

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Atividade de novos derivados de tiazolidinodionas sobre a diferenciação de
pré-osteoblastos e pré-adipócitos**

Cristiane Akemi Iamamoto Saito

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientador:
Profa Dra Dulcineia Saes Parra Abdalla

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Saito, Cristiane Akemi Yamamoto

S158a Atividade de novos derivados de tiazolidinodionas sobre a diferenciação de pré-osteoblastos e pré-adipócitos / Cristiane Akemi Yamamoto Saito. -- São Paulo, 2014.
117p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Abdalla, Dulcineia Saes Parra

1. Bioquímica clínica 2. Diferenciação celular : Fisiologia
3. Diabetes mellitus I. T. II. Abdalla, Dulcineia Saes Parra, orientador.

616.0756 CDD

Cristiane Akemi Iamamoto Saito

Atividade de novos derivados de tiazolidinodionas sobre a diferenciação de pré-osteoblastos e pré-adipócitos

Versão corrigida

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla
orientador/presidente

Maíra Galdino da Rocha Pitta
1º examinador

Heraldo Possolo de Souza
2º examinador

Maria Isabel Cardoso Alonso Vale
3º examinador

Ricardo Ambrósio Fock
4º examinador

São Paulo, 06 de fevereiro de 2015

Dedico este trabalho

A meus pais, José Toshiaki Iamamoto e Miyoko Murakami Iamamoto, pelo apoio e amor incondicionais.

A Alexandre Yukio Saito (*in memoriam*), grande amor, amigo e companheiro de todos os momentos.

Agradecimentos

A Deus, a meus pais e antepassados, a quem devo minha existência e de quem recebo a força e a convicção de que é preciso avançar sempre, pois a vida é um infinito de possibilidades que nos leva naturalmente à elevação da alma.

Ao meu amado Alexandre Yukio Saito (*in memoriam*), grande amor, amigo e companheiro. De nossa convivência, tenho somente boas lembranças. Sua generosidade, sempre amável no trato com as pessoas, a disciplina no cumprimento dos deveres, o bom humor, o espírito independente, a dignidade... Muito de você permanece em mim e me impulsiona a continuar e a me tornar um ser humano cada vez melhor!

À Profa. Dulcineia S.P. Abdalla, pela confiança que depositou em mim quando aceitou me orientar no doutorado, mesmo sem ter referências prévias a meu respeito. Sou muito grata não somente pela orientação no doutorado e pelas oportunidades que proporcionou a mim durante o período em que fiz parte de seu grupo de pesquisa, mas principalmente pela grande generosidade, pelo apoio e pela compreensão que recebi no momento mais sombrio que vivenciei.

À querida Martina Rudnicki, que admiro muito pela competência, determinação e liderança. Sua paixão pela pesquisa é inspiradora. Sou muito grata por ter me auxiliado no dia a dia durante todo o doutorado, mostrando os caminhos que poderiam ser seguidos quando algo dava errado (e isso aconteceu muitas vezes...), pelo apoio no período do doutorado sanduíche, pelas valiosas sugestões feitas na redação dessa tese. Agradeço, sobretudo, por ter me incentivado a sair de minha zona de conforto, pois é na adversidade que mostramos todo o nosso potencial e alcançamos o progresso.

À Fernanda A. César, que admiro pela disciplina e dedicação em tudo que faz. Assim como a Martina, você acrescentou bastante a minha tese de doutorado e ao grupo de pesquisa das TZDs. Muito obrigada!

À querida Renila Ferrer, sempre alegre e amável! Muito obrigada por ter me ajudado nos experimentos, pelo apoio no período do doutorado sanduíche, sobretudo pela amizade.

À Aldacilene Silva, muito obrigada pelas sugestões na redação da tese. Essa ajuda veio em um momento que me motivou a retomar as atividades.

A todos que continuam no Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo-SP, coordenado pela Profa Dulcineia S. P. Abdalla, ou que passaram por ele, os queridos Luciane A. Faine, Martina Rudnicki, Julio B. Daleprane, Fernanda A. César, Tanize E. S. Faulin, Marcela F. Cavalcante, Soraya M. Kazuma, Elaine Moura Augusto, Daniel F. Guilherme, Fernanda Gomes, Aldacilene Silva, Fernando S. Fuchigami, Renila Ferrer, Jacqueline C. Silva, Nicolas Saavedra, Alejandro Cuevas. Todos vocês têm virtudes extraordinárias que tomariam páginas e páginas descrevendo-as. Dentre todas elas, guardo comigo o coleguismo, a boa vontade em ajudar em todos os assuntos e a amizade, que fizeram o ambiente de trabalho tornar-se agradável e produtivo.

Ao Prof. Ivan R. Pitta, à Profa. Sueli L. Galdino e à Profa. Maria do Carmo Lima do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da UFPE, Recife-PE, pela colaboração com a síntese das TZDs.

À Profa Cecília H. A. Gouveia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, São Paulo-SP, que gentilmente cedeu as células MC3T3-E1.

Ao Prof. Bernhard Brune do Instituto de Bioquímica I da Universidade Johann Wolfgang Goethe, Frankfurt am Main, Alemanha, pela valiosa oportunidade de realização do doutorado sanduíche em seu laboratório de pesquisa.

Ao pesquisador Dimitry Namgaladze, pela orientação durante o doutorado sanduíche. Sua dedicação e paixão pela pesquisa são admiráveis.

À doce e amável Marina Kemmerer e aos gentis Marcel Boss e Tilo Knape, pelo auxílio nos experimentos durante o doutorado sanduíche, sobretudo pelo acolhimento com que me receberam no laboratório.

À Profa Maria Isabel C. Alonso-Vale da UNIFESP, Diadema-SP, pela colaboração com os experimentos de captação de glicose que muito acrescentaram a esse trabalho.

Ao Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo-SP, coordenado pela Profa Primavera Borelli, pelo compartilhamento de espaço físico, equipamentos e reagentes. Agradecimento especial às alunas Karina Nakajima e Amanda R. Crisma e à técnica Mariana C. F. Silva, pelas contribuições técnicas e teóricas sobre protocolos de osteogênese, dentre outros, que foram essenciais para a realização desse estudo.

Ao Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo-SP, coordenado pela Profa Ana Campa, pelo compartilhamento de equipamentos e reagentes. Agradecimento especial aos alunos Fabíola B. F. Monteiro e Edson M. Oliveira pelas contribuições técnicas e teóricas sobre protocolos de adipogênese.

Ao Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo-SP, pelo compartilhamento de equipamentos.

Ao técnico Maurício dos Santos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo-SP, pelas determinações de glicose e da atividade da fosfatase alcalina.

À técnica Renata C. Albuquerque da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo-SP, pelo auxílio nos experimentos utilizando citometria de fluxo.

Às secretarias do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas e de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo-SP, Ana Dantas, Edna Lima, Sueli Providelo, Maria Lima, Elaine Ychico, Jorge Lima, Miriam Wrigg e Irineu de Oliveira pelo auxílio nas questões burocráticas.

Ao Setor de Monografia da Biblioteca do Conjunto das Químicas da USP, especialmente à Maria Luíza T. do Carmo, pelo auxílio na elaboração da ficha catalográfica.

À Simone Ferderbar, que junto com a Profa. Dulcineia idealizou esse projeto de pesquisa que fui incumbida de dar continuidade.

À Olga Trokina, que me recebeu com bastante hospitalidade em sua casa durante o doutorado sanduíche.

A CAPES, CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro que permitiu a realização desse trabalho.

Aos familiares e amigos que sempre estiveram comigo em momentos importantes de minha vida.

Quero, um dia, dizer às pessoas que nada foi em vão... Que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades e às pessoas, que a vida é bela sim e que eu sempre dei o melhor de mim... E que valeu a pena.

Mário Quintana

RESUMO

SAITO, C. A. I. **Atividade de novos derivados de tiazolidinodionas sobre a diferenciação de pré-osteoblastos e pré-adipócitos.** 2014. 117f. (Tese de Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

As tiazolidinodionas (TZDs) são sensibilizadores de insulina utilizados no tratamento do diabetes mellitus tipo 2. Contudo, apesar dos efeitos benéficos sobre a glicemia, importantes efeitos adversos incluindo perda óssea e aumento de adiposidade são relatados com o uso clínico das TZDs. Assim, é necessário o desenvolvimento de novos derivados de TZDs com potenciais efeitos benéficos sobre a hiperglicemia e menos efeitos adversos. Neste estudo, investigamos os efeitos de 5 novos derivados de TZDs (LYSO-7, GQ-89, GQ-150, GQ-177 e SF-3) sobre a diferenciação celular de pré-osteoblastos murinos MC3T3-E1, pré-adipócitos murinos 3T3-L1 e pré-adipócitos SGBS de linhagem humana. Seus potenciais efeitos sobre a utilização de glicose, a produção de adipocinas e mediadores pró-inflamatórios também foram avaliados, utilizando linhagens murinas e humanas de adipócitos, e macrófagos THP-1 de linhagem humana. O principal achado de nosso estudo foi que os novos derivados de TZDs estimulam a utilização celular de glicose, porém não alteram o processo de diferenciação celular de pré-osteoblastos e pré-adipócitos, quando comparados com a TZD clássica Rosiglitazona. Conforme esperado, o tratamento com Rosiglitazona na concentração de 5 μM inibiu a osteogênese de pré-osteoblastos murinos MC3T3-E1. No entanto, o tratamento com 2 novos derivados de TZDs (GQ-89 e GQ-177) na mesma concentração não afetou a diferenciação celular, sendo possível observar níveis de mineralização de matriz extracelular similares aos do grupo controle. Além disso, enquanto a GQ-89 estimulou a atividade da fosfatase alcalina, a GQ-177 não modulou sua atividade enzimática e induziu a expressão gênica de osteocalcina. Contudo, ambos inibiram a expressão de Runx2 e colágeno. Por sua vez, quando os efeitos foram avaliados sobre a diferenciação de adipócitos, foi possível observar que ao contrário do efeito pró-adipogênico constatado com a Rosiglitazona na concentração de 1 μM , as TZDs GQ-150, GQ-177, LYSO-7 e SF-3 foram incapazes de induzir o acúmulo lipídico em pré-adipócitos murinos e humanos. Além disso, a GQ-150 inibiu a expressão gênica de C/EBP α , assim como a expressão gênica e os níveis protéicos de CD36, enquanto que a SF-3 estimulou a expressão gênica de C/EBP α e de FABP4 e diminuiu

a expressão gênica e os níveis protéicos de CD36, os quais não foram modificados pela LYSO-7 em pré-adipócitos murinos 3T3-L1. No entanto, em pré-adipócitos SGBS de linhagem humana, nenhum efeito sobre os marcadores de fenótipo adipogênico C/EBP α e FABP4 foi observado com os novos derivados de TZDs. Ademais, os novos derivados de TZDs não interferiram na via de sinalização de Wnt, não apresentaram qualquer efeito sobre a expressão de adipocinas (adiponectina, resistina e leptina) e mediadores pró-inflamatórios (IL-6, CCL2/MCP-1, TNF- α e JNK), bem como não ativaram o fator de transcrição PPAR γ no ensaio de gene repórter. Por sua vez, a LYSO-7, GQ-150 e SF-3 aumentaram o consumo de glicose em presença de insulina em adipócitos 3T3-L1 e modificaram a atividade de enzimas mitocondriais em adipócitos SGBS e macrófagos THP-1. Entretanto, o efeito sensibilizador de insulina foi confirmado somente com a GQ-177 pelo aumento da captação de glicose e somente a LYSO-7 e a SF-3 foram capazes de inibir o consumo de oxigênio e modificar a taxa de glicólise em macrófagos, sugerindo que também poderiam alterar os níveis de ATP/ADP. Considerando que baixos níveis de ATP estimulam a via de sinalização de AMPK, essa via também foi investigada em nosso estudo. Entretanto, os resultados sobre a ativação de AMPK foram inconclusivos. Desse modo, nossos resultados apontam que os novos derivados de TZDs não atuam como ligantes de PPAR γ , apresentam atividade sensibilizadora de insulina *in vitro*, e que exercem menores efeitos antiosteoblásticos e adipogênicos quando comparados com a Rosiglitazona. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos responsáveis por esses efeitos, bem como para estabelecer se os novos derivados de TZDs são mais seguros *in vivo*, com relação ao risco de fraturas ósseas e ganho de massa adiposa.

Palavras-chave: tiazolidinodionas, osteoblastos, adipócitos, adipocinas, diabetes

ABSTRACT

SAITO, C. A. I. **Activity of new derivatives of thiazolidinediones on differentiation of preosteoblasts and preadipocytes.** 2014. 117f. (Tese de Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Thiazolidinediones (TZDs) are insulin sensitizers used in the treatment of type 2 diabetes mellitus. However, despite the beneficial effects on blood glucose, significant adverse effects including bone loss and increased adiposity are reported with the clinical use of TZDs. Thus, it is necessary to develop new derivatives of TZDs with potential beneficial effects on hyperglycemia and fewer adverse effects. In this study, we investigated the effects of 5 new derivatives of TZDs (LYSO-7, GQ-89, GQ-150, GQ-177 e SF-3) on cellular differentiation in murine MC3T3-E1 preosteoblasts, murine 3T3-L1 preadipocytes, and SGBS preadipocytes from human lineage. Potential effects on glucose consumption, adipokines, and pro-inflammatory mediators were also assessed using murine and human strains of adipocytes, and macrophages from human THP-1 lineage. The main finding of this study was that new derivatives of TZDs stimulate glucose consumption, but do not change the cell differentiation process of preosteoblasts and preadipocytes compared to classical TZD Rosiglitazone. As expected, the treatment with Rosiglitazone, at 5 μ M, inhibited the osteogenesis in murine MC3T3-E1 preosteoblasts. However, the treatment with 2 new derivatives of TZDs (GQ-89 and GQ-177) at the same concentration did not affect cell differentiation, and levels of mineralization of the extracellular matrix similar to the control group were observed. In addition, whereas the GQ-89 stimulated the activity of alkaline phosphatase, GQ-177 does not modulate its enzymatic activity and induced gene expression of osteocalcin. However, both of them inhibit the expression of Runx2 and collagen. In turn, when the effects were assessed on the adipocyte differentiation, unlike the proadipogenic effect observed with Rosiglitazone at a concentration of 1 μ M, the new TZDs GQ-150, GQ-177, LYSO-7 and SF-3 were unable to induce lipid accumulation in human and murine preadipocytes. In addition, GQ-150 inhibited the gene expression of C/EBP α , as well as the gene expression and protein levels of CD36, whereas SF-3 stimulated the gene expression of C/EBP α and FABP4 and decreased gene expression and protein levels of CD36, which was not modified by LYSO-7 on murine 3T3-L1 preadipocytes. However, no effect on markers of adipogenic phenotype C/EBP α and

FABP4 has been observed with the novel derivatives of TZDs in human SGBS preadipocytes. Furthermore, the new derivatives of TZDs do not interfere with the Wnt signaling pathway, showed no effect on the adipokines expression (adiponectin, resistin and leptin) and proinflammatory mediators (IL-6, CCL2 / MCP-1, TNF α and JNK) and did not activate the transcription factor PPAR γ in the gene reporter assay. In turn, LYSO-7, GQ-150, and SF-3 increased glucose consumption in the presence of insulin in 3T3-L1 adipocytes and modified the activity of mitochondrial enzymes in SGBS adipocytes and THP-1 macrophages. However, the effect on insulin sensitization was confirmed only to GQ-177 that increased glucose uptake and just LYSO-7 and SF-3 were able to inhibit oxygen consumption and modify the rate of glycolysis in macrophages, suggesting that they could also alter the levels of ATP/ADP. Since low levels of ATP could stimulate AMPK pathway, this signaling pathway was also investigated in our study. However, the results on the AMPK activation were inconclusive. Thus, our results demonstrate that the new derivatives of TZDs do not act as PPAR γ ligands, present insulin sensitizing activity *in vitro*, and display minor antiosteoblastic and adipogenic effects when compared to Rosiglitazone. More studies are needed to elucidate the exact mechanisms responsible for these effects, as well as to establish whether the safety of the new TZDs with respect to the risk of bone fractures and body mass gain using *in vivo* models.

