e resistência insulínica, e também em humanos (95–97). No entanto, os efeitos benéficos dos agonistas totais do PPAR γ são acompanhados de uma série de efeitos desfavoráveis como retenção hídrica e adipogênese (98). Esses efeitos adversos são associados ao agonismo total do PPAR γ (110).

Estudos recentes evidenciam que a ativação parcial e específica do PPAR γ (125,126) e sua modulação diferencial em tecidos distintos (127) pode ser mais efetiva e segura do que a ação de agonistas completos e não seletivos como as TZDs (125). Desse modo, vários estudos têm sido feitos no intuito de desenvolver agonistas parciais de PPAR γ que apresentem os efeitos benéficos das TZDs sem apresentar os efeitos adversos como retenção hídrica e ganho de peso (111,113,128).

A diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos é comandada por vários fatores de transcrição (43). A cultura de pré-adipócitos 3T3-L1 é um bom modelo *in vitro* para caracterizar a diferenciação pré-adipocitária (129).

Amato e colaboradores (2012) demonstraram que o agonista parcial do PPAR γ , GQ-16, induz uma menor expressão da proteína adipogênica FABP em cultura de adipócitos. Ainda, ensaios *in vivo* mostraram que o GQ-16 parece ser tão eficaz quanto a rosiglitazona na melhora da sensibilidade à insulina, sem induzir o ganho de peso. Considerando ainda, que o agonista parcial, ao se ligar ao PPAR γ produz uma alteração conformacional diferente do agonista completo rosiglitazona, e isso poderia explicar uma menor expressão de genes adipogênicos, o presente estudo procurou indentificar quais os genes adipogênicos ambos agonistas poderiam induzir. Ainda, se a via da ERK1/2 está envolvida no processo de diferenciação adipogênica durante sua fase inicial, a inibição dessa via poderia ser um fator discordante no efeito adipogênico

entre o agonista completo e o parcial, por isso utilizou-se o inibidor da MEK1/2, U0126 (10 μ M).

Neste estudo foi observado que o agonista total teve efeito adipogênico no início da diferenciação das células 3T3-L1, maior do que o comparado ao agonista parcial GQ-16. Além disso foi visto que esse efeito pode ser em parte pela via da MAPK, uma vez que na presença do inibidor da MEK1/2, o efeito da RSG sobre a expressão relativa do RNAm dos genes *Ap2*, *Adpn* e *Glut-4* foi diminuído. Já foi evidenciado que GQ-16 induz acúmulo lipídico, embora de forma menos pronunciada que a rosiglitazona em adipócitos 3T3-L1 diferenciados (130). No entanto, nenhum mecanismo que poderia estar envolvido nessa resposta diferencial entre RSG e GQ-16 havia antes sido explorada.

O trabalho de Milton e colaboradores (2015) comparou os efeitos da rosiglitazona e do GQ-16 em células de adipócitos maduros 3T3-L1 usando *microarray* e PCR em tempo real e como resultado, o agonista parcial de PPAR γ mostrou, de fato, menor potencial adipogênico comparado à rosiglitazona devido à fraca indução do GQ-16 de genes relacionado à adipogênese como *C/ebp α* , *Cdipoq*, *Fabp4*, *Lpl* (109). Em outro estudo o tratamento com GQ-16 induziu a expressão de genes relacionados com a termogênese no tecido adiposo marrom (*Ucp-1* e *Cidea*) e no tecido adiposo branco epididimal (*Ucp-1*) em camundongos com obesidade e hiperglicemia induzidas por dieta rica em gordura (110).

Song e colaboradores (2016), avaliaram a expressão de *Ppar γ 2* e *Ap2* em diferentes dias de indução da diferenciação das células 3T3-L1, a partir do segundo dia já foi possível observar que a indução destes genes foi drasticamente aumentada e no D4, principalmente, a expressão de *Ap2* (63). Por isso, neste estudo, os experimentos foram conduzidos até o D4 para a expressão de genes para os experimentos de *western blot*.

O processo de adipogênese envolve a exposição de células confluentes a estímulos que ativam uma cascata de fatores de transcrição que induzem a expressão do PPAR γ e C/EBP α , estes por sua vez induzem a expressão de proteínas responsáveis pela sensibilidade à insulina (38). Muitos estudos tem sido feitos para determinar uma função da ERK1/2 no processo de adipogênese. Alguns estudos mostram que a ERK1/2 bloqueia a adipogênese (83) e outros mostram que essa via ativa a adipogênese (84). Um dos fatores para esses resultados contraditórios deve-se ao período da diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos em que foi analisado

o papel da ERK1/2. Fatores que ativam a via MEK/ERK nos estágios finais da adipogênese bloqueiam a expressão de genes adipogênicos devido a fosforilação do PPAR γ pela MAPK. Entretanto, a ativação dessa via durante os estágios iniciais da adipogênese, antes da expressão de grande quantidade de PPAR γ pode, por outro lado, promover a diferenciação por ativar fatores de transcrição que aumentam a expressão de PPAR γ e C/EBP (82,131)

Neste trabalho, a fosforilação da ERK 1/2 não foi alterada pelo o tratamento com RSG e GQ-16 no tempo de 48 horas. Na presença do U0126 RSG e principalmente o GQ-16 diminuíram a fosforilação da ERK1/2. Song e colaboradores (2016) Para identificar o papel da ERK1/2 na adipogênese induzida por GPR120 (receptor acoplado a proteína G), as células 3T3-L1 no início da diferenciação foram incubadas com TUG-891 (agonista do GPR120) e U0126 (inibidor da ERK 1/2) e foi visto que o pré-tratamento com inibidor da ERK reduziu o acúmulo de triglicerídeos e diminuiu o papel do TUG-891 na adipogênese, ainda aumentou a expressão dos níveis de PPAR γ 2 e Ap2 (63). A insulina aumenta a fosforilação da ERK1/2 de forma rápida e transiente em cultura de pré-adipócitos 3T3-L1 no início da adipogênese, já em 5 minutos de tratamento, efeito que durou até os 30 minutos (82). Por isso, outros experimentos, onde a fosforilação da ERK1/2 é vista em curto período de tempo, questão de minutos, deverão ser feitos para verificar os efeitos dos agonistas de PPAR γ nessa via de sinalização.

