

ANA CAROLINA ANDRADE DE CARVALHO

**EFEITO DE AGONISTAS DE PPAR γ SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES
INFLAMATÓRIOS E ADIPOGÊNICOS EM SISTEMA DE COCULTURA
MACRÓFAGOS-ADIPÓCITOS**

Brasília, 2022

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

ANA CAROLINA ANDRADE DE CARVALHO

EFEITO DE AGONISTAS DE PPAR γ SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES
INFLAMATÓRIOS E ADIPOGÊNICOS EM SISTEMA DE COCULTURA
MACRÓFAGOS-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.

Orientadora: Angélica Amorim Amato

Co-orientadora: Carine Royer

Brasília

2022

ANA CAROLINA ANDRADE DE CARVALHO

EFEITO DE AGONISTAS DE PPAR γ SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES
INFLAMATÓRIOS E ADIPOGÊNICOS EM SISTEMA DE COCULTURA
MACRÓFAGOS-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

BANCA EXAMINADORA

PROFESSORA DOUTORA ANGÉLICA AMORIM AMATO (Presidente)

Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília

PROFESSORA DOUTORA DJANE BRAZ DUARTE

Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília

DOUTORA CAROLINA MARTINS RIBEIRO

Ministério da Saúde

Dedico este trabalho à minha mãe e ao meu padrasto, Vanessa e Ari, e à minha avó Selma, que sempre me incentivaram e tornaram toda a minha formação possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter me dado forças e determinação para concluir este trabalho. Por Ele ter me mostrado Sua atuação em minha vida em tantos momentos durante esta caminhada e não ter soltado minha mão em nenhum instante. E ainda, por todas as bençãos que derramou em minha vida que me permitiram chegar até aqui.

Gostaria de agradecer também à toda a minha família, que me incentivou a iniciar esse projeto e que esteve ao meu lado em toda essa trajetória. Um agradecimento especial à minha mãe, Vanessa, que tantas vezes me ouviu e me deu apoio nos momentos difíceis, e à minha avó, Selma, que sempre mostrou estar torcendo por mim. Muito obrigada também ao meu irmão, Filipe, que me fez rir nas horas em que isso era tudo o que eu estava precisando e me deu forças para continuar lutando. E ainda, queria agradecer também ao meu padrasto, Ari, por ter me feito sua filha e ter sempre me ajudado e me aconselhado na minha vida acadêmica.

Uma gratidão enorme pela orientação da professora Carine, que se tornou a minha “mãe científica”. O tanto que aprendi com ela, eu não sei nem descrever. Ensinos que irei levar para toda a vida. Eu agradeço muito pela paciência, carinho e compreensão que ela sempre demonstrou por mim. Tenho orgulho de dizer que a professora Carine fez parte da minha formação e que hoje eu sou uma profissional melhor por causa dela.

Ainda quero agradecer ao meu namorado, Guilherme, por todas as incontáveis vezes que ele me ouviu desabafar e me aconselhou em todo esse processo, sendo também o meu exemplo de dedicação e comprometimento. Também à Talita, que sempre esteve presente para me oferecer um ombro amigo.

Gostaria de agradecer também à professora Angélica por ter me ajudado em tantos momentos e ter me acolhido como aluna. Por fim, gratidão por todos do Farmol que compartilharam alegrias, frustrações, nervosismos e risadas comigo, mas principalmente ao Henrique e à Natália que tantas vezes me ofereceram apoio tanto emocional quanto nos experimentos.

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

(Josué, 1:9)

RESUMO

Introdução: a obesidade é uma doença crônica que já afeta boa parte da população mundial. O aumento de sua incidência causa consequentemente o aumento de doenças a ela relacionadas, como hipertensão e DM2. O desbalanço do tecido adiposo e a inflamação – resultante também da infiltração de macrófagos – foram identificados como os principais causadores desses distúrbios. Já foi demonstrado o papel crucial que o PPAR γ possui tanto na diferenciação de adipócitos quanto na regulação de genes inflamatórios em macrófagos. Estudos prévios indicaram que o GQ-16, agonista parcial de PPAR γ , apresenta efeitos sensibilizador insulínico comparáveis aos do agonista total rosiglitazona, porém sem indução de ganho de peso. **Objetivo:** Estudar os efeitos anti-inflamatórios e adipogênicos do agonista total e parcial do PPAR γ , rosiglitazona e GQ-16, respectivamente, sobre as respostas inflamatória e adipogênica em dois tipos de sistema de cocultura de macrófagos-adipócitos. **Métodos:** linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 e de pré-adipócitos 3T3-L1 maduros foram cultivados e realizado sistema de cocultura por contato e *transwell* com posterior tratamento de 24 horas com veículo (DMSO 0,01%), rosiglitazona (10^{-5} M) e GQ-16 (10^{-5} M), na presença e ausência de estímulo inflamatório com LPS (100 ng/mL). Como controle foram utilizadas células 3T3-L1 diferenciados e RAW 264.7 cultivados separadamente, os quais receberam os mesmos tratamentos da cocultura. As células foram coletadas com Trizol e a expressão relativa do RNAm dos genes inflamatórios e adipogênicos foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). **Resultados:** na cocultura por contato, o LPS aumentou a expressão do RNAm da *Il6* e esse efeito foi revertido pela rosiglitazona quando os macrófagos foram pré-tratados com o LPS. O mesmo não foi visto na expressão do RNAm do *Tnfa*. Na maioria dos tratamentos, a expressão do RNAm dos dois genes foi mais acentuada na cocultura do que quando as células foram cultivadas separadamente. Em relação aos genes adipogênicos, o LPS foi capaz de aumentar a expressão do RNAm apenas da *Fabp4* e do *Glut4*, na cocultura por contato. Esse estímulo ainda foi intensificado pela rosiglitazona na expressão do RNAm da *Fabp4*, quando anteriormente os macrófagos foram expostos ao LPS. Apenas houve diferença estatisticamente significativa na expressão do RNAm da *Adpn* no tratamento com GQ+LPS do experimento-controle, em que ocorreu aumento da expressão do gene em relação ao LPS. Os três genes

adipogênicos, na maior parte dos tratamentos, tiveram o RNAm menos expresso na cocultura por contato do que no controle. Na cocultura *transwell*, o LPS aumentou a expressão do RNAm apenas da *Il6* e da *Adpn*, e a rosiglitazona, diminuiu e aumentou, respectivamente, esse efeito quando os macrófagos foram pré-tratados com LPS. **Conclusão:** a interação entre macrófagos e adipócitos parece possuir papel fundamental na regulação da expressão de genes inflamatórios e adipogênicos. O efeito anti-inflamatório da rosiglitazona foi confirmado e o GQ-16 mostrou possuir menor efeito adipogênico em relação ao agonista total de PPAR γ .

Palavras-chave: obesidade; inflamação; resistência insulínica; adipócitos; macrófagos; PPAR γ ; rosiglitazona; GQ-16.

ABSTRACT

Introduction: obesity is a chronic disease that already affects a large part of the world population. The increase in its incidence consequently causes an increase in diseases related to it, such as hypertension and DM2. Adipose tissue malfunction and inflammation – also resulting from macrophage infiltration – have been identified as the main causes of these disorders. The crucial role that PPAR γ plays in both the regulation of adipocytes and inflammatory genes in macrophages has already been demonstrated. Previous studies indicate that GQ-16, a PPAR γ partial agonist, has insulin sensitizing effects comparable to those of the full agonist rosiglitazone, but without inducing weight gain. **Aim:** To study the anti-inflammatory and adipogenic effects of full and partial PPAR γ agonists, rosiglitazone and GQ-16, respectively, on inflammatory and adipogenic responses in two types of macrophage-adipocyte coculture system. **Methods:** RAW 264.7 murine macrophages and 3T3-L1 preadipocytes were cultured in a contact and transwell coculture system with subsequent 24-hour treatment with vehicle (DMSO 0.01%), rosiglitazone (10^{-5} M) and GQ-16 (10^{-5} M), in the presence and absence of inflammatory stimulus with LPS (100 ng/mL). Differentiated 3T3-L1 and RAW 264.7 cultivated separately were used as control, which received the same treatments as the coculture. Cells were harvested with Trizol and the relative mRNA expression of inflammatory and adipogenic genes was analyzed by real-time quantitative PCR (RT-PCRq). **Results:** in contact coculture, LPS increased *Il6* mRNA expression and this effect was reversed by rosiglitazone when macrophages were pretreated with LPS. The same was not seen in the expression of *Tnfa* mRNA. In most treatments, the mRNA expression of the two genes was more pronounced in the co-culture than when the cells were cultured separately. Regarding adipogenic genes, LPS was able to increase mRNA expression only of *Fabp4* and *Glut4*, in contact coculture. This stimulus was further intensified by rosiglitazone in the expression of *Fabp4* mRNA, when macrophages were previously exposed to LPS. There was only a statistically significant difference in the expression of *Adpn* mRNA in the treatment with GQ+LPS in the control experiment, in which there was an increase in gene expression in relation to LPS. The three adipogenic genes, in most treatments, had the mRNA less expressed in the contact coculture than in the control. In the transwell coculture, LPS increased mRNA expression only of *Il6* and *Adpn*, and rosiglitazone, respectively, decreased

and increased this effect when macrophages were pretreated with LPS. **Conclusion:** the interaction between macrophages and adipocytes seems to have a fundamental role in regulating the expression of inflammatory and adipogenic genes. The anti-inflammatory effect of rosiglitazone was confirmed and GQ-16 was shown to have a lower adipogenic effect compared to the full PPAR γ agonist.

Keywords: obesity; inflammation; insulin resistance; adipocytes; macrophages; PPAR γ ; rosiglitazone; GQ-16.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Doenças relacionadas com a síndrome metabólica	20
Figura 2 A inflamação sistêmica de baixo grau induzida pela obesidade	22
Figura 3 A inflamação induzida pela obesidade causa resistência à insulina	23
Figura 4 Mecanismo de ativação da transcrição gênica.....	27
Figura 5 Mecanismos de repressão de transcrição de genes	28
Figura 6 Representação esquemática dos domínios funcionais dos PPARs	29
Figura 7 Estrutura química do GQ-16 em comparação às TZDs rosiglitazona e pioglitazona.....	34
Figura 8 Ensaio de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1	38
Figura 9 Desenho esquemático dos dias da diferenciação de adipócitos e realização da cocultura.....	39
Figura 10 Esquema ilustrativo de sistema de cocultura por contato e <i>transwell</i>	41
Figura 11 Tratamento de macrófagos RAW 264.7 com LPS por 24 horas	41
Figura 12 Efeito de agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm da <i>Il6</i> , em sistema de cocultura por contato de macrófagos-adipócitos.....	51
Figura 13 Comparação do controle com a cocultura de macrófagos-adipócitos por contato na expressão do RNAm da <i>Il6</i>	52
Figura 14 Efeito de agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm da <i>Il6</i> , em sistema de cocultura <i>transwell</i> de macrófagos-adipócitos.....	54
Figura 15 Efeito de agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm do <i>Tnfa</i> , em sistema de cocultura por contato de macrófagos-adipócitos.....	56
Figura 16 Comparação do controle com a cocultura de macrófagos-adipócitos por contato na expressão do RNAm do <i>Tnfa</i>	57
Figura 17 Efeito de agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm da <i>Fabp4</i> , em sistema de cocultura por contato de macrófagos-adipócitos.....	59
Figura 18 Comparação do controle com a cocultura de macrófagos-adipócitos por contato na expressão do RNAm da <i>Fabp4</i>	60

Figura 19 Efeito de agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm da <i>Fabp4</i> , em sistema de cocultura <i>transwell</i> de macrófagos-adipócitos.....	62
Figura 20 Efeito de agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm da <i>Adpn</i> , em sistema de cocultura por contato de macrófagos-adipócitos.....	64
Figura 21 Comparação do controle com a cocultura de macrófagos-adipócitos por contato na expressão do RNAm da <i>Adpn</i>	65
Figura 22 Efeito de agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm da <i>Adpn</i> , em sistema de cocultura <i>transwell</i> de macrófagos-adipócitos.....	67
Figura 23 Efeito de agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm do <i>Glut4</i> , em sistema de cocultura por contato de macrófagos-adipócitos.....	69
Figura 24 Comparação do controle com a cocultura de macrófagos-adipócitos por contato na expressão do RNAm do <i>Glut4</i>	70
Figura 25 Efeito de agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm do <i>Glut4</i> , em sistema de cocultura <i>transwell</i> de macrófagos-adipócitos.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantificação e análise de pureza do RNA total de amostras da cocultura por contato	44
Tabela 2 – Quantificação e análise de pureza do RNA total de amostras da cocultura <i>transwell</i>	46
Tabela 3 – Sequência dos <i>primers</i> utilizados para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AdipoR1 – Receptor 1 de adiponectina
AdipoR2 – Receptor 2 de adiponectina
ADPN – Adiponectina
AF-1 – Função ativadora 1
AF-2 – Função ativadora 2
AKT – Proteína quinase B
AMPK – Proteína quinase ativada por AMP
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APS – Atenção Primária à Saúde
Arg1 – Arginase 1
Cdk5 – Quinase 5 dependente de ciclina
C/EBP β – Proteínas de ligação ao intensificador de CCAAT beta
C/EBP δ – Proteínas de ligação ao intensificador de CCAAT gama
CO₂ – Dióxido de Carbono
COCULT - Cocultura
CONT – Controle
CREB – Elemento responsivo ligado á proteína monofosfato cíclico de adenosina
Ct – *Threshold cycle*
DBD – Domínio de ligação ao DNA
DEPC – Dietilpirocarbonato
DM 2 – Diabetes Mellitus Tipo 2
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNase - Enzima desoxiribonuclease
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática
Enzima RT – Enzima transcriptase reversa
EPM – Erro padrão da média
ERK – Quinases reguladoras de sinais extracelulares
FABP4 – Proteína de ligação a ácidos graxos 4
GLUT4 – Transportador de glicose 4

GP130 – Receptor da glicoproteína 130
GPR40 – Receptor 40 acoplado à proteína G
HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica
HDAC – Desacetilases de histonas
HDL – Lipoproteína de alta densidade
IBMX – Isobutilmetilxantina
IKB α – Inibidor do fator nuclear kappa B quinase subunidade alfa
IKK – I κ B quinase
IL-1 β – Interleucina 1 beta
IL-1 – Interleucina 1
IL-3 – Interleucina 3
IL-4 – Interleucina 4
IL-6 - Interleucina 6
IL-6R – Receptor de Interleucina 6
IL-7 – Interleucina 7
IL-8 – Interleucina 8
IL-10 – Interleucina 10
IL-18 – Interleucina 18
IMC – Índice de Massa Corporal
INCA – Instituto Nacional do Câncer
INF γ – Interferon Gama
iNOS – Óxido nítrico induzível
IR – Receptor de insulina
IRS1 – Substrato 1 do receptor de insulina
JAK – Janus quinase
JNK – Quinase c-Jun N-terminal
LBD – Domínio de ligação com o ligante
LBP – Proteína de ligação ao LPS
LPS – Lipopolissacarídeo
M1 – Macrófago do tipo 1
M2 – Macrófago do tipo 2
MAPK – Proteínas cinases ativadas por mitógenos
MCP-1 – Proteína quimiotática para monócitos-1
MEC – Matriz extracelular

Mrc1 – Receptor de manose C – tipo 1
NFκB – Fator nuclear kappa B
NCoA – Coativador de receptor nuclear
NCoR – Correpessor de receptor nuclear
OMS – Organização Mundial de Saúde
PBS – Solução salina tamponada com fosfato
PCR – Reação em cadeia de polimerase
PNS – Pesquisa Nacional de Saúde
PPAR – Receptor ativado por proliferadores peroxissomais
PPARα – Receptor alfa ativado por proliferadores peroxissomais
PPARβ/δ – Receptor beta-delta ativado por proliferador peroxissomal
PPARγ – Receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais
PPRE – Elemento responsivo ao PPAR
RN – Receptores nucleares
RNA – Ácido ribonucleico
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
RNase – Enzima ribonuclease
ROSI – Rosiglitazona
RPM – Rotações por minuto
RT-PCR – Reação em cadeia de polimerase em tempo real
RT-PCRq - Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real
RXR – Receptor retinóide X
SFB - Soro fetal bovino
SM – Esfingomielina fosfodiesterase
SNB - Soro neonatal bovino
SOCS3 – Supressor da sinalização da citocina 3
STAT – Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
TACE – Enzima de conversão de fator de necrose tumoral alfa
TGFβ – Fator de crescimento transformante beta
TLR4 – Toll-like receptor 4
TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa
TZD – Tiazolidineidiona
WCRF – Fundo Mundial para Pesquisa contra o Câncer
15d-PGJ2 – 15-deoxy 12,14 prostaglandina J2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 OBESIDADE, INFLAMAÇÃO E RESISTÊNCIA INSULÍNICA	19
1.2 SISTEMAS DE COCULTURA	25
1.3 RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAIIS	26
1.4 RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADOR DE PEROXISSOMA GAMA (PPAR γ)	30
1.5 AGONISTAS TOTAL E PARCIAL DE PPAR γ	31
2 OBJETIVOS	36
2.1 OBJETIVO GERAL	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3 MÉTODOS	37
3.1 CULTURA DE CÉLULAS:	37
3.2 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO DE PRÉ-ADIPÓCITOS 3T3-L1	37
3.3 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE COCULTURA MACRÓFAGOS-ADIPÓCITOS	39
3.4 COCULTURA MACRÓFAGOS-ADIPÓCITOS	40
3.5 TRATAMENTOS	41
3.5.1 <i>Cocultura por Contato</i>	41
3.5.2 <i>Cocultura por Sistema Transwell</i>	42
3.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	43
3.6.1 <i>Extração de RNA</i>	43
3.6.2 <i>Análise de Pureza do RNA Total</i>	44
3.6.3 <i>Tratamento com DNase</i>	47
3.6.4 <i>Transcrição Reversa e Amplificação por PCR em Tempo Real (RT-PCR)</i>	47
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
4 RESULTADOS	50
4.1 QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE PUREZA	50

4.2 EFEITO DE AGONISTAS DE PPAR γ NA EXPRESSÃO RELATIVA DO RNAm DE GENES INFLAMATÓRIOS EM SISTEMA DE COCULTURA MACRÓFAGOS-ADIPÓCITOS POR CONTATO E TRANSWELL:	50
4.2.1 Efeito de Agonistas de PPAR γ na Expressão Relativa do RNAm da Il6 em Sistema de Cocultura por Contato de Macrófagos-Adipócitos.....	50
4.2.2 Efeito de Agonistas de PPAR γ na Expressão Relativa do RNAm da Il6 em Sistema de Cocultura Trasnwel de Macrófagos-Adipócitos	53
4.2.3 Efeito de Agonistas de PPAR γ na Expressão Relativa do RNAm do Tnfa em Sistema de Cocultura por Contato de Macrófagos-Adipócitos.....	54
4.3 EFEITO DE AGONISTAS DE PPAR γ NA EXPRESSÃO RELATIVA DO RNAm DE GENES ADIPOGÊNICOS EM SISTEMA DE COCULTURA MACRÓFAGOS-ADIPÓCITOS POR CONTATO E TRANSWELL	58
4.3.1 Efeito de Agonistas de PPAR γ na Expressão Relativa do RNAm da Fabp4 em Sistema de Cocultura por Contato de Macrófagos-Adipócitos.....	58
4.3.2 Efeito de Agonistas de PPAR γ na Expressão Relativa do RNAm da Fabp4 em Sistema de Cocultura Trasnwel de Macrófagos-Adipócitos:	61
4.3.3 Efeito de Agonistas de PPAR γ na Expressão Relativa do RNAm da Adiponectina (Adpn) em Sistema de Cocultura por Contato de Macrófagos-Adipócitos	62
4.3.4 Efeito de Agonistas de PPAR γ na Expressão Relativa do RNAm da Adpn em Sistema de Cocultura Trasnwel de Macrófagos-Adipócitos	66
4.3.5 Efeito de Agonistas de PPAR γ na Expressão Relativa do RNAm do Glut4 em Sistema de Cocultura por Contato de Macrófagos-Adipócitos.....	67
4.3.6 Efeito de Agonistas de PPAR γ na Expressão Relativa do RNAm do Glut4 em Sistema de Cocultura Trasnwel de Macrófagos-Adipócitos	71
5 DISCUSSÃO	73
6 CONCLUSÃO	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE, INFLAMAÇÃO E RESISTÊNCIA INSULÍNICA

É comprovado que a obesidade é uma doença que tem, cada vez mais, crescido e afetado a população mundial. De acordo com dados obtidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade no mundo praticamente triplicou desde 1975. Em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos, com idade superior a 18 anos, se encontraram em situação de sobrepeso, e, destes, 650 milhões com obesidade, representando assim 39% e 13% da população mundial, respectivamente. Dados do mesmo ano também apontaram altos números de crianças e adolescentes, com idades de 5 a 19 anos, apresentando sobrepeso ou obesidade, representando mais de 340 milhões de indivíduos (1).

O Índice de Massa Corporal (IMC) é a forma mais amplamente utilizada para se mensurar a obesidade. A OMS considera com sobrepeso uma pessoa que possui IMC maior ou igual a 25 e, obeso, o indivíduo que possui IMC maior ou igual a 30. Esse índice é calculado por meio da razão entre o peso corporal e a altura (1):

$$IMC = \frac{\text{peso corporal (Kg)}}{\text{altura (m)}}$$

A obesidade é considerada uma doença crônica, de fisiopatologia complexa e não totalmente compreendida. Possui uma etiologia variada, que pode depender de diversos fatores. Interações com o meio, pré-disposição genética e comportamento humano podem ser exemplos. O peso corporal não irá variar se a energia consumida for igual a energia gasta. Acredita-se que, no caso da obesidade, ocorre um desequilíbrio positivo entre esse consumo e gasto de energia, no qual a energia consumida se torna maior do que a que é perdida pelo corpo (2,3).

O fato de a obesidade hoje ser considerada um importante problema de saúde não é apenas devido ao aumento de sua incidência, mas também pelo fato de estar fortemente relacionada com a síndrome metabólica, condição esta que é associada com estados pró-inflamatórios e caracterizada por hiperglicemia, obesidade abdominal, hipertensão, elevação de triglicerídeos no plasma e redução dos níveis de colesterol HDL no plasma. Indivíduos com síndrome metabólica possuem maiores riscos de desenvolver Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2), dislipidemia

e hipertensão arterial sistêmica (HAS). O desbalanço do tecido adiposo e a inflamação foram identificados como os principais causadores desses distúrbios. Além disso, cada uma dessas doenças, por sua vez, associa-se ao aumento dos riscos de aterosclerose e doença cardiovascular (figura 1), as principais causas de mortalidade em vários países (2,4–6).

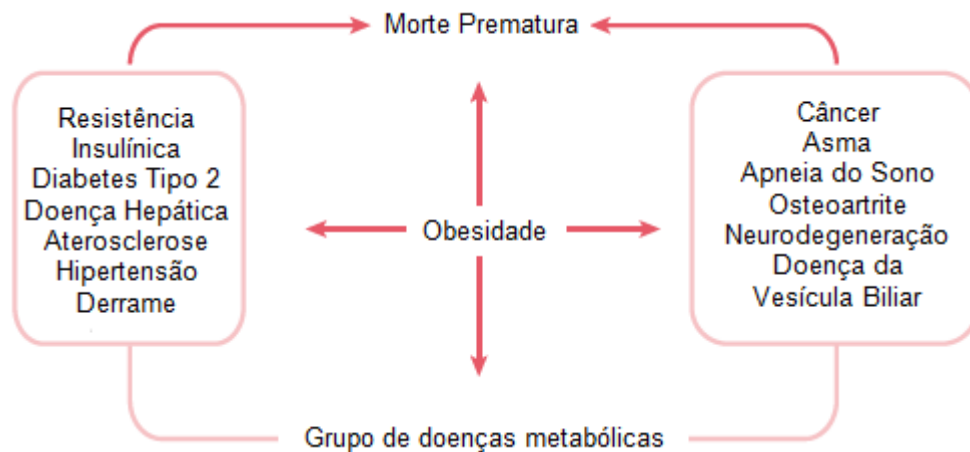


Figura 1 Doenças relacionadas com a Síndrome Metabólica (Adaptado de 6).

O tecido adiposo é composto de adipócitos maduros, uma matriz extracelular (MEC), tecidos vasculares e neurais e uma variedade de outros tipos celulares, os quais incluem pré-adipócitos, fibroblastos e células-tronco mesenquimais. Além disso, quase todas as células imunes já foram encontradas nesse tecido, como macrófagos, mastócitos, monócitos, células dendríticas, células *natural killer*, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos B e T (5,8). Ele é 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 (9).

Os macrófagos são as células do sistema imune que estão em maior quantidade no tecido adiposo. Estudos mostraram que os neutrófilos e as células *natural killer*, por sua vez, medeiam a resistência à insulina em camundongos em resposta à uma dieta rica em gordura. Além disso, estas últimas ainda promovem a proliferação e auxiliam na polarização de macrófagos no tecido. Os linfócitos B contribuem para a inflamação local e sistêmica, devido à secreção de citocinas, produção de anticorpos e apresentação de antígenos às células T. Por fim, tanto os linfócitos T CD4+ quanto os linfócitos T CD8+ foram identificados no tecido adiposo,

onde regulam a inflamação local por meio da secreção de citocinas que influenciam na diferenciação e polarização dos macrófagos (8).

Os macrófagos do tecido adiposo são representados por 2 tipos principais: podem se apresentar tanto no perfil M1 quanto no perfil M2. O estado pró-inflamatório dos macrófagos é representado pelo perfil M1, sendo este estimulado pelo Interferon-gama (INF γ) e lipopolissacarídeo (LPS) e é o responsável pela secreção de citocinas, como fator de necrose tumoral α (TNF α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 (IL-1), e espécies reativas de oxigênio. Já o seu perfil M2 representa o estado anti-inflamatório, o qual é estimulado pela IL-4 e IL-3 e é o responsável pela secreção de mediadores anti-inflamatórios como IL-10, fator de crescimento transformante β (TGF β) e IL-4, por exemplo. A obesidade induz uma mudança fenotípica entre essas populações de macrófagos, fazendo com que ocorra uma troca do estado anti-inflamatório (M2) para o estado inflamatório (M1) (5). Isso acontece porque, conforme o tecido adiposo expande, a população de linfócitos T muda: ocorre uma diminuição das células T reguladoras e um aumento das células T CD4 $^{+}$ e T CD8 $^{+}$. Além disso, ainda há um declínio de citocinas e adipocinas anti-inflamatórias (8).