Keywords: thiazolidinediones, osteoblasts, adipocytes, adipokines, diabetes

Lista de figuras

Figura 1: Sinergismo de ações benéficas promovidas por agonistas duais de PPAR α/γ	22
Figura 2: Modulação seletiva de PPAR.....	23
Figura 3: Função central de PPAR na inflamação induzida pela obesidade.	29
Figura 4: Estrutura do domínio de PPAR γ	33
Figura 5: Mecanismo de ativação de PPAR γ por TZDs.....	33
Figura 6: Papel central da modulação da inflamação no tecido adiposo pelas TZDs para os seus efeitos sobre o metabolismo lipídico e de glicose	35
Figura 7: Processo de maturação de células tronco mesenquimais na medula óssea é alterado por TZD.	39
Figura 8: Regulação de fatores de transcrição adipogênicos (C/EBP α e PPAR γ) por moléculas de sinalização extracelular da família de Wnt.....	40
Figura 9: Morte celular em osteoblastos após 28 dias de indução osteogênica em presença de TZDs.....	65
Figura 10: Efeitos das TZDs sobre a mineralização de matriz.....	66
Figura 11: Efeitos das TZDs sobre a atividade de fosfatase alcalina.	67
Figura 12: Efeitos das TZDs sobre a expressão de genes específicos do fenótipo osteoblástico	68
Figura 13: Efeitos das TZDs sobre a expressão de genes específicos da via de sinalização de Wnt.	69
Figura 14: Padronização do protocolo de adipogênese.	70
Figura 15: Morte celular de adipócitos após 6 dias de indução adipogênica com TZDs.....	72
Figura 16: Efeitos das TZDs sobre o acúmulo intracelular de lipídios.	74
Figura 17: Efeitos das TZDs sobre os marcadores do fenótipo adipogênico.	76
Figura 18: Efeitos das TZDs sobre a via de sinalização de Wnt.	77
Figura 19: Efeitos das TZDs sobre a diferenciação celular de pré-adipócitos humanos.....	79
Figura 20: Efeitos das TZDs sobre a ativação de PPAR γ	80

Figura 21: Efeitos das TZDs sobre o consumo de glicose.	81
Figura 22: Efeito da GQ-177 sobre a captação de glicose	82
Figura 23: Efeitos das TZDs sobre a expressão de adipocinas.	84
Figura 24: Efeitos das TZDs sobre a expressão de mediadores pró-inflamatórios.	87
Figura 25: Efeitos das TZDs sobre a função mitocondrial de macrófagos THP-1.	88
Figura 26: Efeitos das TZDs sobre a via de sinalização de AMPK.	89

Lista de tabelas

Tabela 1: Adipocinas e seus efeitos biológicos.	27
Tabela 2: Distribuição tecidual, agonistas e funções biológicas de PPAR.	30
Tabela 3: Principais mecanismos de ganho de peso com o uso de antidiabéticos.	37
Tabela 4: Possíveis causas de ganho de peso com o uso de TZDs.....	37
Tabela 5: Viabilidade de pré-osteoblastos MC3T3-E1 após 24 horas de cultivo com TZDs. .	65
Tabela 6: Viabilidade de pré-adipócitos 3T3-L1 após 24 horas de cultivo com TZDs.....	71
Tabela 7: Viabilidade celular de pré-adipócitos SGBS após 48 horas de indução adipogênica em presença de TZDs	78
Tabela 8: Viabilidade celular de macrófagos THP-1 após 24h e 48h de cultivo com TZDs ...	85

Lista de siglas

- AP-1: ativador 1 de proteína, um fator de transcrição pró-inflamatório
- aP2: proteína 2 de adipócitos, uma proteína citosólica conhecida também como proteína 4 de ligação a ácidos graxos (FABP4), frequentemente utilizado como marcador de fenótipo adipogênico
- ATP: adenosina trifosfato
- BCA: ácido bicincônico
- CCL2: quimiocina da família CC, inicialmente denominada MCP-1
- C/EBP α : proteína de ligação ao CCAAT/enhancer α , membro da família de fatores de transcrição C/EBP, importante para a adipogênese
- CD36: receptor scavenger presente na membrana, responsável pelo influxo de lipídios, também denominado translocase de ácidos graxos ou proteína transportadora de ácidos graxos, frequentemente utilizado como marcador de fenótipo adipogênico
- CS: *Calf Serum* - soro de bezerro
- DKK1: membro 1 da família dickkopf de inibidores da via de sinalização Wnt
- DMEM: meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
- DMSO: dimetilssulfoxido
- FABP4: proteína 4 de ligação a ácidos graxos, frequentemente utilizado como marcador de fenótipo adipogênico, denominado também como aP2
- GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- GPIT: Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica
- ³H-2DG: (³H)-2-desoxi-D-glicose
- IGF-1: fator de crescimento 1 insulina-símile
- IL-6: interleucina 6
- IR/IGF-1: receptor de insulina/ fator de crescimento 1 insulina-símile
- KOH: hidróxido de potássio
- LBD: domínio de ligação ao ligante
- LPSF: Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos
- MCP-1: proteína 1 quimioatrativa de macrófagos
- MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- NF- κ B: fator nuclear kappa-B, um fator de transcrição pró-inflamatório
- PAI-1: inibidor 1 do ativador de plasminogênio

PBS: tampão fosfato-salino

PPAR: receptores ativados por proliferadores de peroxissoma, uma família de fatores de transcrição

PPER: elementos responsivos ao PPAR

Rosi: Rosiglitazona, membro da classe de antidiabéticos das Tiazolidinodionas

Runx2: fator de transcrição 2 relacionado ao Runt , membro da família de fatores de transcrição Runx, importante para a diferenciação osteogênica

RXR: receptor retinóide α

SDS: duodecil sulfato de sódio

SFB: soro fetal bovino

TBS: tampão Tris-salino

TBS-T: tampão Tris-salino adicionado de Tween

TNF- α : fator de necrose tumoral α

TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato, utilizado para induzir a diferenciação de monócitos em macrófagos

TZDs: Tiazolidinodionas, uma classe de antidiabéticos

UFPE: Universidade Federal de Pernambuco

Wnt: glicoproteínas da família wingless/int, que estimulam a via de sinalização que recebem o mesmo nome

Wnt10b: membro 10b da família Wnt

α -MEM: meio de cultura essencial mínimo, desenvolvido por Eagle, modificação α

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	Tecido adiposo, inflamação e PPAR: implicações na obesidade	25
2.2	Tiazolidinodionas	31
2.2.1	PPAR γ como receptor biológico das TZDs	32
2.2.2	Efeitos benéficos das TZDs sobre a resistência à insulina, inflamação e aterosclerose.....	34
2.2.3	Efeitos deletérios das TZDs: ganho de peso e perda óssea.....	37
3	OBJETIVOS	44
3.1	Objetivo geral	44
3.2	Objetivos específicos	44
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1	TZDs.....	46
4.2	Linhagens celulares	46
4.3	Viabilidade celular.....	47
4.3.1	Células MC3T3-E1.....	47
4.3.2	Células 3T3-L1	48
4.3.3	Células SGBS	48
4.3.4	Células THP-1	49
4.4	Morte celular.....	49
4.5	Diferenciação celular	50
4.5.1	Diferenciação osteogênica	50
4.5.1.1	Mineralização de matriz.....	50
4.5.1.2	Fosfatase alcalina	51
4.5.1.3	Marcadores de fenótipo osteoblástico e da via de sinalização de Wnt	51
4.5.2	Diferenciação adipogênica.....	53
4.5.2.1	Pré-adipócitos 3T3-L1	54
4.5.2.2	Pré-adipócitos SGBS.....	56
4.6	Transativação dependente de ligante de PPAR γ	57
4.7	Consumo de glicose.....	57

4.8	Captação de glicose	58
4.9	Adipocinas	59
4.9.1	Adipócitos 3T3-L1	59
4.9.2	Adipócitos SGBS.....	60
4.10	Mediadores pró-inflamatórios	60
4.10.1	Adipócitos 3T3-L1 estimulados com LPS.....	60
4.10.2	Macrófagos THP-1 estimulados com ácido palmítico.....	61
4.11	Ensaio de fluxo extracelular	62
4.12	Via de sinalização de AMPK	63
4.13	Análise dos resultados	63
5	RESULTADOS	64
5.1	Efeitos das TZDs sobre a diferenciação celular osteogênica	64
5.2	Efeitos das TZDs sobre a diferenciação celular adipogênica.....	70
5.3	Efeitos das TZDs sobre a transativação de PPAR γ	79
5.4	Efeitos das TZDs sobre o consumo e a captação de glicose	81
5.5	Efeitos das TZDs sobre a produção de adipocinas	82
5.6	Efeitos das TZDs sobre os mediadores pró-inflamatórios	84
5.7	Efeitos das TZDs sobre o consumo de oxigênio e a taxa de acidificação extracelular	87
5.8	Efeitos das TZDs sobre a via de sinalização de AMPK.....	88
6	DISCUSSÃO	90
7	CONCLUSÕES	97
	REFERÊNCIAS	100
	ANEXOS.....	113

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma condição complexa e multifatorial, causada por fatores genéticos, e fisiológicos, bem como hábitos e estilo de vida, sendo os mais significativos a dieta altamente calórica e o sedentarismo (NAMMI et al., 2004).

Em 2014, estimou-se que nos Estados Unidos dois terços dos adultos apresentavam sobrepeso, enquanto a frequência de obesidade, que é definida pelo índice de massa corpórea superior a 30 kg/m^2 , foi de 34,9% (OGDEN et al., 2014). Apesar da maior notoriedade desta condição em países desenvolvidos como os Estados Unidos, a obesidade também tem aumentado nos países em desenvolvimento. No Brasil, houve um grande aumento nos índices de obesidade em homens, variando de 2,8% na década de 70 para 16% em 2012, enquanto em mulheres o aumento foi de 8% para 18% no mesmo período (BRASIL, 2013).

A importância da obesidade para a saúde pública decorre não somente de sua elevada prevalência mundial, mas principalmente em virtude das anormalidades metabólicas e fatores de risco cardiovasculares aos quais está associada, que incluem hipertensão, tolerância diminuída à glicose, resistência à insulina, hiperinsulinemia e dislipidemia. Essas anormalidades, coletivamente denominadas de síndrome metabólica ou síndrome X (REAVEN, 1988), aumentam o risco de morte prematura pelo desenvolvimento de doenças crônicas como diabetes mellitus tipo 2, aterosclerose e doenças cardiovasculares (NAMMI et al., 2004). Caracterizada pelo excesso de tecido adiposo no abdômen, a adiposidade visceral é apontada como a principal causa de anormalidades metabólicas e, desta forma, representa um importante alvo no tratamento da síndrome metabólica (MATSUZAWA, 2006).

Durante muito tempo, o tecido adiposo foi considerado apenas um órgão passivo, destinado à reserva do excesso energético na forma de triacilgliceróis. Atualmente, o tecido adiposo é descrito como um órgão endócrino, responsável pela produção e secreção de uma grande variedade de hormônios e de citocinas, também denominadas adipocinas, as quais são importantes para a homeostase energética e para a inflamação. No contexto da obesidade, surgem cada vez mais evidências da participação de adipocinas pró-inflamatórias no desenvolvimento das doenças cardiovasculares e do diabetes mellitus tipo 2, fortalecendo o papel do estado inflamatório crônico observado na obesidade para a patogênese de suas comorbidades (FISCHER-POSOVSZKY; WABITSCH; HOCHBERG, 2007).

A obesidade é o principal fator de risco para o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2. Em 2013, a prevalência mundial de diabetes mellitus tipo 2 era de 382 milhões de pessoas, sendo estimado que este número assumirá proporções epidêmicas em 2035, alcançando 592 milhões de casos (OGDEN et al., 2014). Acredita-se que a prevalência de doenças cardiovasculares também aumente, uma vez que o diabetes é caracterizado não somente pela hiperglicemia, mas também por disfunções vasculares de pobre prognóstico (REIFEL-MILLER et al., 2005). A dislipidemia é outro fator de risco cardiovascular observado no diabetes, a qual é caracterizada por baixas concentrações séricas de lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) e elevadas concentrações séricas de triacilgliceróis e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol) (REAVEN, 1988). Portanto, assim como a diminuição da adiposidade visceral e o controle glicêmico, o controle da dislipidemia também é importante para evitar as complicações associadas ao diabetes.

A descoberta dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) como reguladores importantes do metabolismo energético e da inflamação despertou o interesse por esses receptores como possíveis alvos-terapêuticos com aplicação em doenças metabólicas humanas, particularmente no tratamento da resistência à insulina e da dislipidemia. Duas classes farmacológicas, as tiazolidinodionas (TZDs) e os fibratos, foram empiricamente identificadas, respectivamente, pelas ações sensibilizadoras de insulina via ativação da isoforma gama (PPAR γ) (KAWAMATSU; ASAKAWA; SARAIE; IMAMIYA; et al., 1980; KAWAMATSU; ASAKAWA; SARAIE; MIZUNO; et al., 1980; KAWAMATSU; SARAIE; et al., 1980) e hipolipemiantes via ativação da isoforma alfa (PPAR α) (REDDY; KRISHNAKANTHA, 1975; REIFEL-MILLER et al., 2005). Atualmente, sabe-se que estes fármacos também podem compartilhar os efeitos hipoglicemiantes e hipolipemiantes característicos de cada classe, em menor ou maior intensidade.

As TZDs diminuem não somente a hiperglicemia, mas também a hiperinsulinemia compensatória em pacientes com diabetes tipo 2, bem como exercem efeitos menos pronunciados sobre os parâmetros lipídicos (ARONOFF et al., 2000). Por outro lado, os fibratos melhoram tanto o perfil lipídico como o controle glicêmico em pacientes com síndrome metabólica (JONES et al., 1990; STAELS et al., 1998). Além disso, existem inúmeras evidências sobre os efeitos anti-inflamatórios de TZDs e fibratos. Esses fármacos podem inibir a atividade de uma variedade de fatores de transcrição pró-inflamatórios, tais como NF-kB e AP-1 (BLASCHKE et al., 2006; DELERIVE et al., 1999), mediadores pró-inflamatórios (CABRERO; LAGUNA; VAZQUEZ, 2002) e moléculas de adesão ao

endotélio (LI et al., 2004). Estas características são relevantes para o tratamento do diabetes, assim como para a prevenção de suas complicações cardiovasculares.

Entretanto, a segurança dos agonistas de PPAR tem sido questionada pela descrição de efeitos adversos associados ao seu uso clínico. A ativação de PPAR α pelos fibratos está associada com colelitíase, aumento reversível das concentrações plasmáticas de homocisteína, uréia e creatinina (DAVIDSON et al., 2007) e rabdomiólise (SGRO; ESCOUSSE, 1991). Por sua vez, ganho de peso consequente da expansão do tecido adiposo (FONSECA, 2003; ZHANG, H. et al., 2005), perda óssea (GREY, 2008) e maior risco de câncer de bexiga (MAMTANI et al., 2012) é relatado em pacientes que fazem uso de fármacos da classe das TZDs. Além disso, estudos de meta-análise têm correlacionado o uso de TZDs à maior incidência de eventos cardiovasculares (SCHERNTHANER; CHILTON, 2010). Sendo assim, existe grande interesse pelo desenvolvimento de novos agonistas de PPAR, visando identificar novas moléculas com menos efeitos adversos, mas que preservem ou potencializem os efeitos terapêuticos esperados.

Nesse sentido, a área de desenvolvimento de novos agonistas de PPAR é bastante complexa. Uma vez que a ativação seletiva de cada subtipo de PPAR está associada a efeitos deletérios, a determinação do subtipo desse receptor nuclear mais adequado como alvo farmacológico nas doenças metabólicas e inflamatórias é uma tarefa desafiadora. Desse modo, uma nova abordagem para o desenvolvimento de fármacos agonistas de PPAR consiste na síntese de agonistas capazes de ativar todas as isoformas de PPAR (pan-agonistas) ou ainda duas isoformas desse receptor (agonistas duais).

Em razão de muitos pacientes com resistência à insulina também apresentarem quadros de dislipidemia, especula-se que agonistas duais de PPAR (agonistas PPAR α/γ) que combinem os efeitos hipolipemiantes da ativação de PPAR α com os efeitos sensibilizadores de insulina da ativação de PPAR γ (LALLOYER; STAELS, 2010), além das propriedades anti-inflamatórias de ambos proporcionariam vantagens terapêuticas. Entretanto, a possibilidade de somatório de efeitos adversos não pode ser descartada. Segundo Balakumar et al. (2007), a opção terapêutica mais apropriada seriam fármacos com atividades agonistas equilibradas para PPAR α/γ , para evitar efeitos deletérios pela ativação suprafisiológica de ambos os receptores (figura 1) (BALAKUMAR et al., 2007). Por outro lado, a utilização de pan-agonistas (PPAR $\alpha/\beta/\delta/\gamma$) também tem sido proposta em alguns estudos. A ativação simultânea de PPAR α e PPAR β/δ contribuiria positivamente para contrabalancear o ganho de peso proporcionado pelo agonismo de PPAR γ , uma vez que já foi observado que a ativação

seletiva de PPAR α (GUERRE-MILLO et al., 2000; MANCINI et al., 2001) ou de PPAR β/δ (WANG et al., 2003) pode diminuir a adiposidade em modelos experimentais de obesidade. Portanto, a expectativa é que o uso de pan-agonistas resultaria na manutenção dos efeitos hipoglicemiantes e hipolipemiantes característicos, respectivamente, de agonistas de PPAR γ e PPAR α , mantendo ou diminuindo o peso corporal, em consequência do agonismo de PPAR β/δ (HARRINGTON et al., 2007).

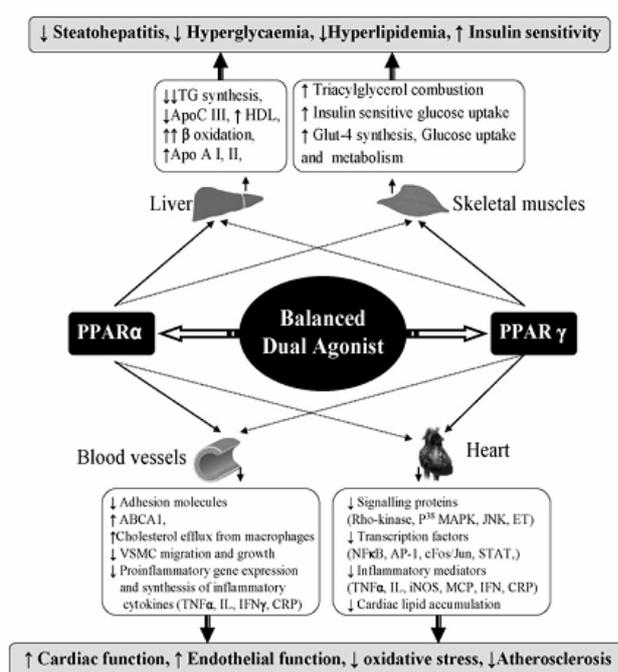


Figura 1: Sinergismo de ações benéficas promovidas por agonistas duais de PPAR α/γ (BALAKUMAR et al., 2007).

Outra abordagem seria o conceito de moduladores seletivos de PPAR, que tem o objetivo de gerar agonistas com um perfil terapêutico específico. Segundo essa estratégia, o agonista, ao interagir com o PPAR, induz uma mudança específica na conformação do receptor, resultando em recrutamento de coativadores e em regulação transcricional gene-específica diferentes (figura 2). Desta forma, modificações estruturais em agonistas de PPAR podem gerar alterações significativas em suas atividades biológicas, permitindo identificar moléculas com menos efeitos adversos, mas que preservem ou potencializem os efeitos terapêuticos (LALLOYER; STAELS, 2010).