A expressão de citocinas pró-inflamatórias em adipócitos já foi demonstrada em outros trabalhos. Ren e colaboradores (2018) mostraram que adipócitos 3T3-L1, quando tratados com o fator-1 inflamatório alográfico (AIF-1) derivado de macrófagos por 48 horas, aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio, TNF- α , IL-6, liberação de resistina e inibem a secreção de adiponectina (132). Em outro estudo, cultura de adipócitos humanos quando pré-tratadas com agonista de PPAR β/δ aleglitazar por 24 horas antes do estímulo inflamatório do TNF- α , diminuiu a secreção de IL-6, quimiocina CXC-L10 e proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1) e restaurou a sinalização da insulina (133). Essas propriedades podem ser benéficas para pacientes diabéticos e obesos. Além disso, mostra que a ativação do PPAR γ em adipócitos é consistente com uma ação anti-inflamatória, como visto no presente trabalho, onde os agonistas total e parcial de PPAR γ foram capazes de inibir a expressão do RNAm do gene inflamatório *IL-6*.

Uma vez que a obesidade pode levar a um aumento do recrutamento de células do sistema imune para o tecido adiposo, como por exemplo macrófagos e ainda agonistas de PPAR γ apresentarem efeito anti-inflamatório, o presente estudo também buscou verificar o efeito do agonista parcial GQ-16 e agonista total RSG em cultura de macrófagos na ausência e presença do estímulo inflamatório (3,18). Estudos prévios mostram que, de forma geral, agonistas totais do PPAR γ , exercem efeitos anti-inflamatórios diminuindo a expressão de proteínas de adesão e fatores de transcrição mediados por uma série de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como, por exemplo TNF- α (114). No entanto, mais estudos devem ser realizados sobre possíveis efeitos anti-inflamatórios de agonistas parciais de PPAR γ .

Dentre os agonistas parciais, nesse estudo foi utilizado o GQ-16 e buscou-se avaliar o efeito desse agonista na expressão das citocinas pró- inflamatórias *Tnfa* e *Il6*. Primeiramente foram utilizados dois protocolos experimentais. Um onde os agonistas de PPAR γ foram adicionados antes do estímulo inflamatório, o que poderia indicar um uso profilático de tais agonistas para que em condições que favorecem a obesidade, a inflamação fosse inibida. E o outro modelo experimental em que o estímulo inflamatório foi adicionado anteriormente aos agonistas, e assim mimetizar o que de fato acontece fisiologicamente em indivíduos obesos. Os resultados do presente trabalho mostram que apenas quando o LPS foi adicionado anteriormente ao agonista completo de PPAR γ , este conseguiu diminuir o efeito no LPS na indução dos genes inflamatórios. O agonista parcial GQ-16 não alterou a indução de genes inflamatórios induzidos pelo estímulo inflamatório. Corroborando com os resultados do presente estudo, Soares e Silva (2012) demonstraram que em ratos LDLr(-/-) o GQ-16 não apresentou efeito anti-inflamatório e nem efeito protetor contra aterosclerose (134).

O estudo desenvolvido por Lin e colaboradores (2014) mostrou que 25uM de rosiglitazona em 24 horas não inibiu a resposta inflamatória sem o estímulo do LPS. Já com o estímulo inflamatório, esse agonista diminuiu a produção de óxido nítrico e prostaglandina E2 (121). Resultados semelhantes foram encontrados no presente trabalho, onde a rosiglitazona só diminuiu a expressão de genes inflamatórios na presença do estímulo.

Recentemente, foi evidenciada a atividade de novas glitazonas sobre a inibição simultânea de COX-2/LOX (lipo-oxigenase) e ainda ativar parcialmente o PPAR γ . Em cultura de macrófagos, os compostos atenuaram o aumento da expressão de *Il1 β* e

Tnfa causada pelo LPS, ainda, esses compostos foram capazes de inibir a diferenciação de monócitos THP-1 em macrófagos. Em teste *in vivo*, os compostos inibiram o edema de maneira igual ou superior a fármacos anti-inflamatórios como celecoxibe e diclofenaco (135).

O LPS foi utilizado como um fator pró-inflamatório, pois se sabe que esse lipopolissacarídeo é capaz de ativar a resposta inflamatória corroborando, assim, para ativação de macrófagos (136). O LPS estimula o receptor do tipo Toll 4 (TLR4) em várias células, incluindo macrófagos, para ativar o NFkB e MAPK, as quais são classificadas em pelo menos três componentes: ERKs, JNK e p38 MAPK (137–141).

Outros autores mostram que a via das MAPKs está envolvida na ação anti-inflamatória de agonistas de PPAR γ . Santos e colaboradores (2018) demonstraram que o LPSF/GQ-2, uma nova TZD, possui atividade anti-inflamatória diminuindo marcadores de inflamação como IL-1, iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6 na injúria pulmonar aguda de camundongos induzida por LPS. Esse efeito é devido a inibição da ativação de MAPK e NFkB (142). Trabalhos mostram que a rosiglitazona interfere com a fosforilação da ERK1/2 em diferentes tipos celulares (143,144). Foi demonstrado que a rosiglitazona diminuiu a fosforilação da ERK1/2 e da AKT em células de mieloma em 48 horas de tratamento (143). A inibição dessas vias de sinalização pela rosiglitazona está envolvidas com a diminuição de fatores angiogênicos nessas células. Já em eosinófilos purificados de sangue humano, a rosiglitazona não alterou a fosforilação da ERK1/2 em 110 minutos de tratamento (144).