Nesse sentido, sabe-se hoje que o tecido adiposo produz ácidos graxos livres e vários mediadores inflamatórios implicados na fisiopatologia da obesidade. Isso é resultado do aumento desse tecido provocado pelo estado obeso, o que induz estresse mecânico, estresse do retículo endoplasmático e hipóxia nos adipócitos. Mas, apesar de os adipócitos serem uma fonte de citocinas pró-inflamatórias na obesidade, células como pré-adipócitos, macrófagos e células-tronco adiposas podem produzir níveis ainda mais altos dessas citocinas (5,7,10). Os adipócitos em processo de morte são cercados por macrófagos e o elevado número dessas células em seu perfil M1 no tecido adiposo branco obeso é a principal fonte de TNF α e IL-6 (figura 2). Ainda, as células B, que são recrutadas ao tecido, inibem linfócitos T regulatórios, colaborando ainda mais para a inflamação sistêmica acompanhada de níveis elevados de IL-6 e TNF α (10). Isso tudo, associado com a ativação de vias de sinalização inflamatórias nas células adiposas, contribuem para o desenvolvimento da resistência à insulina (7,11–13).

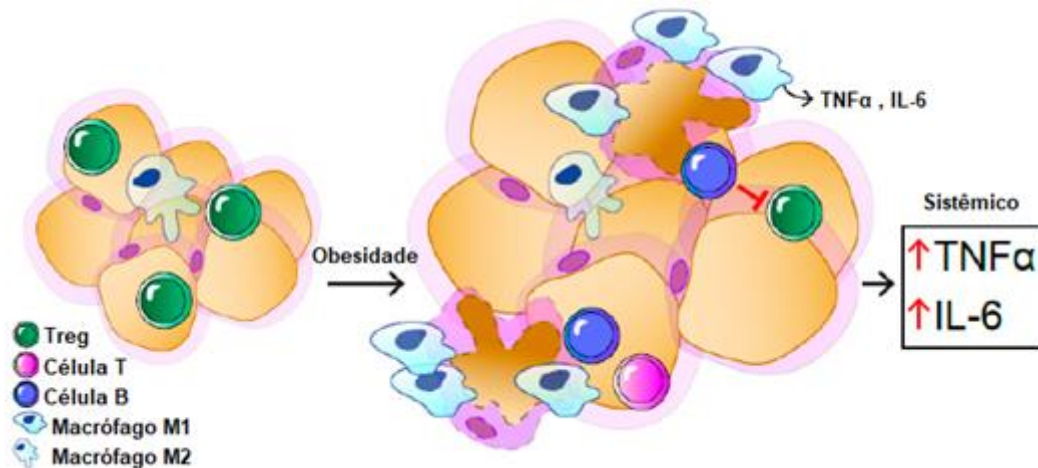


Figura 2 A inflamação sistêmica de baixo grau induzida pela obesidade (Adaptado de 10).

O aumento da proteína quimiotática para monócitos-1 (MCP-1), estimulada pela ativação de múltiplas vias sinalizadoras que são ativadas durante a hipertrofia dos adipócitos, é considerada um dos principais estímulos para o recrutamento de macrófagos no tecido adiposo (14). O trabalho desenvolvido por Lumeng e colaboradores (2007) ainda mostrou que os macrófagos diminuem os níveis de GLUT4, assim como inibem a ação da insulina em adipócitos (15). O GLUT4 é um transportador de glicose que elimina o excesso de glicose circulante, aumentando a sua captação pelo músculo e tecido adiposo em resposta à insulina. A insulina estimula o rápido recrutamento da proteína GLUT4, localizada intracelularmente, para a superfície da célula, provocando assim um aumento da atividade de transporte da glicose para o meio intracelular. Estados crônicos de deficiência de insulina regulam negativamente os níveis de expressão de GLUT4 (16). Estudos também sugerem que tanto o TNF α quanto a IL-6 estão associados com a diminuição da expressão do RNAm de *Glut4* no tecido adiposo e músculo esquelético e também com a redução do substrato 1 do receptor de insulina (IRS1) (11).

Diante disso, pode-se dizer que, no desenvolvimento da obesidade, a intercomunicação existente entre macrófagos e adipócitos é uma realidade. Nesse contexto, pacientes com sobrepeso apresentam resistência à insulina devido ao auxílio recebido de macrófagos. Por outro lado, o emagrecimento dos mesmos indivíduos está associado à redução tanto da infiltração dos macrófagos quanto da expressão de fatores relacionados à inflamação no tecido adiposo (5).

A ligação da insulina ao seu receptor, o receptor de insulina (IR), resulta na ativação da tirosina quinase IR intrínseca e na subsequente fosforilação do IRS1, o que leva à ativação da proteína quinase B (AKT). O $\text{TNF}\alpha$, que, como já dito anteriormente, está elevado na condição de obesidade, principalmente devido à sua estimulação pelos macrófagos, ativa a quinase c-JUN N terminal (JNK) e a I κ B quinase (IKK). As duas reduzem a sinalização de insulina por meio da fosforilação do IRS1 na serina 307. Ainda, a ativação do $\text{TNF}\alpha$ desencadeia a produção de ceramidas através da esfingomielina fosfodiesterase (SM). As ceramidas suprimem a fosforilação do IR inibindo assim a via de sinalização da insulina (figura 3). Já a IL-6, também aumentada na obesidade, liga-se ao seu receptor, o receptor de IL-6 (IL-6R), que recruta duas moléculas do receptor da glicoproteína 130 (GP130) a fim de ativar a janus quinase (JAK). A JAK fosforila resíduos de tirosina do receptor GP130 e, assim, induz a ativação do transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3), o que leva à expressão do regulador negativo da sinalização da IL-6, supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS3). Por fim, o SOCS3 desestabiliza o IRS1, diminuindo assim ação da insulina (figura 3) (10).

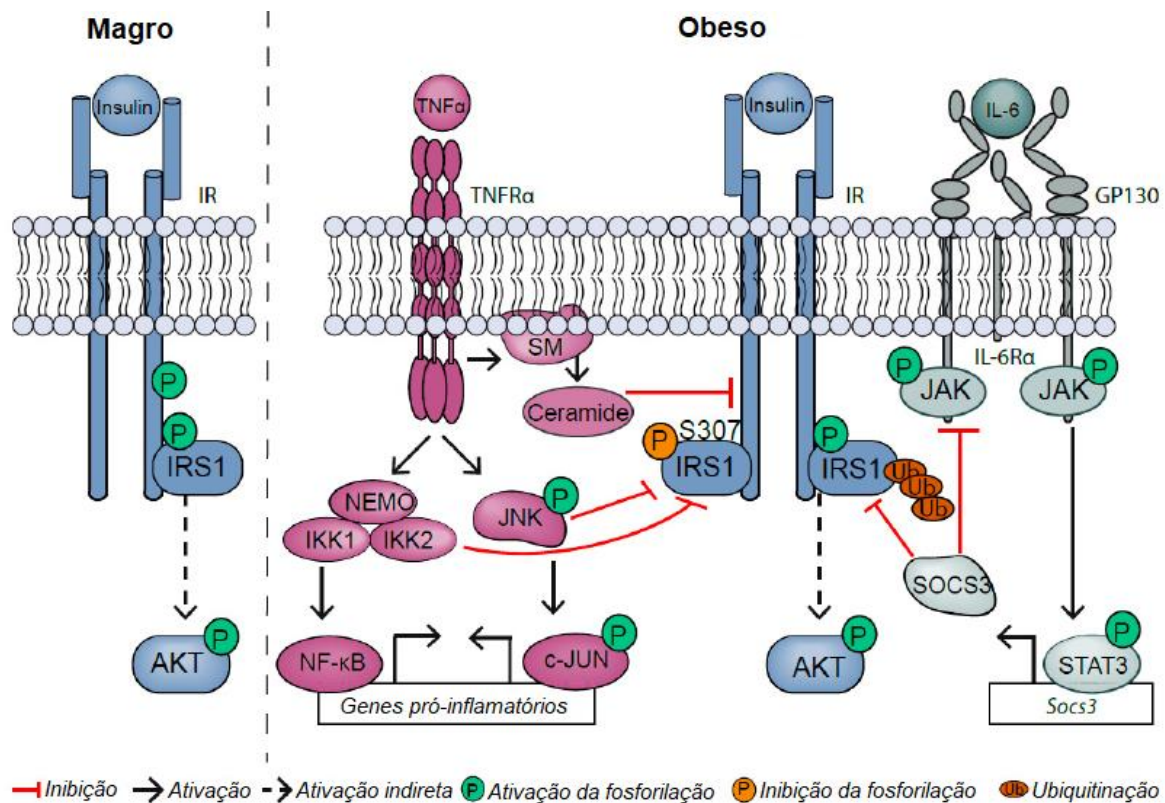


Figura 3 A inflamação induzida pela obesidade causa resistência à insulina (Adaptado de 10).

Em contraste com o aumento da produção de mediadores inflamatórios, a síntese de adipocinas anti-inflamatórias, como é o caso da adiponectina, diminui na condição da inflamação induzida pela obesidade. A adiponectina é a mais conhecida e mais abundante adipocina encontrada no soro humano e é um dos fatores secretados por adipócitos mais extensivamente estudados. Seus efeitos são mediados pelos receptores AdipoR1 e AdipoR2, que ativam a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) em células imunes e tecidos. Ela possui propriedades anti-inflamatórias e atua por meio do bloqueio da ativação do NFκB e reduz citocinas pró-inflamatórias como TNFα, IL-6 e IL-18. A adiponectina ainda exerce um papel importante na adipogênese e sensibilidade insulínica por meio da via da AMPK, que promove a oxidação de ácidos graxos e a captação de glicose no músculo esquelético e no fígado (8,17).

Outra adipocina importante para o desenvolvimento da resistência insulínica é a proteína de ligação a ácidos graxos 4 (FABP4), também conhecida como aP2. Ela é expressa principalmente nos adipócitos e macrófagos e está envolvida na regulação do processo inflamatório e metabólico em células-alvo. A FABP4 é responsável por transportar ácidos graxos para várias organelas na célula, como a mitocôndria, peroxissomo, retículo endoplasmático e núcleo. A expressão da FABP4 é induzida durante a diferenciação de adipócitos e é transcricionalmente controlada por agonistas de PPAR, ácidos graxos, insulina e dexametasona. Também é induzida durante a diferenciação de monócitos em macrófagos e pelo tratamento com LPS (18).

A resistência à insulina é um estado patológico em que as células alvo no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo não respondem de forma adequada à insulina, o que resulta em sua incapacidade de captar e metabolizar glicose de forma eficaz (19,20). Além disso, este estado pode prejudicar a capacidade das ilhotas pancreáticas de sintetizar e secretar insulina suficiente para atender às necessidades metabólicas do corpo. Dentre as manifestações clínicas que a resistência à insulina pode apresentar é possível citar: hiperinsulinemia, hiperglicemia, hiperlipidemia, aumento dos níveis de marcadores inflamatórios circulantes e diminuição dos níveis de adiponectina plasmática (19).

Essa resistência insulínica é o defeito primário que leva ao diabetes do tipo 2. A OMS estima que, em 2014, 422 milhões de adultos estavam vivendo com diabetes no mundo. O número quase que quadruplicou em comparação a 1980, em que se

tinham 108 milhões de indivíduos com a doença. A prevalência do diabetes aumentou de 4,7% para 8,5% nesse período. Já com relação à mortalidade, o diabetes foi responsável por 1,5 milhão de mortes em 2019, sendo que 48% destas foram de pacientes com idades abaixo dos 70 anos. Apesar de não se conseguir distinguir essas estimativas entre os tipos de diabetes (do tipo 1 e do tipo 2), sabe-se que a maioria das pessoas afetadas com a doença possuem o diabetes do tipo 2 (21).

1.2 SISTEMAS DE COCULTURA

Como já mencionado, no tecido adiposo obeso, os adipócitos hipertróficos e hiperplásicos secretam várias citocinas inflamatórias. Dentre elas, a quimiocina MCP-1, que promove a infiltração de macrófagos no tecido. Conforme a obesidade progride, os macrófagos passam a ser os maiores produtores de quimiocinas e citocinas inflamatórias no tecido, e ainda ocorre uma mudança fenotípica entre essas células, fazendo com que os macrófagos passem do seu estado anti-inflamatório (M2) para o estado inflamatório (M1) (15,22–24). Portanto, as interações parácrinas e autócrinas entre adipócitos e macrófagos podem exacerbar a resposta inflamatória do tecido adiposo e o desenvolvimento da resistência insulínica. Além disso, os ácidos graxos livres liberados via lipólise no tecido adiposo são comumente elevados em indivíduos obesos e podem agravar distúrbios do tecido, aumentar as respostas inflamatórias e também induzir resistência à insulina (25,26).

Diante disso, podemos especular o *cross-talk* existente entre adipócitos e macrófagos como um mecanismo que agrava as alterações inflamatórias no tecido adiposo obeso. Uma forma de representar essa interação *in vitro* é por meio da cocultura dessas células. Estudos já demonstraram que o cultivo de macrófagos RAW 264.7 e pré-adipócitos 3T3-L1 diferenciados, em contato direto, foram capazes de aumentar a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias como MCP-1, TNF α e IL-6, assim como diminuir a expressão de adiponectina, citocina anti-inflamatória, sendo que a extensão das mudanças na expressão das citocinas foi dependente da duração da cocultura e do número de células RAW 264.7 utilizadas (26). Corroborando, Lu e colaboradores (2020) demonstraram que a cocultura por contato promoveu um grande aumento nos níveis de IL-6, TNF α e MCP-1 em comparação

ao cultivo dos macrófagos e adipócitos separados. Esse efeito ainda foi ampliado quando as células foram expostas a um estímulo inflamatório (27).

Além disso, estudos também já demonstraram que o cultivo de RAW 264.7 e 3T3-L1 por meio da cocultura em sistema *transwell*, ou seja, sistema no qual as células não entram em contato direto, mas são separadas por uma fina membrana, também foi capaz de induzir o aumento da expressão de MCP-1 e IL-6 em comparação ao cultivo separado das células. Tais resultados indicam que os adipócitos e os macrófagos se comunicam, pelo menos parcialmente, por meio de um mecanismo parácrino (26).

Suganami e colaboradores (2005) sugerem que os ácidos graxos livres, derivados de adipócitos, são um importante mediador parácrino de inflamação em macrófagos pelas seguintes razões: a liberação de ácidos graxos livres pelas células 3T3-L1 é aumentada quando em cocultura com as células RAW 264.7; TNF α aumenta a liberação de ácidos graxos livres pelas 3T3-L1 por meio da indução da lipólise; e os ácidos graxos saturados, como palmitato, podem aumentar a produção de TNF α , induzindo, assim, mudanças inflamatórias nas células RAW 264.7 (26).

Ainda, existem trabalhos que comparam os dois tipos de cocultura. Um exemplo é o trabalho de De Boer e colaboradores (2014) que demonstrou que a secreção de MCP-1 e IL-6 foi 1,5 vezes maior na cocultura por contato do que na cocultura por sistema *transwell*, sendo que as células foram cultivadas e tratadas sob as mesmas condições (28).

1.3 RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAIIS

Os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs) fazem parte de uma superfamília de receptores nucleares (RN), os quais, ao serem ativados por um ligante, promovem a transcrição gênica, regulando assim vários processos biológicos (29). De forma semelhante aos demais receptores nucleares, 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 (30). Nesses mecanismos de regulação da expressão gênica estão envolvidas moléculas chamadas de cofatores, as quais são proteínas que podem tanto reprimir (correpressores) como aumentar (coativadores) a atividade

transcricional do receptor nuclear, por meio da conexão de fatores de transcrição ao processo e ao modificar a estrutura da cromatina do DNA (31).

A transativação se caracteriza pela ativação da transcrição gênica de maneira ligante dependente (figura 4). Os ligantes podem ser sintéticos ou endógenos e, após ativação, formam heterodímeros com o receptor X retinóide (RXR) e se ligam à sequências específicas de reconhecimento, chamados elementos responsivos do receptor ativado por proliferadores peroxissomais (PPRE), na região reguladora gênica dos genes-alvo. Essa ligação propicia a dissociação dos correpressores e o recrutamento do complexo de coativadores nucleares (NCoA), os quais modificam a estrutura da cromatina do DNA, permitindo assim a montagem da maquinaria transcricional e consequentemente a transcrição gênica (32).

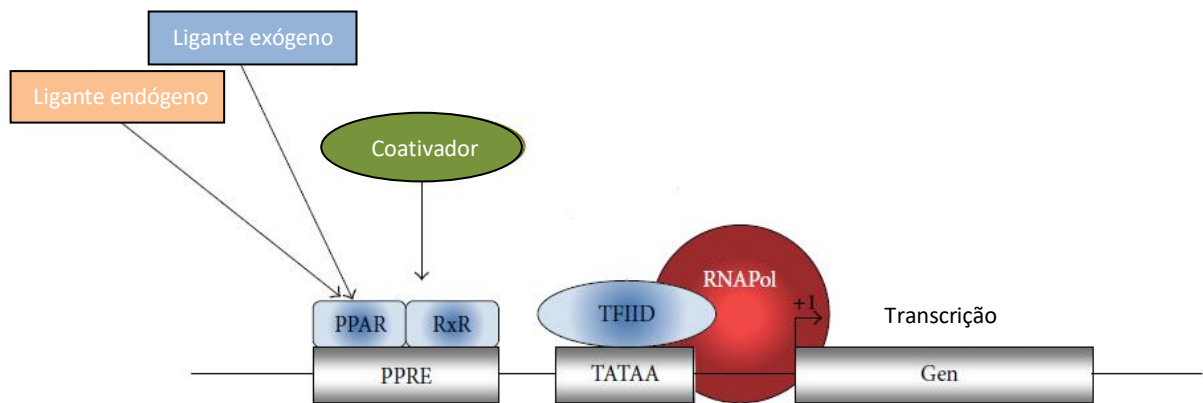


Figura 4 Mecanismo de ativação da transcrição gênica (Adaptado de 12).

A transrepressão também ocorre por meio da ligação do ligante ao PPAR, mas nesse caso de uma maneira PPRE-independente. Embora pouco compreendida, diversos mecanismos são propostos para explicar a transrepressão (figura 5), tais como (A) a interação do PPAR com fatores de transcrição relacionados com atividade inflamatória, tais como NFκB, que causam interferência na ligação do receptor com elementos responsivos nos genes alvos; (B) competição por coativadores; (C) inibição da liberação dos correpressores; (D) indução da expressão de fatores de transcrição repressores, como o IκBα; (E) regulação da atividade da quinase por interação direta.

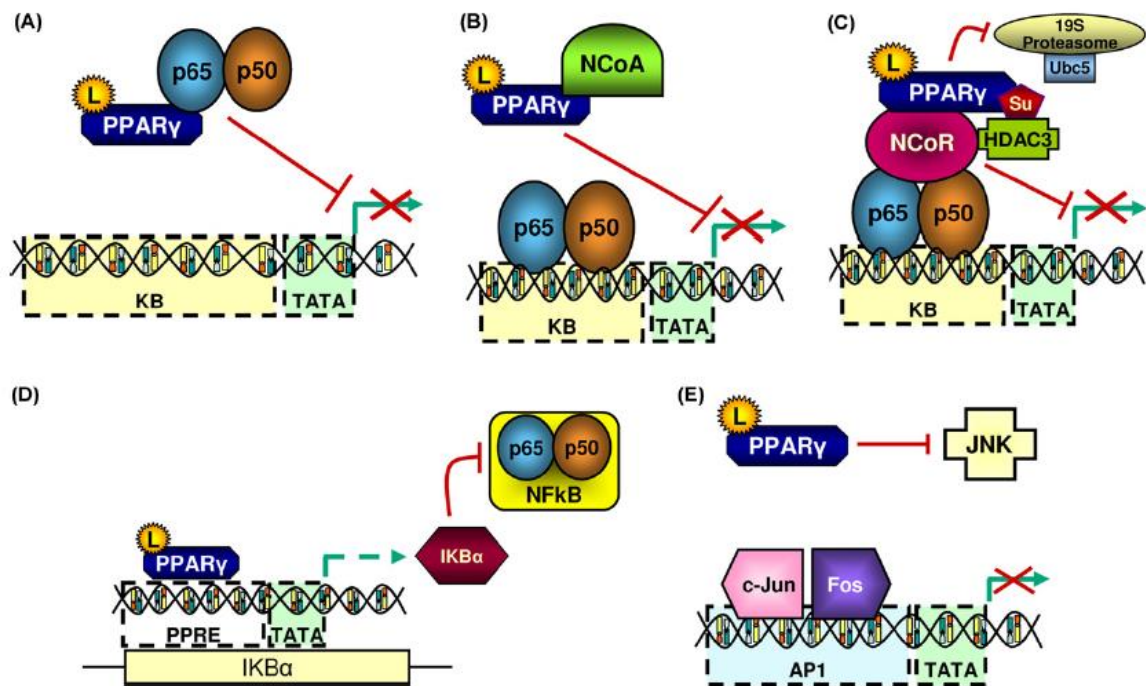


Figura 5 Mecanismos de repressão de transcrição de genes (32).

Por outro lado, a repressão basal acontece independente da ligação do PPAR com o ligante. O heterodímero PPAR-RXR se liga ao PPRE nos genes responsivos e promove o recrutamento de complexos de corepressores, inibindo dessa forma a transcrição. Essas proteínas corepressoras, como o corepressor de RN (NOCR) e as desacetilases de histonas (HDAC), mantêm a cromatina em sua forma enovelada, impedindo, assim, as atividades da maquinaria transcritora e dos complexos coativadores, resultando em uma repressão ativa da expressão gênica (32,33).

Os receptores PPARs são compostos por 4 domínios: A/B, C, D e E/F (figura 6). O domínio A/B se encontra na porção N-terminal do receptor; nele encontra-se a função 1 de ativação (AF-1), a qual é independente de ligante e é responsável pela fosforilação do PPAR. O domínio C, também chamado de domínio de ligação ao DNA (DBD), é onde ocorre a ligação com o PPRE na região promotora dos genes alvos. Já o domínio D (ou co-FBD) serve como sítio de acoplamento de cofatores. Por fim, o domínio E/F, ou domínio de ligação com o ligante (LBD), é onde está localizada a função ativadora 2 dependente de ligante e é o responsável por promover a ativação do PPAR ligado ao PPRE, consequentemente aumentando a expressão gênica (29).



Figura 6 Representação esquemática dos domínios funcionais dos PPARs (29).

Com o tempo se descobriu que os PPARs representam uma família de 3 receptores: PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ , sendo que todas as isoformas exercem suas funções principalmente por meio da transcrição gênica. Dessa forma, eles são capazes de regular uma variedade de genes, estando envolvidos na regulação metabólica de glicose e lipídeos, na homeostase, na adipogênese, sensibilidade insulínica, resposta imune, crescimento celular e diferenciação (29).

O PPAR α é encontrado principalmente no fígado, e está presente em uma quantidade menor no coração e músculo esquelético, tecidos com altos índices de catabolismo de ácidos graxos. Dessa forma, esse receptor possui um papel fundamental na regulação do catabolismo de ácidos graxos uma vez que regula a oxidação desses ácidos por meio do controle da expressão de enzimas na via de β -oxidação (34,35). Este receptor possui como ligantes endógenos ácidos graxos de cadeia longa, enquanto que de forma não natural possuem como agonistas os fibratos, os quais são utilizados como medicamentos antilipidêmicos (31).

Já o PPAR β/δ é expresso na maioria dos tipos celulares, sendo que foram demonstradas funções importantes relacionadas a esse receptor em tecidos como: músculo esquelético, tecido adiposo, pele, estômago e cérebro. Entretanto, ainda é importante dizer que esse isotipo foi encontrado no fígado, rim e intestino, tecidos esses envolvidos com aspectos do metabolismo lipídico (31,36). A respeito disso, o PPAR β/δ participa da homeostasia lipídica, regulação da oxidação de ácidos graxos, inflamação e equilíbrio de colesterol e glicose plasmáticos. Por outro lado, sua expressão também pode estar relacionada com resultados desfavoráveis de vários cânceres, mas os dados ainda são inconclusivos e contraditórios e por isso não se sabe claramente o papel desse receptor no processo carcinogênico (37). Diferentemente dos outros isotipos, não se conhece sobre ligantes seletivos para esse receptor (9)(38).

Por último, o PPAR γ é o receptor mais estudado da família dos PPARs. Ele possui papel importante em vários tecidos metabólicos, sendo expresso no tecido adiposo branco e marrom, intestino grosso e baço, manifestando-se também na placenta e em macrófagos. Porém, sua expressão é mais pronunciada nos

adipócitos, onde atua na regulação da adipogênese, balanço energético e biosíntese lipídica. Esse receptor ainda possui ação como sensibilizador insulínico, sendo por isso alvo de medicamentos antidiabéticos conhecidos como tiazolidinedionas (TZDs) (39,40).

1.4 RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADOR DE PEROXISSOMA GAMA (PPAR γ)

O PPAR γ possui 3 isoformas diferentes: PPAR γ 1, PPAR γ 2 e PPAR γ 3. As proteínas produzidas pelo RNA mensageiro do PPAR γ 1 e PPAR γ 3 são idênticas, enquanto a proteína formada pelo PPAR γ 2 possui 30 aminoácidos a mais na sua porção amino terminal. Todas as isoformas desse receptor desempenham importante papel na diferenciação de adipócitos e no metabolismo de glicose, mas são expressos de forma diferente no corpo. O PPAR γ 1 pode ser encontrado em diferentes tecidos, sendo expresso em praticamente quase todos os tipos celulares, principalmente em células inflamatórias, como macrófagos, linfócitos e células dendríticas. Já a expressão do PPAR γ 2 e do PPAR γ 3 é quase que exclusiva dos adipócitos (39,41). Tanto PPAR γ 1 quanto PPAR γ 2 são fundamentais para o desenvolvimento do tecido adiposo e controle da sensibilidade insulínica. No entanto, PPAR γ 2 é a isoforma regulada em resposta à ingestão de nutrientes e à obesidade (39).

Atualmente, sabe-se que o PPAR γ desempenha um papel fundamental na diferenciação de células adiposas. Quando esse receptor é ativado, estimula todo um processo de diferenciação nos fibroblastos, o que inclui mudanças morfológicas, acúmulo de lipídeos e a expressão de genes característicos dos adipócitos (42). Estudos já demonstraram a atuação do PPAR γ tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Em cultura de pré-adipócitos, a diferenciação foi observada na presença de agonistas de PPAR γ . O receptor foi expresso no início da adipogênese e levou a um aumento de fatores de transcrição como C/EBP β e C/EBP δ (43–45). Ainda, em experimentos com ratos quiméricos, foi demonstrado o quanto o PPAR γ é essencial para a diferenciação de adipócitos (46).

O PPAR γ que está presente em macrófagos possui sua expressão induzida rapidamente após a diferenciação de monócitos em macrófagos (47,48). Esses receptores induzem uma regulação negativa de uma grande quantidade de genes

inflamatórios nessas células. Sendo assim, é de se esperar que sua depleção faça cessar essa repressão das vias inflamatórias intracelulares dos macrófagos (49). Já foram reportados estudos nos quais o uso de agonistas de PPAR γ foram capazes de inibir citocinas pró-inflamatórias, como TNF α , IL-6 e interleucina 1 beta (IL-1 β) (50).