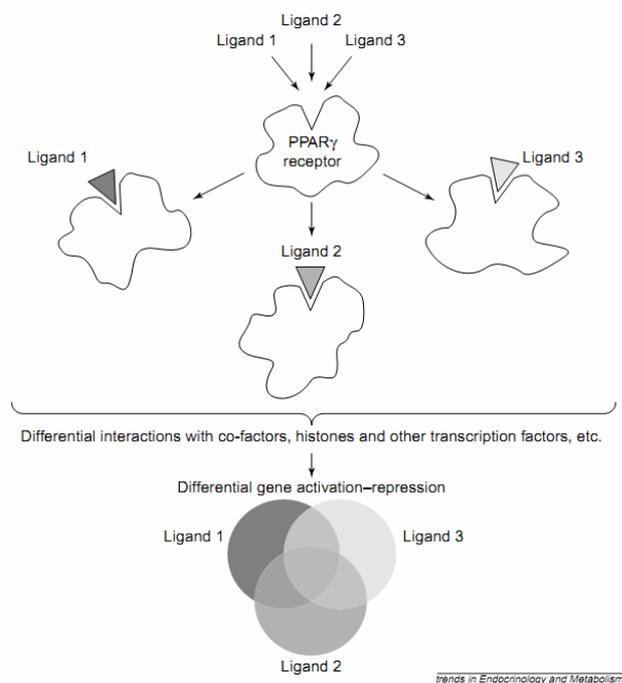


Figura 2: Modulação seletiva de PPAR. Cada ligante de PPAR γ provoca mudanças conformacionais únicas, gerando diferentes padrões de expressão gênica (OLEFSKY; SALTIEL, 2000).

Trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF), filiado ao Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (GPIT) (<http://www.ufpe.br/gpit>) têm explorado como "scaffold" o anel tiazolidínico como novas entidades químicas com potencial atividade biológica (MOURAO et al., 2005). A base para o desenvolvimento de novas moléculas tiazolidínicas dicarboniladas e compostos análogos bioisómeros como potenciais ligantes tem sido defendida pela sua estrutura heterocíclica contendo carbonilas exocíclicas e átomos de enxofre e nitrogênio que fazem parte do núcleo pentagonal. As TZDs podem interagir com estruturas moleculares nucleofílicas e eletrofílicas de biomacromoléculas (alvo terapêutico) e, do ponto de vista reacional, apresentam grande reatividade. Também podem ser alquiladas na posição 3 com haletos de alquila ou arila tanto em solventes próticos ou apróticos. Possuem, ainda, um grupamento metileno ativo que pode ser condensado com cetonas ou aldeídos aromáticos. Pela substituição dos átomos de oxigênio da tiazolidino-2,4-diona por enxofre, três tio-derivados da tiazolidinodiona são teoricamente possíveis: 2-tioxo-tiazolidino-4-ona; 4-tioxo-tiazolidino-2-ona; e a tiazolidino-2,4-ditiona. Para avaliar a afinidade das TZDs por reagentes orgânicos e biomacromoléculas, foram feitas modificações em sua estrutura química visando derivatizações comportando diversos substituintes, de modo a obter espaços químicos facilitadores de interações intermoleculares com sistemas biológicos. Para tanto, o LPSF desenvolve vias de obtenção de

novas TZDs bioativas, o que culminou com a construção de uma importante coleção de moléculas bioativas. Atualmente, esta biblioteca conta com mais de 400 TZDs quimicamente definidas.

O Laboratório de Bioquímica Clínica da USP coordenado pela Profa Dra Dulcineia S.P. Abdalla, em colaboração com o Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta do LPSF da UFPE, tem explorado nos últimos anos as propriedades farmacológicas de novos derivados de TZDs. Resultados promissores têm sido encontrados pelo nosso grupo de pesquisa. Em trabalho prévio, foi demonstrado que o derivado SF-23 tem propriedades antioxidantes superiores ao da Rosiglitazona, bem como propriedades anti-inflamatórias (FAINE et al., 2011). Os novos derivados LYSO-7, GQ-145 e GQ-177 inibem a progressão de lesões ateroscleróticas em camundongos *knockout* para o gene do receptor de LDL submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica (CÉSAR, 2013). Além disso, propriedades anti-inflamatórias similares às da Rosiglitazona são observadas com esses compostos em cultura de macrófagos murinos e células endoteliais HUVEC.

Neste estudo, investigamos os efeitos de novos derivados de TZDs sobre o processo de diferenciação celular de pré-adipócitos murinos e humanos, assim como de pré-osteoblastos murinos. Adicionalmente, avaliamos a via de sinalização de Wnt no contexto da diferenciação celular. Investigamos se os compostos apresentam efeitos sensibilizadores de insulina em adipócitos murinos e o papel das adipocinas, de mediadores pró-inflamatórios e da via de sinalização de AMPK nesse processo, utilizando ambas as linhagens murina e humana de adipócitos e macrófagos de linhagem humana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido adiposo, inflamação e PPAR: implicações na obesidade

O tecido adiposo é o principal reservatório energético do organismo. Os adipócitos são as únicas células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triacilglicerol em seu citoplasma, sem que isto seja nocivo para sua integridade funcional. Essas células possuem todas as enzimas e proteínas reguladoras necessárias para sintetizar ácidos graxos (lipogênese) e estocar triacilglicerol em períodos em que a oferta de nutrientes é abundante, e para mobilizá-los por meio da lipólise quando há deficiência calórica. Desse modo, a regulação desses processos ocorre por meio de nutrientes e sinais aferentes dos tradicionais sistemas neurais e hormonais, e depende das necessidades energéticas do indivíduo (AHIMA; FLIER, 2000).

Em mamíferos, existem dois tipos de tecido adiposo, o branco e o marrom. Este último tecido é composto por adipócitos menores em tamanho, com múltiplas gotículas de gordura e um número maior de mitocôndrias. Essas células são especializadas em gerar calor, predominantemente pela oxidação de ácidos graxos e participam da regulação da temperatura corporal. Em fetos e recém-nacidos estão localizados na região intraescapular, enquanto que em adultos distribui-se nas regiões supraclavicular, suprarrenal e cervical (CANNON; NEDERGAARD, 2004).

Por outro lado, os adipócitos do tecido adiposo branco são células maiores em tamanho, com poucas mitocôndrias e uma gota única de gordura e desempenham funções mais abrangentes que o tecido adiposo marrom. Uma vez que constituem depósitos localizados em diversas regiões do organismo, envolvem ou estão infiltrados em órgãos e estruturas internas, o tecido adiposo branco pode oferecer proteção mecânica contra choques e traumatismos externos, permitindo um deslizamento adequado entre vísceras e feixes musculares, sem comprometer a integridade e funcionalidade dos mesmos. Além disso, pela distribuição mais abrangente, que inclui a derme e o tecido subcutâneo, constitui um excelente isolante térmico, desempenhando um importante papel também na manutenção da temperatura corporal (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

O tecido adiposo foi considerado por muitos anos um órgão passivo, cuja única função seria o armazenamento energético. No entanto, com a descoberta recente de uma variedade de compostos bioativos, denominados adipocinas, os quais são produzidos e secretados pelo tecido adiposo, a função endócrina deste tecido começou a ser reconhecida. Até o momento, mais de uma centena de adipocinas já foram identificadas, incluindo ácidos graxos, prostaglandinas e esteroides, assim como proteínas complexas (FISCHER-POSOVSZKY et al., 2007).

As adipocinas podem exercer funções locais ou atuar em regiões distantes de onde foram produzidas. Elas estabelecem uma rede de comunicações com outros tecidos e órgãos tais como músculo esquelético, córtex adrenal, cérebro e sistema nervoso simpático, contribuindo para efeitos fisiológicos como o controle do apetite, balanço energético, metabolismo lipídico, modulação da imunidade, sensibilidade à insulina, angiogênese, pressão arterial e homeostase, conforme descrito resumidamente na tabela 1 (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; RONTI; LUPATTELLI; MANNARINO, 2006).

As adipocinas estão envolvidas também em condições patológicas, como ocorre na obesidade. De fato, o acúmulo de gordura, particularmente visceral, induz alterações no perfil de produção e secreção de adipocinas que são observadas nesta condição e acompanhadas por anormalidades metabólicas como resistência à insulina, hipertensão e dislipidemia, as quais caracterizam a síndrome metabólica. Entre as diversas adipocinas secretadas pelo tecido adiposo, destacam-se a leptina, a adiponectina, a adipsina, a resistina, o fator de necrose tumoral α (TNF- α), o inibidor 1 do ativador de plasminogênio (PAI-1), o fator 1 de crescimento insulina-símile (IGF-1), a proteína 1 quimioatrativa de macrófagos (CCL2/MCP-1) e a visfatina (QUEIROZ et al., 2009). Com exceção quase que única da adiponectina, a produção e a secreção desses diversos fatores se intensificam com a obesidade (FRUHBECK et al., 2001), sendo muitos deles, como o TNF- α , a resistina, o PAI-1, a interleucina 6 (IL-6) e o CCL2/MCP-1, diretamente associados à indução de resistência à insulina, à hipercoagulabilidade e à aterogênese. Por sua vez, esses processos podem gerar hipertensão, agravamento de estados pró-inflamatórios e aumentar o risco de eventos cardiovasculares e acidentes tromboembólicos (HAUNER, 2004). Além disso, a diminuição na secreção de adiponectina pode contribuir também para este quadro, pois esta adipocina possui não somente atividade sensibilizadora de insulina como também exerce efeitos anti-inflamatórios (GIL-CAMPOS; CANETE; GIL, 2004). Assim, este perfil de adipocinas, predominantemente pró-inflamatório em conjunto com baixas concentrações de adiponectina, correlaciona-se

fortemente com a síndrome metabólica e é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares (FERNANDEZ-REAL; RICART, 2003).

Tabela 1: Adipocinas e seus efeitos biológicos.

Adipocinas	Efeitos biológicos
Adiponectina	Aumenta a sensibilidade à insulina, tem ação anti-inflamatória e atenua a progressão da aterosclerose.
Leptina	Sinaliza o sistema nervoso central sobre os estoques corporais de energia (sinal de saciedade), inibe a lipogênese, estimula a lipólise, melhora a sensibilidade à insulina e tem efeito angiogênico.
IL-6	Pró-inflamatório, lipolítico, reduz a sensibilidade à insulina, inibe a gliconeogênese, aumenta a síntese hepática <i>de novo</i> de ácidos graxos e colesterol.
PAI-1	Inibe a ativação do plasminogênio, inibindo a fibrinólise.
Adipsina	Ativa a via alternativa do complemento, estimula o estoque de triacilgliceróis no tecido adiposo e inibe a lipólise.
TNF α	Lipolítico, aumenta o consumo energético, inibe a síntese de adiponectina e reduz a sensibilidade à insulina.
Resistina	Aumenta a resistência à insulina.
Angiotensinogênio	Precursor da angiotensina II, está envolvido na regulação da pressão arterial.
IGF-1	Estimula a proliferação e diferenciação de adipócitos.
CCL2/MCP-1	Infiltração de macrófagos e induz resistência à insulina.
Visfatina	Insulinomimético produzido predominantemente pelo tecido adiposo visceral.
Estrógenos	Produzidos pela ação da aromatase, corresponde à principal fonte estrogênica em homens e em mulheres após a menopausa.
Glicocorticoides	Pela ação da enzima 11-hidroxiesteroide desidrogenase, gera cortisol a partir de cortisona.

Atualmente, considera-se que as alterações metabólicas associadas à obesidade e suas complicações sejam decorrentes de um tipo específico de obesidade, denominada obesidade hipertrófica. No adulto, a expansão do tecido adiposo pode ocorrer pelo aumento do tamanho dos adipócitos preexistentes (hipertrofia), pelo aumento do número de adipócitos a partir de células precursoras, como pré-adipócitos e células tronco mesenquimais (hiperplasia), ou por

ambos os processos (SPALDING et al., 2008). A obesidade hiperplásica não está relacionada com anormalidades metabólicas, possivelmente porque neste tipo de obesidade há predomínio de adipócitos jovens e pequenos, os quais possuem grande capacidade de produção de adiponectina e baixa produção de adipocinas pró-inflamatórias. Entretanto, à medida que os adipócitos vão se tornando hipertróficos pelo aumento dos depósitos de triacilgliceróis, estas células passam a produzir grandes quantidades de adipocinas pró-inflamatórias, e apresentam uma capacidade limitada de produção de adiponectina (QUEIROZ et al., 2009). Este quadro inflamatório pode ser agravado pela infiltração de macrófagos no tecido adiposo. De fato, o predomínio de adipócitos hipertróficos reduz o fluxo sanguíneo e, em última instância, induz hipóxia, bem como inflamação e recrutamento de macrófagos (GOOSSENS, 2008).

Os macrófagos, por sua vez, produzem uma variedade de citocinas pró-inflamatórias como TNF α , CCL2/MCP-1 e IL-6. Além disso, as citocinas produzidas pelos macrófagos estimulam a produção de adipocinas pró-inflamatórias (FLOWER et al., 2003) e o recrutamento de mais macrófagos para o tecido adiposo (SARTIPY; LOSKUTOFF, 2003), amplificando ainda mais a inflamação neste tecido, com reflexos sistêmicos. Sendo assim, em virtude da disfunção metabólica observada na obesidade estar fortemente associada com a inflamação, a obesidade tem sido classificada como uma doença inflamatória crônica.

A obesidade hipertrófica também provoca mudanças estruturais e metabólicas em outros órgãos além do tecido adiposo (STIENSTRA et al., 2007). Citocinas produzidas pelo tecido adiposo inflamado inibem a adipogênese e a capacidade de armazenar triacilgliceróis, provavelmente por estimularem a via de sinalização Wnt (GUSTAFSON; SMITH, 2006), o que pode justificar a ocorrência de acúmulo ectópico de lipídios em músculo esquelético, fígado e pâncreas. O grau de infiltração de lipídios nestes tecidos correlaciona-se fortemente com a resistência à insulina observada em obesos (YKI-JARVINEN, 2002). Corroborando estes achados, foi observado que o aumento de CCL2/MCP-1 produzido por adipócitos pode favorecer a esteatose hepática em obesos, uma vez que esta adipocina parece estimular o estoque hepático de triacilgliceróis (KANDA et al., 2006). Além disso, a ativação crônica do NF- κ B por adipocinas pró-inflamatórias induz um estado de inflamação no fígado, caracterizado por produção de proteínas de fase aguda e infiltração de macrófagos, que contribui para o desenvolvimento de resistência à insulina naquele órgão (ARKAN et al., 2005; CAI et al., 2005).

Por causa das comorbidades que acarreta, em conjunto com a elevada prevalência mundial, a obesidade tem sido considerada um sério problema de saúde pública em muitos

países. Portanto, terapias mais eficazes para prevenir o surgimento de doenças relacionadas à obesidade como o diabetes, a aterosclerose e as doenças cardiovasculares são necessárias. Nesse sentido, fármacos que atuam nos PPAR têm despertado bastante interesse, já que estes receptores estão envolvidos na regulação da inflamação e do metabolismo energético, sendo capazes de amenizar as alterações metabólicas causadas pela obesidade, bem como prevenir suas complicações. Como esquematizado na figura 3, a principal função dos agonistas de PPAR consiste em diminuir a inflamação do tecido adiposo, fígado e da parede vascular (STIENSTRA et al., 2007). A tabela 2 relaciona as principais características dos subtipos de PPAR, com ênfase na obesidade e suas complicações.

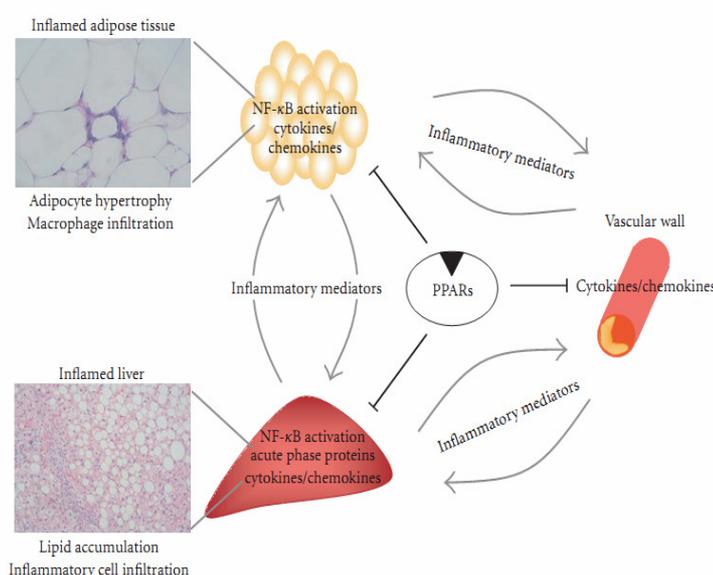


Figura 3: Função central de PPAR na inflamação induzida pela obesidade. A obesidade visceral e o fígado gorduroso estimulam a inflamação no tecido adiposo e no fígado pelo aumento de infiltração macrófagica nestes tecidos, resultando em produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias. Pela inibição da expressão de genes pró-inflamatórios no fígado, no tecido adiposo e na parede vascular, PPAR exercem suas funções protetoras na obesidade, evitando sua progressão e complicações (STIENSTRA et al., 2007).

Atualmente, existem duas classes de agonistas de PPAR em uso clínico, as TZDs (agonistas de PPAR γ) e os fibratos (agonistas de PPAR α), que são utilizados, respectivamente, no tratamento da resistência à insulina e da dislipidemia. Apesar da eficiência que apresentam no controle das doenças para as quais são indicados, problemas com relação à segurança e a ocorrência de efeitos adversos têm estimulado a pesquisa por novos agonistas de PPAR. Nesse contexto, têm sido propostos os conceitos de agonistas duais (α/γ) ou pan-agonistas de PPAR ($\alpha/\beta/\delta/\gamma$) bem como de moduladores seletivos de PPAR,

visando obter novos fármacos que apresentem menos efeitos adversos, mas que preservem ou potencializem os efeitos terapêuticos.

Tabela 2: Distribuição tecidual, agonistas e funções biológicas de PPAR.