Em células de câncer de próstata PC-3, rosiglitazona 10uM não alterou a fosforilação da ERK1/2 em 5, 15, 30, 60 e 360 minutos de tratamento. No entanto, esse agonista de PPAR γ atenuou a fosforilação dessa via estimulada por IGF-1 (71). A ERK também se mostrou envolvida em outras ações de agonistas de PPAR γ . Em cultura de células microvascular endotelial humana, o pré-tratamento por 30 minutos com agonistas de PPAR γ inibiu a fosforilação da ERK1/2 provocada por 15 minutos de estímulo inflamatório (145). No presente estudo, a mesma concentração de rosiglitazona só foi capaz de inibir a fosforilação dessa via de sinalização em 15 e 60 minutos de tratamento com LPS, mostrando um efeito dependente do tempo. Já o GQ-16 teve efeito somente em 15 minutos de tratamento com LPS.

Experimentos de silenciamento do PPAR γ demonstraram o envolvimento do receptor em mediar tanto o efeito rápido não-genômico da fosforilação da ERK1/2 quanto os efeitos a longo prazo na secreção de citocinas e quimiocinas quimiocinas

(62,73,74). Quando avaliada a expressão de genes inflamatórios em cultura de macrófagos neste trabalho, nem o QG-16 nem RSG não mostraram efeito anti-inflamatório através da via da ERK, sugerindo que estes efeitos podem ser por outros mediadores ou outras vias de sinalização.

No entanto, a expressão basal do RNAm do gene *Tnfa* foi diminuída com a inibição da MEK1/2. Experimentos realizados em fibroblastos em cultura transfectadas com siRNA específico da isoforma ERK foi visto que estas células tiveram a expressão de *il8* induzidas por *Tnfa* atenuada quando a isoforma da ERK2 foi silenciada, mas o mesmo não ocorreu com o silenciamento da isoforma ERK1 (146). Quando tratadas com U0126, a cultura de células dendríticas imaturas diferenciadas de monócitos, houve a redução da expressão de citocinas inflamatórias, entre elas *Il6* e *Tnfa* (147) o que não foi observado neste trabalho quando analisado a expressão de *Il6*.

Alguns estudos mostram que os efeitos que os agonistas de PPAR γ exercem sobre as vias de sinalização são de forma independente de PPAR γ . De fato, já foi demonstrado que a rosiglitazona pode agir via um receptor de membrana acoplado à proteína G, o GPR40 (65,71,81,148). Os resultados de Wang e colaboradores (2015) demonstraram que o GPR40 e o PPAR γ podem funcionar juntos como uma via de sinalização de transdução integrada de dois receptores. Além da ativação direta no receptor PPAR γ , a rosiglitazona também exigiu o GPR40 para propagar de forma ideal um sinal nuclear do PPAR γ no endotélio humano. O GPR40 e o PPAR γ pareceram funcionar aditivamente e, às vezes, sinergicamente para iniciar respostas genômicas do PPAR γ , dependendo do contexto transcricional (149).

Outros estudos mostram o envolvimento direto do PPAR γ onde pode haver uma interação direta do PPAR γ com MEK1 ou ERK (131,145,150,151). Ainda, as tiazolidinedionas podem ter ação potencializada agindo tanto via GPR40 quanto via PPAR γ (82). Em cultura de osteócitos, TZDs ativaram rapidamente a ERK1/2 e p38. Foi demonstrado que este efeito foi mediado pelo GPR40, em paralelo, as TZDs também ativavam o PPAR γ e a somatória destes eventos desencadeia na inibição da formação óssea e apoptose de osteócitos (68).

Diante disso, os efeitos apresentados no presente trabalho pelos agonistas de PPAR γ devem ser investigados quanto a dependência de: PPAR γ ; ligação de outro receptor; ou da ligação tanto com o PPAR γ quanto com outro receptor.

6 CONCLUSÃO

- Os agonistas de PPAR γ aumentaram a expressão relativa do RNAm de genes adipogênicos em cultura de pré-adipócitos no início da diferenciação adipogênica, embora o efeito do agonista parcial GQ-16 tenha sido inferior ao do agonista total RSG;

- O aumento da expressão relativa do RNAm de genes adipogênicos em cultura de pré-adipócitos no início da diferenciação estimulado pela RSG tem o envolvimento da MEK1/2;

- O aumento da expressão relativa do RNAm de genes adipogênicos em cultura de pré-adipócitos no início da diferenciação estimulado pelo GQ-16 não envolve a via da ERK;

- Ambos os agonistas diminuíram a expressão relativa do RNAm do gene inflamatório *Il6* em cultura de pré-adipócitos no início da diferenciação e esse efeito não foi alterado com a inibição da MEK1/2;

- Em cultura de macrófagos na ausência do estímulo inflamatório, RSG e GQ-16 em 6 e 24h não tiveram efeito sobre a expressão relativa do RNAm de genes inflamatórios;

- Em 6 horas de o agonista parcial, ao contrário do esperado, aumentaram a expressão de *Il6*, quando houve a pré-estimulação de macrófagos com LPS;

- A RSG diminuiu o efeito estimulatório do LPS na expressão relativa do RNAm dos genes inflamatórios *Il6* e *Tnfa* em 24 horas de tratamento em cultura de macrófagos;

- GQ-16 não alterou o efeito estimulatório do LPS na expressão relativa do RNAm dos genes inflamatórios *Il6* e *Tnfa* em 24 horas de tratamento em cultura de macrófagos;

- A adição dos agonistas total e parcial antes do estímulo inflamatório não alterou a expressão de genes inflamatórios em macrófagos.