Essa capacidade do PPAR γ de bloquear a expressão de genes pró-inflamatórios pode ser por diferentes meios, sendo que o principal é antagonizando cascatas de sinalização. Ele pode regular negativamente fatores de transcrição através da eliminação de coativadores transcricionais como o elemento responsivo ligado à proteína monofosfato cíclico de adenosina (CREB) ou o coativador-1 do receptor de esteroide, por exemplo (51). Por outro lado, estudos já demonstraram que o PPAR γ é direcionado para os complexos corepressores de histona desacetilase-3 do receptor nuclear em resposta a SUMOilação dependente de ligante (52), protegendo assim esse complexo da degradação proteossomal, sendo que, normalmente, a histona desacetilase-3 remove o complexo corepressor, o que provoca a expressão dos genes pró-inflamatórios. Além disso, o PPAR γ reprime a ativação da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK), o que faz com que os fatores de transcrição sejam mantidos sem fosforilação e, conseqüentemente, inativos (53).

1.5 AGONISTAS TOTAL E PARCIAL DE PPAR γ

O receptor nuclear PPAR γ possui ligantes naturais, os agonistas endógenos, que podem ser divididos em: eicosanóides e prostaglandinas, ácidos graxos insaturados, nitroalcanos e fosfolipídios oxidados. Dentre eles, o principal é a ciclopentenona prostaglandina 15-deoxi Δ 12-14-prostaglandina-J2 (15d-PGJ2). Já os ligantes sintéticos, agonistas farmacológicos, podem ser divididos em: família tiazolidinediona (TZDs), agonistas não-TZDs, moduladores seletivos de PPAR γ , agonistas duplos α/γ e agonistas pan $\alpha/\delta/\gamma$. Esses fármacos são usados principalmente no tratamento do Diabetes Mellitus do tipo 2 (41).

As TZDs são agonistas totais de PPAR γ e têm sido utilizadas no tratamento da hiperglicemia desde 1997, podendo ser usadas tanto em monoterapia quanto em combinação com outros agentes anti-hiperglicemiantes. Ao se ligarem no receptor nuclear, funcionam como sensibilizadores insulínicos, aumentando a absorção de glicose, principalmente no tecido adiposo. Esse efeito pode ser explicado: por

alterarem a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico e consequentemente promoverem a absorção e o armazenamento de ácidos graxos no tecido adiposo, uma vez que existe uma correlação entre altos níveis de ácidos graxos livres e resistência à insulina; por inibirem a expressão de genes pró-inflamatórios e como resultado diminuir a produção de citocinas envolvidas com a inflamação, as quais induzem resistência insulínica; e por aumentarem a produção de adiponectina, produto secretório do adipócito, que foi observado estar associado tanto com o aumento da oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético quanto com a melhora da glicemia em ratos diabéticos (54,55).

Porém, além desses mecanismos genômicos dos agonistas de PPAR γ , alguns ligantes demonstraram efeitos mesmo na ausência do receptor (em modelos de siRNA e de gene *knockout*), o que sugere a existência de receptores distintos também capazes de responder a esses agonistas (32). Um exemplo seria o receptor acoplado a proteína G 40 (GPR40), um receptor de membrana associado à secreção de insulina induzida por ácidos graxos livres e glicose. Estudos demonstraram que as TZDs possuem potencial para se ligarem e ativarem esse receptor, produzindo efeitos que se sobrepõem aos do PPAR γ (56–62). Ainda, efeitos deletérios das TZDs podem se dever ao fato de se ligarem a esse receptor, mas essa informação ainda é controversa. A apoptose de osteoblastos e osteócitos, induzida por TZD, tem sido diretamente ligada ao GPR40. Por outro lado, o agonista de GPR40, GW9508, que bloqueia a diferenciação de osteoclastos *in vitro*, mostrou prevenir a perda óssea induzida por ovariectomia em camundongos *wildtype*, mas não em camundongos GPR40 *knockout* (63).

Apesar dos efeitos anti-hiperglicemiante e anti-inflamatório das TZDs estarem bem estabelecidos, a sua utilização tem sido associada a vários efeitos adversos. O principal deles é o aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares, como infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, parada cardíaca, derrames, entre outros. Por esse motivo, em 2010, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) cancelou o registro de medicamentos contendo rosiglitazona (64). Ainda, as TZDs podem provocar: ganho de peso, retenção hídrica, risco de fraturas ósseas e aumento da incidência de câncer de bexiga (65).

A fim de solucionar os problemas associados às TZDs, foram conduzidas investigações para o desenvolvimento de agonistas parciais de PPAR γ . Um agonista parcial tem uma atividade intrínseca mais baixa em um receptor em comparação a

um agonista completo, sendo assim, não produzirão a mesma extensão da resposta biológica que um agonista completo quando ligado ao receptor (66). Os agonistas parciais de PPAR γ surgiram como estratégia terapêutica, pois eles mantêm os efeitos benéficos das TZDs como sensibilizadores insulínicos, porém sem apresentar os efeitos colaterais indesejados, devido à sua incapacidade de ativar totalmente o receptor (67).

Vários agonistas parciais de PPAR γ foram identificados, em estudos pré-clínicos, como tendo eficácia antidiabética e toxicidade reduzida. Como exemplo, é possível citar o estudo de Hou e colaboradores (2018) no qual é demonstrado que o tratamento de camundongos com CMHX008, agonista parcial de PPAR γ , resultou no aumento da sensibilização insulínica comparáveis aos da rosiglitazona, porém com um menor risco de perda óssea (68). INT131 é outro composto que foi identificado como um potente agonista parcial de PPAR γ que mostrou diminuir fortemente os níveis de glicose em modelos de roedores com diabetes mellitus. INT131 ainda exibiu diminuição dos efeitos adversos em comparação à rosiglitazona – os ratos tratados com o agonista parcial apresentaram menor ganho de peso corporal, ganho de peso cardíaco e ganho de peso pulmonar em comparação aos tratados com rosiglitazona, sugerindo que INT131 reduz a retenção de líquidos (69). E, recentemente, um derivado de tetrazol, KY-903, demonstrou atuar como agonista parcial de PPAR γ com similar eficácia, porém com menos efeitos adversos, em comparação à pioglitazona. KY-903 apresentou menor ganho de peso corporal e menor perda óssea quando comparado ao agonista total, uma vez que aumentou os níveis de adiponectina sem causar diferenciação de adipócitos (70).

O mecanismo no qual esses agonistas parciais possuem poder sensibilizador insulínico comparáveis aos de agonistas totais pode ser explicado pelo estudo de Choi e colaboradores (2010), o qual demonstrou que a fosforilação do PPAR γ no resíduo de Ser273 possui relação com a obesidade e resistência insulínica, uma vez que resulta na desregulação de genes-alvo, como a adiponectina. Além disso sugeriu que tanto as TZDs quanto os agonistas parciais melhoravam a sensibilidade insulínica principalmente pela inibição da fosforilação do PPAR γ mediada por Cdk5 na Ser273 (71). Ainda, agonistas parciais parecem possuir um recrutamento diferencial de coreguladores, levando a uma mudança na expressão de genes em comparação aos agonistas totais (72).

A busca por moduladores seletivos de PPAR γ levou ao desenvolvimento de vários compostos sintéticos, dentre eles o GQ-16 (figura 7). Estudos demonstraram que esse ligante apresenta atividade específica para PPAR γ , não sendo capaz de ativar outros subtipos do receptor, e que ele atua como um agonista parcial fraco em comparação à rosiglitazona. Ainda, em estudos realizados com ratos submetidos a uma dieta rica em gordura, o agonista parcial mostrou aumentar a fosforilação do receptor de insulina (substrato do receptor de insulina 1, IRS-1) no tecido adiposo, fígado e músculo, além de conseguir bloquear efeitos inflamatórios relacionados com a resistência insulínica, de forma equivalente à rosiglitazona, porém, sem induzir o ganho de peso provocado pela TZD (73).

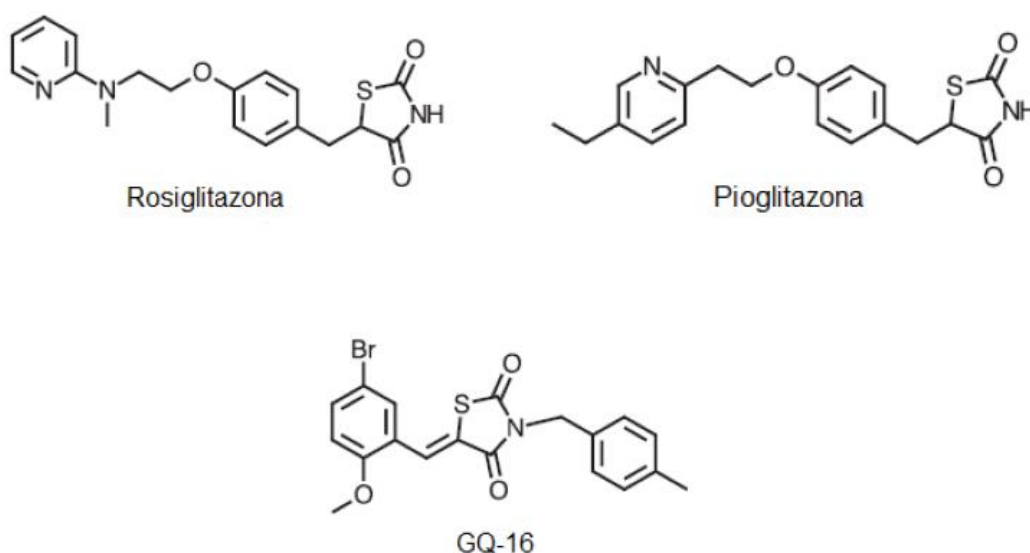


Figura 7 Estrutura química do GQ-16 em comparação às TZDs rosiglitazona e pioglitazona (73).

Esse novo composto sintético, QG-16, mostrou resultados promissores nos estudos realizados até o momento. Suas características de agonismo parcial/modulador seletivo e específico do PPAR γ , seu menor poder adipogênico em comparação à rosiglitazona e seus efeitos *in vivo* sugerem seu potencial terapêutico nas doenças metabólicas relacionadas à obesidade, DM2 e inflamação crônica. Contudo, algumas questões ainda necessitam melhor esclarecimento. Qual o mecanismo pelo qual o GQ-16 melhora a sensibilidade à insulina sem promover alguns dos efeitos colaterais como ganho de peso? Será que 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? É de suma importância compreender os mecanismos moleculares que levam ao aumento do recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo, pois poderia prevenir a inflamação induzida pela obesidade e consequentemente a resistência à insulina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos anti-inflamatórios e adipogênicos do agonista total e parcial do PPAR γ , rosiglitazona e GQ-16, respectivamente, sobre as respostas inflamatória e adipogênica em dois tipos de sistema de cocultura de macrófagos-adipócitos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar os efeitos do GQ-16 e rosiglitazona na expressão de genes inflamatórios na cocultura por contato e na cocultura *transwell*;
- Investigar os efeitos do GQ-16 e rosiglitazona na expressão de genes adipogênicos em adipócitos diferenciados em 2 sistemas de cocultura;
- Estudar se há diferença na expressão de genes inflamatórios e adipogênicos entre o controle e a cocultura por contato.

3 MÉTODOS

3.1 CULTURA DE CÉLULAS:

Macrófagos murinos RAW 264.7 foram cultivados em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contendo 2 nM de glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB), em placas para cultura de tecidos de 150 mm. As células foram mantidas em incubadora a 37°C e com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado dia sim, dia não. Ao atingirem confluência, as células foram plaqueadas em placa de 6 poços, com 5x10⁵ células/poço.

Pré-adipócitos murinos 3T3-L1 foram cultivados em meio de cultura DMEM contendo 2 nM de glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro neonatal bovino (SNB), em placas para cultura de tecidos de 150 mm. As culturas celulares foram mantidas em incubadora a 37°C e com 5% de CO₂. Ao atingirem 75% de confluência, as células foram plaqueadas em placa de 6 poços, com 4,8x10⁴ células/poço.

3.2 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO DE PRÉ-ADIPÓCITOS 3T3-L1

Pré-adipócitos 3T3-L1 foram cultivados em meio de cultura DMEM contendo 2 nM de glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 10% de SNB até sua confluência. Dois dias depois (D0), foram tratados com coquetel indutor de diferenciação, contendo 500 µM de IMBX, 5 µg/mL de insulina e 1 µM de dexametasona durante mais dois dias (D2). Nesse período foi realizada a troca do meio de cultura para DMEM com SFB. Em seguida, foram tratados com 5µg/mL de insulina por mais 12 dias (figura 8).

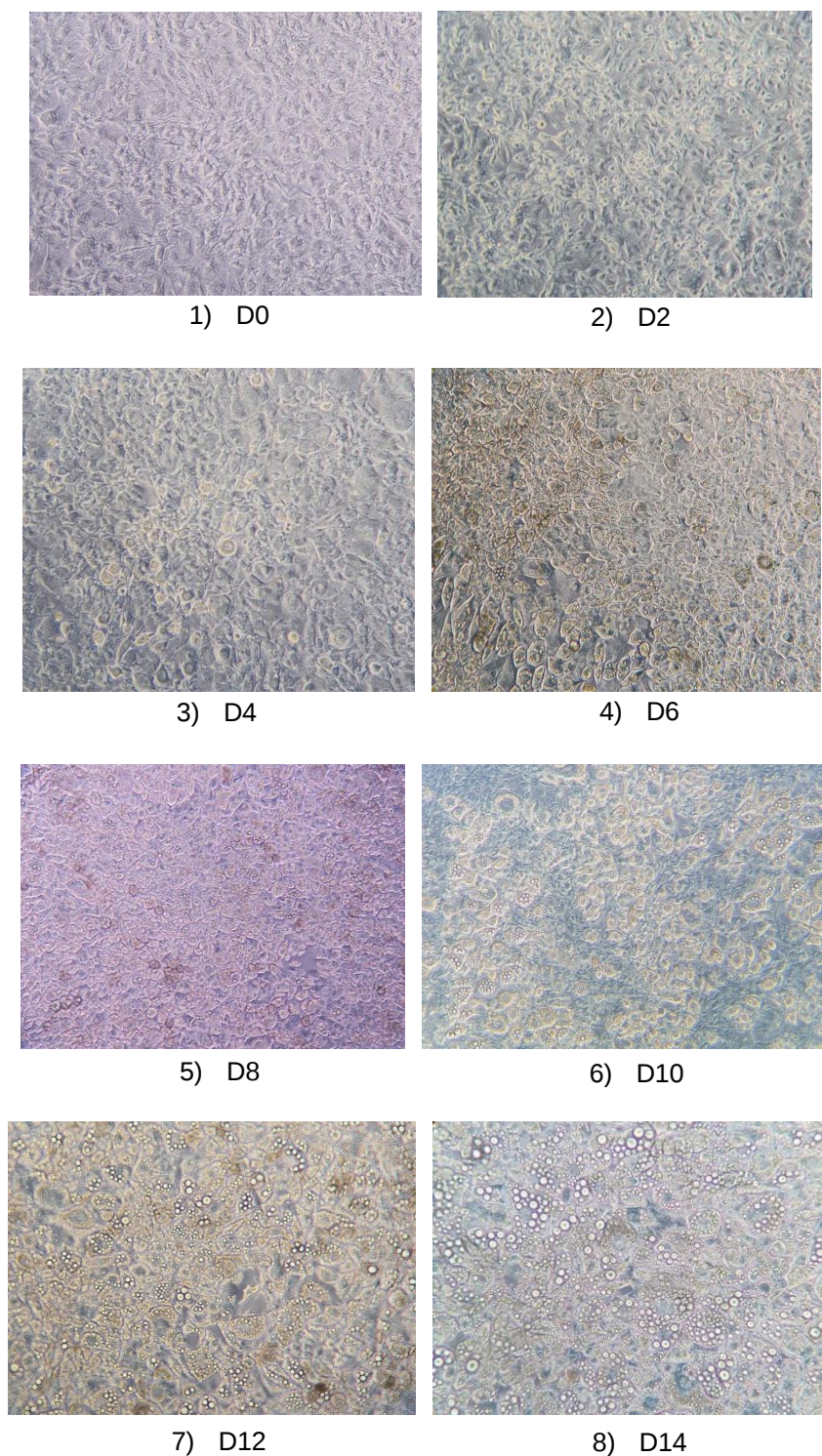


Figura 8 Ensaio de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1. Pré-adipócitos 3T3-L1 foram cultivados em meio de cultura DMEM contendo 2 nM de glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 10% de SNB até sua confluência (D-2). Dois dias depois, foram tratados com coquetel indutor de diferenciação (D0), contendo 500 µM de IMBX, 5 µg/mL de insulina e 1 µM de dexametasona durante mais dois dias (D2). Nesse período foi realizada a troca do meio de cultura para DMEM com SFB. Em seguida, foram tratados com 5 µg/mL de insulina por mais 12 dias.

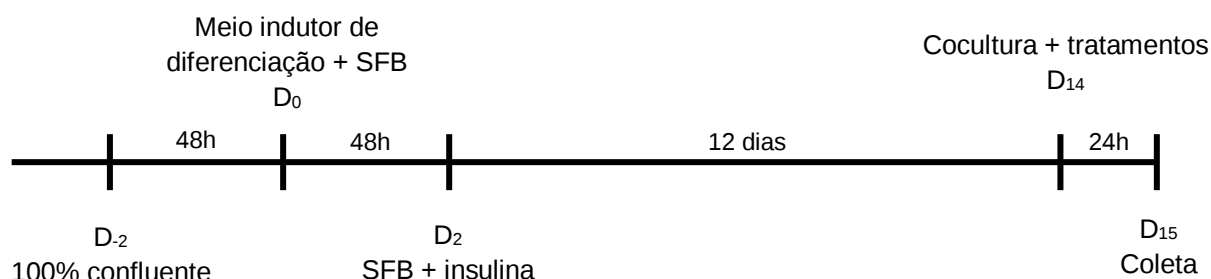


Figura 9 Desenho esquemático dos dias da diferenciação de adipócitos e realização da cocultura.

3.3 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE COCULTURA MACRÓFAGOS-ADIPÓCITOS

Para a padronização do método, intensa pesquisa foi realizada a fim de se determinar pontos como: quantidade de células a se utilizar; tempo de realização da cocultura; tempo de tratamento com o estímulo inflamatório; momento de adição dos agonistas; como realizar o experimento-controle.

Muitos artigos analisados não descrevem a quantidade de macrófagos adicionados sobre os adipócitos e, aqueles que descrevem, muitas vezes não informam o tipo de placa de cultura celular utilizada. Diante disso, foi um desafio determinar a quantidade de células RAW 264.7 que seriam adicionadas na cocultura. A princípio, foram utilizadas 1×10^5 células/poço, conforme descrito no trabalho de Suganami e colaboradores (2005) (26), entretanto, essa quantidade não se mostrou suficiente para a quantificação do RNA total das amostras. Em consequência disso, aumentou-se para o dobro a quantidade de macrófagos utilizados na cocultura (2×10^5 células/poço).

O tratamento dos macrófagos com o LPS foi realizado por 24 horas, conforme estudos anteriores (74). Apesar de haver trabalhos que realizaram o tratamento com o LPS por 48 horas na cocultura entre macrófagos e adipócitos (75,76), também existem estudos que mostram a capacidade do LPS em aumentar o processo inflamatório em menores tempos, como em 6 horas de tratamento (77).

Para a realização dos tratamentos, foram analisados estudos que os adicionaram antes da cocultura (78), no mesmo momento da execução da cocultura (79–81), ou ainda após algum tempo de incubação da cocultura (27,75,77,82,83).

Por fim, foi escolhido adicionar os tratamentos com os agonistas de PPAR γ no mesmo instante em que se realizou a cocultura entre as células.

Após decidir por adicionar os tratamentos no mesmo momento da cocultura, surgiu o questionamento de por quanto tempo incubar as células. Muitos artigos relatam manter a cocultura em incubação por 48 horas (26,75,76,80). Porém, como para a realização do tratamento é utilizado meio DMEM sem soro, as células 3T3-L1 já diferenciadas não aguentariam permanecer na placa por muitos dias sem a presença do soro e por isso foi escolhido realizar a incubação da cocultura por 24 horas, conforme artigos anteriores (77–79,83).

Ainda, para a execução do experimento-controle, foi observado que era feito o cultivo separado dos macrófagos e adipócitos, nas mesmas condições e sob os mesmos tratamentos feitos na cocultura, e apenas no momento da coleta que essas células eram unidas. Porém, por descuido, se pensou que o experimento-controle para os dois tipos de cocultura eram realizados da mesma forma, quando na verdade, para o controle da cocultura *transwell* deve ser apenas do cultivo dos adipócitos, já que apenas os adipócitos dessa cocultura que são coletados, uma vez que a membrana onde se encontram os macrófagos nesse sistema não suporta a adição do Trizol. Diante desse equívoco, não foi possível obter resultados verdadeiros com relação ao controle da cocultura *transwell* e nem realizar a comparação da interação parácrina entre as células com o cultivo separado dos adipócitos.

3.4 COCULTURA MACRÓFAGOS-ADIPÓCITOS

A cocultura de adipócitos 3T3-L1 diferenciados e macrófagos RAW 264.7 foi realizada de duas maneiras. Foi utilizado um sistema de cocultura *transwell* (Costar) em placas com membrana de poro 0,4 μ m que separa a câmara inferior contendo as células 3T3-L1 diferenciadas da câmara superior com as células RAW 264.7. O outro sistema foi pelo contato direto de adipócitos diferenciados e macrófagos.

A adição dos macrófagos (2×10^5 células/poço) (26), tanto no sistema por contato (figura 9A) quanto no sistema *transwell* (figura 9B), foi realizada no dia 14 de diferenciação dos adipócitos. Em seguida, as células receberam os tratamentos com os agonistas. Após 24 horas de tratamento, foram colhidas com Trizol para a extração do RNA (figura 10).

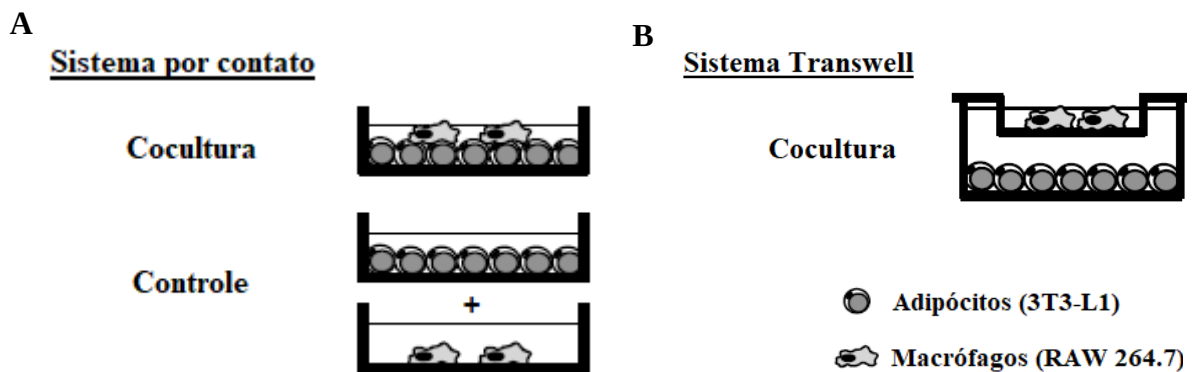


Figura 10 Esquema ilustrativo de sistema de cocultura por contato e *transwell* (Adaptado de 21).

3.5 TRATAMENTOS

Macrófagos RAW 264.7 foram estimulados com LPS (100 ng/mL) 24 horas antes da realização da cocultura. É possível observar pela figura 11 a diferença de coloração do meio de cultura (DMEM + SFB) quando na presença do estímulo inflamatório (Placa de Petri à direita).

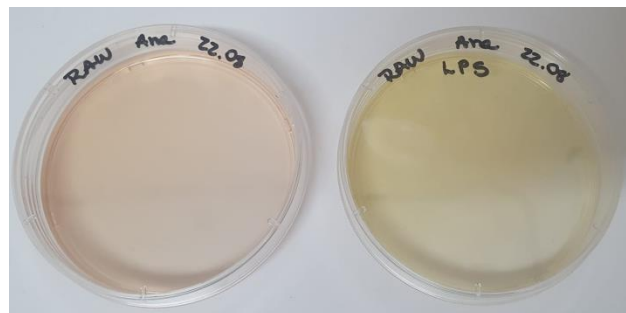


Figura 11 Tratamento de macrófagos RAW 264.7 com LPS por 24 horas.

3.5.1 Cocultura por Contato

Os macrófagos RAW 264.7, pré-tratados ou não com o LPS (100 ng/mL) por 24h, foram adicionados (2×10^5 células/poço) diretamente sobre os adipócitos 3T3-L1 no dia 14 de diferenciação destes, assim como descrito anteriormente, em meio DMEM sem soro fetal bovino. Em seguida, foram acrescentados os seguintes tratamentos por 24 horas:

- 1) Veículo (DMSO 0,01%).
- 2) Rosiglitazona (10^{-5} M).
- 3) GQ-16 (10^{-5} M).

- 4) Veículo (DMSO 0,01%) + LPS (100 ng/mL)
- 5) Rosiglitazona (10^{-5} M) + LPS (100 ng/mL).
- 6) GQ-16 (10^{-5} M) + LPS (100 ng/mL).

A placa de 6 poços com 3T3-L1 diferenciados e a placa de 6 poços com macrófagos RAW 264.7, cultivados isoladamente, foram utilizadas como controle interno. As células foram cultivadas pelo mesmo período e receberam os mesmos tratamentos que a cocultura (descritos acima). A concentração dos agonista escolhida para realização dos tratamentos foi baseada em estudos prévios (73). No momento da coleta, as células foram misturadas, sendo transferidas para o mesmo tubo do tipo eppendorf®.

3.5.2 Cocultura por Sistema Transwell

As células RAW 264.7, pré-tratados ou não com o LPS (100 ng/mL) por 24h, foram adicionadas em membrana de poro 0,4 μ m presente na câmara superior da placa do sistema *transwell* de cocultura (2×10^5 células/poço). Dessa forma, os macrófagos ficaram separados da câmara inferior que continha as células 3T3-L1 diferenciadas, em meio DMEM sem soro fetal bovino em ambas as câmaras. Em seguida, foram acrescentados os seguintes tratamentos, nas duas câmaras da placa, por 24 horas:

- 1) Veículo (DMSO 0,01%).
- 2) Rosiglitazona (10^{-5} M).
- 3) GQ-16 (10^{-5} M).
- 4) Veículo (DMSO 0,01%) + LPS (100 ng/mL)
- 5) Rosiglitazona (10^{-5} M) + LPS (100 ng/mL).
- 6) GQ-16 (10^{-5} M) + LPS (100 ng/mL).

A concentração dos agonista escolhida para realização dos tratamentos foi baseada em estudos prévios (73). Nesse tipo de sistema, apenas as células 3T3-L1, que estavam na câmara inferior da placa, foram coletadas.