	PPAR α	PPAR β/δ	PPAR γ
Distribuição tecidual	Fígado, tecido adiposo, músculo esquelético, coração, monócitos, macrófagos e linfócitos (MANDARD; MULLER; KERSTEN, 2004)	Onipresente (PETERS et al., 2000)	Tecido adiposo ($\gamma 1$ e $\gamma 2$), músculo esquelético, cólon, pulmões e macrófagos ($\gamma 1$) (LAZAR, 2005); Células estromais de medula óssea (GIMBLE et al., 1996), osteoblastos (JEON et al., 2003), precursores de osteoclastos (MBALAVIELE et al., 2000).
Agonistas naturais	Ácidos graxos insaturados e eicosanoides (MANDARD et al., 2004)	Ácidos graxos saturados, poli-insaturados e eicosanoides (LALLOYER; STAELS, 2010)	Ácidos graxos insaturados e eicosanoides (LEHRKE; LAZAR, 2005)
Agonistas sintéticos	Hipolipemiantes da classe dos fibratos (LALLOYER; STAELS, 2010)	Derivados do ácido fenoxicético (SZNAIDMAN et al., 2003)	Hipoglicemiantes da classe das TZDs (LALLOYER; STAELS, 2010)
Efeitos biológicos	Aumenta a oxidação de ácidos graxos (MANDARD et al., 2004), aumenta a concentração sérica de HDL-colesterol e diminui a de triacilgliceróis (STAELS et al., 1998); Efeito hipoglicemiante (JONES et al., 1990); Efeitos anti-inflamatórios (DELERIVE et al., 1999) e antiaterogênicos (LI et al., 2004); Diminui a hipertrofia do tecido adiposo (STIENSTRA et al., 2007).	Efeitos anti-inflamatórios e antiaterogênicos (GRAHAM et al., 2005). Diminui a adiposidade (WANG et al., 2003), melhora o metabolismo da glicose e a sensibilidade à insulina (LEE et al., 2006), aumenta a oxidação de ácidos graxos (QIN et al., 2008).	Promove a adipogênese, possui efeitos anti-inflamatórios, antiaterogênicos e sensibilizadores de insulina (TONTONOZ; SPIEGELMAN, 2008); Aumenta a concentração sérica de HDL-colesterol (SZAPARY et al., 2006), diminui a de triacilgliceróis (YKI-JARVINEN, 2004) e de ácidos graxos livres (MAGGS et al., 1998).

2.2 Tiazolidinodionas

TZDs, também denominadas glitazonas, são agentes sensibilizadores de insulina amplamente prescritos no tratamento do diabetes mellitus tipo 2 como monoterapia ou em associação com outros antidiabéticos, como sulfonilureias, metformina, insulina ou inibidores de glicosidase (LALLOYER; STAELS, 2010). Estima-se que as TZDs correspondam a mais de 20% dos hipoglicemiantes orais em uso nos Estados Unidos (YKI-JARVINEN, 2005), sendo que existe a previsão que este número aumente em virtude das vantagens que esta nova classe de antidiabéticos apresenta em relação aos demais, como o controle glicêmico por período mais prolongado (KAHN et al., 2006) e outras propriedades terapêuticas além da ação hipoglicemiante, como as ações anti-inflamatórias e antiaterogênicas, bem como a melhora de alguns parâmetros da dislipidemia, incluindo a diminuição de triacilgliceróis (YKI-JARVINEN, 2004) e o aumento de HDL-colesterol (SZAPARY et al., 2006).

Desde a sua descoberta na década de 80, as TZDs têm sido consideradas fármacos promissores no tratamento do diabetes, inicialmente pela identificação de seus efeitos hipoglicemiantes (LALLOYER; STAELS, 2010). A Troglitazona (Rezulin[®]) foi a primeira TZD aprovada para uso clínico, mas foi retirada do mercado no ano 2000 por provocar toxicidade hepática (BAILEY, 2000). A partir de então, foi dada maior atenção para a segurança de novos agonistas de PPAR γ . No mesmo período, dois novos membros desta classe, a Pioglitazona (Actos[®]) e a Rosiglitazona (Avandia[®]), foram introduzidos no mercado global. Apesar de seus efeitos benéficos para o controle do diabetes e de suas complicações, alguns efeitos adversos têm sido associados ao uso prolongado destes fármacos, incluindo aumento de fraturas ósseas (GREY, 2009) e ganho de peso pela formação de edema e pelo aumento da adiposidade (FONSECA, 2003). Por essa razão, estes fármacos têm sido utilizados com restrições por pacientes com maior risco de fraturas ósseas, como mulheres na menopausa e indivíduos com histórico familiar de fraturas. Em 2010, o uso da Rosiglitazona foi suspenso em alguns países europeus e no Brasil (BRASIL, 2010) e restrito nos Estados Unidos pela forte associação de seu uso com eventos cardiovasculares, como o infarto do miocárdio (HOME, 2011) e maior risco de câncer de bexiga (MAMTANI et al., 2012). Atualmente, apenas a Pioglitazona continua em uso no Brasil e na Europa.

Diante desse quadro, faz-se necessário o desenvolvimento de novos fármacos da classe das TZDs, visando obter compostos mais seguros, que preservem os efeitos terapêuticos

esperados. Após o risco cardiovascular, a perda óssea e o ganho de peso são os principais efeitos adversos que limitam o uso das TZDs, principalmente em pacientes mais propensos a fraturas. Existem evidências de que a perda óssea seja consequência do aumento da adipogênese na medula óssea, em detrimento da osteogênese. Por essa razão, neste estudo investigamos os efeitos de novos derivados de TZDs sobre a osteogênese e adipogênese *in vitro*, com o objetivo de identificar possíveis candidatos a fármacos com menor potencial antiosteoblástico e adipogênico.

A seguir, é apresentada uma breve revisão sobre o mecanismo de ação das TZDs via ativação de PPAR γ , seus efeitos terapêuticos, assim como os deletérios, com ênfase na perda óssea e na adipogênese.

2.2.1 PPAR γ como receptor biológico das TZDs

As TZDs exercem suas ações sensibilizadoras de insulina pelo agonismo em PPAR γ , um membro da família de fatores de transcrição PPAR, subgrupo da superfamília de receptores nucleares. Por sua vez, outros efeitos terapêuticos das TZDs, tais como propriedades anti-inflamatórias e antiaterogênicas também parecem ser mediados pela ativação de PPAR γ , direta ou indiretamente (TONTONOZ; SPIEGELMAN, 2008).

Duas isoformas de PPAR γ são descritas, PPAR γ 1 e PPAR γ 2. Enquanto a isoforma PPAR γ 2 é expressa exclusivamente em adipócitos, a expressão da isoforma PPAR γ 1 é relatada como sendo predominante no tecido adiposo, embora também tenha sido observada em outros tecidos incluindo cólon, retina, baço, osteoblastos e células hematopoiéticas (ROSEN et al., 1999; SHAO; LAZAR, 1997; TONTONOZ et al., 1994). Assim como outros membros da família de receptores nucleares PPAR, PPAR γ forma um heterodímero com o receptor retinoide X (RXR). A proteína PPAR γ possui domínios que são encontrados em aproximadamente todos os receptores nucleares (figura 4). O acoplamento da TZDs ao domínio de ligação ao ligante (LBD) libera repressores, expondo o sítio ativo para a ligação do heterodímero de PPAR γ -RXR a sequências específicas do DNA, localizadas na região promotora de genes-alvos, conhecidas como elementos responsivos ao PPAR (PPRE). Desse modo, a presença da TZDs provoca mudanças conformacionais por meio do recrutamento de um complexo de coativadores, que acetila histonas, levando a uma conformação mais aberta e

ativa do nucleossomo, facilitando assim a atividade transcricional de genes específicos (figura 5). PPRE têm sido encontrados em regiões regulatórias de inúmeros genes envolvidos no metabolismo lipídico e no balanço energético (REGINATO; LAZAR, 1999).

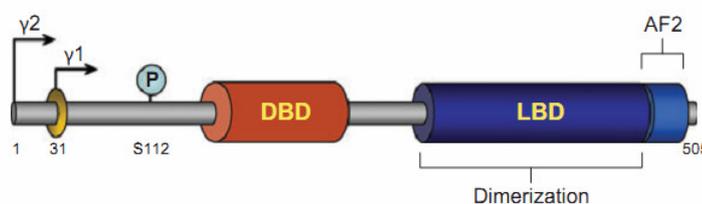


Figura 4: Estrutura do domínio de PPAR γ . A proteína do PPAR γ 2 contém 30 aminoácidos adicionais na região N-terminal, quando comparado com PPAR γ 1. As posições do sítio de fosforilação S112, domínio de ligação ao DNA (DBD), domínio de ligação ao ligante (LBD) e o sítio de ativação transcricional dependente de ligante (AF2) estão apresentados na figura. P: sítio de fosforilação; os números correspondem à posição dos aminoácidos. (TONTONZO; SPIEGELMAN, 2008).

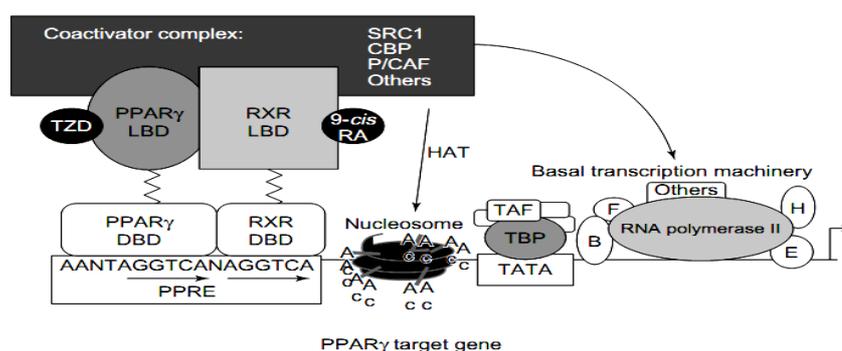


Figura 5: Mecanismo de ativação de PPAR γ por TZDs. PPAR γ liga-se a sequências específicas de DNA em genes-alvos como um heterodímero com RXR. TZDs e/ou ligantes de RXR, como o ácido 9-cis-retinoico, recrutam coativadores para o gene alvo, resultando em aumento de transcrição pela atividade de histona acetilase ou por interações com a maquinaria de transcrição basal. CBP: proteína ligante de CREB; CREB: proteína ligante do elemento de resposta de AMP cíclico; P/CAF: fator associado a p300/CBP; SRC1: coativador de receptor de esteroide; TAF: fator associado à TBP; TBP: proteína ligante de TATA (REGINATO; LAZAR, 1999).

2.2.2 Efeitos benéficos das TZDs sobre a resistência à insulina, inflamação e aterosclerose

As TZDs são compostos que apresentam importante ação potencializadora sobre a resposta de tecidos insulino-sensíveis. Por esse motivo, têm grande potencial de emprego na prática clínica para o tratamento de diabetes mellitus tipo 2 e de diversas morbidades que cursam com quadro importante de resistência à insulina, como obesidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (SPIEGELMAN, 1998; SUGII et al., 2009; TAKADA, J. et al., 2007).

Apesar dos mecanismos moleculares pelos quais as TZDs exercem seus efeitos terapêuticos não estarem completamente elucidados, existem evidências de que o tecido adiposo é o principal órgão envolvido (LALLOYER; STAELS, 2010). O diabetes mellitus tipo 2 está relacionado com concentrações plasmáticas elevadas de ácidos graxos livres e depósitos de lipídios em outros tecidos além do adiposo, como fígado e músculo esquelético. Este acúmulo ectópico de lipídios está altamente associado à resistência periférica à insulina em pacientes (YKI-JARVINEN, 2002). De fato, a ativação de PPAR γ promove adipogênese e, conseqüentemente, leva a uma redistribuição de gordura, aumentando a capacidade de estoque de triacilgliceróis no tecido adiposo, antes comprometida pela obesidade hipertrófica, diminuindo conseqüentemente o acúmulo ectópico de lipídios e a resistência à insulina. Coerente com essa hipótese, as TZDs diminuem a concentração plasmática de ácidos graxos livres pelo aumento de sua captação e oxidação nos adipócitos (BODEN et al., 2005). Além disso, as TZDs causam um aumento preferencial do tecido adiposo subcutâneo, provavelmente pela maior expressão de PPAR γ neste tecido, com menor efeito sobre o visceral (LEFEBVRE et al., 1998). Esta redistribuição de gordura é acompanhada por aumento da sensibilidade à insulina e pode ser explicada pelo remodelamento do tecido adiposo, caracterizado pela diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos pequenos no tecido adiposo subcutâneo e apoptose de adipócitos hipertróficos no tecido adiposo visceral e subcutâneo (CAREY et al., 2002; MIYAZAKI et al., 2002; OKUNO et al., 1998). O aumento do número de adipócitos pequenos no tecido adiposo subcutâneo também pode ocorrer pelo aumento na proliferação de células maduras, o que foi demonstrado por Kajita et al. (2012) (KAJITA et al., 2012).

Além da maior capacidade de estoque de triacilgliceróis no tecido adiposo, evitando dessa forma o depósito ectópico, outra característica dos adipócitos jovens e pequenos gerados pelo processo de adipogênese é a modificação do perfil de secreção de adipocinas. Há diminuição de adipocinas pró-inflamatórias e de resistina, que estão fortemente associadas com resistência à insulina, e aumento de adiponectina, uma adipocina que é considerada um sensibilizador endógeno de insulina. A diminuição da inflamação do tecido adiposo tem reflexos positivos no metabolismo de glicose, como o aumento da captação de glicose pelo músculo esquelético e a supressão da gliconeogênese hepática. Também há diminuição do infiltrado de macrófagos no tecido adiposo, com predominância de macrófagos do subtipo M2 (anti-inflamatório), o que contribui ainda mais para o efeito anti-inflamatório das TZDs (figura 6).

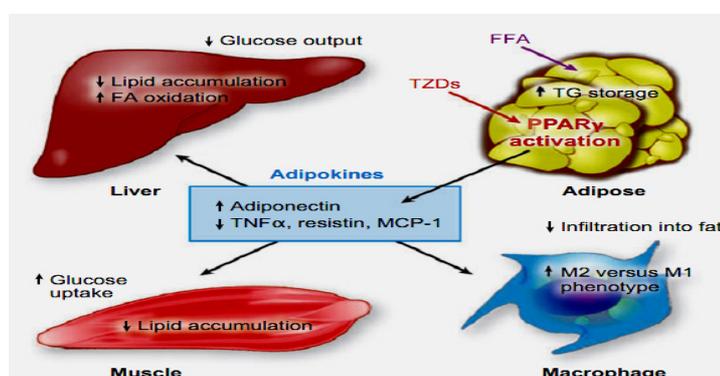


Figura 6: Papel central da modulação da inflamação no tecido adiposo pelas TZDs para os seus efeitos sobre o metabolismo lipídico e de glicose (TONTONNOZ; SPIEGELMAN, 2008).

Outro efeito terapêutico atribuído às TZDs é a prevenção da aterosclerose. Efeitos anti-inflamatórios diretos sobre a parede vascular e sobre componentes da placa aterosclerótica podem explicar as propriedades antiaterogênicas das TZDs em modelos animais e *in vitro*. Estudos têm demonstrado que as TZDs inibem a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (PASCERI et al., 2000), assim como a proliferação de células musculares lisas da parede vascular (LAW et al., 2000) e a formação de células espumosas, diminuindo o número e o tamanho de lesões ateroscleróticas (LI et al., 2004). As TZDs reduzem a formação de espécies reativas de oxigênio em cultura de células endoteliais, resultante de altas concentrações de glicose (FUJISAWA et al., 2009), induzem a formação de óxido nítrico (CHO et al., 2004) e apresentam efeitos anti-inflamatórios, diminuindo TNF α , proteína C reativa, CCL2/MCP-1 e metaloprotease de matriz-9 (MOHANTY et al., 2004). Efeitos inibitórios na migração e proliferação celular, eventos importantes que contribuem

para a aterosclerose (LAW et al., 2000), bem como a inibição da expressão de VCAM-1 em células endoteliais (MEHTA et al., 2003), também foram demonstrados com diversas TZDs.

Algumas TZDs também demonstram efeitos independentes da ativação de PPAR γ . De modo importante, as TZDs atenuam a resposta pressora a norepinefrina e angiotensina II, prevenindo o desenvolvimento de hipertensão, por mecanismos independentes de PPAR γ (GILES; SANDER, 2007; ZHANG, B. B. et al., 1993). Esse efeito foi explorado por diversos trabalhos que caracterizam um efeito anti-hipertensivo em modelos animais e pacientes. Adicionalmente, a Rosiglitazona e a Pioglitazona apresentaram propriedades antiangiogênicas em modelos *in vitro* e *in vivo* nas concentrações encontradas no plasma humano após o tratamento com esses fármacos (ALJADA et al., 2008; PANIGRAHY et al., 2002; VIJAY et al., 2009).

A ativação da via de sinalização de AMPK também tem sido proposta como um dos mecanismos pelos quais as TZDs exercem seus efeitos terapêuticos de modo independente de PPAR γ . Fryer et al (2002) demonstraram que a Rosiglitazona aumenta a relação AMP/ATP em cultura primária de células musculares esqueléticas de camundongos, ocasionando a ativação de AMPK (FRYER; PARBU-PATEL; CARLING, 2002). Este efeito também foi observado em tecido adiposo e hepático de ratos tratados com Troglitazona ou Pioglitazona (LEBRASSEUR et al., 2006) e em pacientes diabéticos tratados com Pioglitazona (COLETTA et al., 2009). A ativação da via de sinalização de AMPK regula o metabolismo de glicose e lipídios, o processo inflamatório, a proliferação celular e a função mitocondrial, sendo sugerida como um possível alvo terapêutico das TZDs.

Os estudos citados acima propõem diferentes mecanismos das TZDs, dependentes e independentes de PPAR γ , que explicam os efeitos benéficos observados em quadros de resistência à insulina, síndrome metabólica e diabetes mellitus tipo 2. Adicionalmente, sugerem que as TZDs podem apresentar efeitos protetores contra doenças cardiovasculares por apresentarem atividade antiaterogênica. Entretanto, em um estudo realizado em camundongos diabéticos, o tratamento com Rosiglitazona causou sinais precoces de cardiomiopatia hipertrófica (HEMMERYCKX et al., 2013). Em pacientes, a utilização de Rosiglitazona por período prolongado tem sido associada com aumento de eventos cardiovasculares, como falência cardíaca, infarto do miocárdio (HOME, 2011) e maior risco de câncer de bexiga (MAMTANI et al., 2012). Portanto, mais estudos são necessários para a compreensão das consequências da ativação prolongada de PPAR γ (TONTONOZ; SPIEGELMAN, 2008).