- A inibição da MEK1/2 diminuiu a expressão relativa do RNAm do gene inflamatório *Tnfa* mas não alterou o efeito do LPS na expressão desse mesmo gene em cultura de macrófagos;

- A inibição MEK1/2 não alterou a expressão relativa do RNAm do gene inflamatório *Il6* mas quando associada ao LPS aumentou expressão desse mesmo gene em cultura de macrófagos;

- Os agonistas de PPAR γ não alteraram a fosforilação da ERK1/2 nos tempos e linhagens celulares estudados. Ainda, RSG e GQ-16 também não alteraram a fosforilação dessa via de sinalização na presença do estímulo inflamatório LPS em cultura de macrófagos.

Assim, com os resultados do presente trabalho, pode-se sugerir que o efeito adipogênico maior da RSG em relação ao GQ-16 deve-se em parte ao envolvimento da via da ERK. Ainda, o agonista total apresentou efeito anti-inflamatório quando comparado ao agonista parcial. Com estes resultados, este projeto contribuiu para a elucidação do mecanismo de ação do GQ-16, um novo modulador seletivo de PPAR γ .

7 REFERÊNCIAS

1. Tateya S, Kim F, Tamori Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:93.
2. Nguyen DM, El-Serag HB. The Epidemiology of Obesity. *Gastroenterol Clin North Am* [Internet]. 2010 Mar 1 [cited 2019 May 26];39(1):1–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889855309001289?via%3Dihub>
3. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2011 Jan 21;11:85. Available from: <https://doi.org/10.1038/nri2921>
4. Bachmayer C, Kemmer A, Ehrmann N, Hasenberg T, Lammert A, Hammes HP. Adipokines and endothelial dysfunction in obesity WHO°III. *Microvasc Res* [Internet]. 2013;89:129–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2013.04.007>
5. WHO. WHO | Overweight and obesity [Internet]. Who. 2018. Available from: https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_obesity/overweight_adolscents/en/
6. Global Health Observatory. GHO | By category | Prevalence of obesity among adults, BMI ≥ 30, age-standardized - Estimates by World Bank income group [Internet]. Who. 2017. Available from: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.WB2480A?lang=en>
7. Saúde M da. *Vigitel Brasil 2016* [Internet]. 2016. Available from: http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/17/Vigitel_17-4-17-final.pdf
8. Evans RM, Barish GD, Wang Y-X. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*. 2004 Apr;10(4):355–61.
9. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006 Dec;444(7121):860–7.
10. Karalis KP, Giannogonas P, Kodela E, Koutmani Y, Zoumakis M, Teli T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. *FEBS J*. 2009 Oct;276(20):5747–54.

11. Aldhahi W, Hamdy O. Adipokines, inflammation, and the endothelium in diabetes. *Curr Diab Rep*. 2003 Aug;3(4):293–8.
12. Bastard J-P, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw*. 2006 Mar;17(1):4–12.
13. Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol*. 2010 Jul;88(1):33–9.
14. Porcheray F, Viaud S, Rimaniol A-C, Leone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, et al. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2005 Dec;142(3):481–9.
15. Pimentel GD, Ganeshan K, Carnevalheira JBC. Hypothalamic inflammation and the central nervous system control of energy homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2014;397(1–2):15–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2014.06.005>
16. Dalmas E, Clement K, Guerre-Millo M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol*. 2011 Jul;32(7):307–14.
17. Weisberg SP, Leibel RL, Anthony W, Jr F, Weisberg SP, Mccann D, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue Find the latest version : Obesity is associated with. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796–808.
18. Kalupahana NS, Claycombe KJ, Moustaid-Moussa N. (n-3) Fatty Acids Alleviate Adipose Tissue In fl ammation and Insulin Resistance : *Adv Nutr*. 2011;2:304–16.
19. Izaola O, de Luis D, Sajoux I, Domingo JC, Vidal M. Inflamación y obesidad (Lipoinflamación). *Nutr Hosp*. 2015;31(6):2352–8.
20. de Luis DA, Aller R, Izaola O, Conde R, Gonzalez Sagrado M. The Ratio of Adiponectin to HOMA as an Index of Metabolic Syndrome in Obese Women. *Ann Nutr Metab* [Internet]. 2011;58(4):301–6. Available from: <https://www.karger.com/DOI/10.1159/000331216>
21. Lumeng CN, Deyoung SM, Saltiel AR. Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. *Am J Physiol Metab*. 2007;292(1):E166–74.
22. Lee YS, Park MS, Choung JS, Kim SS, Oh HH, Choi CS, et al. Glucagon-like peptide-1 inhibits adipose tissue macrophage infiltration and inflammation in an

- obese mouse model of diabetes. *Diabetologia*. 2012;55(9):2456–68.
23. Tse L. Chronic Inflammation in Fat Plays a Crucial Role in Development of Obesity. *Screen*. 2003;112(12):1821–30.
 24. Cintra DE, Pauli JR, Araújo EP, Moraes JC, de Souza CT, Milanski M, et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *J Hepatol* [Internet]. 2008 Apr 1;48(4):628–37. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.12.017>
 25. Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* [Internet]. 2009;6(6):399–409. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2009.55>
 26. Janeway CAJ, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197–216.
 27. Dong J-T. Anticancer activities of PPAR γ in breast cancer are context-dependent. *Am J Pathol*. 2013 Jun;182(6):1972–5.
 28. 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;45(2):120–59.
 29. Lefebvre P, Fruchart J, Staels B, Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart J, et al. Sorting out the roles of PPAR α in energy metabolism and vascular homeostasis Find the latest version : Review series Sorting out the roles of PPAR α in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest*. 2006;116(3):571–80.
 30. Burri L, Thoresen GH, Berge RK. The role of PPAR activation in liver and muscle. *PPAR Res*. 2010;2010.
 31. Kersten S. Integrated physiology and systems biology of PPAR α . *Mol Metab*. 2014;3(4):354–71.
 32. Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1771(8):926–35.
 33. Aranda A, Pascual A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiol Rev*. 2001;81(3):1269–304.
 34. Santos GM, Fairall L, Schwabe JWR. Negative regulation by nuclear receptors: A plethora of mechanisms. *Trends Endocrinol Metab*. 2011;22(3):87–93.
 35. Zoete V, Grosdidier A, Michielin O. Peroxisome proliferator-activated receptor