3.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

3.6.1 Extração de RNA

A extração do RNA das células de adipócitos 3T3-L1 e das células de macrófagos RAW 264.7 foi realizada utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante. Em suma, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS, enquanto mantidas sobre gelo. Foi adicionado 1 mL de TRIzol® por poço nas células em cocultura e 500 µL de TRIzol® por poço nas células do controle interno, seguido de homogeneização com a ponteira, a fim de se 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® livres de RNase e mantidas acondicionadas em temperatura de -80 °C até o procedimento de extração. No caso do controle interno, os macrófagos e os adipócitos foram misturados no momento da coleta, sendo transferidos para o mesmo tubo do tipo eppendorf®.

Para a extração do RNA total, as suspensões de células foram descongeladas em gelo e posteriormente mantidas em temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio em cada amostra e em seguida as mesmas foram agitadas em agitador tipo vórtex por 15 segundos. Depois de 3 minutos descansando em temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a 14000 RPM por 15 minutos, a 4°C, para separação de fases. Formaram-se 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 para precipitação do RNA. As amostras foram então agitadas em vórtex por mais 15 segundos, seguido de incubação em temperatura ambiente por 10 minutos. Após incubação, centrifugou-se novamente os tubos a 14000 RPM por mais 10 minutos, a 4°C. Um *pellet* foi formado e cada tubo foi vertido em papel filtro para descarte do sobrenadante. Ao *pellet* foi adicionado 1 mL de etanol 75% (v/v), com temperatura entre 2 a 8°C, para posterior agitação em vórtex e centrifugação a 14000 RPM por 2 minutos, sendo essa sequência repetida por mais duas vezes. Após o último descarte do sobrenadante e a completa secagem do conteúdo do tubo, o *pellet* foi ressuspensionado entre 10 e 30 µL de água milli-Q estéril tratada com 0,1% (v/v) de dietilpirocarbonato (DEPC).

3.6.2 Análise de Pureza do RNA Total

A pureza das amostras de RNA total foi mensurada por espectrometria, utilizando o aparelho NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences, UK, EU). O grau de contaminação por proteínas foi obtido através da razão entre os comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. Razões entre 1,6 e 2,2 foram consideradas adequadas (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Quantificação e análise de pureza do RNA total de amostras da cocultura por contato

Amostra	Tratamento	Concentração	Pureza
COCULTURA POR CONTATO N1	Cocultura DMSO	0,144	1,905
	Cocultura ROSI	0,126	1,869
	Cocultura GQ	0,112	1,872
	Cocultura DMSO + LPS	0,119	1,874
	Cocultura ROSI + LPS	0,116	1,877
	Cocultura GQ + LPS	0,134	1,888
	3T3 + RAW DMSO	0,130	1,879
	3T3 + RAW ROSI	0,144	1,846
	3T3 + RAW GQ	0,132	1,849
	3T3 + RAW DMSO + LPS	0,141	1,848
	3T3 + RAW ROSI + LPS	0,146	1,853
	3T3 + RAW GQ + LPS	0,137	1,829
COCULTURA POR CONTATO N2	Cocultura DMSO	0,145	1,838
	Cocultura ROSI	0,143	1,850
	Cocultura GQ	0,132	1,869
	Cocultura DMSO + LPS	0,143	1,855
	Cocultura ROSI + LPS	0,136	1,848
	Cocultura GQ + LPS	0,138	1,849
	3T3 + RAW DMSO	0,135	1,842
	3T3 + RAW ROSI	0,150	1,829
	3T3 + RAW GQ	0,133	1,834
	3T3 + RAW DMSO + LPS	0,122	1,877
	3T3 + RAW ROSI + LPS	0,126	1,880
	3T3 + RAW GQ + LPS	0,134	1,841
COCULTURA POR	Cocultura DMSO	0,138	1,830
	Cocultura ROSI	0,139	1,826

CONTATO N3	Cocultura GQ	0,143	1,855
	Cocultura DMSO + LPS	0,145	1,828
	Cocultura ROSI + LPS	0,139	1,770
	Cocultura GQ + LPS	0,128	1,833
	3T3 + RAW DMSO	0,136	1,838
	3T3 + RAW ROSI	0,134	1,811
	3T3 + RAW GQ	0,120	1,818
	3T3 + RAW DMSO + LPS	0,140	1,819
	3T3 + RAW ROSI + LPS	0,133	1,814
	3T3 + RAW GQ + LPS	0,147	1,813
	Cocultura DMSO	0,150	1,816
	Cocultura ROSI	0,140	1,856
COCULTURA POR CONTATO N4	Cocultura GQ	0,148	1,883
	Cocultura DMSO + LPS	0,145	1,828
	Cocultura ROSI + LPS	0,147	1,813
	Cocultura GQ + LPS	0,142	1,839
	3T3 + RAW DMSO	0,149	1,874
	3T3 + RAW ROSI	0,148	1,827
	3T3 + RAW GQ	0,147	1,817
	3T3 + RAW DMSO + LPS	0,138	1,821
	3T3 + RAW ROSI + LPS	0,133	1,855
	3T3 + RAW GQ + LPS	0,141	1,820
	Cocultura DMSO	0,141	1,918
	Cocultura ROSI	0,144	1,880
COCULTURA POR CONTATO N5	Cocultura GQ	0,149	1,869
	Cocultura DMSO + LPS	0,133	1,834
	Cocultura ROSI + LPS	0,142	1,904
	Cocultura GQ + LPS	0,150	1,909
	3T3 + RAW DMSO	0,134	1,845
	3T3 + RAW ROSI	0,133	1,855
	3T3 + RAW GQ	0,142	1,859
	3T3 + RAW DMSO + LPS	0,131	1,896
	3T3 + RAW ROSI + LPS	0,137	1,895
	3T3 + RAW GQ + LPS	0,143	1,889

Tabela 2 – Quantificação e análise de pureza do RNA total de amostras da cocultura *transwell*

Amostra	Tratamento	Concentração	Pureza
COCULTURA TRANSWELL N1	Cocultura DMSO	0,139	1,744
	Cocultura ROSI	0,140	1,759
	Cocultura GQ	0,129	1,755
	Cocultura DMSO + LPS	0,143	1,750
	Cocultura ROSI + LPS	0,146	1,722
	Cocultura GQ + LPS	0,136	1,726
	3T3 + RAW DMSO	0,146	1,750
	3T3 + RAW ROSI	0,143	1,741
	3T3 + RAW GQ	0,131	1,735
	3T3 + RAW DMSO + LPS	0,125	1,720
	3T3 + RAW ROSI + LPS	0,150	1,773
	3T3 + RAW GQ + LPS	0,140	1,712
COCULTURA TRANSWELL N2	Cocultura DMSO	0,136	1,784
	Cocultura ROSI	0,126	1,815
	Cocultura GQ	0,138	1,801
	Cocultura DMSO + LPS	0,134	1,816
	Cocultura ROSI + LPS	0,132	1,761
	Cocultura GQ + LPS	0,144	1,804
	3T3 + RAW DMSO	0,147	1,808
	3T3 + RAW ROSI	0,130	1,810
	3T3 + RAW GQ	0,129	1,718
	3T3 + RAW DMSO + LPS	0,122	1,837
	3T3 + RAW ROSI + LPS	0,122	1,832
	3T3 + RAW GQ + LPS	0,119	1,840
COCULTURA TRANSWELL N3	Cocultura DMSO	0,136	1,894
	Cocultura ROSI	0,134	1,845
	Cocultura GQ	0,141	1,862
	Cocultura DMSO + LPS	0,132	1,860
	Cocultura ROSI + LPS	0,143	1,855
	Cocultura GQ + LPS	0,129	1,883
	3T3 + RAW DMSO	0,147	1,844
	3T3 + RAW ROSI	0,144	1,842
	3T3 + RAW GQ	0,127	1,822
	3T3 + RAW DMSO + LPS	0,137	1,854

COCULTURA TRANSWELL N4	3T3 + RAW ROSI + LPS	0,148	1,859
	3T3 + RAW GQ + LPS	0,146	1,838
	Cocultura DMSO	0,136	1,803
	Cocultura ROSI	0,137	1,869
	Cocultura GQ	0,134	1,836
	Cocultura DMSO + LPS	0,142	1,821
	Cocultura ROSI + LPS	0,137	1,849
	Cocultura GQ + LPS	0,143	1,845
	3T3 + RAW DMSO	0,131	1,832
	3T3 + RAW ROSI	0,109	1,845
	3T3 + RAW GQ	0,146	1,838
	3T3 + RAW DMSO + LPS	0,118	1,788
	3T3 + RAW ROSI + LPS	0,127	1,854
	3T3 + RAW GQ + LPS	0,127	1,822

3.6.3 Tratamento com DNase

Para certificar de que não haveria possíveis contaminações por DNA genômico, o RNA total extraído foi tratado com 1 unidade/ μ L 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.

3.6.4 Transcrição Reversa e Amplificação por PCR em Tempo Real (RT-PCR)

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. O produto de amplificação dos genes IL-6, TNF α , FABP4, ADPN e GLUT4 foi determinado pelo sistema SYBR® Green. A sequência dos *primers* utilizados se encontram na tabela 3. O método utilizado para a detecção do RNA se baseia em uma transcrição reversa feita enzimaticamente a partir do RNA obtido nas amostras, obtendo-se assim um DNA. Sondas marcadas com fluoróforos, compostas pela sequência

complementar do DNA que se procura são misturadas ao DNA obtido através da transcrição reversa, identificando-se indiretamente a presença de determinadas sequências de RNA. A quantidade de RNA também pode ser inferida através da intensidade de luz emitida, com intensidade proporcional à quantidade do produto de amplificação e é representada por Ct (*threshold cycle* / ciclo quantitativo).

As reações foram preparadas em placas de 96 poços (MicroAmp Optical, Applied Biosystems) para um volume final de 20 µL e continham 0,08 µL de Mix da enzima RT (125x), 10 µL de Mix Power SYBR® Green RT-PCR (2x), 0,2 µL (100nM) de cada primer e 15 ng de RNA. Completou-se o volume com água livre de RNase e DNase. Um controle negativo (sem amostras de RNA) foi realizado para cada par de primer, para verificar possíveis contaminações. A placa de 96 poços foi 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. A quantificação relativa dos RNA mensageiros foi feita por meio do método de comparação de Ct ou $\Delta\Delta Ct$, utilizando-se a seguinte fórmula aritmética:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \rightarrow [(Cq_{Gi} - Cq_{Ci}) \text{ amostra A} - (Cq_{Gi} - Cq_{Ci}) \text{ amostra B}]$$

Tabela 3 – Sequência dos *primers* utilizados para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real

Gene ¹	Sequência do oligonucleotídeo (5'-3')
<i>Tnfa</i>	Foward: 5'-CCCTCACA CT CAGATCATCTTCT-3' Reverse: 5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3'
<i>Il6</i>	Foward: 5'-TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC-3' Reverse: 5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTCC-3'
<i>Fabp4</i>	Foward: 5'-ACACCGAGATTTCTTCAA ACTG-3' Reverse: 5'-CCATCTAGGGTTATGATGCTCTTCA-3'
<i>Adpn</i>	Foward: 5'-GCACTGGCAAGTTCTACTGCAA-3'

	Reverse: 5'-GTAGGTGAAGAGAACGGCCTTGT-3'
<i>Glut4</i>	Foward: 5'-GAAGCCAGGAGCTTGATGTG-3'
	Reverse: 5'-TCAGGGCCCCTAAAGTCAG-3'
<i>Gapdh</i>	Foward: 5'-AAGGGCTCATGACCACAGTC-3'
	Reverse: 5'-CAGGGATGATGTTCTGGGCA-3'

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

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e comparados por Teste t de Student para 2 amostras ou ANOVA seguido de testes múltiplos de Tukey. O critério de significância para todas as análises foi o valor $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Foi realizada a cocultura de pré-adipócitos diferenciados em adipócitos com macrófagos para determinar se a presença de macrófagos poderia alterar o efeito adipogênico e anti-inflamatório dos agonistas total e parcial, rosiglitazona e GQ-16, respectivamente, nos adipócitos.

4.1 QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE PUREZA

4.2 EFEITO DE AGONISTAS DE PPAR γ NA EXPRESSÃO RELATIVA DO RNAm DE GENES INFLAMATÓRIOS EM SISTEMA DE COCULTURA MACRÓFAGOS-ADIPÓCITOS POR CONTATO E *TRANSWELL*:

4.2.1 Efeito de Agonistas de PPAR γ na Expressão Relativa do RNAm da *IL6* em Sistema de Cocultura por Contato de Macrófagos-Adipócitos

A figura 12 mostra a expressão do RNAm da *IL6* em sistema de cocultura de macrófagos-adipócitos por contato após o tratamento com os agonistas total e parcial de PPAR γ , rosiglitazona (ROSI) e GQ-16, respectivamente, bem como o efeito do estímulo inflamatório prévio nos macrófagos, representado pelo LPS (100 ng/mL), em 24 horas de tratamento.

No sistema de cocultura macrófagos-adipócitos por contato, a expressão dos genes se dá tanto pela presença de adipócitos quanto pela presença de macrófagos. Já no controle, os macrófagos e adipócitos foram cultivados separadamente e misturados apenas no momento da coleta.

É possível notar que a expressão do RNAm da *IL6*, quando houve a exposição prévia dos macrófagos do experimento controle ao LPS (100 ng/mL) por 24h, foi aproximadamente 23 vezes maior em comparação aos tratamentos com o veículo (DMSO 0,01%) e com os agonistas total e parcial de PPAR γ (figura 12 A). Ainda, no tratamento com os agonistas, quando os macrófagos foram pré-tratados com o LPS, tanto a rosiglitazona quanto o GQ-16 conseguiram reverter o aumento da expressão do RNAm da *IL6* evocado pelo pré-tratamento, mas o agonista total demonstrou esse efeito em maior intensidade, mostrando ser 3,23 vezes menor que o tratamento com o LPS (figura 12 B). Os tratamentos na cocultura (figura 12 C e D) mostraram resultados semelhantes em comparação ao controle, porém, apenas a rosiglitazona

foi capaz de reverter o estímulo do LPS na expressão do RNAm da *IL6*, sendo a expressão gênica 4,86 vezes menor, enquanto que a expressão provocada pelo GQ-16 é 1,61 vezes maior em comparação ao LPS (figura 12 D).

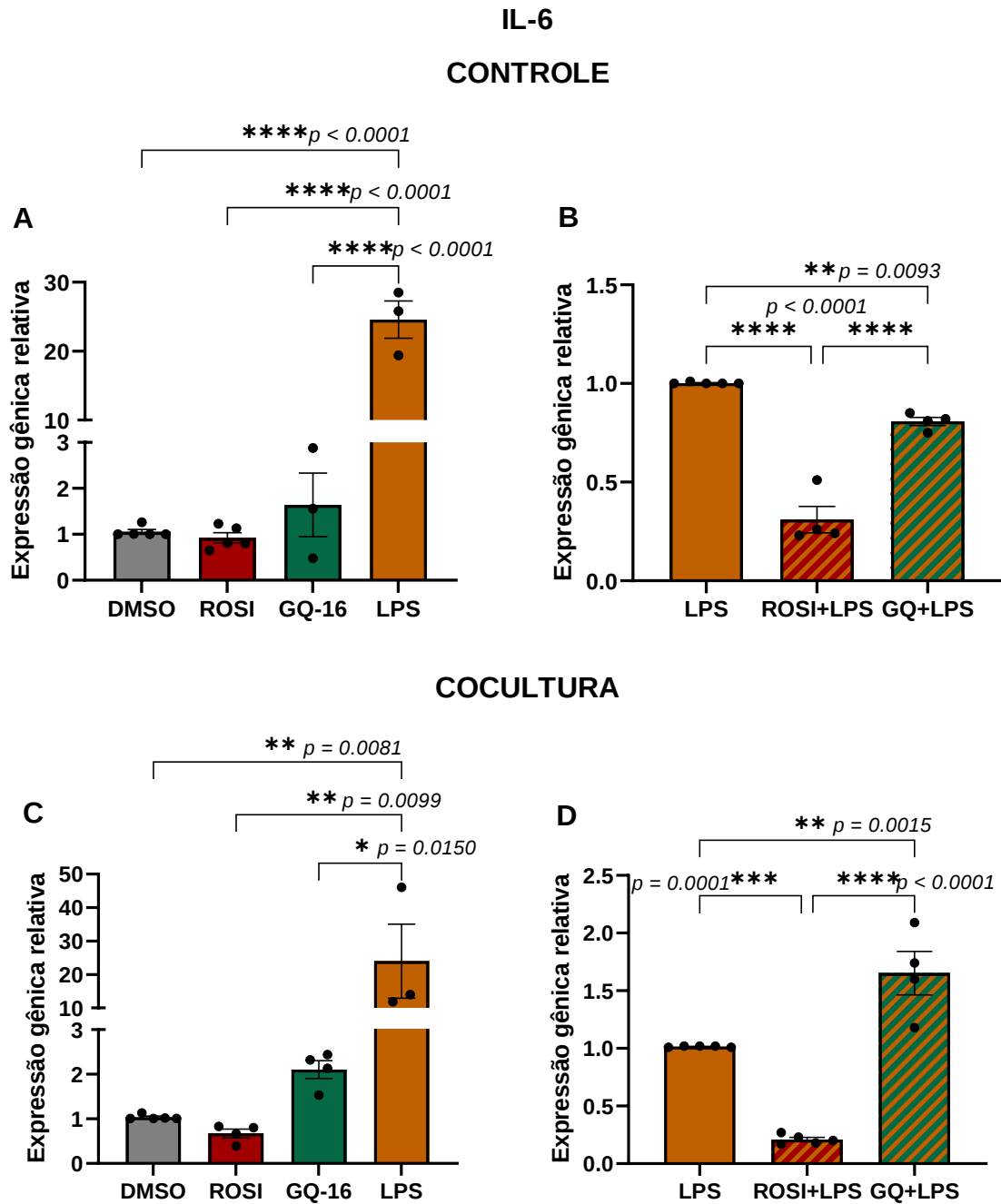


Figura 12 Efeito de agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm da *IL6*, em sistema de cocultura por contato de macrófagos-adipócitos. Dois dias após sua confluência (D0), os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados com coquetel indutor de diferenciação por mais dois dias (D2). Em seguida, foram tratados com 5 μ g/mL de insulina por mais 12 dias. Após esse período, os macrófagos, pré-tratados ou não com LPS (100 ng/mL) por 24 horas, foram adicionados sobre os adipócitos (C e D) e, então, realizados os tratamentos com veículo (DMSO 0,01%), rosiglitazona

(ROSI, 10^{-5} M) e GQ-16 (10^{-5} M). No caso do controle interno (A e B), os adipócitos diferenciados e os macrófagos foram cultivados isoladamente e receberam os mesmos tratamentos que a cocultura. Após 24 horas de tratamento, as células foram colhidas com Trizol para a extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro da *Il6* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente, expressos como média da expressão relativa $\pm$ EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey.

Já ao se comparar a cocultura por contato com o controle (figura 13), é possível observar que apenas os tratamentos com a rosiglitazona e o GQ-16, quando os macrófagos foram pré-tratados com o LPS, mostraram diferença estatisticamente significativa em relação ao cultivo das células separadamente, sendo a expressão do RNAm da *Il6* na cocultura 2,6 e 9,94 vezes maiores, respectivamente, que a expressão no controle. (figura 13 E e F).

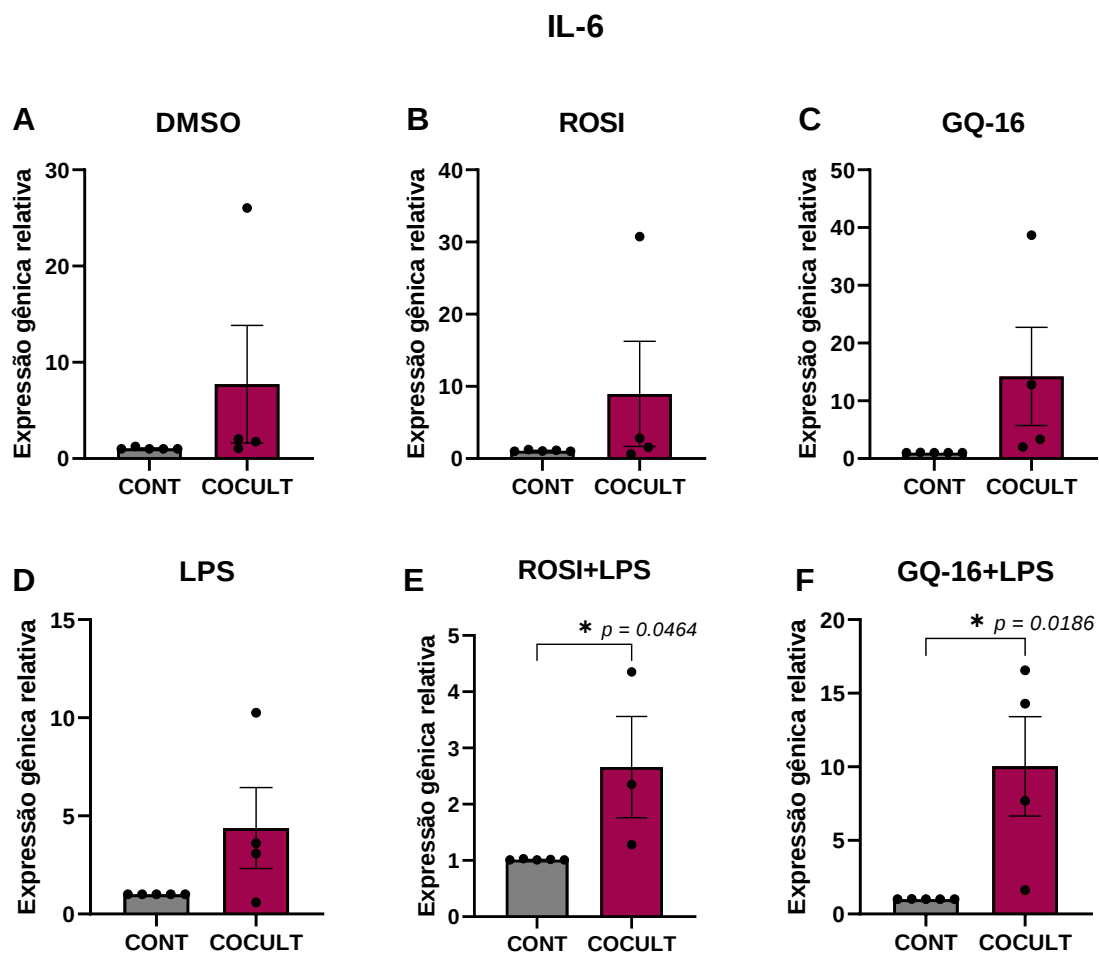


Figura 13 Comparação do controle com a cocultura de macrófagos-adipócitos por contato na expressão do RNAm da *Il6*. Dois dias após sua confluência (D0), os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados com coquetel indutor de diferenciação por mais dois dias (D2). Em seguida, foram tratados com 5 μ g/mL de insulina por mais 12 dias. Após esse período, os macrófagos, pré-tratados ou não

com LPS (100 ng/mL) por 24 horas, foram adicionados sobre os adipócitos e, então, realizados os tratamentos com veículo (DMSO 0,01%), rosiglitazona (ROSI, 10^{-5} M) e GQ-16 (10^{-5} M). No caso do controle interno, os adipócitos diferenciados e os macrófagos foram cultivados isoladamente e receberam os mesmos tratamentos que a cocultura. Após 24 horas de tratamento, as células foram colhidas com Trizol para a extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro da *Il6* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente, expressos como média da expressão relativa $\pm$ EPM e analisados por Teste t de Student.

4.2.2 Efeito de Agonistas de PPAR γ na Expressão Relativa do RNAm da *Il6* em Sistema de Cocultura *Transwell* de Macrófagos-Adipócitos

A figura 14 mostra a expressão relativa do RNAm da *Il6* em sistema *transwell* de cocultura de macrófagos-adipócitos após o tratamento com os agonistas total e parcial de PPAR γ , rosiglitazona e GQ-16, respectivamente, bem como o efeito do LPS (100 ng/mL), utilizado como estímulo inflamatório nos macrófagos 24 horas antes da cocultura. A cocultura *transwell* demonstra a comunicação parácrina entre as células, e a expressão dos genes se dá pela presença dos adipócitos.

A expressão do RNAm da *Il6* no tratamento prévio dos macrófagos com o LPS se mostrou aproximadamente 20 vezes maior em comparação ao veículo (DMSO 0,01%), 32 vezes maior em relação à rosiglitazona e 6,7 vezes maior em comparação ao GQ-16 (figura 14 A). Ainda, quando no pré-tratamento dos macrófagos com o LPS, o agonista total foi capaz de diminuir esse estímulo inflamatório, induzido pelo LPS, de forma significativa, uma vez que a expressão gênica de *Il6* se mostrou 3 vezes menor. Porém, o mesmo não foi visto no tratamento realizado com o agonista parcial, o qual não apresentou diferença estatística na expressão do RNAm da *Il6* (figura 14 B).

IL-6

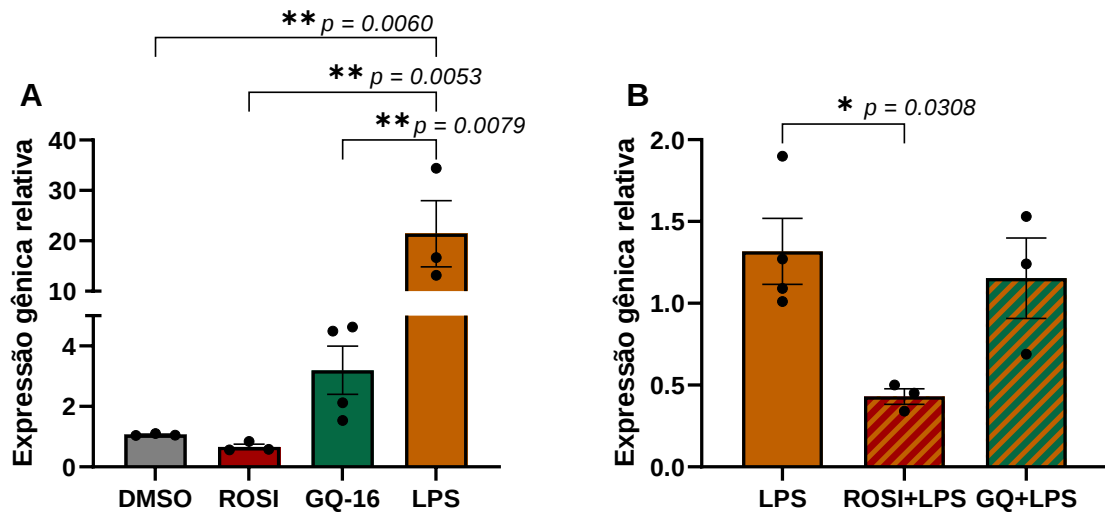


Figura 14 Efeito de agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm da *Il6*, em sistema de cocultura *transwell* de macrófagos-adipócitos. Dois dias após sua confluência (D0), os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados com coquetel indutor de diferenciação por mais dois dias (D2). Em seguida, foram tratados com 5 μ g/mL de insulina por mais 12 dias. Após esse período, os macrófagos, pré-tratados ou não com LPS (100 ng/mL) por 24 horas, foram adicionados sobre os adipócitos e, então, realizados os tratamentos com veículo (DMSO 0,01%), rosiglitazona (ROSI, 10^{-5} M) e GQ-16 (10^{-5} M). Após 24 horas de tratamento, as células foram colhidas com Trizol para a extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro da *Il6* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente, expressos como média da expressão relativa $\pm$ EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey.