2.2.3 Efeitos deletérios das TZDs: ganho de peso e perda óssea

A obesidade é uma condição que determina o desenvolvimento de resistência à insulina, portanto a perda de peso constitui uma medida preventiva importante para as complicações do diabetes. Entretanto, paradoxalmente, a maioria dos medicamentos utilizados no tratamento do diabetes causa ganho de peso. Os principais mecanismos propostos para este efeito são descritos na tabela 3 (FONSECA, 2003).

Tabela 3: Principais mecanismos de ganho de peso com o uso de antidiabéticos.

Eliminação do estado catabólico

Retenção de calorías pela eliminação da glicosúria

Estimulação do apetite pela hipoglicemia

Inibição da lipólise pela insulina (endógena ou exógena)

Estimulação da lipogênese pela insulina (endógena ou exógena)

Aumento da adipogênese (agonistas de PPAR γ)

Retenção de fluido e edema

Com relação às TZDs, o principal mecanismo de ganho de peso consiste no aumento de adipogênese, predominantemente no tecido adiposo subcutâneo. Entretanto, também existem outras causas possíveis de ganho de peso com o uso prolongado destes fármacos (tabela 4) (FONSECA, 2003). Pacientes que utilizam TZDs apresentam edema, o que pode contribuir para o ganho de peso. Embora a causa exata da retenção de fluidos pelo uso de TZDs não esteja clara, alguns mecanismos têm sido propostos, como a estimulação da reabsorção de sódio nos túbulos renais (MUTO et al., 2001), o aumento da atividade do sistema nervoso simpático (YOSHIMOTO et al., 1997) e a alteração do transporte intersticial de íons (HOSOKAWA et al., 1999). Outro exemplo é a diminuição da concentração plasmática de leptina, provavelmente pela inibição de sua síntese no tecido adiposo, que é acompanhada por aumento de apetite (SHIMIZU et al., 1998).

Tabela 4: Possíveis causas de ganho de peso com o uso de TZDs.

Aumento da adipogênese

Estimulação do apetite pela hipoglicemia e diminuição de leptina

Retenção de calorías pela eliminação da glicosúria

Retenção de fluidos

O efeito adipogênico das TZDs é resultado do agonismo em PPAR γ , um importante fator de transcrição adipogênico. Apesar do ganho de massa adiposa ser um efeito indesejável em pacientes diabéticos que utilizam TZDs, ele tem efeitos benéficos por favorecer a hiperplasia do tecido adiposo subcutâneo, evitando o acúmulo ectópico de lipídios e a inflamação, que em conjunto contribuem para as ações sensibilizadoras de insulina atribuídas a esses fármacos (SMITH; HAMMARSTEDT, 2010). Entretanto, o aumento de adipogênese na medula óssea tem sido relacionado a efeitos deletérios para o esqueleto (GREY, 2008).

Considerando que PPAR γ é expresso em células da medula óssea, como células estromais, osteoblastos e precursores de osteoclastos, é possível que a ativação deste receptor por TZDs seja responsável, direta ou indiretamente, pela perda óssea observada em pacientes diabéticos. Resultados conflitantes têm sido encontrados com relação ao papel de PPAR γ para o desenvolvimento e para a função de osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção óssea. Alguns estudos *in vitro* mostram que as TZDs inibem a osteoclastogênese (CHAN et al., 2007; MBALAVIELE et al., 2000; OKAZAKI et al., 1999). Contudo, a função e o desenvolvimento destas células não foram afetados em animais transgênicos deficientes de PPAR γ (KAWAGUCHI et al., 2005).

A maioria dos estudos sugere que agonistas de PPAR γ exercem seus efeitos deletérios no esqueleto por favorecerem a adipogênese na medula óssea, em detrimento da osteoblastogênese. Segundo essa hipótese, com a diminuição do número total de osteoblastos, células responsáveis pela formação óssea, há um desequilíbrio entre formação e reabsorção, com predominância deste último, o que determina perda óssea (figura 7). Alguns estudos *in vitro* indicam essa hipótese. Lecka-Czernick et al. (1999) demonstraram que a ativação da isoforma de PPAR γ 2 por um agonista específico, Rosiglitazona, converte células da linhagem osteoblástica para adipócitos em fase de diferenciação terminal e suprime irreversivelmente o fenótipo osteoblástico e a expressão de seus genes específicos (LECKA-CZERNIK et al., 1999). Em 2002, este mesmo grupo comparou o efeito de uma variedade de ligantes de PPAR γ na diferenciação das células U-33/ γ 2 em adipócitos e osteoblastos. Verificaram que produtos da oxidação do ácido linoleico, o ácido 9,10-epoxioctadecanoico (9,10-EOA) e o ácido 9,10-dihidroioctadecanoico (9,10-DHO) inibem a diferenciação de osteoblastos. Por outro lado, 9-HODE induz a diferenciação de adipócitos sem afetar a diferenciação de osteoblastos. Estes resultados indicam que PPAR γ 2 estimula múltiplas vias de sinalização que promovem a diferenciação de adipócitos, inibição da diferenciação de osteoblastos, ou ambos, dependendo da natureza do ligante (LECKA-CZERNIK et al., 2002).

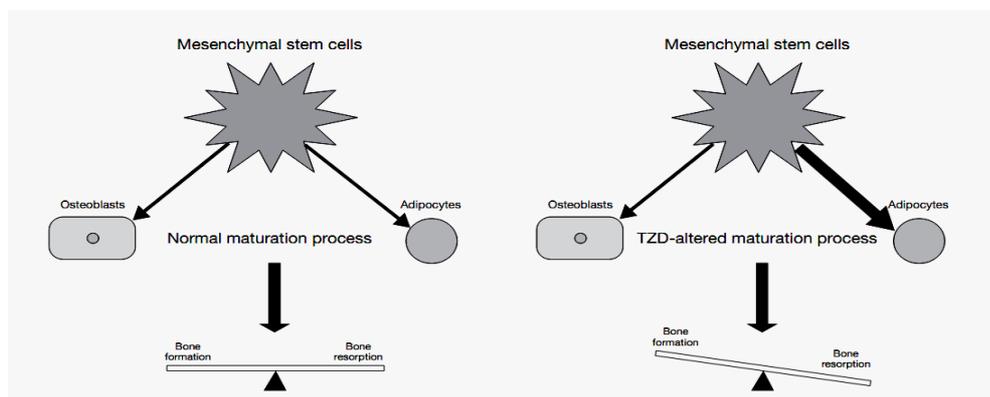


Figura 7: Processo de maturação de células tronco mesenquimais na medula óssea é alterado por TZD. Na ausência de TZD, o processo de maturação de células tronco mesenquimais ocorre de maneira balanceada para preservar a integridade óssea. Contudo, a introdução de TZD altera este processo de maturação em favor da diferenciação em adipócitos, prejudicando a de osteoblastos, provocando diminuição da formação óssea (RICHE; TRAVIS KING, 2010).

Hasegawa et al. (2008) observaram em cultura de osteoblastos obtidos de medula óssea de ratos redução da formação de nódulos ósseos e da expressão de marcadores relacionados ao fenótipo de osteoblastos (osteopontina, fosfatase alcalina, sialoproteína óssea e osteocalcina), assim como aumento do número de adipócitos e da expressão de marcadores correspondentes ao fenótipo dessas células (lipoproteína lipase, aP2 e adiposina) após tratamento com um ligante PPAR γ -seletivo (HASEGAWA et al., 2008). Resultados semelhantes foram encontrados por outros investigadores, que mostraram que a ativação de PPAR γ suprime a expressão de marcadores de fenótipo osteoblástico e a mineralização de matriz (JEON et al., 2003; KHAN; ABU-AMER, 2003).

Uma vez que tanto adipócitos quanto osteoblastos derivam de um precursor mesenquimal comum na medula óssea, tem sido proposto que quando o programa de diferenciação adipogênica é iniciado por PPAR γ , o de diferenciação osteoblastogênica é inibido, o que explicaria as observações apresentadas acima. Recentemente, Gustafson et al. (2010) sugeriram um provável mecanismo pelo qual agonistas de PPAR γ , como as TZDs, inibiriam a osteoblastogênese. Segundo os autores, o uso de TZDs promove o aumento de DKK1, um inibidor da via de sinalização Wnt, com a consequente atenuação desta via em células precursoras, levando à supressão da osteoblastogênese e ao aumento de adipogênese (GUSTAFSON; ELIASSON; SMITH, 2010). De fato, existe uma clara relação entre a sinalização de Wnt com massa óssea em humanos e murinos. Evidências apontam que a sinalização canônica de Wnt promove a formação óssea por vários mecanismos, incluindo renovação de células tronco, estimulação da proliferação de osteoblastos e indução de osteoblastogênese (KATO et al., 2002; NUTTALL; GIMBLE, 2004; REYA; CLEVERS,

2005). Além disso, tratamentos farmacológicos que aumentam a sinalização Wnt em células tronco mesenquimais estimulam a osteoblastogênese e inibem a adipogênese. Funcionalmente, a ativação de β -catenina através da sinalização canônica de Wnt inibe a adipogênese, primariamente por bloquear a indução dos fatores de transcrição adipogênicos C/EBP α e PPAR γ . Consistente com essas observações, a supressão da sinalização de Wnt estimula a adipogênese (BENNETT et al., 2002), como o observado pela indução de PPAR γ (LIU; FARMER, 2004; MOLDES et al., 2003; ROSS et al., 2000). A figura 8 mostra a inibição de C/EBP α e PPAR γ pela sinalização Wnt.

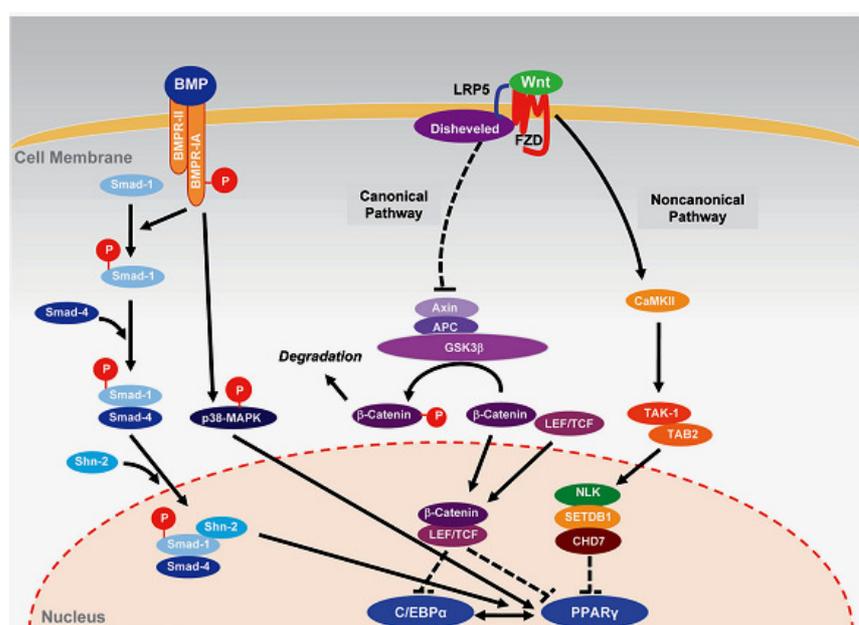


Figura 8: Regulação de fatores de transcrição adipogênicos (C/EBP α e PPAR γ) por moléculas de sinalização extracelular da família de Wnt. As proteínas Wnt ligam-se a FZDs, gerando sinais intracelulares não canônicos e canônicos. A sinalização canônica de Wnt potencializa a estabilidade de β -catenina e reprime a transativação de PPAR γ e C/EBP α pela via LEF/TCF, enquanto a não canônica ativa CaMKII e MAPK quinases, tais como TAK-1 e TAB2, reprimindo a transativação de PPAR γ via ativação de NLK, que forma complexos associados a cromatina, com CHD7, SETDB1 e PPAR γ . (MURUGANANDAN; ROMAN; SINAL, 2009).

A indução de perda óssea pelo uso de TZDs, como resultado da inibição da osteoblastogênese, também é demonstrada em estudos com animais. Sorocéanu et al. (2004) relataram que o tratamento de ratos com Rosiglitazona (3 mg/kg/dia) diminuiu significativamente o número e a atividade de osteoblastos (SOROCEANU et al., 2004). Ali et al. (2004) verificaram que a rosiglitazona atenua a diferenciação de osteoblastos e reduz a taxa de formação óssea (ALI et al., 2005). Syversen et al. (2009) observaram que ratas tratadas com Pioglitazona apresentavam perda óssea e prejuízo da força mecânica quando comparadas com animais tratados com veículo (SYVERSEN et al., 2009).

Outros estudos indicam que a redução da atividade de PPAR γ estimula a osteoblastogênese e inibe a adipogênese, além de provocar alterações metabólicas sistêmicas. Akune et al. (2004) verificaram que a diminuição da atividade do PPAR γ 2 resulta em aumento da massa óssea devido ao aumento do número de osteoblastos. Contudo, o aumento da atividade do PPAR γ 2 induzido pela administração de TZD induz a perda óssea, que é acompanhada por mudanças na composição celular da medula óssea, como diminuição do número de osteoblastos e aumento do número de adipócitos (AKUNE et al., 2004).

Anghel et al. (2007) constataram que a deleção de um alelo de PPAR γ em camundongos prejudicou não somente o armazenamento de lipídios, mas também a expressão de genes envolvidos na captação e utilização de glicose, na via da pentose-fosfato, síntese de ácidos graxos, lipólise e no transporte de glicerol, assim como na sinalização IR/IGF-1. Essas alterações conduziram a níveis circulantes reduzidos de adiponectina e a uma crise energética no tecido adiposo branco, causando um decréscimo quase à metade de seu conteúdo intracelular de ATP. Além disso, houve diminuição na taxa metabólica e na atividade física de camundongos PPAR γ (+/-), que foi abolido pelo tratamento com TZD. Esses resultados destacam a ação multifacetada do PPAR γ na manutenção do tecido adiposo e no balanço energético sistêmico (ANGHEL et al., 2007).

Takada et al. (2009) suprimiram a transativação de PPAR γ por meio de duas vias de sinalização (cascata TAK1/TAB1/NIK induzida por TNF- α ou por IL-1 e via Wnt não canônica), o que resultou em atenuação da adipogênese mediada por PPAR γ e estímulo da diferenciação osteoblástica a partir de células tronco mesenquimais (TAKADA; KOUZMENKO; KATO, 2009).

Por outro lado, Samarasinghe et al. (2009) causaram mutações em PPAR γ no domínio em que o ligante interage com o receptor, mais especificamente modificando os determinantes de seletividade dos ligantes pelos subtipos de PPAR. Dois aminoácidos do PPAR γ foram substituídos pelos correspondentes resíduos de PPAR α de tal forma que PPAR γ mut respondesse preferencialmente ao WY-14643, um agonista de PPAR α , que à Pioglitazona, uma TZD. PPAR γ tipo selvagem, quando expresso em pré-adipócitos 3T3-L1, induz adipogênese após tratamento com hormônio ou com TZD. Por outro lado, PPAR γ mut bloqueia o aumento de proteínas específicas de adipócitos induzido por TZD, mas surpreendentemente não evita o aumento dessas proteínas induzido por hormônio. Os resultados sugerem que as TZDs e os ligantes endógenos não interagem da mesma maneira no domínio de ligação ao receptor PPAR γ . Os autores propuseram que ligantes endógenos têm

propriedades distintas que permitem certa promiscuidade de ligação, estimulando o recrutamento e a liberação de cofatores de adipogênese (SAMARASINGHE et al., 2009).

Coletivamente, estes estudos confirmam que os efeitos deletérios para o tecido ósseo, pelo aumento de adipogênese e pela supressão da osteoblastogênese, são desencadeados diretamente da ativação de PPAR γ , uma vez que estes efeitos são bloqueados quando a sinalização de PPAR γ está diminuída.

Estudos em humanos também têm demonstrado os efeitos deletérios das TZDs sobre o tecido ósseo. De fato, pacientes com diabetes mellitus tipo 2 apresentam diminuição das concentrações séricas de marcadores de formação óssea, como fosfatase alcalina (BERBEROGLU et al., 2007; GREY et al., 2007), bem como perda óssea (GREY et al., 2007; SCHWARTZ et al., 2006; YATURU; BRYANT; JAIN, 2007) e aumento da incidência de fraturas (KAHN et al., 2006; KAHN et al., 2008; SOLOMON et al., 2009), após tratamento com TZDs. Mulheres na pós-menopausa que utilizaram TZDs também apresentam diminuição das concentrações séricas de marcadores de formação óssea, como osteocalcina e telopeptídeo N-terminal do pró-colágeno tipo 1, e perda óssea (GREY et al., 2007).

A observação de perda óssea e o risco aumentado de fraturas em pacientes que utilizam TZDs é muito preocupante, considerando que a população para quem estes fármacos são destinados, os diabéticos, já apresentam fragilidade óssea. Estudos epidemiológicos mostram que pacientes com diabetes apresentam maior risco de fraturas não vertebrais, principalmente nas regiões da coxa, quadril, úmero proximal e pés (JANGHORBANI et al., 2007; MIAO et al., 2005), o que pode ser explicado, em parte, pelo maior risco de quedas em consequência das complicações da doença, como comprometimento visual, neuropatia, nefropatia e doenças cerebrovasculares (SCHWARTZ et al., 2002; VESTERGAARD; REJNMARK; MOSEKILDE, 2009). Além disso, é possível que essas complicações tenham efeitos negativos para a massa óssea, causando maior fragilidade. Há diminuição de massa óssea em mãos e pés de pacientes diabéticos com nefropatia e neuropatia, em relação àqueles que não apresentam essas complicações (CUNDY; EDMONDS; WATKINS, 1985; VESTERGAARD, 2007). Outros estudos sugerem que as grandes quantidades de produtos de glicação gerados em diabéticos alteram a força e o remodelamento ósseos de maneira prejudicial (KATAYAMA et al., 1996; MIYATA et al., 1997; ZHOU et al., 2006), podendo contribuir para o maior risco de fraturas nesses pacientes.