- structures: Ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2007;1771(8):915–25.
36. Lamas Bervejillo M, Ferreira AM. Understanding Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: From the Structure to the Regulatory Actions on Metabolism. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1127:39–57.
 37. Heikkinen S, Auwerx J, Argmann CA. PPAR γ in human and mouse physiology. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1771(8):999–1013.
 38. Rosen ED, Spiegelman BM. PPAR γ : a Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth. *J Biol Chem*. 2001;276(41):37731–4.
 39. 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.
 40. Elstner E, Müller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H, et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BXN mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1998;95(15):8806–11. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9671760>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC21158>
 41. Tontonoz P, Singer S, Forman BM, Sarraf P, Fletcher JA, Fletcher CD, et al. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1997;94(1):237–41. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8990192>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC19300>
 42. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR γ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* [Internet]. 1994 May 15;8(10):1224–34. Available from:
<http://genesdev.cshlp.org/content/8/10/1224.abstract>
 43. Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2009 Apr;20(3):107–14.
 44. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*. 2002;53:409–35.
 45. Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPAR γ . *Cell*. 2005;123(6):993–9.

46. Medina-Gomez G, Gray S, Vidal-Puig A. Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and PPAR γ coactivator-1 (PGC1). *Public Health Nutr.* 2007;10(10A):1132–7.
47. Ren D, Collingwood TN, Rebar EJ, Wolffe AP, Camp HS. PPAR γ knockdown by engineered transcription factors : exogenous PPAR γ 2 but not PPAR γ 1 reactivates adipogenesis service PPAR γ knockdown by engineered transcription factors : exogenous PPAR γ 2 but not PPAR γ 1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev.* 2002;(734):27–32.
48. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, et al. PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell.* 1999;4(4):585–95.
49. Rosen ED, Hsu C-H, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, et al. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes Dev* [Internet]. 2002 Jan 1;16(1):22–6. Available from: <http://genesdev.cshlp.org/content/16/1/22.abstract>
50. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, et al. N Kubota, PPAR [gamma] mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Molecular Cell*, 1999.pdf. 1999;4:597–609.
51. Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, et al. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem.* 1998 Oct;273(40):25573–80.
52. Von Knethen A, Soller M, Tzieply N, Weigert A, Johann AM, Jennewein C, et al. PPAR γ 1 attenuates cytosol to membrane translocation of PKC α to desensitize monocytes/macrophages. *J Cell Biol.* 2007;176(5):681–94.
53. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res.* 2000 Oct;49(10):497–505.
54. 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;437(7059):759–63.
55. Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, Peuchmaur M, Englaro W, Schoonjans K, et al. Attenuation of Colon Inflammation through Activators of the Retinoid X Receptor (Rxr)/Peroxisome Proliferator–Activated Receptor γ (Ppar γ)

- Heterodimer. *J Exp Med*. 2001;193(7):827–38.
56. Bouhrel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dievart R, Brozek J, Haulon S, et al. PPAR γ activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab*. 2007 Aug;6(2):137–43.
 57. Marx N, Kehrle B, Kohlhammer K, Grub M, Koenig W, Hombach V, et al. PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ Res*. 2002 Apr;90(6):703–10.
 58. Clark RB, Bishop-Bailey D, Estrada-Hernandez T, Hla T, Puddington L, Padula SJ. The nuclear receptor PPAR γ and immunoregulation: PPAR γ mediates inhibition of helper T cell responses. *J Immunol*. 2000 Feb;164(3):1364–71.
 59. Nakajima A, Wada K, Miki H, Kubota N, Nakajima N, Terauchi Y, et al. Endogenous PPAR γ mediates anti-inflammatory activity in murine ischemia-reperfusion injury. *Gastroenterology*. 2001 Feb;120(2):460–9.
 60. Chen K, Li J, Wang J, Xia Y, Dai W, Wang F, et al. 15-Deoxy- γ 12,14-prostaglandin J2 Reduces Liver Impairment in a Model of ConA-Induced Acute Hepatic Inflammation by Activation of PPAR γ and Reduction in NF- κ B Activity. *PPAR Res*. 2014;2014:215631.
 61. LeBrasseur NK, Kelly M, Tsao T-S, Farmer SR, Saha AK, Ruderman NB, et al. Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am J Physiol Metab*. 2006;291(1):E175–81.
 62. Luconi M, Cantini G, Serio M. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ): Is the genomic activity the only answer? *Steroids* [Internet]. 2010;75(8–9):585–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2009.10.012>
 63. Song T, Zhou Y, Peng J, Tao YX, Yang Y, Xu T, et al. GPR120 promotes adipogenesis through intracellular calcium and extracellular signal-regulated kinase 1/2 signal pathway. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2016;434(February 2017):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2016.06.009>
 64. Huang Y, Liu F, Grundke-iqbal I, Iqbal K, Gong C. NF- κ B precursor , p105 , and NF- κ B inhibitor , I κ B α , are both elevated in Alzheimer disease brain. 2005;373:115–8.