4.2.3 Efeito de Agonistas de PPAR γ na Expressão Relativa do RNAm do *Tnfa* em Sistema de Cocultura por Contato de Macrófagos-Adipócitos

A figura 15 mostra a expressão do RNAm do gene *Tnfa* em sistema de cocultura de macrófagos-adipócitos por contato após o tratamento com os agonistas total e parcial de PPAR γ , rosiglitazona e GQ-16, respectivamente, bem como o efeito do estímulo inflamatório prévio dos macrófagos da cultura de células por 24 horas de tratamento com LPS (100 ng/mL).

No sistema de cocultura macrófagos-adipócitos por contato, a expressão dos genes se dá tanto pela presença de adipócitos quanto pela presença de macrófagos. Já no controle, os macrófagos e adipócitos foram cultivados separadamente e misturados apenas no momento da coleta.

Diferentemente do que se esperava, a expressão gênica do RNAm do *Tnfa*, mediador pró-inflamatório, se mostrou menor no tratamento com LPS em comparação ao veículo em aproximadamente 14 vezes e em comparação à rosiglitazona e GQ-16 apresentou ser aproximadamente 12 vezes menor (figura 15 A). Resultados similares puderam ser observados nos tratamentos feitos na cocultura por contato (figura 15 C). Ainda no experimento controle, não houve diferença estatisticamente relevante nas células com a adição dos agonistas quando os macrófagos foram pré-tratados com LPS (figura 15 B). Por outro lado, na cocultura, quando os macrófagos foram anteriormente expostos ao LPS, a expressão do gene, nos tratamentos tanto com a rosiglitazona quanto com o GQ-16, diminuiu significativamente em comparação ao LPS (figura 15 D), apresentando ser quase 1,7 vezes menor.

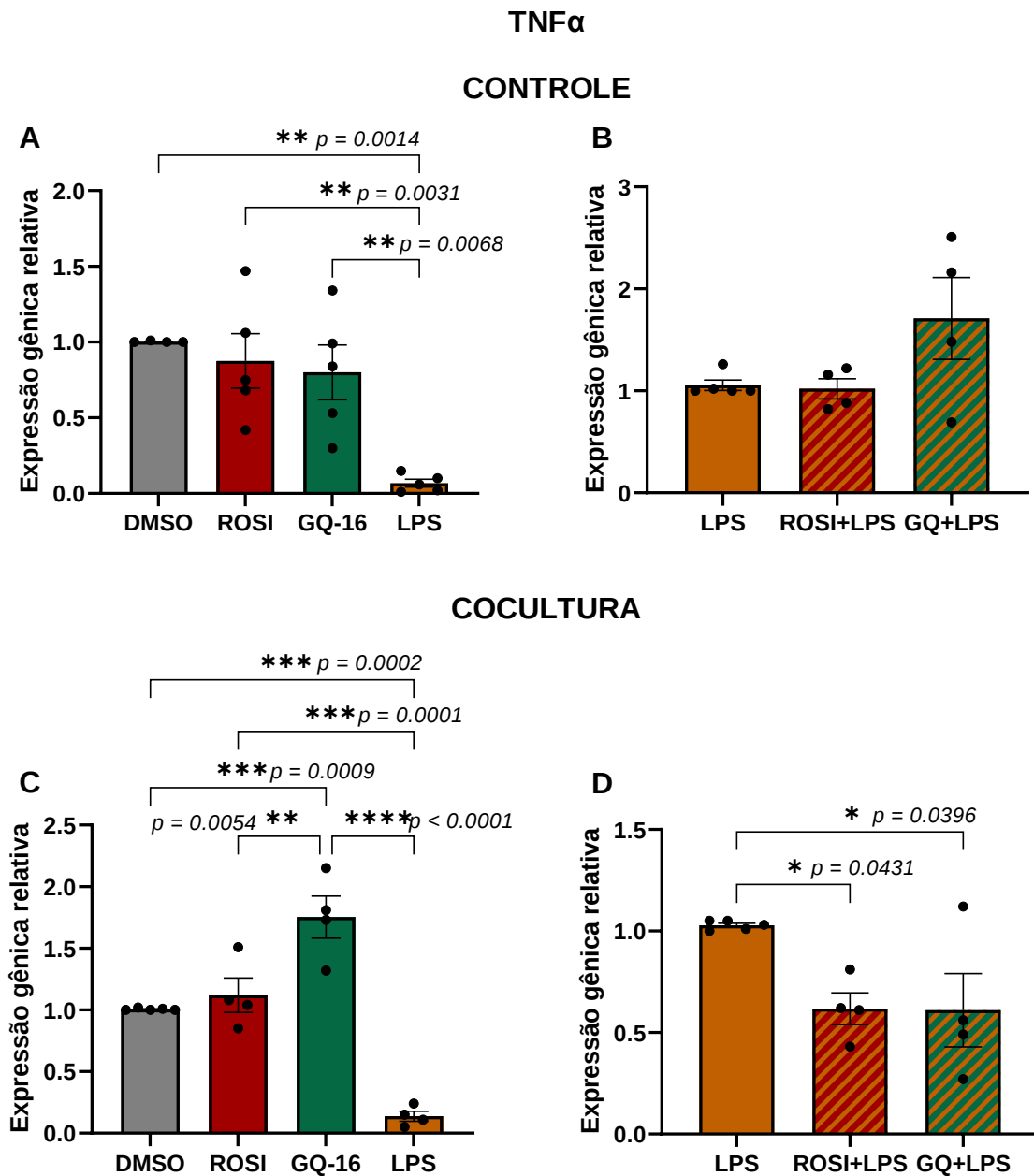


Figura 15 Efeito de agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm do *Tnfa*, em sistema de cocultura por contato de macrófagos-adipócitos. Dois dias após sua confluência (D0), os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados com coquetel indutor de diferenciação por mais dois dias (D2). Em seguida, foram tratados com 5 μ g/mL de insulina por mais 12 dias. Após esse período, os macrófagos, pré-tratados ou não com LPS (100 ng/mL) por 24 horas, foram adicionados sobre os adipócitos (C e D) e, então, realizados os tratamentos com veículo (DMSO 0,01%), rosiglitazona (ROSI, 10^{-5} M) e GQ-16 (10^{-5} M). No caso do controle interno (A e B), os adipócitos diferenciados e os macrófagos foram cultivados isoladamente e receberam os mesmos tratamentos que a cocultura. Após 24 horas de tratamento, as células foram colhidas com Trizol para a extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do *Tnfa* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente, expressos como média da expressão relativa $\pm$ EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey.

A expressão do RNAm do *Tnfa* na cocultura por contato em comparação à sua expressão no controle interno, quando as células foram cultivadas separadamente, demonstrou um resultado mais condizente com o que se esperava, mostrando que o cultivo das células em contato direto influenciou para uma maior expressão do gene (figura 16 C a F). A rosiglitazona não mostrou diferença estatisticamente significativa na expressão do gene (figura 16 B). E, curiosamente, a expressão do RNAm do *Tnfa* no tratamento com o veículo mostrou ser 1,84 vezes menor na cocultura (figura 16 A), entretanto, como o TNF α é uma citocina pró-inflamatória, muito presente na inflamação induzida pela obesidade, era de se esperar que o contato dos macrófagos e adipócitos, característico do quadro obeso, aumentasse a sua expressão.

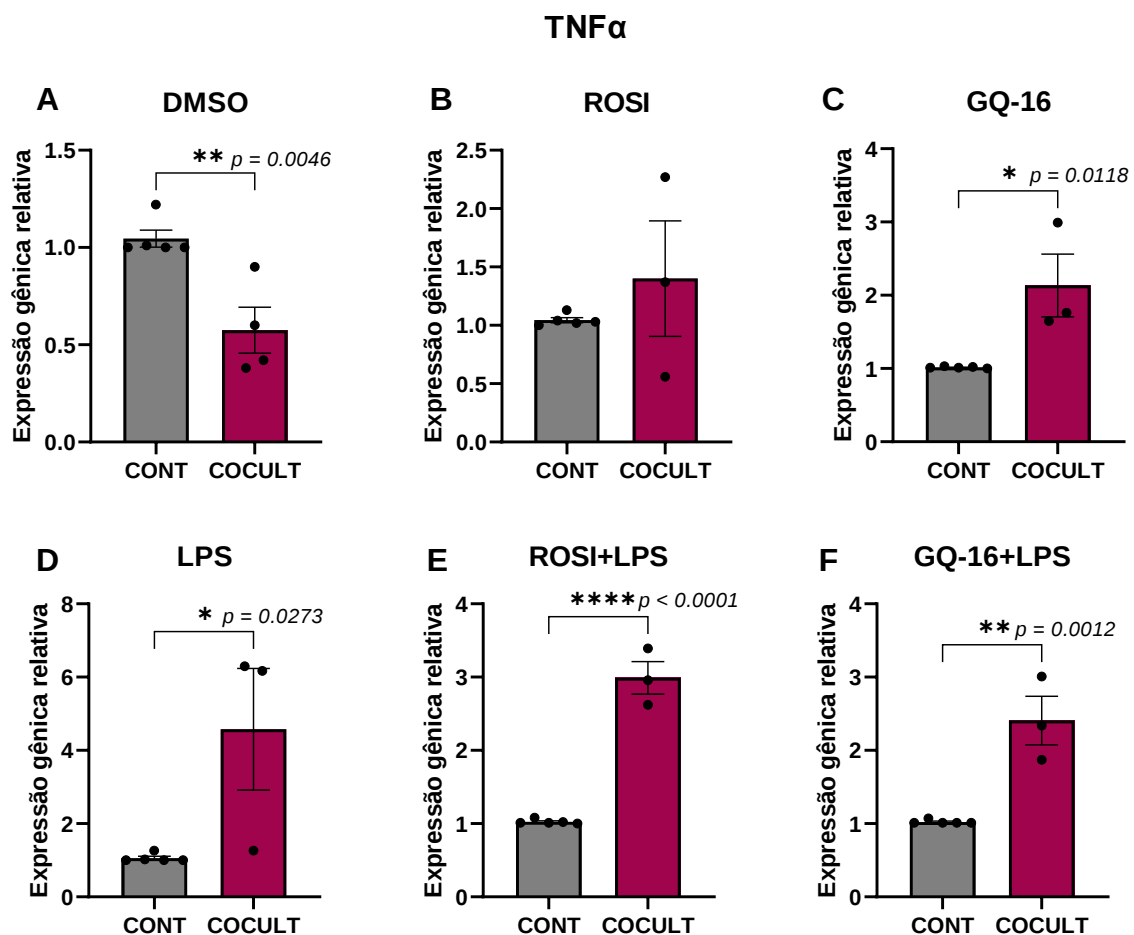


Figura 16 Comparação do controle com a cocultura de macrófagos-adipócitos por contato na expressão do RNAm do *Tnfa*. Dois dias após sua confluência (D0), os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados com coquetel indutor de diferenciação por mais dois dias (D2). Em seguida, foram tratados com 5 μ g/mL de insulina por mais 12 dias. Após esse período, os macrófagos, pré-tratados ou não

com LPS (100 ng/mL) por 24 horas, foram adicionados sobre os adipócitos e, então, realizados os tratamentos com veículo (DMSO 0,01%), rosiglitazona (ROSI, 10^{-5} M) e GQ-16 (10^{-5} M). No caso do controle interno, os adipócitos diferenciados e os macrófagos foram cultivados isoladamente e receberam os mesmos tratamentos que a cocultura. Após 24 horas de tratamento, as células foram colhidas com Trizol para a extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do *Tnfa* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente, expressos como média da expressão relativa $\pm$ EPM e analisados por Teste t de Student.

4.3 EFEITO DE AGONISTAS DE PPAR γ NA EXPRESSÃO RELATIVA DO RNAm DE GENES ADIPOGÊNICOS EM SISTEMA DE COCULTURA MACRÓFAGOS-ADIPÓCITOS POR CONTATO E TRANSWELL

4.3.1 Efeito de Agonistas de PPAR γ na Expressão Relativa do RNAm da *Fabp4* em Sistema de Cocultura por Contato de Macrófagos-Adipócitos

A figura 17 mostra a expressão relativa da *Fabp4* em sistema de cocultura de macrófagos-adipócitos por contato após o tratamento com os agonistas total e parcial de PPAR γ , rosiglitazona e GQ-16, respectivamente, bem como o efeito proporcionado pelo LPS (100 ng/mL) após 24 horas de tratamento nos macrófagos, previamente à realização da cocultura.

No sistema de cocultura macrófagos-adipócitos por contato, a expressão dos genes se dá tanto pela presença de adipócitos quanto pela presença de macrófagos. Já no controle, os macrófagos e adipócitos foram cultivados separadamente e misturados apenas no momento da coleta.

Olhando para o experimento controle, apenas a rosiglitazona apresentou diferença estatística, fazendo a expressão do RNAm da *Fabp4* ser aproximadamente 1,87 vezes maior tanto em relação ao veículo (figura 17 A), quanto em relação ao estímulo inflamatório quando no pré-tratamento dos macrófagos com o LPS (figura 17 B). Já na cocultura, tanto a rosiglitazona quanto o LPS foram capazes de aumentar a expressão do RNAm da *Fabp4*, mostrando ser 2,95 e 2,83 vezes maiores, respectivamente, em comparação ao veículo (DMSO 0,01%) (figura 17 C). Quando os macrófagos foram pré-tratados com o LPS (100 ng/mL) por 24h, o tratamento com o agonista total, rosiglitazona, conseguiu aumentar ainda mais a ação do LPS na expressão relativa do RNAm do referido

gene (figura 17 D), mostrando ser 2,38 vezes maior que o tratamento com o LPS sozinho. O agonista parcial GQ-16 não demonstrou resultados estatisticamente significativos (figura 17 C e D).

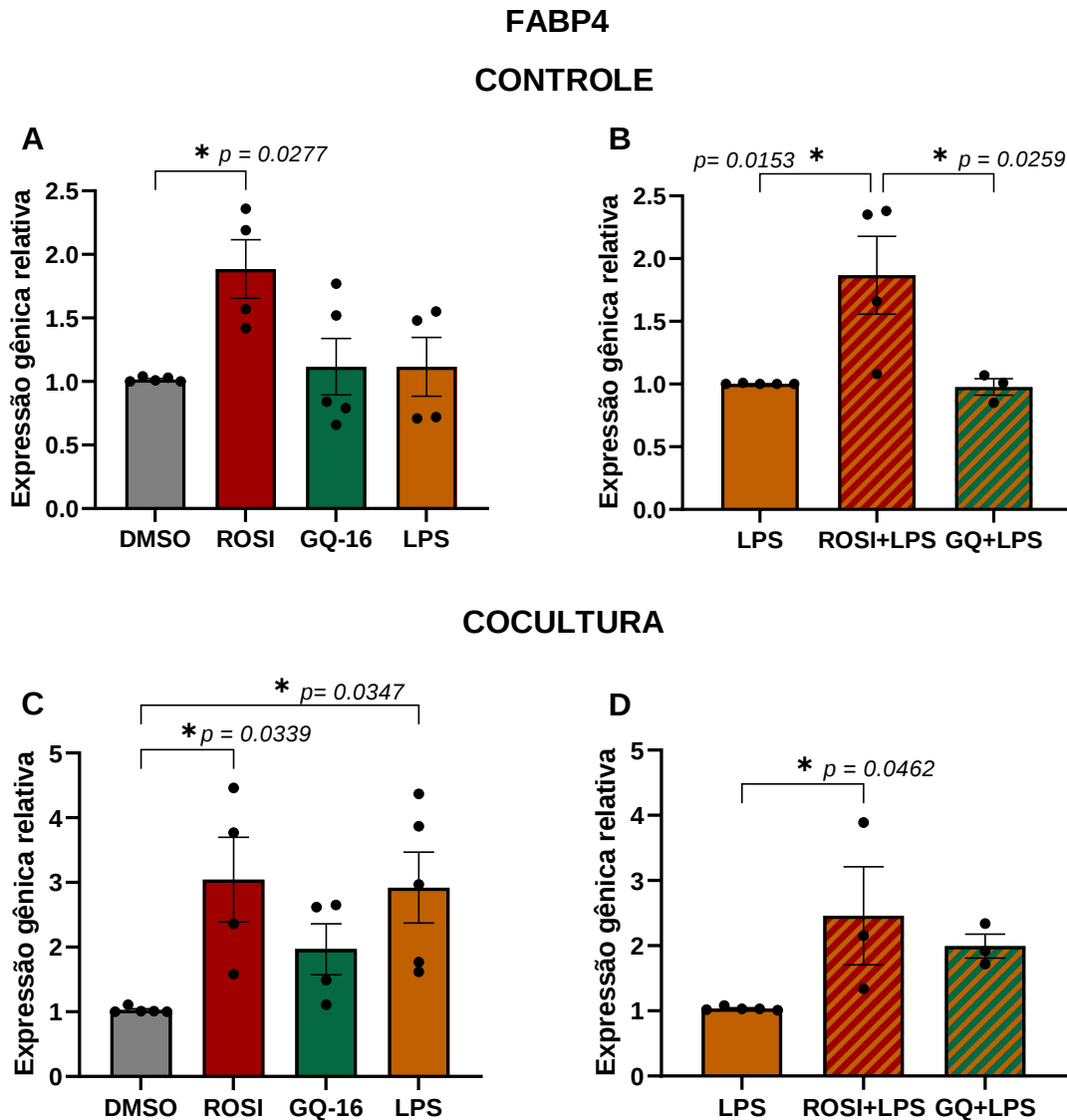


Figura 17 Efeito de agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm da *Fabp4*, em sistema de cocultura por contato de macrófagos-adipócitos. Dois dias após sua confluência (D0), os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados com coquetel indutor de diferenciação por mais dois dias (D2). Em seguida, foram tratados com 5 $\mu\text{g/mL}$ de insulina por mais 12 dias. Após esse período, os macrófagos, pré-tratados ou não com LPS (100 ng/mL) por 24 horas, foram adicionados sobre os adipócitos (C e D) e, então, realizados os tratamentos com veículo (DMSO 0,01%), rosiglitazona (ROSI, 10^{-5}M) e GQ-16 (10^{-5}M). No caso do controle interno (A e B), os adipócitos diferenciados e os macrófagos foram cultivados isoladamente e receberam os mesmos tratamentos que a cocultura. Após 24 horas de tratamento, as células foram colhidas com Trizol para a extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro da *Fabp4* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real

(RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente, expressos como média da expressão relativa $\pm$ EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey.

Diferentemente do observado com os genes inflamatórios, nesse caso, ao se comparar a expressão do RNAm da *Fabp4* no controle e na cocultura, este último reprimiu a expressão do RNAm (figura 18 A a C). Entretanto, era de se esperar que essa adipocina estivesse aumentada quando as células estão em contato direto, em um sistema que simula a condição de obesidade, ainda mais com o tratamento com a rosiglitazona, uma vez que este agonista já mostrou possuir alto efeito adipogênico (65) e esta é uma adipocina que sinaliza ganho de peso (84). Já quando os macrófagos foram pré-estimulados com LPS (Figura 18 D a F) apenas o tratamento com GQ-16 foi capaz de aumentar a expressão do RNAm da *Fabp4* (figura 18 F), mostrando ser 1,54 vezes maior que o controle.

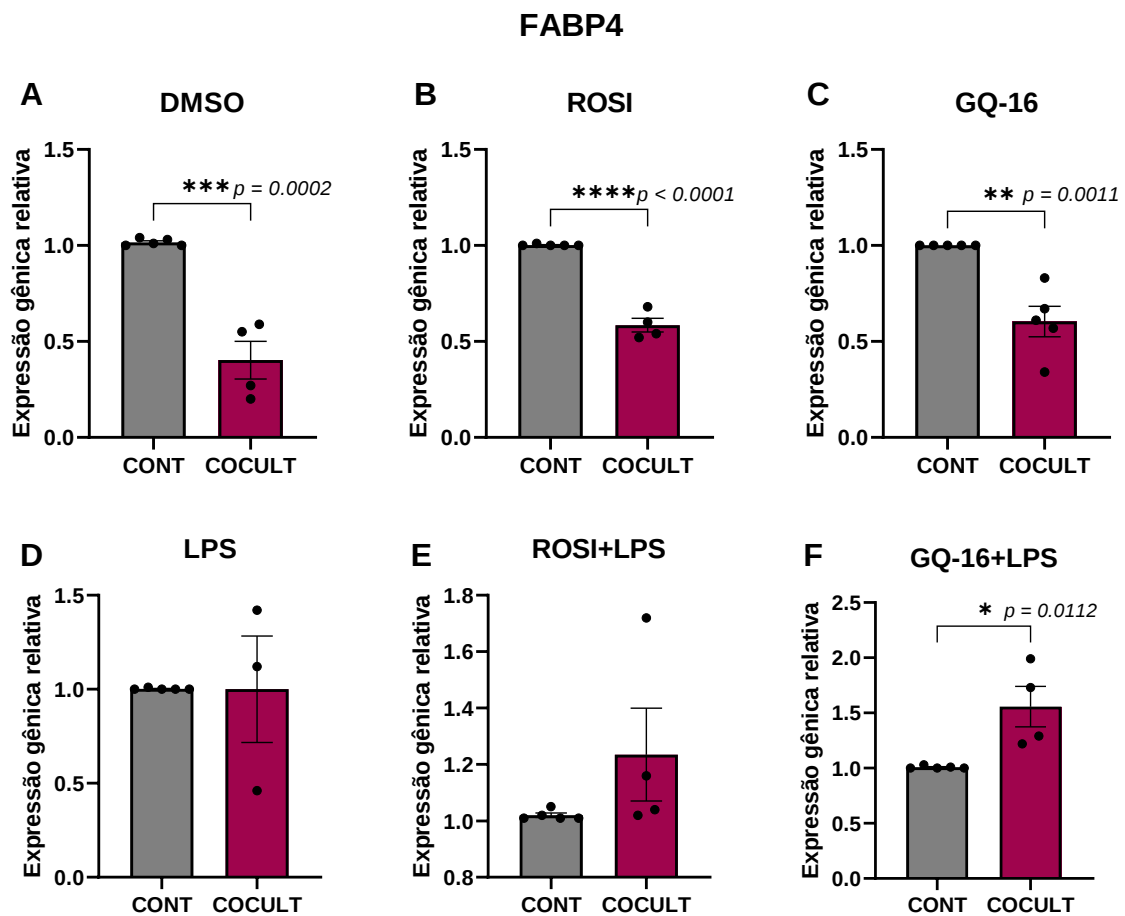


Figura 18 Comparação do controle com a cocultura de macrófagos-adipócitos por contato na expressão do RNAm da *Fabp4*. Dois dias após sua confluência (D0), os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados com coquetel indutor de diferenciação por mais dois dias (D2). Em seguida, foram tratados com 5 μ g/mL de insulina por mais 12 dias. Após esse período, os macrófagos, pré-tratados

ou não com LPS (100 ng/mL) por 24 horas, foram adicionados sobre os adipócitos e, então, realizados os tratamentos com veículo (DMSO 0,01%), rosiglitazona (ROSI, 10^{-5} M) e GQ-16 (10^{-5} M). No caso do controle interno, os adipócitos diferenciados e os macrófagos foram cultivados isoladamente e receberam os mesmos tratamentos que a cocultura. Após 24 horas de tratamento, as células foram colhidas com Trizol para a extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro da *Fabp4* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente, expressos como média da expressão relativa $\pm$ EPM e analisados por Teste t de Student.

4.3.2 Efeito de Agonistas de PPAR γ na Expressão Relativa do RNAm da *Fabp4* em Sistema de Cocultura *Transwell* de Macrófagos-Adipócitos:

A figura 19 mostra a expressão relativa do RNAm da *Fabp4* em sistema *transwell* de cocultura de macrófagos-adipócitos após o tratamento com os agonistas total e parcial de PPAR γ , rosiglitazona e GQ-16, respectivamente, bem como o efeito da pré-exposição dos macrófagos ao LPS (100 ng/mL) por 24 horas.

Apenas a rosiglitazona demonstrou diferença estatisticamente significativa em relação ao veículo (DMSO) na expressão do RNAm da *Fabp4*, mostrando ser 6,92 vezes maior. Por outro lado, tanto o tratamento com o agonista parcial, quanto o tratamento prévio dos macrófagos com LPS, não demonstraram diferença estatisticamente relevante (figura 19 A). Quando os macrófagos foram pré-expostos ao LPS, é possível observar que o agonista total apresenta uma inclinação em aumentar a expressão relativa do RNAm da *Fabp4*, apresentando ser quase 10 vezes maior que no tratamento com o LPS sozinho ($p = 0,1198$), embora esse aumento não tenha sido estatisticamente relevante devido à variação entre os experimentos, uma vez que o número de experimentos realizados foi pequeno. Já o agonista parcial parece não apresentar efeito em comparação ao LPS (figura 19 B). Esses resultados estão de acordo com estudos prévios que demonstraram que a rosiglitazona possui maior efeito adipogênico que o GQ-16 (73,85).

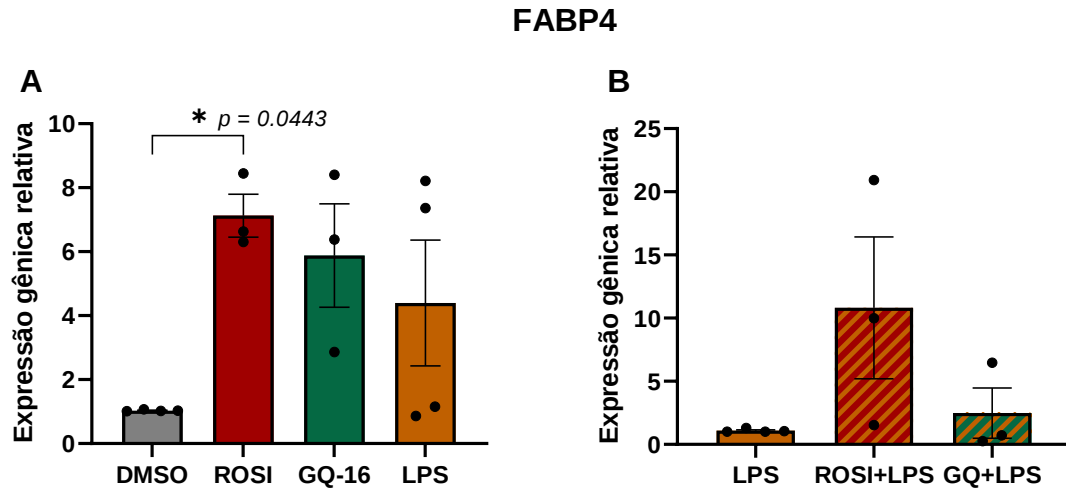


Figura 19 Efeito de agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm da *Fabp4*, em sistema de cocultura *transwell* de macrófagos-adipócitos. Dois dias após sua confluência (D0), os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados com coquetel indutor de diferenciação por mais dois dias (D2). Em seguida, foram tratados com 5 μ g/mL de insulina por mais 12 dias. Após esse período, os macrófagos, pré-tratados ou não com LPS (100 ng/mL) por 24 horas, foram adicionados sobre os adipócitos e, então, realizados os tratamentos com veículo (DMSO 0,01%), rosiglitazona (ROSI, 10⁻⁵M) e GQ-16 (10⁻⁵M). Após 24 horas de tratamento, as células foram colhidas com Trizol para a extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro da *Fabp4* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente, expressos como média da expressão relativa $\pm$ EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey.