Apesar das TZDs representarem uma inovação no tratamento do diabetes mellitus tipo 2, seus efeitos adversos têm limitado seu uso clínico, o que justifica os esforços para o desenvolvimento de novos moduladores de PPAR γ que mantenham a alta potência para o tratamento do diabetes, mas que apresentem menos efeitos adversos (HIGGINS; DEPAOLI, 2010).

Estudos moleculares mostram evidências de que as atividades adipogênica e antiosteoblástica de PPAR γ são reguladas por vias diferentes. A atividade adipogênica envolve a ligação ao PPRE em regiões de regulação gênica, enquanto a antiosteoblástica é independente de PPRE (LECKA-CZERNIK et al., 2007). De modo similar, as atividades anti-inflamatórias e antiaterogênicas de PPAR γ também são reguladas de maneira independente de PPRE (GLASS; SAIJO, 2010).

Coerente com essas evidências, alguns estudos mostram que é possível separar os efeitos antiosteoblásticos dos adipogênicos utilizando ligantes distintos quimicamente. Em um modelo *in vitro* de diferenciação celular a partir de células mesenquimais com alta expressão de PPAR γ 2, diferentes ligantes derivados do ácido linoleico foram capazes de gerar respostas diferentes: induziram adipogênese sem afetar a osteoblastogênese, apresentaram efeito antiosteoblástico sem induzir adipogênese ou apresentaram ambos os efeitos adipogênico e antiosteoblástico (LECKA-CZERNIK et al., 2002). Este conceito também foi avaliado *in vivo*, usando a TZD Netoglitazona que, apesar de ter apresentado efeitos hipoglicemiantes e adipogênicos comparáveis aos da Rosiglitazona, não suprimiu a osteoblastogênese (LAZARENKO et al., 2006).

Mais estudos são necessários na área de desenvolvimento de agonistas de PPAR, principalmente com relação à segurança, por representarem uma estratégia promissora para combater a inflamação associada à obesidade e, conseqüentemente, prevenir suas complicações como o diabetes, a aterosclerose e as doenças cardiovasculares. Em nosso estudo, investigamos os efeitos de novos derivados de TZDs sintetizados pelo método de bioisosterismo sobre a adipogênese e a osteogênese *in vitro*, com o objetivo de identificar moléculas com menores efeitos adipogênicos e antiosteoblásticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar se os novos derivados de TZDs preservam a atividade sensibilizadora de insulina sem interferirem na diferenciação celular de pré-adipócitos e de pré-osteoblastos.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar estudos *in vitro* com células MC3T3-E1 expostas aos novos derivados de TZDs para:
 - Avaliar a viabilidade e a morte celular;
 - Investigar a diferenciação celular de pré-osteoblastos murinos pela determinação da mineralização de matriz, da atividade da fosfatase alcalina e da expressão de marcadores de osteoblastos (Runx2, colágeno e osteocalcina) e da via de sinalização de Wnt (Dkk1, Wnt10b e β -catenina).

- Realizar estudos *in vitro* com células 3T3-L1 expostas aos novos derivados de TZDs para:
 - Avaliar a viabilidade e a morte celular;
 - Investigar a diferenciação celular de pré-adipócitos murinos, avaliando o acúmulo de lipídios, a expressão de marcadores adipogênicos (PPAR γ 2, C/EBP α , FABP4 e CD36) e da via de sinalização de Wnt (β -catenina);
 - Determinar o consumo e a captação de glicose;
 - Avaliar a produção das adipocinas resistina e leptina;
 - Investigar o processo inflamatório avaliando a expressão gênica de IL-6 e CCL2/MCP-1 em adipócitos 3T3-L1 expostos ao LPS.

- Realizar estudos *in vitro* com células SGBS expostas aos novos derivados de TZDs para:
 - Investigar a diferenciação celular de pré-adipócitos humanos, avaliando o acúmulo de lipídios e a expressão dos marcadores de adipócitos C/EBP α e FABP4;
 - Avaliar a expressão gênica da adiponectina.

- Realizar estudos *in vitro* com células HEK293T expostas aos novos derivados de TZDs para investigar se esses compostos ativam PPAR γ pela ligação específica ao LBD;

- Realizar estudos *in vitro* com células THP-1 expostas aos novos derivados de TZDs para:
 - Investigar o processo inflamatório avaliando a expressão gênica de p-cJun e TNF- α em macrófagos humanos THP-1 expostos ao ácido palmítico;
 - Avaliar a função mitocondrial (atividade de enzimas mitocondriais, consumo de oxigênio e taxa de acidificação extracelular);
 - Investigar a via de sinalização de AMPK.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TZDs

Os novos derivados de TZDs avaliados neste estudo foram sintetizados pelo LPSF da UFPE e estão sob as patentes: PI 0300997-1 “Compostos arilidenotiazolidinadiônicos com atividade hipoglicêmica” em INPI 10/04/2003, ver. Prop. Intelectual 1695 em 01/07/2003; PCT / BR2004/00053 “Thiazolidinedione compounds with hypoglycemic properties” em 08/04/2004, UFPE e PI 0601826-2 “Compostos tiazolidinadiônicos com atividade hipoglicêmica” em INPI 24/03/2006, UFPE. A Rosiglitazona foi adquirida da Cayman Chemical.

4.2 Linhagens celulares

As células MC3T3-E1 (linhagem de pré-osteoblastos murinos) foram gentilmente cedidas pela Profa Dra Cecília Helena de Azevedo Gouveia, do ICB/USP. Os pré-osteoblastos foram cultivados em meio de cultura α -MEM (Alpha Minimum Essencial Medium, Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 mg/ml) (todos obtidos da Life Technologies).

As células 3T3-L1 (linhagem de pré-adipócitos murinos) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) alta glicose (25 mM), contendo 10% de soro de bezerro (CS-*Calf Serum*) (Life Technologies) e antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 mg/ml).

As células SGBS (linhagem de pré-adipócitos obtidos de pacientes com a Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel) foram cultivadas em DMEM/F12 alta glicose (25 mM), contendo biotina 33 μ M, pantotenato 17 μ M (todos da Sigma-Aldrich), CS 10% e antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 mg/ml).

As células THP-1 (linhagem de monócitos humanos, ATCC) foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Life Technologies), suplementado com CS 10% e antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 mg/ml).

As células HEK293T (linhagem de células de rim humano, ATCC) foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Life Technologies), suplementado com 10% de SFB e antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 mg/ml).

As células MC3T3-E1, 3T3-L1 e SGBS foram mantidas em cultura em confluência não superior a 70%, com troca de meio de cultura a cada 3 dias para as células MC3T3-E1 e 3T3-L1, e a cada 4 dias para as células SGBS. As células THP-1 foram mantidas em concentração não superior a 1×10^6 células/mL, com troca de meio de cultura a cada 3 dias. Todas as linhagens celulares foram mantidas a 37°C, em atmosfera úmida e com 5% de CO₂, até os procedimentos experimentais.

4.3 Viabilidade celular

A viabilidade celular das linhagens utilizadas neste estudo foi avaliada pelo método de redução de brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazana, realizado conforme descrito por Denizot e Lang (1986) (DENIZOT; LANG, 1986).

4.3.1 Células MC3T3-E1

Para a realização deste ensaio, foram cultivadas 1×10^4 células/poço em placas com 96 poços, em um volume de 100 µL. Após 3 horas de incubação a 37° C, em atmosfera úmida e CO₂ 5% para permitir a aderência celular, o meio de cultura α-MEM suplementado com SFB 10% foi substituído por meio de cultura com SFB 1% e as células foram incubadas por 24 horas. Em seguida, 100 µL de meio de cultura α-MEM suplementado com SFB 1%, contendo concentrações variadas de TZDs (0,3125 - 20 µM) foram adicionados. Concentrações equivalentes do veículo dimetilssulfóxido (DMSO) (Merck) presente nos poços tratados com

TZDs (0,003125 - 0,2% - v/v) também foram testadas. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi removido por inversão da placa e 50 µL de uma solução de MTT (Sigma-Aldrich) a 1 mg/mL em meio de cultura livre de vermelho de fenol (Life Technologies) foram adicionados e as placas foram agitadas por 3h à 37° C. Ao término desse tempo, o MTT não reduzido foi removido por inversão da placa e 100 µL de DMSO foram adicionados em cada poço. As placas foram vigorosamente agitadas por 30 minutos para completa solubilização do produto formazana. A densidade óptica desse produto, resultante da redução do MTT pelas enzimas mitocondriais das células viáveis, foi determinada em leitor de ELISA a 580 nm. A viabilidade celular foi calculada em relação às células expostas ao veículo DMSO. Foram consideradas concentrações não citotóxicas de TZDs aquelas que apresentaram viabilidade celular igual ou superior a 90%.

4.3.2 Células 3T3-L1

A viabilidade de células 3T3-L1 foi determinada como descrito anteriormente, com poucas alterações. Brevemente, foram cultivadas 5×10^3 células/poço em uma placa com 96 poços, em meio de cultura DMEM alta glicose suplementado com CS 10%. Após incubação durante a noite, o meio de cultura foi substituído por DMEM alta glicose com CS 5% e as placas incubadas por 24 horas. As demais etapas foram realizadas como descrito para as células MC3T3-E1.

4.3.3 Células SGBS

Os pré-adipócitos SGBS foram estimulados a se diferenciarem em adipócitos, conforme descrito adiante em *diferenciação adipogênica*, por 48 horas, em placas com 96 poços e em presença de concentrações variadas de TZDs (0,5; 1; 2 µM). As células foram incubadas com MTT 1mg/mL por mais 4 horas em atmosfera úmida, CO₂ a 5% e a 37° C. Após esse período, foram adicionados 100 µL de isopropanol: HCl 1M (24:1) e as placas

foram vigorosamente agitadas por 15 minutos para completa solubilização do produto formazana. A densidade óptica desse produto foi determinada em leitor de ELISA a 560 nm.

4.3.4 Células THP-1

Para a realização desse ensaio em células THP-1, foram cultivadas 1×10^4 células/poço em placas com 96 poços. As células foram estimuladas a se diferenciarem em macrófagos em presença de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (Sigma-Aldrich) a 100 nM por 24 horas. Em seguida, o meio de cultura foi removido e substituído por meio suplementado com concentrações variáveis de TZDs (0,5 – 10 μ M) e as células foram incubadas por 24 ou 48 horas. As próximas etapas do ensaio foram realizadas como descrito anteriormente para os pré-adipócitos SGBS.

4.4 Morte celular

Os pré-osteoblastos MC3T3-E1 e os pré-adipócitos 3T3-L1 foram estimulados a se diferenciarem em placas com 6 poços, em presença de TZDs, conforme descrito adiante em diferenciação celular. Após o período de 28 dias para os pré-osteoblastos, e de 6 dias para os pré-adipócitos, a morte celular foi avaliada utilizando o kit para detecção de apoptose anexina V-FITC da Sigma-Aldrich, segundo as instruções do fabricante.

4.5 Diferenciação celular

4.5.1 Diferenciação osteogênica

Após tornarem-se 80 a 90% confluentes, os pré-osteoblastos MC3T3-E1 foram estimulados para se diferenciarem em osteoblastos pela adição de meio de cultura α -MEM suplementado com SFB 10% e indutores osteogênicos (ácido ascórbico 50 μ M, β -glicerofosfato 10 mM e dexametasona 100 nM) (todos da Sigma-Aldrich) por até 28 dias. Somente 50% do meio de cultura foi trocado a cada 3 ou 4 dias para preservar fatores de crescimento produzidos pelas células. Durante todo o período de indução, as células foram cultivadas com veículo (DMSO 0,05%) ou TZDs 5 μ M. A diferenciação osteogênica foi verificada pela mineralização de matriz (28° dia), atividade de fosfatase alcalina (7°, 14°, 21° e 28° dias) e expressão de genes específicos do fenótipo osteoblástico e da via de sinalização de Wnt por PCR em tempo real (7°, 14° e 28° dias) e Western Blot (β -catenina, no 7° dia).

4.5.1.1 Mineralização de matriz

A mineralização de matriz extracelular foi determinada pelo corante alizarina vermelha S, que torna evidente os depósitos de cálcio (GREGORY et al., 2004). Os pré-osteoblastos foram estimulados a se diferenciarem, conforme descrito anteriormente, em placas com 24 poços, na presença de TZDs 5 μ M, por um período de 28 dias. O meio de cultura foi removido e os poços lavados 2 vezes com PBS. Foram adicionados 250 μ L/poço de formalina tamponada 10% para fixação das células durante 1 hora. Após este período, os poços foram lavados 2 vezes com água destilada e corados com 250 μ L/poço de alizarina vermelha S (Sigma-Aldrich) a 2%, pH 4,2, durante 20 minutos, sob agitação lenta, protegidos da luz. O corante foi removido, os poços foram lavados com água destilada e após secagem completa, o corante foi extraído de cada poço para quantificação. Para tanto, foram adicionados 300 μ L/poço de ácido acético (Merck) a 10%, as placas foram incubadas a

temperatura ambiente, sob agitação vigorosa e protegidas da luz durante 30 minutos. Com o auxílio de uma espátula, a monocamada de células foi removida, homogeneizada e o volume obtido transferido para microtubos (Eppendorf). Para potencializar a extração do corante, os tubos foram incubados a 85°C, protegidos da luz, durante 10 minutos. Ao final deste período, os tubos foram incubados no gelo, protegidos da luz, durante 5 minutos para interromper a extração. Os tubos foram centrifugados a 20000xg, a 4°C, durante 15 minutos e 100 µL/poço foram transferidos para uma placa com 96 poços. Após, foram adicionados 35 µL/poço de KOH (Merck) a 10% para ajustar o pH para 4,2 e as absorbâncias foram registradas em um comprimento de onda de 405 nm. A mineralização de matriz foi expressa em relação às células expostas ao veículo DMSO.

4.5.1.2 Fosfatase alcalina

Os pré-osteoblastos foram estimulados a se diferenciarem, conforme descrito anteriormente, em placas com 6 poços, na presença de TZDs 5 µM, por um período de 7, 14, 21 ou 28 dias. O meio de cultura foi removido e os poços lavados 2 vezes com PBS. Em seguida, foram adicionados 500 µL/poço de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma-Aldrich) a 0,1% e as placas foram incubadas a temperatura ambiente, sob agitação vigorosa, durante 40 minutos para promover a lise das células. Com o auxílio de uma espátula, a monocamada de células foi removida e homogeneizada e o volume obtido foi armazenado a -20°C até a análise, que foi realizada com o kit comercial Fosfatase alcalina liquiform (Labtest), pelo método de Bowers e Mc Comb modificado, utilizando um procedimento automatizado. A atividade de fosfatase alcalina foi expressa em U/g de proteína. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Lowry modificado, utilizando o kit comercial Pierce Modified Lowry Protein Assay (Thermo Scientific).

4.5.1.3 Marcadores de fenótipo osteoblástico e da via de sinalização de Wnt

Para as análises por PCR em tempo real, os pré-osteoblastos foram estimulados a se diferenciarem, conforme descrito anteriormente, em placas com 6 poços, na presença de TZDs 5 μ M, por um período de 7, 14 ou 28 dias. Após esses períodos, o meio de cultura foi removido e foi adicionado 1 mL de Trizol (Life Technologies) por poço para a extração do RNA total das células conforme instruções do fabricante. O RNA foi quantificado a 260 nm e sua pureza avaliada a 260/280 nm. Foram consideradas para a análise somente as amostras que apresentaram purezas iguais ou superiores a 1,80. Em seguida, 1 μ g de RNA total foi convertido em cDNA utilizando o kit High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems), conforme as instruções do fabricante. O cDNA das amostras foi armazenado a -20°C, até a análise dos marcadores de fenótipo osteoblástico e da via de Wnt, que foi realizada por PCR em tempo real. As amplificações por PCR em tempo real foram realizadas em duplicatas, utilizando concentrações finais de cDNA 1 ng/ μ L, pares de primers (Life Technologies) 200 nM e reagente Power Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems) diluído 1:2 por reação, exceto para o gene do DKK1, para o qual foi utilizada a concentração final de cDNA 2 ng/ μ L. As reações foram conduzidas separadamente com os seguintes oligonucleotídeos:

Gene	Forward	Reverse
Ciclofilina	ATGGTCAACCCCACCGTGT	TCTGCTGTCATTGGGACCTTGT
Runx2	TTCATTCGCCTCACAAACA	GACGCCATAGTCCCTCCTT
α 1(I) colágeno	ACTGTCCCAACCCCCAAAG	CGTATTCTTCCGGGCAGAAA
Osteocalcina	CTCTGTCTCTCTGACCTCACAG	GGAGCTGCTGTGACATCCATAC
Wnt10b	GCTTTCTCCTTCTCCATGCT	CTTCTCTCCGAAGTCCATGTC
DKK1	GAGGGGAAATTGAGGAAAGC	GGTGCACACCTGACCTTCTT

As condições da reação foram: 95 °C durante 10 minutos para desnaturação inicial; 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos para término do processo de desnaturação e 60 °C por 1 minuto para o anelamento e alongação dos primers. O método $\Delta\Delta$ Ct foi adotado para determinar a expressão gênica pela subtração do Ct do gene da ciclofilina (constitutivo) do Ct do gene de interesse, sendo os valores expressos como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Para as análises por Western Blot, os pré-osteoblastos foram estimulados a se diferenciarem, conforme descrito anteriormente, em garrafas com área de 25 cm², na presença de TZDs 5 μ M, por um período de 7 dias. Após esse período, o meio de cultura foi removido, as garrafas foram lavadas com PBS e as células lisadas com tampão uréia 6,65M, glicerol

10%, SDS 1% e Tris 10 mM pH 6,8 suplementado com o inibidor de proteases fluoreto de fenilmetilssulfonil (PMSF), raspadas com espátula e sonicadas em banho de gelo. Após, o lisado foi centrifugado a 10000xg, por 10 minutos, a 4°C, para remoção do material insolúvel. Os sobrenadantes foram coletados e analisados quanto à concentração de proteínas totais pelo método de BCA, usando um kit comercial (Thermo Scientific). Para todos os grupos avaliados, a mesma quantidade de proteína (100 µg) foi desnaturada por aquecimento a 95°C, durante 5 minutos, em tampão de amostra contendo β-mercaptoetanol, analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e transferida eletroforicamente em sistema semi-seco para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com solução composta por leite desnatado 2% em TBS, por 2 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada durante a noite, a 4°C, com o anticorpo primário e, após, com o anticorpo secundário por mais 1 hora a temperatura ambiente. As incubações foram conduzidas separadamente para cada anticorpo primário, que foi utilizado nas seguintes diluições: β-catenina (1:1000) (Abcam); β-actina conjugado com peroxidase (1:2000) (Sigma-Aldrich). Foi utilizado anticorpo secundário *anti-mouse* diluído 1:5000 (GE Healthcare) para a análise da β-catenina. As proteínas marcadas pelos anticorpos foram visualizadas por quimiluminescência usando o sistema de detecção ECL Amersham (GE Healthcare) e as imagens foram documentadas para posteriores análises.