65. Gras D, Chanez P, Urbach V, Vachier I, Godard P, Bonnans C. Thiazolidinediones induce proliferation of human bronchial epithelial cells through the GPR40 receptor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 Jun;296(6):L970-8.
66. Cantini G, Lombardi A, Borgogni E, Francalanci M, Ceni E, Degl'Innocenti S, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) is required for modulating endothelial inflammatory response through a nongenomic mechanism. *Eur J Cell Biol*. 2010;89(9):645–53.
67. Endo Y, Suzuki M, Yamada H, Horita S, Kunimi M, Yamazaki O, et al. Thiazolidinediones enhance sodium-coupled bicarbonate absorption from renal proximal tubules via PPAR γ -dependent nongenomic signaling. *Cell Metab*. 2011;13(5):550–61.
68. Mieczkowska A, Baslé MF, Chappard D, Mabileau G. Thiazolidinediones Induce Osteocyte Apoptosis by a G Protein-coupled Receptor 40-dependent Mechanism * □. 2012;287(28):23517–26.
69. Reginato MJ, Krakow SL, Bailey ST, Lazar MA. Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J Biol Chem*. 1998;273(4):1855–8.
70. Toriumi Y, Hiraoka M, Watanabe M, Yoshida M. Pioglitazone reduces monocyte adhesion to vascular endothelium under flow by modulating RhoA GTPase and focal adhesion kinase. *FEBS Lett*. 2003;553(3):419–22.
71. Papageorgiou E, Pitulis N, Manoussakis M, Lembessis P, Koutsilieris M. Rosiglitazone attenuates insulin-like growth factor 1 receptor survival signaling in PC-3 cells. *Mol Med*. 2008;14(7–8):403–11.
72. Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Iino N, Takeshita A. 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones activate the MEK/ERK pathway through phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2001 Dec;276(52):48950–5.
73. Lombardi A, Cantini G, Mello T, Francalanci M, Gelmini S, Cosmi L, et al. Molecular mechanisms underlying the pro-inflammatory synergistic effect of tumor necrosis factor α and interferon γ in human microvascular endothelium. 2009;88:731–42.
74. Lombardi A, Cantini G, Piscitelli E, Gelmini S, Francalanci M, Mello T, et al. A new mechanism involving ERK contributes to rosiglitazone inhibition of tumor

- necrosis factor- α and interferon- γ inflammatory effects in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(4):718–24.
75. Kotarsky K, Nilsson NE, Flodgren E, Owman C. A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs. *J Biol Chem.* 2003;278(1):406–10.
 76. Smith NJ, Stoddart LA, Devine NM, Jenkins L, Milligan G. The Action and Mode of Binding of Thiazolidinedione Ligands at Free Fatty Acid Receptor 1. *J Biol Chem.* 2009;284(26):17527–39.
 77. Stoddart LA, Brown AJ, Milligan G. Uncovering the Pharmacology of the G Protein-Coupled Receptor GPR40: High Apparent Constitutive Activity in Guanosine 5'-[γ -³⁵S]thio- triphosphate Binding Studies Reflects Binding of an Endogenous Agonist. *J Biol Chem.* 2007;282(4):994–1005.
 78. Zhou C, Tang C, Chang E, Ge M, Lin S, Cline E, et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Discovery of 5-aryloxy-2,4-thiazolidinediones as potent GPR40 agonists. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20(3):1298–301.
 79. Alquier T, Peyot M, Latour MG, Kebede M, Sorensen CM, Gesta S, et al. Deletion of GPR40 Impairs Glucose-Induced Insulin Secretion In Vivo in Mice Without Affecting Intracellular Fuel Metabolism in Islets. *J Biol Chem.* 2009;284(11):6077–85.
 80. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β cells through GPR40. *J Biol Chem.* 2003;278(20):2001–4.
 81. Wang S, Awad KS, Elinoff JM, Dougherty EJ, Ferreyra GA, Wang JY, et al. G Protein-coupled Receptor 40 (GPR40) and Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma (PPARgamma): AN INTEGRATED TWO-RECEPTOR SIGNALING PATHWAY. *J Biol Chem.* 2015 Aug;290(32):19544–57.
 82. Prusty D, Park B-H, Davis KE, Farmer SR. Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem.* 2002 Nov;277(48):46226–32.
 83. Kim SW, Muise AM, Lyons PJ, Ro HS. Regulation of adipogenesis by a transcriptional repressor that modulates MAPK activation. *J Biol Chem.* 2001 Mar;276(13):10199–206.
 84. Bost F, Caron L, Marchetti I, Dani C, Le Marchand-Brustel Y, Binetruy B. Retinoic acid activation of the ERK pathway is required for embryonic stem cell