4.3.3 Efeito de Agonistas de PPAR γ na Expressão Relativa do RNAm da Adiponectina (*Adpn*) em Sistema de Cocultura por Contato de Macrófagos-Adipócitos

A figura 20 mostra a expressão relativa do RNAm da *Adpn* em sistema de cocultura de macrófagos-adipócitos por contato após o tratamento com os agonistas total e parcial de PPAR γ , rosiglitazona e GQ-16, respectivamente, bem como o efeito do estímulo inflamatório nos macrófagos antes de serem adicionados na cocultura com adipócitos diferenciados.

No sistema de cocultura macrófagos-adipócitos por contato, a expressão dos genes se dá tanto pela presença de adipócitos quanto pela presença de macrófagos. Já no controle, os macrófagos e adipócitos foram cultivados separadamente e misturados apenas no momento da coleta.

Quando as células foram cultivadas separadamente, o GQ-16, na ausência do estímulo inflamatório, foi o único a apresentar resultado estatisticamente significativo, tendo a expressão do RNAm da *Adpn* com esse agonista sido 1,55 vezes maior que o tratamento com o veículo (figura 20 A). Também o agonista parcial, no experimento controle, foi capaz de aumentar o efeito produzido pelo pré-tratamento dos macrófagos com o LPS, sendo, nesse caso, 1,21 vezes maior (figura 20 B). A cocultura não foi capaz de produzir efeitos estatisticamente significativos na expressão do RNAm da *Adpn* (figura 20 C e D). Porém, podemos sugerir que os agonistas, quando os macrófagos são expostos anteriormente ao estímulo inflamatório, apresentam uma tendência em aumentar a expressão do RNAm da *Adpn* quando em comparação ao tratamento com o LPS sozinho, uma vez que a expressão do gene se mostrou 1,67 vezes maior, no tratamento com a rosiglitazona ($p = 0,4178$), e 2,24 vezes maior no tratamento com o GQ-16 ($p = 0,0953$).

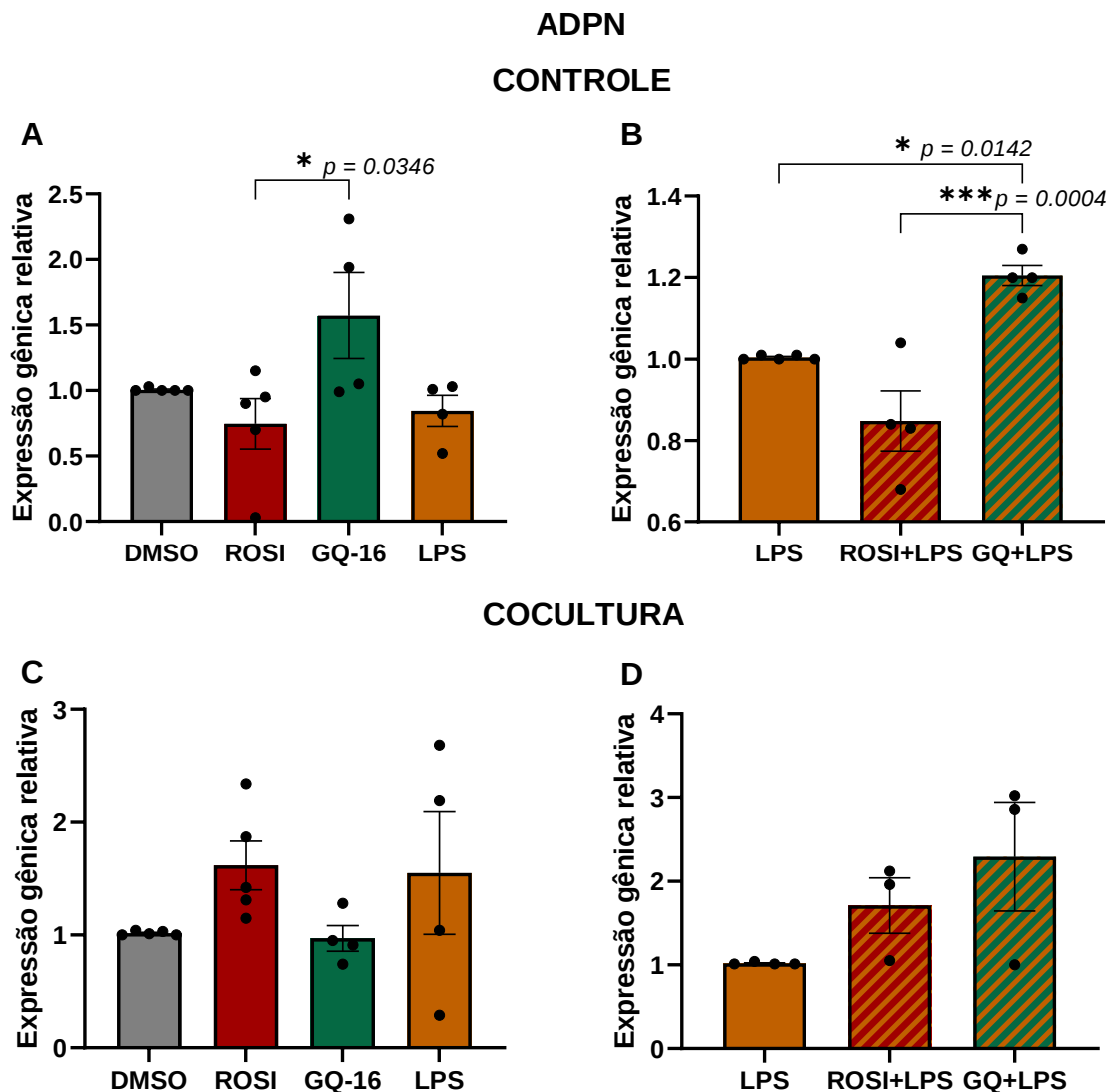


Figura 20 Efeito de agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm da *Adpn*, em sistema de cocultura por contato de macrófagos-adipócitos. Dois dias após sua confluência (D0), os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados com coquetel indutor de diferenciação por mais dois dias (D2). Em seguida, foram tratados com 5 μ g/mL de insulina por mais 12 dias. Após esse período, os macrófagos, pré-tratados ou não com LPS (100 ng/mL) por 24 horas, foram adicionados sobre os adipócitos (C e D) e, então, realizados os tratamentos com veículo (DMSO 0,01%), rosiglitazona (ROSI, 10⁻⁵M) e GQ-16 (10⁻⁵M). No caso do controle interno (A e B), os adipócitos diferenciados e os macrófagos foram cultivados isoladamente e receberam os mesmos tratamentos que a cocultura. Após 24 horas de tratamento, as células foram colhidas com Trizol para a extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro da *Adpn* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente, expressos como média da expressão relativa $\pm$ EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey.

Quando a cocultura é comparada com o experimento controle, a primeira demonstrou, pelo menos em parte dos tratamentos, uma diminuição na expressão

do RNAm da *Adpn* (figura 21 A a C). Ainda, quando os macrófagos foram expostos ao LPS antes da realização da cocultura, esse estímulo inflamatório mostrou uma inclinação para a mesma diminuição, mostrando a expressão gênica ser até 2 vezes menor em comparação ao cultivo separado das células ($p = 0,0543$), porém não apresentou resultado estatisticamente significativo devido à grande variação entre os experimentos (figura 21 D). Já o tratamento com os agonistas, quando os macrófagos foram pré-estimulados com LPS, não mostrou diferença estatística na expressão do RNAm da *Adpn*.

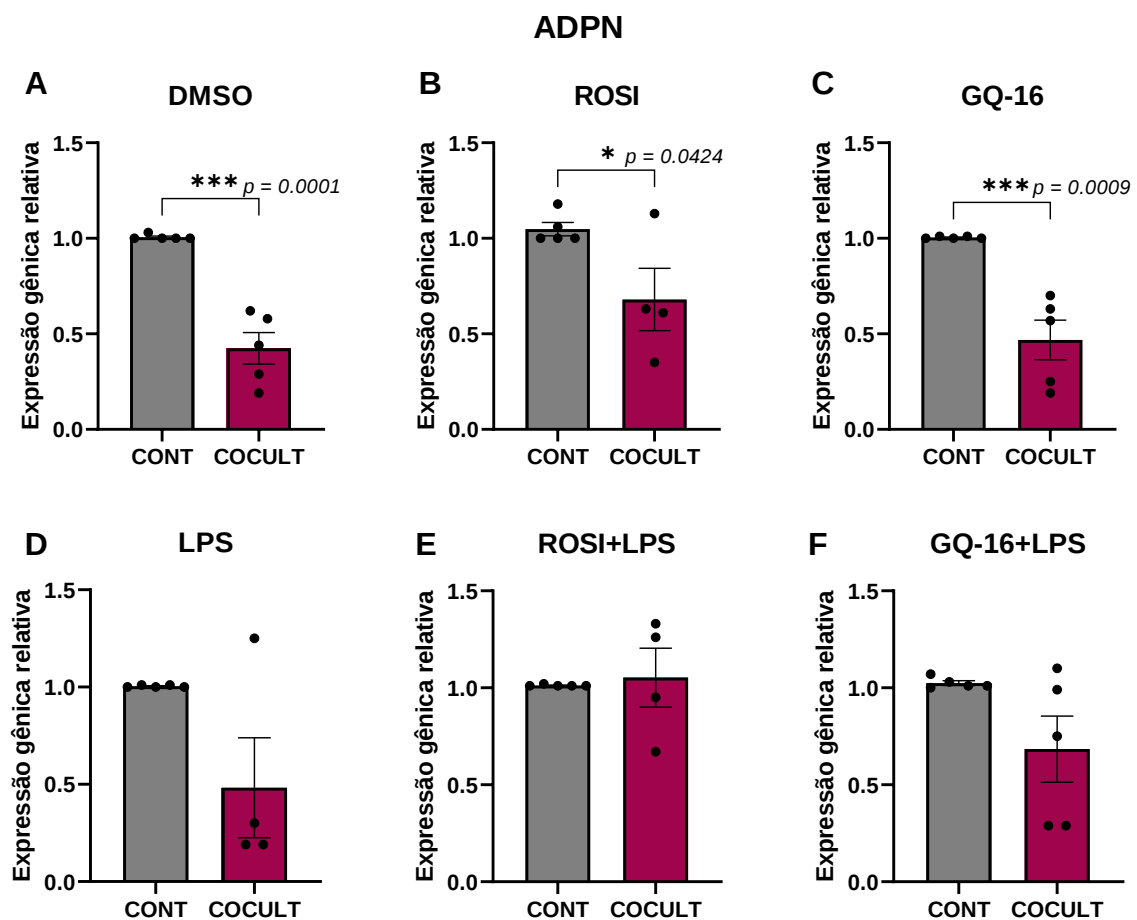


Figura 21 Comparação do controle com a cocultura de macrófagos-adipócitos por contato na expressão do RNAm da *Adpn*. Dois dias após sua confluência (D0), os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados com coquetel indutor de diferenciação por mais dois dias (D2). Em seguida, foram tratados com 5 µg/mL de insulina por mais 12 dias. Após esse período, os macrófagos, pré-tratados ou não com LPS (100 ng/mL) por 24 horas, foram adicionados sobre os adipócitos e, então, realizados os tratamentos com veículo (DMSO 0,01%), rosiglitazona (ROSI, 10^{-5} M) e GQ-16 (10^{-5} M). No caso do controle interno, os adipócitos diferenciados e os macrófagos foram cultivados isoladamente e receberam os mesmos tratamentos que a cocultura. Após 24 horas de tratamento, as células foram colhidas com Trizol para a extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro da *Adpn* foi

analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente, expressos como média da expressão relativa $\pm$ EPM e analisados por Teste t de Student.

4.3.4 Efeito de Agonistas de PPAR γ na Expressão Relativa do RNAm da *Adpn* em Sistema de Cocultura *Transwell* de Macrófagos-Adipócitos

A figura 22 mostra a expressão relativa do RNAm da *Adpn* em sistema *transwell* de cocultura de macrófagos-adipócitos após o tratamento com os agonistas total e parcial de PPAR γ , rosiglitazona e GQ-16, respectivamente. Ainda, demonstra a ação do estímulo inflamatório, representado pelo LPS (100 ng/mL), quando no tratamento dos macrófagos por 24 horas antes da realização da cocultura.

Tanto a pré-exposição dos macrófagos ao LPS quanto o GQ-16 foram capazes de aumentar a expressão do RNAm da *Adpn* em comparação ao veículo, mostrando a expressão gênica ser 2,28 e 3 vezes maior, respectivamente, enquanto a rosiglitazona não apresentou efeito (figura 22 A). Já, quando em comparação ao efeito gerado pelo LPS, a TZD, quando os macrófagos haviam sido pré-tratados com o estímulo inflamatório, conseguiu aumentar ainda mais a ação induzida pelo LPS na expressão do gene, mostrando esta ser 2,65 vezes maior. Inclusive, esse aumento também se mostrou estatisticamente diferente quando em comparação ao efeito apresentado pelo GQ-16 nas mesmas condições se mostrando 4,2 vezes maior nesse caso. Já o agonista parcial não foi capaz de demonstrar diferença estatística comparado ao tratamento com LPS (figura 22 B). Como a rosiglitazona possui uma ação anti-inflamatória bem estabelecida, esse resultado está em concordância com tal efeito, uma vez que a ADPN é uma adipocina anti-inflamatória.

ADPN

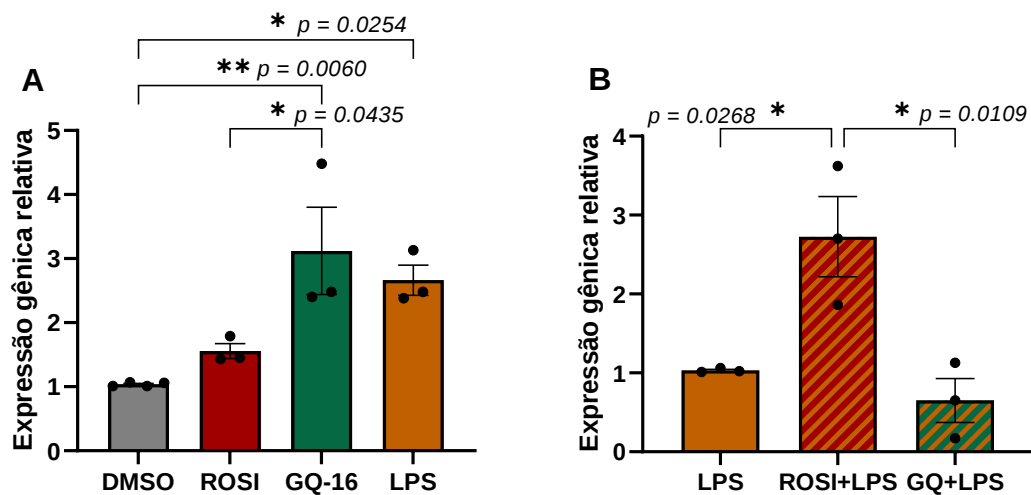


Figura 22 Efeito de agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm da *Adpn*, em sistema de cocultura *transwell* de macrófagos-adipócitos. Dois dias após sua confluência (D0), os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados com coquetel indutor de diferenciação por mais dois dias (D2). Em seguida, foram tratados com 5 μ g/mL de insulina por mais 12 dias. Após esse período, os macrófagos, pré-tratados ou não com LPS (100 ng/mL) por 24 horas, foram adicionados sobre os adipócitos e, então, realizados os tratamentos com veículo (DMSO 0,01%), rosiglitazona (ROSI, 10^{-5} M) e GQ-16 (10^{-5} M). Após 24 horas de tratamento, as células foram colhidas com Trizol para a extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro da *Adpn* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente, expressos como média da expressão relativa $\pm$ EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey.

4.3.5 Efeito de Agonistas de PPAR γ na Expressão Relativa do RNAm do *Glut4* em Sistema de Cocultura por Contato de Macrófagos-Adipócitos

A figura 23 mostra a expressão do RNAm do *Glut4* em sistema de cocultura de macrófagos-adipócitos por contato após o tratamento com os agonistas total e parcial de PPAR γ , rosiglitazona e GQ-16, respectivamente, bem como o efeito do estímulo inflamatório LPS (100 ng/mL) por 24 horas como pré-tratamento dos macrófagos da cocultura com adipócitos diferenciados.

No sistema de cocultura macrófagos-adipócitos por contato, a expressão dos genes se dá tanto pela presença de adipócitos quanto pela presença de macrófagos. Já no controle, os macrófagos e adipócitos foram cultivados separadamente e misturados apenas no momento da coleta.

No experimento controle, nenhum dos tratamentos apresentou alteração estatisticamente significativa na expressão do RNAm do *Glut4* em relação ao veículo (figura 23 A). Por outro lado, quando os macrófagos foram pré-tratados com LPS, ambos os agonistas de PPAR γ diminuíram a expressão do RNAm do referido gene em relação ao estímulo inflamatório (figura 23 B), tendo na expressão gênica se mostrado 1,75 vezes menor no tratamento com a rosiglitazona e 1,96 vezes menor no tratamento com o GQ-16. Na cocultura, apenas quando os macrófagos foram pré-tratados com LPS houve diferença estatisticamente significativa na expressão do RNAm do *Glut4* em relação ao veículo (DMSO 0,01%), apresentando ser 4,28 vezes maior (figura 23 C). Já os tratamentos com rosiglitazona e GQ-16, na presença do estímulo inflamatório, não demonstraram alterar significativamente esse efeito do LPS nos macrófagos (figura 23 D).

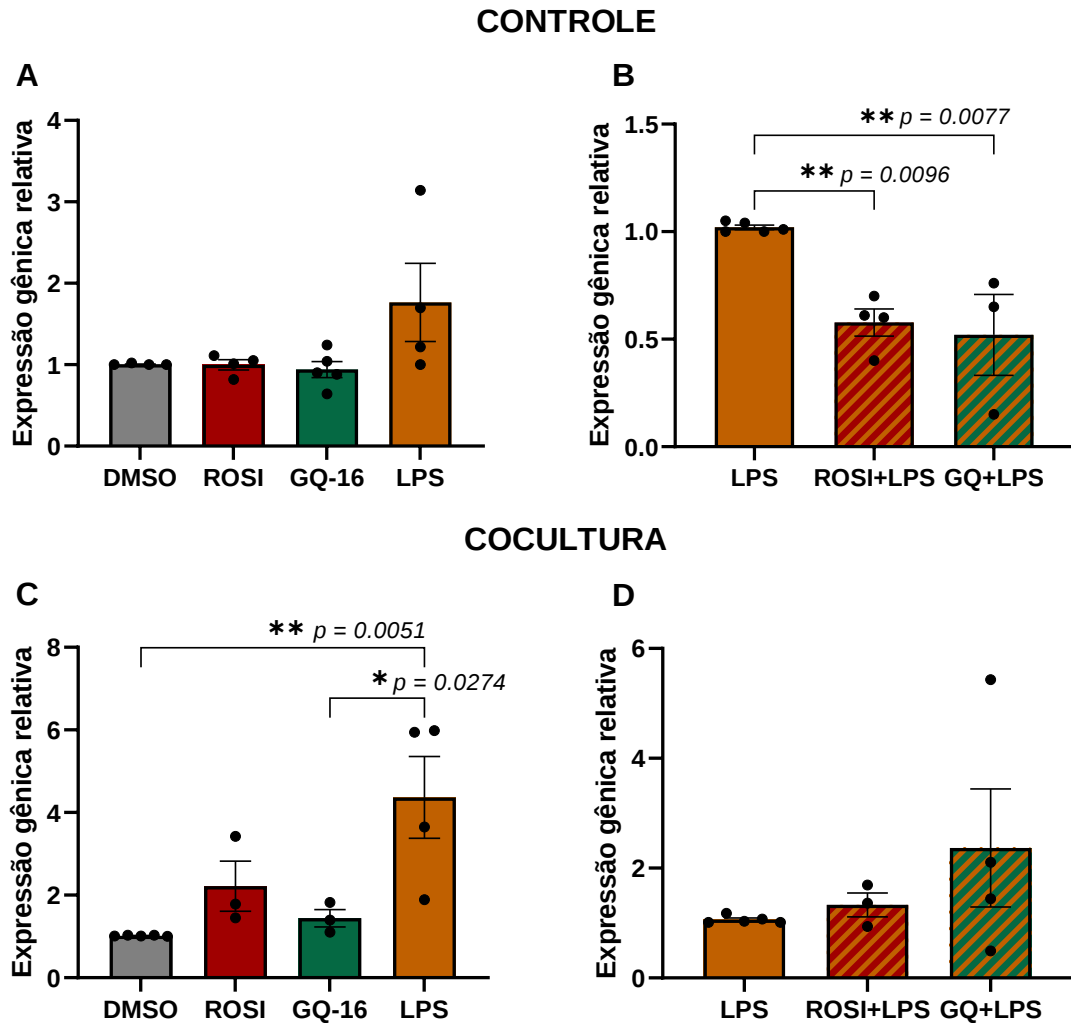


Figura 23 Efeito de agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm do *Glut4*, em sistema de cocultura por contato de macrófagos-adipócitos. Dois dias após sua confluência (D0), os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados com coquetel indutor de diferenciação por mais dois dias (D2). Em seguida, foram tratados com 5 μ g/mL de insulina por mais 12 dias. Após esse período, os macrófagos, pré-tratados ou não com LPS (100 ng/mL) por 24 horas, foram adicionados sobre os adipócitos (C e D) e, então, realizados os tratamentos com veículo (DMSO 0,01%), rosiglitazona (ROSI, 10⁻⁵M) e GQ-16 (10⁻⁵M). No caso do controle interno (A e B), os adipócitos diferenciados e os macrófagos foram cultivados isoladamente e receberam os mesmos tratamentos que a cocultura. Após 24 horas de tratamento, as células foram colhidas com Trizol para a extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro da *Glut4* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente, expressos como média da expressão relativa $\pm$ EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey.

Ao se comparar cocultura e controle, apenas ROSI+LPS e GQ+LPS não alteraram de forma a ter significância estatística a expressão do RNAm do *Glut4* (figura 24 E e F). Já os outros tratamentos mostraram diminuição na expressão do

RNAm do *Glut4* na cocultura em comparação ao experimento controle (figura 24 A a D).

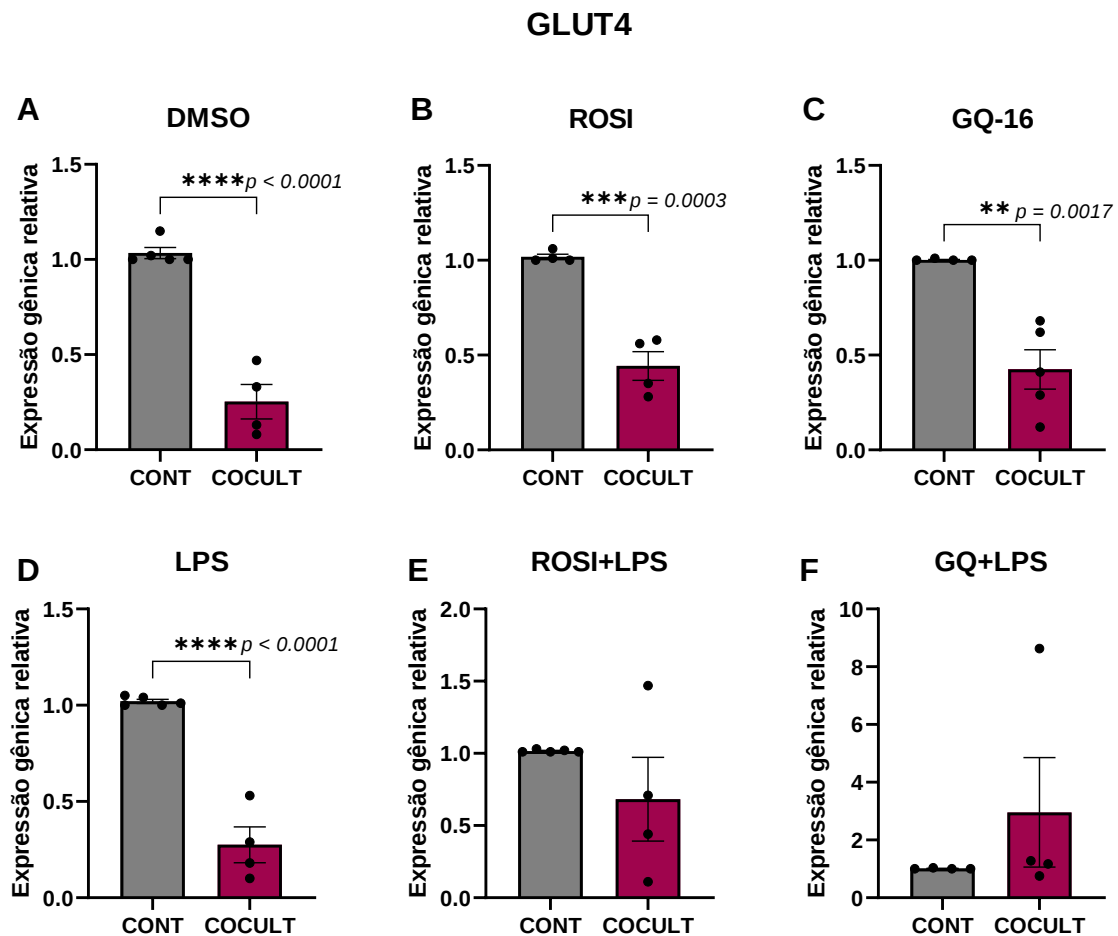


Figura 24 Comparação do controle com a cocultura de macrófagos-adipócitos por contato na expressão do RNAm do *Glut4*. Dois dias após sua confluência (D0), os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados com coquetel indutor de diferenciação por mais dois dias (D2). Em seguida, foram tratados com 5 µg/mL de insulina por mais 12 dias. Após esse período, os macrófagos, pré-tratados ou não com LPS (100 ng/mL) por 24 horas, foram adicionados sobre os adipócitos e, então, realizados os tratamentos com veículo (DMSO 0,01%), rosiglitazona (ROSI, 10⁻⁵M) e GQ-16 (10⁻⁵M). No caso do controle interno, os adipócitos diferenciados e os macrófagos foram cultivados isoladamente e receberam os mesmos tratamentos que a cocultura. Após 24 horas de tratamento, as células foram colhidas com Trizol para a extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do *Glut4* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente, expressos como média da expressão relativa ± EPM e analisados por Teste t de Student.