4.5.2 Diferenciação adipogênica

Para os estudos de diferenciação celular, os pré-adipócitos 3T3-L1 foram induzidos a se diferenciarem em adipócitos no 2º dia após atingirem 80 a 90% de confluência, utilizando placas ou garrafas de cultura previamente gelatinizadas. Foi adicionado um coquetel adipogênico composto por DMEM alta glicose, suplementado com 10% de SFB, antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 mg/ml), 3-isobutilmetilxantina (IBMX) 0,5 mM e dexametasona 1 µM (ambos da Sigma-Aldrich) em presença de TZDs a 1 µM e, após 3 dias, 50% do volume do meio de cultura foi removido e acrescentado o mesmo volume de DMEM alta glicose, suplementado com 10% de SFB e veículo (DMSO 0,01%) ou TZDs a 1 µM. As células foram cultivadas por mais 3 dias.

Os pré-adipócitos SGBS foram induzidos a se diferenciarem em adipócitos quando atingiram 80 a 90% de confluência. O meio de cultura foi substituído por DMEM/F12 livre de soro, suplementado com biotina 33 μM , pantotenato 17 μM , transferrina 0,01mg/mL, insulina 20 nM, cortisol 100 nM, T3 0,2 nM, dexametasona 25 nM, IBMX 250 mM (todos da Sigma-Aldrich) e antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 mg/ml). Após 4 dias, as células foram expostas a biotina 33 μM , pantotenato 17 μM , transferrina 0,01mg/mL, insulina 20 nM, cortisol 100 nM e T3 0,2 nM por mais 10 dias, realizando trocas de meio a cada 4 dias. Durante todo o período de diferenciação celular, as células foram cultivadas em presença de DMSO 0,01% ou TZDs 1 μM .

O período de tempo do início do protocolo de diferenciação adipogênica até a avaliação das células maduras foi de 6 dias para os adipócitos 3T3-L1 e de 14 dias para os adipócitos SGBS. A diferenciação adipogênica foi verificada pela avaliação do acúmulo intracelular de lipídios (no 6º dia, para os adipócitos 3T3-L1; no 14º dia, para os adipócitos SGBS), pela expressão dos marcadores adipogênicos PPAR γ 2, C/EBP α , FABP4 e CD36 (no 1º, 2º e 6º dias, para os adipócitos 3T3-L1; no 7º e 14º dias, para os adipócitos SGBS) e de β -catenina, um mediador intracelular da via de sinalização de Wnt conhecida por regular o processo de adipogênese (no 1º, 2º e 6º dias, para os adipócitos 3T3-L1).

4.5.2.1 Pré-adipócitos 3T3-L1

4.5.2.1.1 Acúmulo de lipídios

Os pré-adipócitos foram estimulados a se diferenciarem, conforme descrito anteriormente, em placas com 24 poços. Após 6 dias de indução, o meio de cultura foi removido e as células foram fixadas com 250 μL /poço de formalina tamponada 3,7%, durante 1 hora. Após este período, os poços foram lavados 2 vezes com água destilada e corados com 250 μL /poço de oil red O 0,3% (Sigma-Aldrich) em isopropanol 60% (Labsynth), durante 10 minutos. As células foram lavadas com água destilada e após secagem completa das placas, o corante foi extraído dos poços para quantificação pela adição de 300 μL /poço de isopropanol 100%. As placas foram incubadas a temperatura ambiente, sob agitação vigorosa, durante 15 minutos. Após esse período, 100 μL /poço foram transferidos para uma placa com 96 poços e

as absorvâncias foram registradas em um comprimento de onda de 490 nm. O acúmulo de lipídios foi expresso em relação às células expostas ao veículo DMSO.

4.5.2.1.2 Marcadores de fenótipo adipogênico e da via de sinalização de Wnt

Para as análises por PCR em tempo real, os pré-adipócitos foram estimulados a se diferenciarem conforme descrito anteriormente, em placas com 6 poços por 1, 2 ou 6 dias. Após esses períodos de indução, o RNA total das células foi extraído, quantificado e transcrito em cDNA para análise de expressão gênica, como descrito para os experimentos de osteogênese. Para a normalização dos resultados, a GAPDH foi utilizada como gene constitutivo. Seguem, abaixo, os oligonucleotídeos utilizados para as reações de PCR em tempo real:

Gene	Forward	Reverse
GAPDH	TCCACTCACGGCAAATTCAACG	TAGACTCCACGACATACTCAGC
C/EBP α	AGAGCCGAGATAAAGCCAAA	ACTGGTCAACTCCAGCACCT
PPAR γ 2	CACAGAGATGCCATTCTGGC	GGCCTGTTGTAGAGCTGGGT
FABP4	GCGTGGAATTTCGATGAAATCA	CCCGCCATCTAGGGTTATGA
CD36	TTTCCTCTGACATTTGCAGGTCTA	AAAGGCATTGGCTGGAAGAA
β -catenina	GTGCTGAAGGTGCTGTCTGT	TAGTCGCTGCATCTGAAAGG

Os pré-adipócitos foram estimulados a se diferenciarem em garrafas de cultura com área de 25 cm² por 6 dias para as análises por Western Blot, que foram realizadas como descrito anteriormente. Para a avaliação das proteínas de interesse, as incubações foram conduzidas separadamente para cada anticorpo primário, que foi utilizado nas seguintes diluições: β -catenina (1:1000) e CD36 (1:100) (ambos da Abcam); GAPDH conjugado com peroxidase (1:5000). As diluições dos anticorpos secundários (GE Healthcare) foram: 1:50000 para a β -catenina (*anti-mouse*) e 1:5000 para CD36 (*anti-rabbit*). As proteínas marcadas pelos anticorpos foram visualizadas por quimiluminescência usando o sistema de detecção ECL Amersham (GE Healthcare) e as imagens foram documentadas para posteriores análises.

4.5.2.2 Pré-adipócitos SGBS

4.5.2.2.1 Acúmulo de lipídios

Após 14 dias de estímulo adipogênico em placas com 12 poços, realizado conforme descrito anteriormente, o meio de cultura foi removido e os poços lavados com PBS. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos, lavadas com água destilada e, em seguida, com isopropanol 60%. As células foram coradas com oil red O 0,3% em isopropanol 60% por 30 minutos para a verificação do acúmulo de lipídios. Após esse período, os poços foram lavados com isopropanol 60% por 5 minutos e, por último, com água destilada. As imagens ao microscópio óptico foram armazenadas para documentação.

4.5.2.2.2 Marcadores de fenótipo adipogênico

Os pré-adipócitos foram estimulados a se diferenciarem por 7 ou 14 dias em placas com 6 poços para a avaliação de marcadores de fenótipo adipogênico por PCR em tempo real. O RNA total foi extraído com o kit PeqGold RNAPure (PeqLab) e transcrito utilizando o kit de síntese de cDNA da Fermentas, seguindo as instruções dos fabricantes. As amplificações por PCR em tempo real foram realizadas em duplicatas, utilizando concentrações finais de cDNA 1 ng/ μ L, pares de primers (Invitrogen) 250 nM e reagente iQ Sybr Green Supermix (Bio-Rad) utilizando as seguintes seqüências de primers:

Gene	<i>Forward</i>	Reverse
18S	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGCG
C/EBP α	AACCTTGTGCCTTGAAATG	CCCTATGTTTCCACCCCTTT
FABP4	CATACTGGGCCAGGAATTTG	GTGGAAGTGACGCCTTTCAT

As condições da reação foram: 95 °C durante 3 minutos para desnaturação inicial; 39 ciclos de 95 °C por 15 segundos para término do processo de desnaturação, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, para o anelamento e alongação dos primers. O método $\Delta\Delta$ Ct foi adotado para determinar a expressão gênica pela subtração do Ct do gene de 18S

(constitutivo) do Ct do gene de interesse, sendo os valores expressos como $2^{-\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.6 Transativação dependente de ligante de PPAR γ

Em uma placa com 96 poços, foram cultivadas 1×10^4 células HEK293T por poço e incubadas com DMEM suplementado com SFB 10% e antibióticos por 24 horas. Após esse período, as células foram transfectadas utilizando o reagente para transfecção jetPRIME (PeqLab), conforme as instruções do fabricante. As quantidades de vetores transfectados foram: 9 μg de pFR Luc (Firefly luciferase), 1 μg de pFA-PPAR γ -LBD-Gal4-DBD e 0,05 μg de pRL-CMV (Renilla luciferase). As células foram incubadas por 5 horas e o meio de cultura substituído. Após incubação durante a noite, foram adicionadas ao meio de cultura concentrações variáveis de TZDs (0,1; 1; 10 μM). Decorridas 24 horas de exposição aos compostos, as células foram lisadas e tiveram as atividades das luciferases quantificadas. A atividade da firefly luciferase foi normalizada pela obtida com a renilla luciferase, que foi realizada como um controle interno e de viabilidade celular.

4.7 Consumo de glicose

Os pré-adipócitos 3T3-L1 foram cultivados em placas previamente gelatinizadas até atingirem 80 a 90% de confluência. Dois dias depois, as células foram estimuladas a se diferenciarem em adipócitos utilizando o meio de indução composto por dexametasona 1 μM , IBMX 500 μM e insulina 1 μM em DMEM alta glicose, suplementado com SFB 10% e antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 mg/ml). Após 3 dias, 50% do meio de cultura foi substituído por DMEM alta glicose suplementado com insulina 1 μM , SFB 10% e antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 mg/ml). O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias por meio livre de indutores adipogênicos. Para a determinação do consumo de glicose, os adipócitos foram utilizados no 9º ou 12º dias após o início da indução adipogênica. As células totalmente diferenciadas em adipócitos foram incubadas com meio DMEM alta

glicose, suplementado com insulina 100 nM, SFB 10% e antibióticos, contendo DMSO 0,01% ou TZDs 1 μ M e, após 4 dias, o meio de cultura foi coletado e armazenado a -20°C até a análise. A glicose foi quantificada no meio de cultura pelo método de Trinder, utilizando o kit comercial Glicose PAP Liquiform (Labtest). O consumo de glicose no meio de cultura foi estimado pela subtração da concentração final de glicose da concentração inicial e foi expresso em relação ao grupo controle (DMSO).

4.8 Captação de glicose

Os pré-adipócitos 3T3-L1 foram cultivados em placas com 24 poços, com DMEM alta glicose contendo CS 10% e antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 mg/ml), até atingirem 80 a 90% de confluência. Dois a três dias após, o meio de cultura foi substituído por meio suplementado com SFB 10% e um coquetel composto por dexametasona 1 μ M, IBMX 500 μ M e insulina 1,67 μ M, para estimular a diferenciação celular. Após 2 dias, o meio foi removido e substituído por meio de cultura suplementado com insulina 410 nM. No 7º dia após o início da indução adipogênica, as células completamente diferenciadas foram expostas a DMSO 0,01% ou TZDs 1 μ M, na presença ou ausência de dexametasona 500 nM, por 18 horas. O meio de cultura foi removido, os poços foram lavados com PBS, foi adicionado meio de cultura livre de soro e insulina, contendo DMSO 0,01% ou TZDs 1 μ M. Após 6 horas de incubação, o meio de cultura foi removido, os poços lavados 2 vezes com PBS, e as células foram incubadas com tampão de sais de Earle, HEPES 10 nM e albumina sérica bovina 1% (pH 7,4), com ou sem insulina 50 nM, por 15 minutos, em banho-maria a 37°C . Ao final desse período, 50 μ L de (^3H)-2-desoxi-D-glicose (^3H -2DG) (concentração final de 4 nM e 0,25 μ Ci/poço) foram adicionados para dar início à reação de captação. Exatamente após 4 minutos, a captação de glicose foi interrompida pela adição de 500 μ L/poço de uma solução gelada de floretina a 300 μ M, preparada em tampão de sais de Earle, HEPES 10 nM, albumina sérica bovina 1% e DMSO 0.05%. As células foram lavadas com PBS, foi adicionado KOH 1mM e as células foram incubadas a 70°C por 20 minutos até completa digestão. Alíquotas de 150 μ L foram coletadas e transferidas para tubos de cintilação contendo 2,5 mL de líquido para cintilação (EcoLume, ICN Pharmaceuticals) e a radiação emitida foi aferida em contador de líquido de cintilação (PerkinElmer). A radiação

inespecífica foi determinada em paralelo, analisando-se a solução gelada de floretina utilizada para interromper a captação de ^3H -2DG. O valor foi descontado da emissão total de radiação e a captação específica foi normalizada pelos valores de proteína total, determinados pelo método de BCA, usando um kit comercial (Thermo Scientific).

4.9 Adipocinas

Para a investigação da produção de adipocinas, foram obtidos adipócitos completamente diferenciados após 14 dias de indução adipogênica (adipócitos SGBS) e após 9 a 12 dias (adipócitos 3T3-L1). Para ambas as linhagens, a diferenciação celular foi induzida como anteriormente descrito, sem a adição de TZDs, em placas com 6 poços.

4.9.1 Adipócitos 3T3-L1

Os adipócitos foram incubados com meio DMEM alta glicose, suplementado com insulina 100 nM, SFB 10% e antibióticos, contendo DMSO 0,01% ou TZDs 1 μM . Após 4 dias, alíquotas do meio de cultura foram coletadas com a adição de PMSF e armazenadas a -20°C para a posterior quantificação de leptina e resistina, enquanto as células foram reservadas para a análise de expressão gênica. As concentrações de leptina e resistina no meio de cultura foram determinadas pelo método Milliplex utilizando o kit para adipocinas de camundongo da Millipore. A expressão gênica foi determinada por PCR em tempo real, nas mesmas condições anteriormente descritas para as linhagens murinas utilizadas neste estudo. As seqüências de oligonucleotídeos foram as seguintes:

Gene	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
GAPDH	TCCACTCACGGCAAATTCAACG	TAGACTCCACGACATACTCAGC
Resistina	CTTTCATTTCCCCTCCTTTTC	CAGTCTATCCTTGACACTGG
Leptina	CCAAAACCCTCATCAAGACC	GTGAAGCCCAGGAATGAAGT

4.9.2 Adipócitos SGBS

Os adipócitos foram cultivados por 24 horas com meio de cultura DMEM/F12 livre de soro, suplementado com antibióticos, biotina 33 μM e pantotenato 17 μM , com a adição de DMSO 0,01% ou TZDs 1 μM . A expressão gênica de adiponectina foi avaliada por PCR em tempo real, conforme descrito anteriormente para essa linhagem celular. As seqüências de oligonucleotídeos utilizados foram os apresentados abaixo:

Gene	<i>Forward</i>	Reverse
18S	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGCG
Adiponectina	GGCCATCTCCTCCTCACTTC	CCGGGCAGACAGATGCC

4.10 Mediadores pró-inflamatórios

4.10.1 Adipócitos 3T3-L1 estimulados com LPS

Para avaliar mediadores pró-inflamatórios, adipócitos 3T3-L1 foram expostos ao Lipopolissacarídeo (LPS), conforme descrito por Lira et al. (2011) (LIRA et al., 2011), e a expressão gênica de IL-6 e CCL2/MCP1 foi avaliada por PCR em tempo real. Células completamente diferenciadas foram obtidas no 9º a 12º dias de indução, conforme descrito anteriormente, em placas com 6 poços. Os adipócitos foram incubados com meio DMEM alta glicose, suplementado com SFB 10%, antibióticos e insulina 100 nM, na presença de DMSO 0,01% ou TZDs 1 μM . Após 3 dias, o meio de cultura foi renovado, com a adição de insulina 100 nM e LPS 75 ng/mL (Sigma-Aldrich), na presença de DMSO 0,01% ou TZDs 1 μM . Após 24 horas de incubação, o RNA total foi extraído e transcrito para posterior análise da expressão gênica dos mediadores pró-inflamatórios, que foi determinada por PCR em tempo real, nas mesmas condições anteriormente descritas para as linhagens celulares murinas utilizadas neste estudo. As seqüências de oligonucleotídeos foram os seguintes:

Gene	Forward	Reverse
GAPDH	TCCAATCACGGCAAATTCAACG	TAGACTCCACGACATACTCAGC
IL-6	TGTGCAATGGCAATTCTGAT	ACCAGAGGAAATTTCAATAGG
CCL2/MCP-1	TGAGTAGGCTGGAGAGCTACA	ATGTCTGGACCCATTCTTC

4.10.2 Macrófagos THP-1 estimulados com ácido palmítico

O processo inflamatório foi induzido pela exposição de macrófagos THP-1 ao ácido palmítico, conforme descrito por Namgaladze et al. (2013) (NAMGALADZE et al., 2013), e avaliado pela expressão gênica de TNF- α e da proteína fosforilada de cJun (p-cJun). Foram cultivadas 1×10^6 células/poço para analisar a expressão gênica em placas com 6 poços, enquanto para a expressão da proteína, foram cultivadas $2,5 \times 10^6$ células/placa de 6 cm de diâmetro com meio RPMI 1640, suplementado com CS 10% e antibióticos. Em seguida, as células foram estimuladas a se diferenciarem em macrófagos pela adição de TPA 100 nM e incubadas por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio contendo DMSO 0,01% ou TZDs 1 μ M e os macrófagos foram cultivados por mais 24 horas. O meio de cultura foi renovado, com a adição de ácido palmítico (Sigma-Aldrich) a 500 μ M, na presença de DMSO 0,01% ou TZDs 1 μ M e as células foram incubadas por 3 horas.