- commitment into the adipocyte lineage. *Biochem J.* 2002 Feb;361(Pt 3):621–7.
85. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003 Dec;112(12):1785–8.
 86. Ferguson JF, Roberts-Lee K, Borcea C, Smith HM, Midgette Y, Shah R. Omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate inflammatory activation and alter differentiation in human adipocytes. *J Nutr Biochem.* 2019 Feb;64:45–9.
 87. May P, Bremond P, Sauzet C, Piccerelle P, Grimaldi F, Champion S, et al. In Vitro Cocktail Effects of PCB-DL (PCB118) and Bulky PCB (PCB153) with BaP on Adipogenesis and on Expression of Genes Involved in the Establishment of a Pro-Inflammatory State. *Int J Mol Sci.* 2018 Mar;19(3).
 88. Mitani T, Takaya T, Harada N, Katayama S, Yamaji R, Nakamura S, et al. Theophylline suppresses interleukin-6 expression by inhibiting glucocorticoid receptor signaling in pre-adipocytes. *Arch Biochem Biophys.* 2018 May;646:98–106.
 89. 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;85(5):803–12.
 90. Szanto A, Nagy L. The many faces of PPAR γ : Anti-inflammatory by any means? Vol. 213, *Immunobiology.* 2008. 789–803 p.
 91. Szeles L, Törőcsik D, Nagy L. Szeles L, Torocsik D, Nagy L PPARgamma in immunity and inflammation: cell types and diseases. *Biochim Biophys Acta* 1771:1014-30. Vol. 1771, *Biochimica et biophysica acta.* 2007. 1014–1030 p.
 92. 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;270(22):12953–6.
 93. Szeles L, Torocsik D, Nagy L. PPARgamma in immunity and inflammation: cell types and diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug;1771(8):1014–30.
 94. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med.* 2004 Sep;351(11):1106–18.
 95. 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.
 96. 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.
97. Combs TP, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang W-J, 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.
 98. Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*. 2007 Jun;356(24):2457–71.
 99. 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.
 100. Grey A. Skeletal consequences of thiazolidinedione therapy. *Osteoporos Int*. 2008 Feb;19(2):129–37.
 101. Chiu M, Mcbeth L, Sindhwani P, Hinds TD. Deciphering the Roles of Thiazolidinediones and PPAR γ in Bladder Cancer. *PPAR Res*. 2017;2017.
 102. Han E, Jang S-Y, Kim G, Lee Y-H, Choe EY, Nam CM, et al. Rosiglitazone Use and the Risk of Bladder Cancer in Patients With Type 2 Diabetes. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Feb;95(6):e2786.
 103. BRASIL AN de VS. No Title [Internet]. Avandia® (rosiglitazona): cancelamento do registro devido ao risco cardiovascular do medicamento. 2010 [cited 2019 Jul 21]. Available from: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=400778&_101_type=content&_101_groupId=33
 104. Olefsky JM. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. *J Clin Invest*. 2000;106(4):467–72.
 105. Janani C, Ranjitha Kumari BD. PPAR gamma gene - A review. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* [Internet]. 2015;9(1):46–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsx.2014.09.015>
 106. 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;278(3):704–11.
107. Rubenstrunk A, Hanf R, Hum DW, Fruchart J-C, Staels B. Safety issues and prospects for future generations of PPAR modulators. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2007;1771(8):1065—1081. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2007.02.003>
 108. Balint BL, Nagy L. Selective modulators of PPAR activity as new therapeutic tools in metabolic diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2006 Mar;6(1):33–43.
 109. Doshi LS, Brahma MK, Bahirat UA, Dixit A V, Nemmani KVS. Discovery and development of selective PPAR gamma modulators as safe and effective antidiabetic agents. *Expert Opin Investig Drugs*. 2010 Apr;19(4):489–512.
 110. Choi J, Banks A, Estall J, Kajimura S, Bostrom P, Laznik D, et al. Obesity-linked phosphorylation of PPAR γ by cdk5 is a direct target of the anti-diabetic PPAR γ ligands. *Nature*. 2010;466(7305):451–6.
 111. Amato AA, Rajagopalan S, Lin JZ, Carvalho BM, Figueira ACM, Lu J, et al. GQ-16, a novel peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligand, promotes insulin sensitization without weight gain. *J Biol Chem*. 2012;287(33):28169–79.
 112. Liu H, Zhang C, Song F, Xiao T, Meng J, Zhang Q, et al. A Novel Partial Agonist of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma with Excellent Effect on Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2015 Jun;353(3):573–81.
 113. Ming Y, Hu X, Song Y, Liu Z, Li J, Gao R, et al. CMHX008, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma partial agonist, enhances insulin sensitivity in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2014;9(7):e102102.
 114. Silva JC, Cesar FA, de Oliveira EM, Turato WM, Tripodi GL, Castilho G, et al. New PPARgamma partial agonist improves obesity-induced metabolic alterations and atherosclerosis in LDLr(-/-) mice. *Pharmacol Res*. 2016 Feb;104:49–60.
 115. Coelho MS, de Lima CL, Royer C, Silva JB, Oliveira FCB, Christ CG, et al. GQ-16, a TZD-Derived Partial PPARgamma Agonist, Induces the Expression of Thermogenesis-Related Genes in Brown Fat and Visceral White Fat and Decreases Visceral Adiposity in Obese and Hyperglycemic Mice. *PLoS One*.

- 2016;11(5):e0154310.
116. Milton FA, Cvorov A, Amato AA, Sieglaff DH, Filgueira CS, Arumanayagam AS, et al. PPAR γ partial agonist GQ-16 strongly represses a subset of genes in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;464(3):718–23.
 117. da Costa Leite LFC, Veras Mourão RH, de Lima M do CA, Galdino SL, Hernandez MZ, de Assis Rocha Neves F, et al. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of arylidene-thiazolidinediones with potential hypoglycemic and hypolipidemic activities. *Eur J Med Chem*. 2007;42(10):1263–71.
 118. Silva MT. Ação do agonista parcial do PPAR gamma, GQ-16, na viabilidade de macrófagos em cultura [Internet]. Universidade de Brasília; 2016. Available from: <http://bdm.unb.br/handle/10483/13882>
 119. Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*. 1974 Oct;3(2):127–33.
 120. Campbell JE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab*. 2013 Jun;17(6):819–37.
 121. Zhang Y, Li R, Meng Y, Li S, Donelan W, Zhao Y, et al. Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling. *Diabetes*. 2014;63(2):514–25.
 122. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.
 123. Kim YA, Kong C-S, Park HH, Lee E, Jang M-S, Nam K-H, et al. Anti-Inflammatory Activity of Heterocarpin from the Salt Marsh Plant *Corydalis heterocarpa* in LPS-Induced RAW 264.7 Macrophage Cells. *Molecules*. 2015 Aug;20(8):14474–86.
 124. McCarron EP, Williams DP, Antoine DJ, Kipar A, Lemm J, Stehr S, et al. Exploring the translational disconnect between the murine and human inflammatory response: analysis of LPS dose-response relationship in murine versus human cell lines and implications for translation into murine models of sepsis. *J Inflamm Res*. 2015;8:201–9.
 125. Hall JM, McDonnell DP. The molecular mechanisms underlying the proinflammatory actions of thiazolidinediones in human macrophages. *Mol Endocrinol*. 2007 Aug;21(8):1756–68.