4.3.6 Efeito de Agonistas de PPAR γ na Expressão Relativa do RNAm do *Glut4* em Sistema de Cocultura *Transwell* de Macrófagos-Adipócitos

A figura 25 mostra a expressão relativa do gene GLUT4 em sistema *transwell* de cocultura de macrófagos-adipócitos após o tratamento com os agonistas total e parcial de PPAR γ , rosiglitazona e GQ-16, respectivamente, bem como o efeito do pré-estímulo dos macrófagos pelo LPS (100 ng/mL) por 24 horas.

Nenhum dos tratamentos apresentou efeito na expressão relativa do RNAm do *Glut4* quando em comparação ao DMSO (figura 25 A). Porém, tanto a rosiglitazona quanto o GQ-16, quando os macrófagos não foram pré-estimulados com LPS, mostraram diferença estatística relevante em comparação ao tratamento com o LPS, mostrando a expressão do gene ser 1,89 e 1,80 vezes maior, respectivamente. Por outro lado, os agonistas, na presença dos macrófagos pré-tratados com LPS, não demonstraram efeito em relação ao pré-tratamento realizado apenas com o LPS nessas células (figura 25 B).

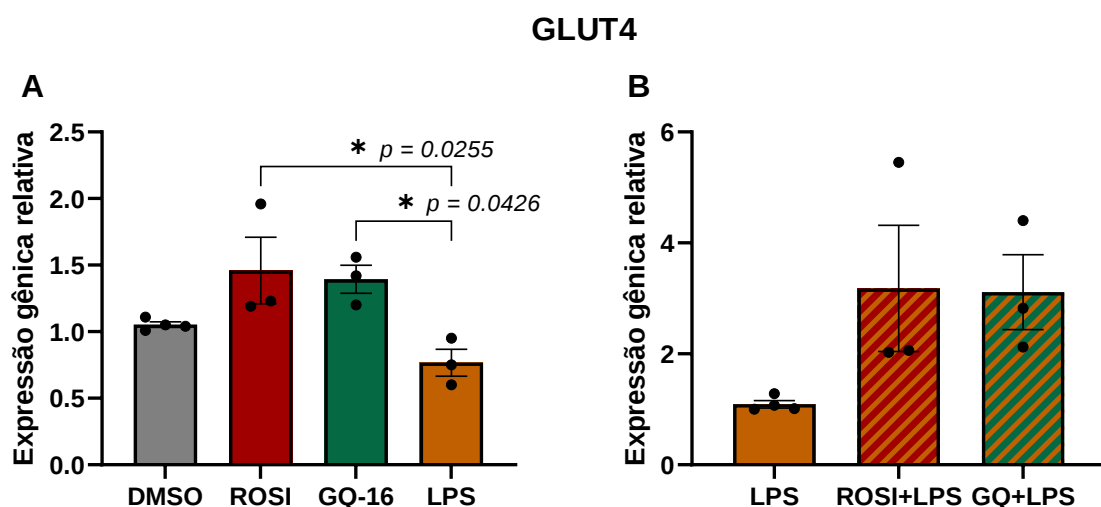


Figura 25 Efeito de agonistas de PPAR γ na expressão relativa do RNAm do *Glut4*, em sistema de cocultura *transwell* de macrófagos-adipócitos. Dois dias após sua confluência (D0), os pré-adipócitos 3T3-L1 foram tratados com coquetel indutor de diferenciação por mais dois dias (D2). Em seguida, foram tratados com 5 μ g/mL de insulina por mais 12 dias. Após esse período, os macrófagos, pré-tratados ou não com LPS (100 ng/mL) por 24 horas, foram adicionados sobre os adipócitos e, então, realizados os tratamentos com veículo (DMSO 0,01%), rosiglitazona (ROSI, 10⁻⁵M) e GQ-16 (10⁻⁵M). Após 24 horas de tratamento, as células foram colhidas com Trizol para a extração do RNA. A expressão relativa do RNA mensageiro do *Glut4* foi analisada por PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq). Dados de experimentos realizados de forma independente,

expressos como média da expressão relativa $\pm$ EPM e analisados por ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey.

5 DISCUSSÃO

A obesidade é uma doença que tem crescido em todo o mundo. No Brasil, de acordo com dados da Pesquisa Nacional de Saúde PNS/2020, aproximadamente 60% dos adultos já têm excesso de peso e 1 em cada 4 tem obesidade. Em 2021, 9,1 milhões de indivíduos adultos atendidos na Atenção Primária à Saúde (APS) já tinham diagnóstico de excesso de peso e mais de 4 milhões, de obesidade, sendo que 624 mil tinham obesidade grave (86). Além disso, a obesidade afeta negativamente todo o corpo, sendo um fator de risco para uma série de doenças como: DM 2, Alzheimer, demência vascular, apneia obstrutiva do sono, aterosclerose acelerada, insuficiência cardíaca, doença hepática gordurosa, esteato-hepatite não alcoólica, osteoartrite, sistema imunológico alterado, resposta prejudicada às vacinas, e maior susceptibilidade ao câncer (87). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), em parceria com o Fundo Mundial para Pesquisa contra o Câncer (WCRF) (2009), a obesidade é responsável por alto índice de diagnósticos de câncer entre homens e mulheres (88). Ademais, essa enfermidade ainda pode levar a estereótipos e discriminação prejudicando o ser humano para além da questão física, mas também nos aspectos sociais e psicológicos (89).

No indivíduo obeso, o tecido adiposo é infiltrado por um grande número de macrófagos, e esse recrutamento é associado à inflamação sistêmica e consequente resistência à insulina (6). No presente estudo, a fim de representar essa infiltração de macrófagos *in vitro*, foram utilizadas células RAW 264.7. Essas células são derivadas de camundongos BALB/c e são descritas como um modelo apropriado de macrófagos. Elas são capazes de realizar pinocitose e fagocitose e, após a estimulação com LPS, aumentam a produção de mediadores inflamatórios, como TNF α , IL-6 e IL-1 β (90,91). Ainda, os macrófagos do tecido adiposo passam por uma mudança fenotípica quando na condição de obesidade: passam do seu perfil M2, responsável pela produção de mediadores anti-inflamatórios, para o seu perfil M1, o qual é responsável pela produção de citocinas inflamatórias (15).

Portanto, a obesidade está relacionada a um estado de inflamação crônica, na qual a intercomunicação existente entre os adipócitos e macrófagos é uma realidade. Para a representação dos adipócitos neste estudo, foram utilizadas as células 3T3-L1, que é uma das linhagens de adipócitos mais frequentemente

empregadas em modelos *in vitro* (5). Os adipócitos diferenciados *in vitro* têm muitas características das células adiposas *in vivo*. Uma evidência disso é que a injeção subcutânea de pré-adipócitos em camundongos nude leva ao desenvolvimento de depósitos de gordura maduras que são histologicamente indistinguíveis do tecido adiposo branco. Durante a fase de crescimento, os pré-adipócitos são morfologicamente semelhantes aos fibroblastos. Na confluência, quando é realizada a indução da diferenciação, ocorrem mudanças drásticas, levando os pré-adipócitos a se converterem para uma forma esférica e acumular gotículas de gordura (92). Esse processo foi possível de ser observado nas células 3T3-L1 utilizadas neste trabalho, conforme foram se diferenciando (figura 8). Além disso, apesar de os pré-adipócitos 3T3-L1 se diferenciarem espontaneamente quando mantidos em SNB durante um certo período, esse processo pode ser acelerado por agentes indutores como dexametasona e IBMX, juntamente com concentrações de insulina (92). Foi exatamente essa a função do tratamento realizado com o meio indutor de diferenciação nos experimentos aqui descritos.

A cocultura de macrófagos e adipócitos maduros foi empregada no presente trabalho a fim de simular, *in vitro*, a condição de contato célula a célula que ocorre *in vivo* quando os macrófagos se infiltram no tecido adiposo. Outros estudos já se utilizaram dessa técnica para reproduzir outros tipos de interações celulares. A revisão de Miki e colaboradores (2012) comenta sobre como é praticamente impossível reproduzir o microambiente do câncer utilizando apenas a linhagem cancerígena e por isso, composições de cocultura de pelo menos dois tipos diferentes de células (linhagem de câncer e de fibroblastos, por exemplo) foram estabelecidas para avaliar as interações célula-célula, simulando assim, de forma máxima, o microambiente que ocorre *in vivo* durante o câncer humano (93). Artigos anteriores já realizaram esse tipo de interação, tanto por contato quanto pelo sistema *transwell*, também utilizando as células que foram usadas no presente trabalho, macrófagos murinos RAW 264.7 e pré-adipócitos 3T3-L1 (26,27,75,80–82,94,95). Na cocultura por contato, como ocorre o contato direto entre as células, é verificada a expressão do RNAm de genes tanto dos macrófagos quanto dos adipócitos. Por outro lado, na cocultura *transwell*, é observada como que a secreção de substâncias pelos macrófagos pode alterar a função dos adipócitos.

Já se sabe que o PPAR γ possui papel fundamental na diferenciação de adipócitos. Quando esse receptor é ativado por um ligante nos fibroblastos, a

diferenciação é estimulada, fazendo com que ocorra mudanças morfológicas na célula, acúmulo de lipídeos e a expressão de vários genes característicos das células de gordura (42). O PPAR γ também é expresso em macrófagos e, nessas células, regula negativamente vários genes inflamatórios. Experimentos realizados em camundongos *knock-out* para esse receptor já demonstraram maior ativação da via inflamatória, intolerância à glicose e resistência insulínica (49).

As TZDs são agonistas totais de PPAR γ que agem como sensibilizadores insulínicos, uma vez que aumentam a captação de glicose pelos tecidos sensíveis à insulina. A ativação do PPAR γ pelas TZDs também ocorre nos macrófagos e nessas células, esses agonistas impedem a ativação do NF κ B, consequentemente inibindo a expressão de genes envolvidos nas respostas imune e inflamatória, diminuindo assim a produção de citocinas como TNF α e IL-6 (54). Porém, o uso das TZDs tem sido associado a muitos efeitos adversos como: ganho de peso, insuficiência cardíaca, fraturas ósseas, retenção hídrica, perda óssea e aumento da incidência de câncer de bexiga (65). Como alternativa às TZDs, foram desenvolvidos agonistas parciais de PPAR γ , que mostraram manter o efeito sensibilizador insulínico dos agonistas totais, porém, por não ativarem totalmente o receptor, não apresentaram os efeitos indesejados (67). Amato e colaboradores (2012) relata sobre o desenvolvimento do GQ-16, agonista parcial de PPAR γ , que exibe potente atividade antidiabética em camundongos sem apresentar os efeitos colaterais relacionados ao ganho de peso e edema associados às TZDs (73). Esse agonista parcial foi utilizado como ligante do PPAR γ , juntamente com a rosiglitazona, nos experimentos descritos nesta dissertação.

Para a indução do processo inflamatório, os macrófagos foram tratados com LPS, o qual é o principal componente da membrana externa de bactérias gram-negativas. O LPS no espaço extracelular é detectado, na membrana plasmática da célula, pelo receptor do tipo toll 4 (TLR4). Esse receptor é expresso em células como monócitos, macrófagos e células dendríticas, por exemplo. Ele é associado à proteína MD-2 de forma estável no seu fragmento extracelular, e, ao se ligar ao LPS, com a ajuda da proteína de ligação ao LPS (LBP) e da proteína CD14, é ativado e internalizado, onde transduz o sinal, através dos adaptadores MyD88 e TRIF, para ativar a transcrição, mediada por NF κ B e TRIF, de genes do sistema imunológico. A via do NF κ B é ativada por meio da degradação da sua proteína inibitória (I κ B), que é fosforilada pela IKK e sofre poliubiquitinação. A degradação da I κ B permite a

translocação das proteínas do NFκB para o núcleo, onde se ligam aos seus sítios de ligação ao DNA e promovem a regulação de genes que codificam vários mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, COX-2 e óxido nítrico induzível (iNOS) (96–99).

No que diz respeito à concentração utilizada dos agonistas, foi utilizada a concentração de 10^{-5} M baseado em estudos anteriores, os quais utilizaram essa mesma quantidade de rosiglitazona e GQ-16 em seus experimentos (73). Além disso, ensaios de viabilidade celular já foram realizados nos macrófagos RAW 264.7, que demonstraram que essa concentração do agonista total e parcial não causam efeito sobre a viabilidade da célula, não apresentando, portanto, toxicidade alguma para a mesma (100).

No presente trabalho, a exposição prévia dos macrófagos ao LPS (100 ng/mL), por 24 horas, foi capaz de induzir aumento significativo na expressão do RNAm da *Il6* em comparação ao tratamento com o controle (DMSO 0,01%) e com os agonistas (ROSI e GQ-16) na cocultura, tanto pelo contato direto entre as células quanto pelo sistema *transwell*. Este resultado está de acordo com o estudo de Chae (2018) que demonstrou que as células RAW 264.7 pré-tratadas com LPS, mesmo em doses baixas (50 ng/mL) e doses super baixas (50 pg/mL), apresentaram aumento da produção de IL6 detectada por ELISA (101). O mesmo já foi visto em experimentos realizados em sistema de cocultura de RAW e 3T3-L1, no qual o contato direto entre as células, sob a influência anterior do estímulo inflamatório pelo LPS, elevou a expressão do RNAm desse gene quando em comparação com as células cultivadas separadamente (75). Ainda, trabalhos prévios do grupo já mostraram que o tratamento com LPS por 6h e 24h foi capaz de aumentar em 200 e em 700 vezes, respectivamente, a expressão gênica da *Il6* em macrófagos (102).

Esse efeito do LPS na expressão do RNAm da *Il6* foi revertido pela rosiglitazona, quando os macrófagos foram pré-tratados com LPS, nos dois sistemas de cocultura. Semelhante resposta já foi documentada no estudo de Zhou e colaboradores (2021), em que experimentos de ELISA demonstraram que a rosiglitazona foi capaz de diminuir o teor de IL-6, induzido pelo LPS, nas células RAW 264.7, de uma maneira dose-dependente (103). Também em células 3T3-F442A, a rosiglitazona mostrou reduzir a secreção basal de IL-6 (104). E, apesar de experimentos realizados anteriormente terem mostrado o potencial desse agonista total de PPARγ em reduzir a expressão relativa do RNAm da *Il6* na linhagem de

macrófagos RAW 264.7 pré-tratados com LPS (102), esta dissertação é o primeiro estudo, que se tem conhecimento, que demonstra esse efeito da rosiglitazona em sistema de cocultura de macrófagos-adipócitos.

O GQ-16, quando os macrófagos foram pré-tratados com LPS, mostrou resultado diferente, de maneira estatisticamente relevante, em comparação ao LPS. Porém, sua resposta foi inconsistente na cocultura por contato e no controle (quando as células foram cultivadas separadamente), aumentando e diminuindo a expressão do RNAm da *Il-6*, respectivamente. Já na cocultura por sistema *transwell*, o agonista parcial não alterou a expressão relativa do gene estimulada pelo LPS. Apesar de haver estudos demonstrando o menor efeito adipogênico do GQ-16 em relação à rosiglitazona, como no caso do trabalho de Milton e colaboradores (2015) no qual o agonista parcial de PPAR γ provocou fraca indução de genes relacionados à adipogênese como *C/ebpa*, *Cdipoq*, *Fabp4*, *Lpl* em comparação à rosiglitazona (85), pouco se sabe sobre a diferença entre o GQ-16 e a rosiglitazona à nível de efeito anti-inflamatório. Entretanto, existem estudos que já demonstraram que o GQ-16, assim como as TZDs, pode apresentar alguma resposta anti-inflamatória. Em células 3T3-L1, esse agonista parcial de PPAR γ já demonstrou conseguir reprimir genes relacionados com o processo inflamatório, como o orosomucóide 2 (*orm2*), a galectina 9 e a molécula de adesão celular vascular 1 (VCam1) (85). O GQ-16 também foi capaz de reduzir significativamente a expressão das citocinas pró-inflamatórias IFN γ e TNF α em células mononucleares do sangue periférico de voluntários saudáveis, as quais receberam irradiação *in vitro* (105). Além disso, Amato e colaboradores (2012) já relataram que o GQ-16 e a rosiglitazona foram capazes de bloquear os efeitos de uma dieta rica em gordura nas vias inflamatórias intracelulares de forma similar. Ambos os ligantes reverteram a supressão do IKB α e reduziram a fosforilação da JNK no tecido adiposo, fígado e músculo de camundongos submetidos a uma dieta rica em gordura (73).

Diante desses efeitos do GQ-16 já relatados, juntamente com o resultado obtido na expressão do RNAm da *Il6* no experimento controle, é possível sugerir que o GQ-16 possui, pelo menos em parte, uma ação anti-inflamatória. A fim de se determinar se tal ação decorre de um aumento de marcadores M2, anti-inflamatórios, de macrófagos, ao invés de uma diminuição de marcadores M1, pró-inflamatórios, foram adquiridos *primers* de genes associados ao perfil M2 dos macrófagos: arginase 1 (*Arg1*) e receptor de manose C – tipo 1 (*Mrc1*). Todavia, por

motivo desconhecido, não se conseguiu obter a amplificação desses genes pelos experimentos de RT-PCR em nenhuma das culturas de células. Portanto, seguiu-se com a investigação da expressão dos genes inflamatórios e adipogênicos.

Curiosamente, o pré-tratamento dos macrófagos com o LPS, diminuiu a expressão do RNAm do *Tnfa*, tanto em relação ao veículo (DMSO 0,01%), quanto em relação ao tratamento das células com os agonistas. Esse resultado foi observado tanto na cocultura por contato, quanto no controle interno, quando as células foram cultivadas separadamente. Essa diminuição da expressão gênica do *Tnfa*, em resposta ao estímulo inflamatório nas células RAW 264.7, vai contra resultados anteriores de vários estudos que demonstraram que o LPS, na verdade, aumenta a expressão desse gene em macrófagos (79,101,106). Apesar da falta de efeito do LPS, tanto a rosiglitazona quanto o GQ-16, quando os macrófagos foram pré-expostos ao estímulo inflamatório, apresentaram diminuição da expressão relativa do RNAm do *Tnfa* em comparação ao LPS na cocultura por contato. Estudos anteriores já relataram um efeito anti-inflamatório da rosiglitazona, na qual ela conseguiu diminuir os níveis do *Tnfa* induzido pelo LPS em diferentes contextos: em células endoteliais da veia umbilical humana foi capaz de diminuir em quase 35% a secreção dessa citocina detectada por ELISA, e resultados similares também foram obtidos por RT-PCR e análise de Western Blott (107); no soro de camundongos tratados com o lipopolissacarídeo, o pré-tratamento com essa TZD diminuiu os níveis sanguíneos de *Tnfa* (108); ainda, a rosiglitazona já mostrou diminuir a expressão do RNAm do *Tnfa* induzido por LPS na placenta de fêmeas grávidas de camundongo (109); e inclusive em células RAW 264.7, o conteúdo de *Tnfa*, que havia sido estimulado pelo LPS, foi diminuído com o tratamento com o agonista total de PPAR γ em experimentos feitos por ELISA (103).

Ao se realizar os experimentos de RT-PCR para a visualização da expressão do RNAm do *Tnfa* nas células da cocultura *transwell*, não houve a amplificação do gene. Uma possível explicação para isso se deve ao fato de, nesse tipo de cocultura, apenas os adipócitos serem coletados e a atuação dos macrófagos na secreção de substâncias se dê apenas de forma parácrina. Diante disso, como os macrófagos são a principal fonte de TNF α no tecido adiposo obeso (10), a quantidade expressa na cocultura *transwell* não foi suficiente para se obter amplificação do gene. Resultado que corrobora tal hipótese já pôde ser visto, em experimentos realizados anteriormente, em cultura de pré-adipócitos 3T3-L1, na qual

a expressão relativa do RNAm do *Tnfa* não foi alterada pelo tratamento com os agonistas de PPAR γ no início da diferenciação dipogênica, mas, em cultura de macrófagos RAW 264.7, a rosiglitazona conseguiu diminuir a expressão desse gene induzida pelo tratamento com LPS (102).

O LPS induziu um aumento na expressão do RNAm da *Fabp4* e do *Glut4* em comparação ao veículo na cocultura por contato, porém, no experimento controle, no qual as células foram cultivadas separadamente, e na cocultura *transwell* o mesmo não foi observado. Já com relação à adiponectina, o LPS não apresentou efeito sobre a sua expressão gênica na cocultura por contato, mas sim na cocultura *transwell*, na qual provocou o aumento da expressão do RNAm do gene. Existem estudos de cocultura de macrófagos-adipócitos nos quais o estímulo com LPS foi realizado por 48 horas diretamente na cocultura (75,76), porém outros estudos já demonstraram o efeito do LPS na expressão gênica em menores tempos, como é o caso do artigo de Zhou e colaboradores (2020), em que a cocultura de RAW 264.7 e 3T3-L1, sob o estímulo do LPS por 6 horas, foi capaz de aumentar a expressão da enzima de conversão de TNF α (TACE) e a proteína iRhom2, responsável por mediar a maturação e o transporte de TACE em macrófagos e consequentemente promovendo a hidrólise extracelular de TNF α (77). Além disso, já foi visto que a estimulação com LPS feita em cocultura de macrófagos-adipócitos foi capaz de alterar a expressão de genes em tratamentos feitos por 4, 8, 12 e 24 horas, nos quais os valores com relação ao controle foram dobrados. No mesmo trabalho é dito que a estimulação das células com LPS alterou a expressão de quase 80% dos genes que apresentam sítio de ligação ao NF κ B em suas regiões promotoras. Esse grupo NF κ B inclui várias quimiocinas, genes relacionados à sinalização de TNF α , interferons, entre outros (95). Diante de tais resultados e após uma pesquisa em diversos estudos, o tempo escolhido para tratamento dos macrófagos com LPS neste trabalho foi de 24 horas, assim como realizado em pesquisas anteriores que executaram cocultura também com células RAW 264.7 e 3T3-L1 nesse tempo (74,80,83).

Seria possível sugerir ainda que o LPS, por aumentar a expressão de genes inflamatórios, como já discutido anteriormente, poderia também regular, de forma indireta, genes adipogênicos. Isso porque, com o aumento de mediadores inflamatórios, ocorre também a indução da lipólise, aumentando a quantidade de ácidos graxos livres, os quais, além de agravarem a resposta inflamatória, também

induzem resistência à insulina. Fasshauer e colaboradores (2003) em seu estudo demonstram que a expressão gênica e a secreção proteica de adiponectina é reduzida quando as células 3T3-L1 são tratadas com IL-6 e TNF α (110). Também Rotter e colaboradores (2003) em seu artigo mostram que células 3T3-L1 diferenciadas, tratadas com IL-6 e TNF α por 24 horas, apresentam menor expressão do RNAm do *Glut4* (111). A falta de efeito pelo LPS na expressão de alguns genes, como no caso da adiponectina na cocultura por contato ou da FABP4 e GLUT4 na cocultura *transwell*, pode ter ocorrido devido ao baixo número de replicatas realizadas. Ainda, resultados inesperados, como o aumento da expressão do RNAm da *Adpn* no pré-tratamento dos macrófagos com LPS, por exemplo, verifica-se pelo grande erro padrão da média observado, o qual também é resultado de um pequeno número de replicatas realizadas. Essa baixa quantidade de replicatas foi consequência da falta de recursos e de tempo para a realização dos experimentos.

Quando as células RAW 264.7 foram pré-tratadas com LPS, a rosiglitazona demonstrou aumentar o efeito induzido pelo LPS na expressão relativa do RNAm da *Fabp4* na cocultura por contato. Porém, o mesmo não foi visto na expressão do RNAm da *Adpn* e do *Glut4*. Estudos anteriores já relataram que, em células da medula óssea, a rosiglitazona conseguiu aumentar a expressão relativa do RNAm da *Fabp4* de uma maneira dose-dependente (112). Ainda, em modelos animais de obesidade e diabetes, nos quais a expressão de GLUT4 estava reduzida nas células adiposas, o tratamento com troglitazona restaurou a expressão desse gene para níveis normais (113). Curiosamente, no presente trabalho, a rosiglitazona, quando os macrófagos foram pré-tratados com LPS, diminuiu a expressão do RNAm do *Glut4* em comparação ao tratamento com o LPS sozinho, porém apenas no experimento controle (quando as células foram cultivadas separadamente), enquanto que na cocultura por contato e na cocultura *transwell* não apresentou diferença estatisticamente significativa.

O tratamento com TZD também aumentou a expressão gênica e proteica da FABP4, ADPN e GLUT4 nos adipócitos de indivíduos não-diabéticos porém com marcadores de resistência insulínica (114). Outro estudo mostrou que a expressão do RNAm da *Adpn* diminuiu substancialmente após 48 horas que o meio condicionado, proveniente de macrófagos estimulados com LPS, foi adicionado às células 3T3-L1 (80). No presente trabalho, a expressão gênica de adiponectina não mostrou resultados significativos na cocultura por contato, mas na cocultura

transwell, na condição de pré-exposição da célula RAW 264.7 ao LPS, a rosiglitazona mostrou aumentar a expressão relativa do RNAm da *Adpn* tanto em relação ao LPS quanto em relação ao tratamento com GQ-16, confirmando o efeito anti-inflamatório da TZD. Essa diferença do agonista total para o agonista parcial também pôde ser observada na expressão do RNAm da *Fabp4* no experimento em que macrófagos e adipócitos foram cultivados separadamente, e, na cocultura por sistema *transwell*, apesar da falta de significância estatística, a rosiglitazona demonstrou um aumento de 8 vezes na expressão desse gene em relação ao tratamento realizado com o GQ-16. Estudos prévios, em adipócitos diferenciados, demonstraram que a expressão gênica da *Fabp4*, adipocina que causa ganho de peso, foi mais pronunciada no tratamento com Pioglitazona que no tratamento com o GQ-16 (84), o que corrobora os achados de Amato e colaboradores (2012) que mostram que o GQ-16 apresenta menor efeito adipogênico em relação à rosiglitazona, uma vez que melhora a sensibilidade insulínica em camundongos, mas sem induzir o ganho de peso, que é característico do agonista total (73). Trabalhos prévios, realizados pelo presente grupo de pesquisadores, já mostraram que a rosiglitazona possui um efeito adipogênico no início da diferenciação de pré-adipócitos, uma vez que este ligante foi capaz de aumentar a expressão gênica da *Fabp4* e do *Glut4* nessas células, enquanto que o GQ-16, embora também tenha apresentado efeito adipogênico, este foi em menor grau quando comparado ao produzido pelo agonista total (102).s

Foi feita ainda a comparação dos experimentos de cocultura por contato com os respectivos experimentos-controle, onde as células RAW 264.7 e 3T3-L1 foram cultivadas separadamente. Nos tratamentos em que foi obtida significância estatística, a cocultura mostrou aumentar a expressão do RNAm da *Il6* e do *Tnfa* em comparação ao controle, mostrando que o contato direto entre as células promove uma elevação do processo inflamatório. Esses resultados podem ser corroborados por trabalhos anteriores em que a cocultura de macrófagos RAW 264.7 e adipócitos 3T3-L1 aumentou a expressão gênica de *Il6*, *Mcp-1* e *Tnfa* (26). O único tratamento que mostrou o contrário foi o tratamento realizado com o veículo, no qual a cocultura mostrou um menor efeito na expressão do *Tnfa* em relação ao controle. O DMSO, utilizado como veículo, também pode interferir na expressão de genes e o ideal é que se realize um controle no qual não haja a adição de nenhum tratamento ao meio de cultura, a fim de se obter o real resultado da interação entre as células na

expressão gênica. Porém, como a placa disponível para realização da cocultura *transwell* era de 6 poços, não foi possível efetuar esse tipo de controle.