126. 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.
127. 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.
128. Pal T, Joshi H, Ramaa CS. Design and Development of Oxazol-5-Ones as Potential Partial PPAR- γ Agonist Against Cancer Cell Lines. *Anticancer Agents Med Chem.* 2014;14(6):872–83.
129. Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:715–36.
130. Amato AA. Investigação da atividade farmacológica de benzilideno - e acridinilideno- tiazolidinedionas e de isoflavonas nos receptores alfa, beta/delta e gama ativados por proliferadores prexissomais [Internet]. Universidade de Brasília; 2008. Available from: <http://repositorio.unb.br/handle/10482/1492>
131. Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR γ . *Science.* 1996 Dec;274(5295):2100–3.
132. Ren X, Fu X, Zhang X, Chen S, Huang S, Yao L, et al. Testosterone regulates 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation and epididymal fat accumulation in mice through modulating macrophage polarization. *Biochem Pharmacol.* 2017 Sep;140:73–88.
133. Massaro M, Scoditti E, Pellegrino M, Carluccio MA, Calabriso N, Wabitsch M, et al. Therapeutic potential of the dual peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) α/γ agonist aleglitazar in attenuating TNF- α -mediated inflammation and insulin resistance in human adipocytes. *Pharmacol Res.* 2016 May;107:125–36.
134. Soares E Silva AK, de Oliveira Cipriano Torres D, Santos Rocha SW, dos Santos Gomes FO, dos Santos Silva B, Donato MAM, et al. Effect of new thiazolidine derivatives LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16 on atherosclerotic lesions in LDL receptor-deficient mice (LDLR $^{-/-}$). *Cardiovasc Pathol.* 2013;22(1):81–90.
135. Elzahhar PA, Alaaeddine R, Ibrahim TM, Nassra R, Ismail A, Chua BSK, et al. Shooting three inflammatory targets with a single bullet: Novel multi-targeting anti-inflammatory glitazones. *Eur J Med Chem.* 2019 Apr;167:562–82.

136. Youn CK, Park SJ, Lee MY, Cha MJ, Kim OH, You HJ, et al. Silibinin Inhibits LPS-Induced Macrophage Activation by Blocking p38 MAPK in RAW 264.7 Cells. *Biomol Ther (Seoul)*. 2013 Jul;21(4):258–63.
137. Medzhitov R, Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(10):692–703.
138. Smale ST. Transcriptional regulation in the innate immune system. *Curr Opin Immunol*. 2012;71(2):233–6.
139. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805–20.
140. Ulloa L, Tracey KJ. The “cytokine profile”: A code for sepsis. *Trends Mol Med*. 2005;11(2):56–63.
141. Vaure C, Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol*. 2014;5(JUL):1–15.
142. Santos LAM Dos, Rodrigues GB, Mota FVB, Franca MER de, de Souza Barbosa KP, Oliveira WH de, et al. New thiazolidinedione LPSF/GQ-2 inhibits NFkappaB and MAPK activation in LPS-induced acute lung inflammation. *Int Immunopharmacol*. 2018 Apr;57:91–101.
143. Rui M, Fu T, Liu Y, Huang H, Fu J. [Effect of rosiglitazone on the expression of HIF1alpha and IGF1 mRNA in myeloma]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2014 Jul;35(7):641–4.
144. Smith SG, Imaoka H, Punia N, Irshad A, Janssen LL, Sehmi R, et al. The Effect of PPAR Agonists on the Migration of Mature and Immature Eosinophils. *PPAR Res*. 2012;2012:235231.
145. Cantini G, Lombardi A, Piscitelli E, Poli G, Ceni E, Marchiani S, et al. Rosiglitazone inhibits adrenocortical cancer cell proliferation by interfering with the IGF-IR intracellular signaling. *PPAR Res*. 2008;2008:904041.
146. Namba S, Nakano R, Kitanaka T, Kitanaka N, Nakayama T, Sugiyama H. ERK2 and JNK1 contribute to TNF- α -induced IL-8 expression in synovial fibroblasts. *PLoS One*. 2017;12(8):1–19.
147. Shi W, Hou X, Peng H, Zhang L, Li Y, Gu Z, et al. MEK/ERK signaling pathway is required for enterovirus 71 replication in immature dendritic cells. *Virology*. 2014 Dec;11:227.
148. Kim H-S, Hwang Y-C, Koo S-H, Park KS, Lee M-S, Kim K-W, et al. PPAR- γ activation increases insulin secretion through the up-regulation of the

- free fatty acid receptor GPR40 in pancreatic beta-cells. *PLoS One*. 2013;8(1):e50128.
149. Wang S, Awad KS, Elinoff JM, Dougherty EJ, Ferreyra GA, Wang JY, et al. G protein-coupled receptor 40 (GPR40) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ): An integrated two-receptor signaling pathway. *J Biol Chem*. 2015;290(32):19544–57.
 150. Burgermeister E, Seger R. MAPK kinases as nucleo-cytoplasmic shuttles for PPARgamma. *Cell Cycle*. 2007 Jul;6(13):1539–48.
 151. Atkins KB, Irey B, Xiang N, Brosius FC 3rd. A rapid, PPAR-gamma-dependent effect of pioglitazone on the phosphorylation of MYPT. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009 May;296(5):C1151-61.
 152. Grommes C, Landreth GE, Heneka MT. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol*. 2004 Jul;5(7):419–29.