Ainda, em estudo anterior, foi observado que a cocultura por contato de RAW 264.7 e 3T3-L1 promoveu a diminuição da expressão gênica da *Adpn* em comparação ao cultivo separado das células (26). O mesmo pôde ser visto no presente trabalho, uma vez que a cocultura por contato, nos tratamentos que demonstrou diferença estatisticamente significativa, diminuiu a expressão do RNAm da *Adpn*. A cocultura por contato também promoveu a diminuição da expressão do RNAm da *Fabp4* e *Glut4* na maioria dos tratamentos realizados, sendo que apenas o tratamento do GQ-16+LPS pareceu aumentar a expressão gênica da *Fabp4* na cocultura em relação ao controle. A inflamação resultante da obesidade, promove resistência à insulina e, como o GLUT4 é ativado em resposta à insulina, é de se esperar que, em um estado de obesidade, este transportador esteja diminuído, impossibilitando assim a captação de glicose. Estudos anteriores já relataram, por exemplo, que o tratamento com TNF α reduz drasticamente a expressão proteica de GLUT4 em adipócitos (15). Por outro lado, um aumento dos níveis circulantes de FABP4 já mostrou estar associado à obesidade, síndrome metabólica, resistência insulínica e DM 2 (18), sendo assim, em oposição ao que de fato ocorreu, esperava-se que a cocultura aumentasse a expressão gênica da *Fabp4*.

No presente trabalho, as células foram mantidas em contato direto por um período de 24 horas, conforme estudos anteriores (77–79,83). Porém, vários estudos também já relataram manter a cocultura em incubação por 48 horas (26,75,76,80). Além disso, as quantidades de células utilizadas em cada trabalho variam muito e, como a maioria dos artigos não menciona o tipo de placa de cultura celular utilizada, tornou-se um desafio determinar a quantidade adequada para a realização dos experimentos. Artigos anteriores obtiveram resultados favoráveis com números maiores do que os aqui utilizados, como é o caso de Kang e colaboradores (2019) que utilizaram 5×10^5 células/poço de RAW 264.7 e observaram que a cocultura dessas células com as 3T3-L1 promoveu um aumento significativo da resposta inflamatória, por meio da produção de IL-6 e MCP-1, quando em comparação ao cultivo separado dessas células (80). Por outro lado, artigos que utilizaram macrófagos em menores quantidades das aqui empregadas também apresentaram resultados benéficos, como é o caso do estudo de Suganami e colaboradores (2005), no qual a adição de 1×10^5 células RAW 264.7 por poço sobre

as células 3T3-L1 provocou o aumento da expressão do RNAm das citocinas pró-inflamatórias *Mcp-1*, *Il6* e *Tnfa* e a diminuição da expressão da adipocina anti-inflamatória *Adpn*. Ainda, os mesmos pesquisadores mostraram que a extensão das mudanças na expressão desses genes foi dependente da duração da cocultura e do número de RAW 264.7 (26). Dessa forma, a falta de significância estatística em determinados tratamentos aqui apresentados pode ter ocorrido devido ao tempo da cocultura ou da quantidade de células utilizadas, e mais estudos, em diferentes tempos e número de células, devem ser realizados para confirmar tal hipótese.

Ainda é importante mencionar que um número crescente de estudos têm relatado que as TZDs possuem a capacidade de exercer algumas ações independentes do PPAR γ (115). Além disso, outros trabalhos têm relatado a ocorrência de efeitos rápidos induzidos pelas TZDs, sugerindo assim que esses fármacos podem possuir ações que são mais características de um envolvimento de um receptor de superfície celular do que de um receptor nuclear (116). Dessa forma, foi identificado o GPR40, receptor acoplado à proteína G que é altamente expresso nas células beta pancreáticas e, em menor grau, em outros tecidos, incluindo trato intestinal, células ósseas, células epiteliais pulmonares, cérebro e monócitos. Já foi observado que esse receptor pode ser ativado por ácidos graxos livres e pelas TZDs, e os efeitos mediados por ele na secreção de insulina, estimulada por glicose, são associados com um aumento do influxo de cálcio e não são alterados pela inibição da via da ERK, a qual também é ativada quando os ácidos graxos livres se ligam ao GPR40 (63).

Para os ligantes que ativam ambos os receptores (PPAR γ e GPR40), uma sinalização promovida pelo GPR40 é claramente útil (p38 MAPK), enquanto outros aspectos (ERK1/2) são indesejáveis em relação à ativação do PPAR γ . Enquanto a ativação do GPR40/p38MAPK aumenta os efeitos genômicos do PPAR γ , a ERK1/2 fosforila e assim inativa o PPAR γ , e, separadamente, tem efeitos inflamatórios e proliferativos na vasculatura. Além disso, a resistência à insulina tem sido associada à fosforilação do PPAR γ na Ser273 pela ERK1/2. Agonistas do GPR40, como as TZDs, provavelmente ativam a ERK1/2 na vasculatura. Mas os ligantes de PPAR γ que demonstram nenhuma ou substancialmente reduzida sinalização GPR40/ERK podem ser agonistas mais potentes de PPAR γ e podem ter um melhor perfil de segurança. Ligantes ideais manteriam a capacidade de ativar a p38 MAPK, mas não

a ERK1/2, uma vez que não ativar a ERK1/2 evitaria sua inativação do PPAR γ e o seu impacto deletério na resistência à insulina e inflamação (63).

6 CONCLUSÃO

De modo geral, os resultados obtidos neste trabalho confirmam a ação anti-inflamatória exercida pela rosiglitazona, porém não são suficientes para propor um efeito anti-inflamatório exercido pelo agonista parcial também. Entretanto, diante de estudos anteriores que já demonstraram esse efeito pelo GQ-16, mais estudos sobre esse tema devem ser realizados, inclusive para se investigar o papel desse ligante na expressão de marcadores de macrófagos M2. Além disso, foi possível observar, com os resultados aqui descritos, o menor efeito adipogênico exercido pelo GQ-16 em comparação à rosiglitazona. Por fim, é possível concluir que a interação entre os macrófagos e os adipócitos possui papel relevante na regulação da expressão de genes inflamatórios e adipogênicos.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Obesity and overweight [Internet]. 2021 [cited 2022 Jun 21]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
2. Nguyen DM. The Epidemiology of Obesity. *Gastroenterol Clin NA* [Internet]. 2010;39(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gtc.2009.12.014>
3. Hill J o., Wyatt HR, Peters JC. Energy balance and obesity. *Circulation*. 2012;126(1).
4. Bachmayer C, Lammert A, Hasenberg T. Healthy Obese and Post Bariatric Patients – Metabolic and Vascular Patterns. 2013;483–7.
5. Kalupahana NS, Claycombe KJ, Moustaid-Moussa N. (n-3) Fatty Acids Alleviate Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance: Mechanistic Insights. *Adv Nutr*. 2011;2(4):304–16.
6. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2011;11(2):85–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21252989>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3518031>
7. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. 2006;444(December).
8. Mancuso P. The role of adipokines in chronic inflammation. *ImmunoTargets Ther*. 2016;5:47–56.
9. Evans RM, Barish GD, Wang Y. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*. 2004;10(4):1–7.
10. Kern L, Mittenbühler MJ, Vesting AJ, Ostermann AL, Wunderlich CM, Wunderlich FT. Obesity-induced TNF α and IL-6 signaling: The missing link between obesity and inflammation- driven liver and colorectal cancers. *Cancers (Basel)*. 2019;11(1):1–21.
11. Aldhahi W, Hamdy O. Adipokines , Inflammation , and the Endothelium in

- Diabetes. 2003;(Cvd).
12. Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages : their role in adipose tissue remodeling. 2010;88(July):33–9.
 13. Tateya S, Kim F, Tamori Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. 2013;4(August):1–14.
 14. Yu R, Kim CS, Kwon BS, Kawada T. Mesenteric adipose tissue-derived monocyte chemoattractant protein-1 plays a crucial role in adipose tissue macrophage migration and activation in obese mice. *Obesity*. 2006;14(8):1353–62.
 15. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR, Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization Find the latest version : Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117(1):175–84.
 16. Olson AL, Pessin JE. Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu Rev Nutr*. 1996;16:235–56.
 17. Cawthorn WP, Scheller EL, Learman BS, Parlee SD, Simon BR, Mori H, et al. Bone marrow adipose tissue is an endocrine organ that contributes to increased circulating adiponectin during caloric restriction. *Cell Metab*. 2014;20(2):368–75.
 18. Furuhashi M. Fatty Acid-Binding Protein 4 in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *J Atheroscler Thromb*. 2019;216–32.
 19. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin Receptor Signaling in Normal. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014. 2014;6:a009191.
 20. Sears DD, Hsiao G, Hsiao A, Yu JG, Courtney CH, Ofrecio JM, et al. Mechanisms of human insulin resistance and thiazolidinedione-mediated insulin sensitization. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(44):18745–50.
 21. World Health Organization. Diabetes [Internet]. 2021 [cited 2022 Jun 28]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>

22. Grimbale RF. Inflammatory status and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002;5(5):551–9.
23. Rull A, Camps J, Alonso-Villaverde C, Joven J. Insulin resistance, inflammation, and obesity: Role of monocyte chemoattractant protein-1 (orCCL2) in the regulation of metabolism. *Mediators Inflamm*. 2010;2010(Figure 1).
24. Weisberg SP, Mccann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation. 2003;112(12).
25. Nguyen MTA, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem [Internet]*. 2007;282(48):35279–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M706762200>
26. Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: Role of free fatty acids and tumor necrosis factor α . *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(10):2062–8.
27. Lu Y, Ma J, Zhao J, Song Z, Zhou C, Liu X, et al. The Role of MKP-5 in Adipocyte-Macrophage Interactions during Obesity. *Obes Facts*. 2020;13(1):86–101.
28. De Boer AA, Monk JM, Robinson LE. Docosaheptaenoic acid decreases pro-inflammatory mediators in an in vitro murine adipocyte macrophage co-culture model. *PLoS One*. 2014;9(1):1–12.
29. Monsalve FA, Pyarasani RD, Delgado-Lopez F, Moore-Carrasco R. Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases. *Mediators Inflamm*. 2013;2013.
30. Aranda A, Pascual A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiol Rev*. 2001;81(3):1269–304.
31. 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.
32. Luconi M, Cantini G, Serio M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (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>
 33. Santos GM, Fairall L, Schwabe JWR. Negative regulation by nuclear receptors: A plethora of mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2011;22(3):87–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2010.11.004>
 34. Reddy JK, Hashimoto T. PEROXISOMAL β -OXIDATION AND PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR α : An Adaptive Metabolic System. *Annu Rev Nutr.* 2002;21(1):193–230.
 35. Mandard S, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(4):393–416.
 36. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. The PPARs: From orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem.* 2000;43(4):527–50.
 37. Decara J, Rivera P, López-Gamero AJ, Serrano A, Pavón FJ, Baixeras E, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Experimental Targeting for the Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. *Front Pharmacol.* 2020;11(May):1–18.
 38. Willson TM, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *next Gener Ther.* 1997;
 39. Janani C, Ranjitha Kumari BD. PPAR gamma gene - A review. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* [Internet]. 2014;9(1):46–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsx.2014.09.015>
 40. 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.
 41. Liu Y, Wang J, Luo S, Zhan Y, Lu Q. The roles of PPAR γ and its agonists in

- autoimmune diseases: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2020;(January).
42. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature.* 2006;
 43. Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA. Peroxisome Expression In Adipocyte Differentiation Receptor (PPAR) γ : Adipose-Predominant Expression And Induction Early In Adipocyte Differentiation. *Endocrinology.* 1994;135(2):798–800.
 44. Tontonoz P, Hu E, Graves R, Budavari A, Spiegelman B. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 1994;4:1–2.
 45. Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev.* 1995;9(2):168–81.
 46. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, et al. PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell.* 1999;4(4):611–7.
 47. Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra P, Delerive P, Majd Z, et al. Activation of Proliferator-activated Receptors α and γ Induces Apoptosis of Human Monocyte-derived Macrophages *. 1998;273(40):25573–80.
 48. 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.
 49. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. Vol. 72, *Annual Review of Physiology.* 2009. 219–246 p.
 50. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR γ Agonists Inhibit Production of Monocyte Inflammatory Cytokines. *Nature.* 1998;391(January):82–6.
 51. Yang WEN, Rachez C, Freedman LP. Discrete Roles for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α and Retinoid X Receptor in Recruiting Nuclear Receptor Coactivators. 2000;20(21):8008–17.

52. 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- γ . *Nature*. 2005;437(7059):759–63.
53. 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 (R α r)/Peroxisome Proliferator–Activated Receptor γ (Ppary) Heterodimer. *J Exp Med* [Internet]. 2001;193(7):827–38. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.193.7.827>
54. Quinn CE, Hamilton PK, Lockhart CJ, McVeigh GE. Thiazolidinediones: Effects on insulin resistance and the cardiovascular system. *Br J Pharmacol*. 2008;153(4):636–45.
55. Bruce CR, Mertz VA, Heigenhauser GJF, Dyck DJ. The Stimulatory Effect of Globular Adiponectin on Insulin-Stimulated Glucose Uptake and Fatty Acid Subjects. *Diabetes*. 2005;54(11):3154–60.
56. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β cells through GPR40. 2003;1600(2000):2001–4.
57. 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. 2009;58(November):2607–15.
58. Zhou C, Tang C, Chang E, Ge M, Lin S, Cline E, et al. Discovery of 5-aryloxy-2, 4-thiazolidinediones as potent GPR40 agonists. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. 2010;20(3):1298–301. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.10.052>
59. Kotarsky K, Nilsson NE, Flodgren E, Owman C. A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;301:406–10.
60. 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.

61. Kim HS, Noh JH, Hong SH, Hwang YC, Yang TY, Lee MS, et al. Rosiglitazone stimulates the release and synthesis of insulin by enhancing GLUT-2, glucokinase and BETA2/NeuroD expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;367(3):623–9.
62. Yang C, Chang T, Chang J, Liu M, Tai T, Hsu WH, et al. Rosiglitazone (BRL 49653) Enhances Insulin Secretory Response via Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway. *Diabetes*. 2001;50(November):1–5.
63. Wang S, Dougherty EJ, Danner RL. PPAR γ signaling and emerging opportunities for improved therapeutics. *Pharmacol Res*. 2016;111:76–85.
64. ANVISA. Avandia® (rosiglitazona): cancelamento do registro devido ao risco cardiovascular do medicamento [Internet]. 2010 [cited 2022 Jun 21]. Available from: http://antigo.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13?p_p_id=101_INSTANCE_WvKKx2fhdjM2&p_p_col_id=column-1&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&_101_INSTANCE_WvKKx2fhdjM2_groupId=33868&_101_INSTANCE_WvKKx2fhdjM2_urlTitle=alerta-snvs-anvisa-nuvig-gfarm-n-04-de-29-de
65. Lebovitz HE. Thiazolidinediones: the Forgotten Diabetes Medications. *Curr Diab Rep*. 2019;19(12):1–13.
66. Lieberman JA. Dopamine partial agonists: a new class of antipsychotic drugs. *CNS Drugs*. 2004;
67. Nanjan MJ, Mohammed M, Prashantha Kumar BR, Chandrasekar MJN. Thiazolidinediones as antidiabetic agents: a critical review. *Bioorg Chem* [Internet]. 2018;77:548–67. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.02.009>
68. Hou Y, Cao X, Hu X, Li X, Shi X, Wang H, et al. CMHX008, a PPAR γ partial agonist, enhances insulin sensitivity with minor influences on bone loss. *Genes Dis* [Internet]. 2018;5(3):290–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.004>
69. Taygerly JP, McGee LR, Rubenstein SM, Houze JB, Cushing TD, Li Y, et al. Discovery of INT131: A selective PPAR γ modulator that enhances insulin

- sensitivity. *Bioorganic Med Chem* [Internet]. 2013;21(4):979–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.11.058>
70. Ito Y, Yamamoto M, Furukawa S, Fukui M, Morishita K, Kitao T, et al. Effects of KY-903, a novel tetrazole-based peroxisome proliferator-activated receptor γ modulator, in male diabetic mice and female ovariectomized rats. *Biol Pharm Bull*. 2021;44(5):659–68.
 71. Choi JH, Banks AS, Estall JL, Kajimura S, Laznik D, Ruas JL, et al. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR γ by Cdk5. *Nature*. 2010;466(7305):451–6.
 72. Berger JP, Petro AE, Macnaul KL, Kelly LJ, Zhang BB, Richards K, et al. Distinct properties and advantages of a novel peroxisome proliferator-activated protein [gamma] selective modulator. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2003;17(4):662–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12554792>
 73. 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.
 74. Yamashita A, Soga Y, Iwamoto Y, Yoshizawa S, Iwata H, Kokeguchi S, et al. Macrophage-adipocyte interaction: Marked interleukin-6 production by lipopolysaccharide. *Obesity*. 2007;15(11):2549–52.
 75. Kusumastuti SA, Aris D, Nugrahaningsih A, Sri M, Wahyuningsih H. Centella asiatica (L.) extract attenuates inflammation and improve insulin sensitivity in a coculture of lipopolysaccharide (LPS)-induced 3T3-L1 adipocytes and RAW 264.7 macrophages. *Drug Discov Ther*. 2019;13(5):261–7.
 76. Awaluddin R, Nugrahaningsih DAA, Solikhah EN. The concentration-dependent pro-fibrotic effect of metformin on LPS and high glucose induced fibroblast NIH 3T3 and macrophage raw 264.7 cell co-culture. *Med J Malaysia*. 2020;75(May):10–3.
 77. Zhou C, Chen R, Gao F, Zhang J, Lu F. 4-Hydroxyisoleucine relieves

- inflammation through iRhom2-dependent pathway in co-cultured macrophages and adipocytes with LPS stimulation. *BMC Complement Med Ther*. 2020;20(1):1–11.
78. Martos-Rus C, Katz-Greenberg G, Lin Z, Serrano E, Whitaker-Menezes D, Domingo-Vidal M, et al. Macrophage and adipocyte interaction as a source of inflammation in kidney disease. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82685-4>
 79. Zhang M, Xie Y, Su X, Liu K, Zhang Y, Pang W, et al. Inonotus sanghunag polyhenols attenuate inflammatory response via modulating the crosstalk between macrophages and adipocytes. *Front Immunol*. 2019;10(FEB).
 80. Kang B, Kim CY, Hwang J, Suh HJ, Choi HS. Brassinin, a phytoalexin in cruciferous vegetables, suppresses obesity-induced inflammatory responses through the Nrf2-HO-1 signaling pathway in an adipocyte-macrophage co-culture system. *Phyther Res*. 2019;33(5):1426–37.
 81. Hsu CL, Lin YJ, Ho CT, Yen GC. The inhibitory effect of pterostilbene on inflammatory responses during the interaction of 3T3-L1 adipocytes and RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem*. 2013;61(3):602–10.
 82. Shin H-S, Kang S-I, Ko H-C, Park D, Kim S-J. Tangeretin Improves Glucose Uptake in a Coculture of Hypertrophic Adipocytes and Macrophages by Attenuating Inflammatory Changes. *Dev Reprod*. 2017;21(1):93–100.
 83. Manandhar B, Kim HJ, Rhyu DY. *Caulerpa okamurae* extract attenuates inflammatory interaction, regulates glucose metabolism and increases insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes and RAW 264.7 macrophages. *J Integr Med* [Internet]. 2020;18(3):253–64. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joim.2020.02.001>
 84. Bryant C, Rask G, Waller AP, Francisco AR, Bryant C, Rask G, et al. Selective modulator of nuclear receptor PPAR γ with reduced adipogenic potential ameliorates experimental nephrotic syndrome ameliorates experimental nephrotic syndrome. *iSCIENCE* [Internet]. 2022;25(4):104001. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104001>

85. 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* [Internet]. 2015;464(3):718–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.011>
86. Ministério da Saúde. O impacto da obesidade [Internet]. 2022 [cited 2022 Jul 12]. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-brasil/eu-quer-ter-peso-saudavel/noticias/2022/o-impacto-da-obesidade>
87. Blaszczak AM, Jalilvand A, Hsueh WA. Adipocytes, Innate Immunity and Obesity: A Mini-Review. *Front Immunol*. 2021;12(June):1–7.
88. Instituto Nacional de Câncer/ World Cancer Research Fund. Políticas e Ações para Prevenção do Câncer no Brasil: Alimentação, Nutrição e Atividade Física. 2009; Available from: www.inca.gov.br
89. Ministério da Saúde. Por que prevenir e cuidar da obesidade? [Internet]. 2021 [cited 2022 Jul 12]. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-brasil/eu-quer-ter-peso-saudavel/noticias/2021/por-que-prevenir-e-cuidar-da-obesidade>
90. Millis L, Vapenik J, Sigola L. Lipopolysaccharide-mediated enhancement of zymosan phagocytosis by RAW 264 . 7 macrophages is independent of opsonins, laminarin, mannan, and complement receptor 3. *Sci Direct*. 2014;9.
91. Facchin B., dos Reis GO, Vieira GN, Mohr ETB, da Rosa JS, Kretzer IF, et al. Inflammatory biomarkers on an LPS-induced RAW 264.7 cell model: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm Res*. 2022;
92. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*. 1998;78(3):783–809.
93. Miki Y, Ono K, Hata S, Suzuki T. The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2012;131(3–5):68–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.12.004>

94. Sakamoto Y, Kanatsu J, Toh M, Naka A, Kondo K, Iida K. The dietary isoflavone daidzein reduces expression of pro-inflammatory genes through PPAR α / γ and JNK pathways in adipocyte and macrophage co-cultures. *PLoS One* [Internet]. 2016;11(2):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0149676>
95. Sakoda H, Fujishiro M, Iwashita M, Ohno H, Nishimura F, Asano T. Angiotensin receptor 1 blocker valsartan normalizes gene expression profiles of 3T3-L1 adipocytes altered by co-culture with LPS-treated. *Obes Res Clin Pract* [Internet]. 2012;6(4):e288–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.orcp.2012.05.005>
96. Rathinam VAK, Zhao Y, Shao F. Innate immunity to intracellular LPS. *Nat Immunol*. 2020;20(5):527–33.
97. Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS - induced pro - inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2021;78(4):1233–61. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03656-y>
98. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. 2001;13.
99. Li Q, Verma IM, Pines NT. NF- κ B Regulation in the immune system. 2002;2(October).
100. Tavares da Silva M. Ação do agonista parcial do PPAR γ , GQ-16, na viabilidade de macrófagos em cultura. Universidade de Brasília; 2016.
101. Chae BS. Pretreatment of low-dose and super-low-dose LPS on the production of in vitro LPS-induced inflammatory mediators. *Toxicol Res*. 2018;34(1):65–73.
102. FERREIRA APB. Estudo do envolvimento da via ERK1/2 sobre a resposta adipogênica e anti-inflamatória de agonistas de PPAR γ em macrófagos e adipócitos. Universidade de Brasília; 2019.
103. Zhou J-P, Yang X-N, Song Y, Zhou F, Liu J-J, Hu Y-Q, et al. Rosiglitazone

- alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 cells via inhibition of NF- κ B and in a PPAR γ -dependent manner. *Exp Ther Med*. 2021;22(1).
104. Lagathu C, Bastard JP, Auclair M, Maachi M, Capeau J, Caron M. Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: Prevention by rosiglitazone. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;311(2):372–9.
 105. Brayner Cavalcanti M, Bezerra Leite LL, Manoel de Queiroz D, de Salazar e Fernandes T, Mendes de Oliveira WL, Pereira MC, et al. Evaluation of the action of LPSF/GQ-16 on cytokines and PPAR- γ gene expression after in vitro irradiation of peripheral blood mononuclear cells. *Int J Radiat Biol* [Internet]. 2021;97(12):1649–56. Available from: <https://doi.org/10.1080/09553002.2021.1987556>
 106. Park JY, Kawada T, Han IS, Kim BS, Goto T, Takahashi N, et al. Capsaicin inhibits the production of tumor necrosis factor α by LPS-stimulated murine macrophages, RAW 264.7: A PPAR γ ligand-like action as a novel mechanism. *FEBS Lett*. 2004;572(1–3):266–70.
 107. Ji X, Ji X, Li Q, Lu X, Luo L. Rosiglitazone Reduces Apoptosis and Inflammation in Lipopolysaccharide-Induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Med Sci Monit*. 2018;24:6200–7.
 108. Lee S, Kim W, Kang KP, Moon SO, Sung MJ, Kim DH, et al. Agonist of peroxisome proliferator-activated receptor- γ , rosiglitazone, reduces renal injury and dysfunction in a murine sepsis model. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(March):1057–65.
 109. Bo QL, Chen YH, Yu Z, Fu L, Zhou Y, Zhang G Bin, et al. Rosiglitazone pretreatment protects against lipopolysaccharide-induced fetal demise through inhibiting placental inflammation. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2016;423:51–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2016.01.004>
 110. Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, et al. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-

- L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;301:1045–50.
111. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) Induces Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes and Is , Like IL-8 and Tumor Necrosis Factor- α , Overexpressed in Human Fat Cells from Insulin-resistant Subjects *. *J Biol Chem* [Internet]. 2003;278(46):45777–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M301977200>
 112. Cho ES, Kim MK, Son YO, Lee KS, Park SM, Lee JC. The effects of Rosiglitazone on osteoblastic differentiation, osteoclast formation and bone resorption. *Mol Cells*. 2012;33(2):173–81.
 113. Furuta M, Yano Y, Gabazza EC, Araki-Sasaki R, Tanaka T, Katsuki A, et al. Troglitazone improves GLUT4 expression in adipose tissue in an animal model of obese type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2002;56(3):159–71.
 114. Hammarstedt A, Rotter Sopasakis V, Gogg S, Jansson PA, Smith U. Improved insulin sensitivity and adipose tissue dysregulation after short-term treatment with pioglitazone in non-diabetic, insulin-resistant subjects. *Diabetologia*. 2005;48(1):96–104.
 115. Feinstein DL, Spagnolo A, Akar C, Weinberg G, Murphy P, Gavriluk V, et al. Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: Is mitochondrial function the key? *Biochem Pharmacol*. 2005;70(2):177–88.
 116. Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, et al. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem* [Internet]. 2003;278(13):11303–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M211495200>