A expressão gênica de TNF- α foi avaliada por PCR em tempo real, como anteriormente descrito para a linhagem de pré-adipócitos SGBS. As seqüências utilizadas de oligonucleotídeos foram: TNF- α : Forward-GACAAGCCTGTAGCCCATGT e Reverse-GAGGTACAGGCCCTCTGATG; 18S: Forward- GTAACCCGTTGAACCCATT e Reverse- CCATCCAATCGGTAGCG.

A análise da proteína p-cJun foi realizada por Western Blot. Foi adicionado 1 mL/placa de 6 cm de diâmetro de PBS gelado para a remoção dos macrófagos com o auxílio de uma espátula e as células foram centrifugadas a 16100xg por 30 segundos a 4°C. Em seguida, as células foram ressuspensas em 100 μ L de tampão de lise contendo inibidor de protease e PMSF, sonicadas e centrifugadas a 10000xg por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram recolhidos e tiveram a concentração de proteínas determinada pelo método de Lowry modificado, segundo as instruções do fabricante (Bio-rad). Em seguida, 60 μ g de proteína total foram adicionados ao tampão de amostra SDS-PAGE (Tris 0,1M pH 6,8,

SDS 4%, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol 0,2%, glicerol 2%) e aquecidos a 95° C por 5 minutos. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS e foram submetidas à carga elétrica – 2h a 100 V – para a realização da eletroforese. Concluída a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando um sistema de transferência semi-seco – 105 min a 0,07A/membrana. Sítios de ligação inespecíficos da membrana foram bloqueados com solução de albumina sérica bovina a 5% em TBS-T por 1 hora a temperatura ambiente. Logo em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo primário durante a noite a 4°C sob agitação suave. As incubações foram conduzidas separadamente para cada anticorpo primário, que foi utilizado nas seguintes diluições: p-cJun (Ser73) (1:1000) (Cell Signaling Technology); β -actina (1:3000) (Sigma-Aldrich). Após ser lavada 3 vezes com TBS-T por 5 minutos cada, procedeu-se a incubação da membrana com o anticorpo secundário *anti-rabbit* conjugado ao fluoróforo IRDye 800 (LICOR Biosciences), na diluição de 1:10000, por 45 minutos. A membrana foi novamente lavada 2 vezes com TBS-T por 5 minutos e a fluorescência determinada pelo sistema Odyssey Clx (Uniscience).

4.11 Ensaio de fluxo extracelular

A taxa de consumo de oxigênio (OCR) e a taxa de acidificação extracelular (ECAR) foram avaliadas em macrófagos humanos THP-1 pelo ensaio XF de fluxo extracelular (Seahorse Bioscience). Brevemente, $7,5 \times 10^4$ células/poço foram cultivadas em placas com 96 poços e incubadas com TPA 100 nM por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio livre de TPA, contendo TZDs 1 ou 10 μ M e as células foram incubadas por mais 24 horas. Em seguida, o meio de cultura foi removido e foram adicionados 200 μ L de DMEM suplementado com glicose 11 mM. As placas foram incubadas em ambiente livre de CO₂ por pelo menos 1 hora antes de iniciar as determinações de OCR e ECAR. Durante as determinações, foram injetadas soluções de oligomicina 1 μ M (inibidor e ATPase) ou FCCP 1 μ M (desacoplador da fosforilação oxidativa).

4.12 Via de sinalização de AMPK

A sinalização de AMPK foi investigada em macrófagos THP-1, pela análise da expressão da proteína fosforilada da acetil-CoA-carboxilase (p-ACC). Foram cultivadas $2,5 \times 10^6$ células/placa de 6 cm de diâmetro em meio RPMI 1640, suplementado com CS 10% e antibióticos, com a adição de TPA 100 nM para estimular a diferenciação celular. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio contendo DMSO 0,01% ou TZDs 1 μ M e os macrófagos foram cultivados por mais 24 horas. A p-ACC foi avaliada por Western Blot, seguindo os procedimentos descritos anteriormente para essa linhagem celular. As incubações foram conduzidas separadamente para cada anticorpo primário, que foi utilizado nas seguintes diluições: p-ACC (Ser79) (1:1000) (Cell Signaling Technology); nucleolina (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology). Foi utilizado o anticorpo secundário *anti-rabbit* conjugado ao fluoróforo IRDye 800 (LICOR Biosciences), na diluição de 1:10000. A fluorescência foi determinada pelo sistema Odyssey Clx (Uniscience).

4.13 Análise dos resultados

Os resultados foram expressos como média \pm SD de avaliações em duplicata ou triplicata de pelo menos 2 ou 3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pelo programa GraphPad InStat, utilizando o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrico) seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn, ou testes não pareados, conforme recomendado para cada experimento. Os resultados cuja análise estatística apresentou valores de $p < 0,05$ foram considerados significativamente diferentes.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos das TZDs sobre a diferenciação celular osteogênica

Inicialmente, investigamos se os derivados de TZDs interferem no processo de diferenciação celular de pré-osteoblastos murinos MC3T3-E1. Para selecionarmos os novos derivados de TZDs e as concentrações de trabalho não citotóxicas, realizamos o ensaio de viabilidade celular pelo método de redução de MTT a formazana, após um período de 24 horas de exposição aos compostos.

Como apresentado na tabela 5, o veículo utilizado para o preparo das soluções de TZDs, o DMSO, não apresentou efeito citotóxico sobre as células MC3T3-E1 em todas as concentrações utilizadas, evidenciando que as alterações observadas na viabilidade celular foram decorrentes da exposição às TZDs e não ao veículo. Oito novos derivados de TZDs (SF-23, GQ-89, GQ-97, GQ-145, GQ-150, GQ-169, GQ-177 e LYSO-7) apresentaram os menores efeitos citotóxicos nas concentrações avaliadas, sendo por esse motivo, selecionados para a realização dos experimentos de diferenciação celular osteogênica. Para descartar a hipótese de citotoxicidade após exposição prolongada às TZDs, foi realizada em paralelo a determinação da morte celular avaliando-se as mesmas condições do experimento de osteogênese. Após 28 dias de indução osteogênica com TZDs a 5 μ M não houve mudança na porcentagem de morte celular com relação aos grupos controles não tratado e veículo (figura 9).

Tabela 5: Viabilidade de pré-osteoblastos MC3T3-E1 após 24 horas de cultivo com TZDs.

	0,003125%	0,00625%	0,0125%	0,025%	0,05%	0,10%	0,20%
DMSO	103,5 ± 5,8%	103,6 ± 4,9%	109,7 ± 5,97%	106,3 ± 1,9%	109,4 ± 2,5%	106,2 ± 2,9%	102,4 ± 5,1%
	0,3125 µM	0,625 µM	1,25 µM	2,5 µM	5 µM	10 µM	20 µM
Rosi	105,60 ± 5,3%	108,6 ± 7,5%	109,0 ± 7,3%	101,1 ± 8,6%	107,9 ± 3,6%	106,6 ± 2,2%	109,5 ± 7,9%
SF-3	103,5 ± 4,8%	103,6 ± 5,0%	104,5 ± 4,6%	96,4 ± 2,9%	87,6 ± 4,7%	77,5 ± 2,8%	71,9 ± 2,9%
SF-5	104,18 ± 2,5%	103,9 ± 3,5%	103,6 ± 4,0%	83,7 ± 1,9%	76,0 ± 3,1%	70,4 ± 3,3%	68,3 ± 3,7%
SF-20	101,9 ± 4,8%	99,12 ± 3,37%	99,36 ± 2,47%	98,02 ± 3,01%	91,15 ± 1,21%	82,73 ± 2,21%	82,3 ± 5,8%
SF-23	103,1 ± 5,6%	97,1 ± 2,3%	94,5 ± 2,9%	93,2 ± 3,9%	94,4 ± 2,5%	91,4 ± 4,8%	89,9 ± 4,1%
GQ-11	100,9 ± 5,6%	102,5 ± 9,0%	102,6 ± 12,0%	85,54 ± 5,1%	76,3 ± 3,4%	72,2 ± 1,2%	69,7 ± 1,2%
GQ-32	95,1 ± 4,4%	95,1 ± 2,4%	98,8 ± 2,8%	98,8 ± 2,4%	92,8 ± 2,1%	78,4 ± 3,1%	64,1 ± 1,67%
GQ-89	96,3 ± 3,8%	96,1 ± 4,7%	93,9 ± 5,1%	91,0 ± 4,2%	89,2 ± 2,9%	85,1 ± 5,0%	86,4 ± 4,3%
GQ-97	108,0 ± 3,3%	104,9 ± 2,6%	106,3 ± 3,1%	106,3 ± 5,2%	106,0 ± 6,6%	108,4 ± 8,6%	91,5 ± 6,2%
GQ-145	97,4 ± 4,7%	96,4 ± 3,3%	99,0 ± 3,2%	94,9 ± 4,0%	88,4 ± 6,7%	95,6 ± 3,0%	89,9 ± 4,2%
GQ-150	100,5 ± 5,0%	105,3 ± 3,9%	103,9 ± 4,2%	105,8 ± 3,2%	97,0 ± 6,7%	91,1 ± 3,6%	79,7 ± 3,5%
GQ-169	96,6 ± 3,2%	94,4 ± 3,3%	93,9 ± 2,6%	93,5 ± 3,3%	90,0 ± 4,3%	90,0 ± 5,2	85,2 ± 4,3%
GQ-177	101,6 ± 2,5%	99,1 ± 4,0%	104,3 ± 4,4%	100,3 ± 3,4%	101,0 ± 3,6%	93,0 ± 7,1%	91,1 ± 8,3%
LYSO-7	102,9 ± 3,4%	104,0 ± 4,0%	105,3 ± 4,8%	106,2 ± 5,6%	112,0 ± 6,6%	111,8 ± 4,8%	93,4 ± 7,3%

A viabilidade celular foi avaliada espectrofotometricamente (580 nm) pela redução de MTT a formazana. As concentrações equivalentes de veículo (DMSO) utilizadas nas soluções de TZDs 0,3125, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 e 20 µM foram, respectivamente, 0,003125, 0,00625, 0,0125, 0,025, 0,05, 0,10 e 0,20% (v/v). Os resultados são expressos como média ± SD de 2 experimentos independentes (n = 16).

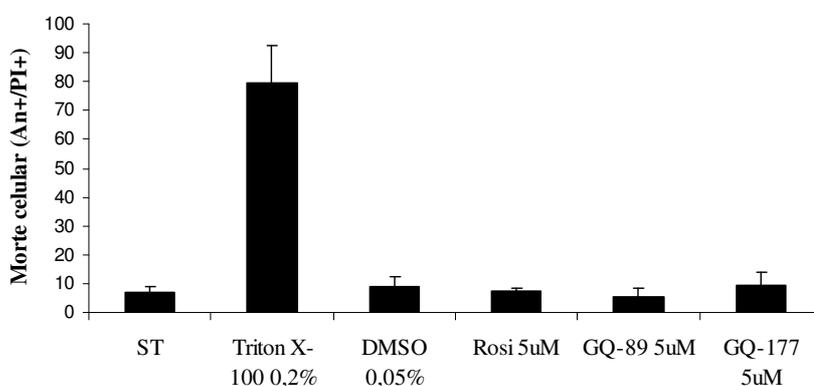
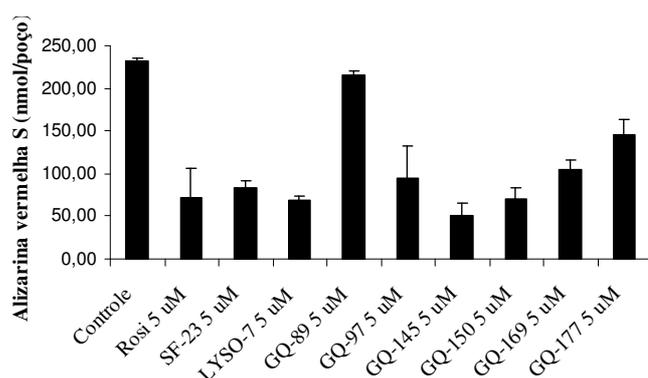


Figura 9: Morte celular em osteoblastos após 28 dias de indução osteogênica em presença de TZDs. Células MC3T3-E1 foram cultivadas com indutores osteogênicos (ácido ascórbico 50 µM, β-glicerofosfato 10 mM e dexametasona 100 nM) por 28 dias na presença de TZDs na concentração de 5 µM, marcadas com PI e anexina V-FITC e avaliadas por citometria de fluxo. Células sem tratamento (ST), com o veículo (DMSO 0,05%) ou com Triton X-100 a 0,2% também foram avaliadas. Os resultados são expressos como média ± SD de 2 experimentos independentes (n = 6).

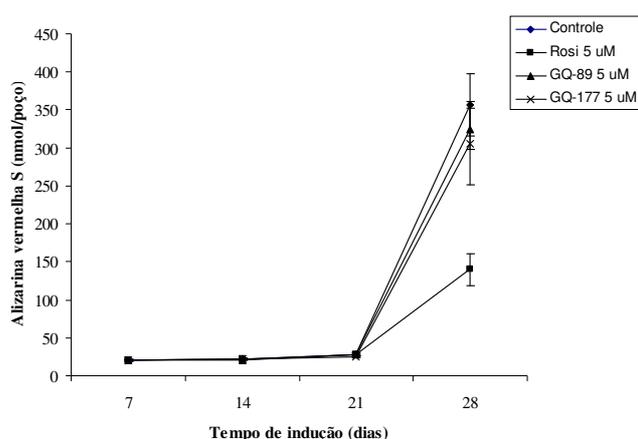
Neste estudo, um dos parâmetros utilizados para avaliar a diferenciação celular osteogênica foi a mineralização de matriz, que foi determinada pelos depósitos de cálcio e visualizada pela coloração com alizarina vermelha S. A figura 10 mostra os efeitos das TZDs sobre a mineralização de matriz em células MC3T3-E1 que foram induzidas a se

diferenciarem em osteoblastos durante 28 dias em um ensaio preliminar com as TZDs selecionadas pelo ensaio de viabilidade celular (A), durante 7, 14, 21 e 28 dias (B) ou por 28 dias (C), avaliando somente os novos derivados TZDs mais promissores (GQ-89 e GQ-177). Na figura 10B, nota-se que a mineralização ocorreu tardiamente, sendo visualizada somente após 28 dias de indução osteogênica. Por esse motivo, foi padronizado o 28º dia para avaliar a mineralização de matriz. Após a realização de 2 experimentos independentes, verificou-se que ao final de 28 dias de indução osteogênica a Rosiglitazona inibia consideravelmente a mineralização de matriz ($28,49 \pm 7,26 \%$), quando comparada com o controle ($97,65 \pm 22,40 \%$), confirmando seu efeito antiosteoblástico. Interessantemente, as TZDs GQ-177 ($90,05 \pm 21,71 \%$) e GQ-89 ($61,19 \pm 23,52 \%$) não modificaram de modo significativo a mineralização de matriz (figura 10C).

A



B



C

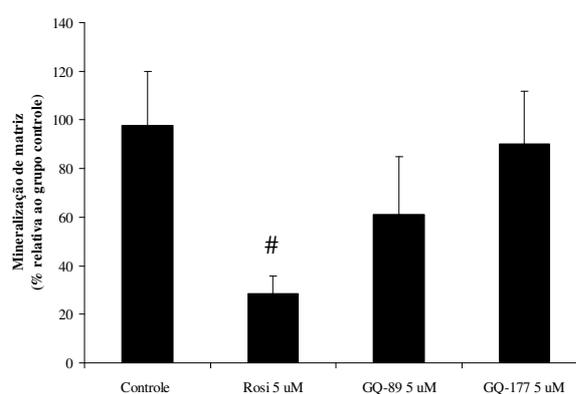


Figura 10: Efeitos das TZDs sobre a mineralização de matriz. Células MC3T3-E1 foram cultivadas com indutores osteogênicos (ácido ascórbico 50 μ M, β -glicerofosfato 10 mM e dexametasona 100 nM) por até 28 dias na presença de TZDs na concentração de 5 μ M. Células cultivadas com indutores osteogênicos e o veículo DMSO (Controle) também foram testadas pela coloração com alizarina vermelha S. (A) Ensaio preliminar com todas as TZDs. (B) A mineralização de matriz foi avaliada nos dias 7, 14, 21 e 28 de indução pela quantificação de alizarina extraída dos poços corados, que foi expressa em nmol/poço. (C) A mineralização de matriz foi avaliada após 28 dias de indução, em porcentagem relativa ao grupo controle (média \pm SD). Todos os grupos experimentais e controles foram avaliados em replicata (n= 9 a 12), em 2 experimentos independentes. # p<0,01 (vs Controle).

Outro marcador de fenótipo osteoblástico utilizado neste estudo foi a fosfatase alcalina. A figura 11 apresenta os efeitos das TZDs sobre a atividade desta enzima em células MC3T3-E1 que foram induzidas a se diferenciarem em osteoblastos durante 7, 14, 21 e 28 dias. Coerente com a atividade antiosteoblástica descrita em literatura, a Rosiglitazona diminuiu a atividade da fosfatase alcalina no 7º dia de indução osteogênica ($65,02 \pm 18,60\%$), quando comparada com o controle ($100,00 \pm 24,09\%$). A partir do 21º dia, foi observada uma tendência de elevação da atividade desta enzima (Rosi: $127,37 \pm 22,15\%$ vs Controle: $99,56 \pm 17,40\%$), atingindo um aumento marcante de atividade no 28º dia (Rosi: $239,46 \pm 51,80\%$ vs Controle: $99,75 \pm 25,35\%$), provavelmente por um mecanismo compensatório à diminuição desta enzima no 7º dia. Diferente do observado com a Rosiglitazona, os novos derivados de TZDs em nenhum momento inibiram a atividade de fosfatase alcalina, o que pode explicar, em parte, a ausência de efeito inibitório sobre a mineralização apresentada por GQ-177 e GQ-89.

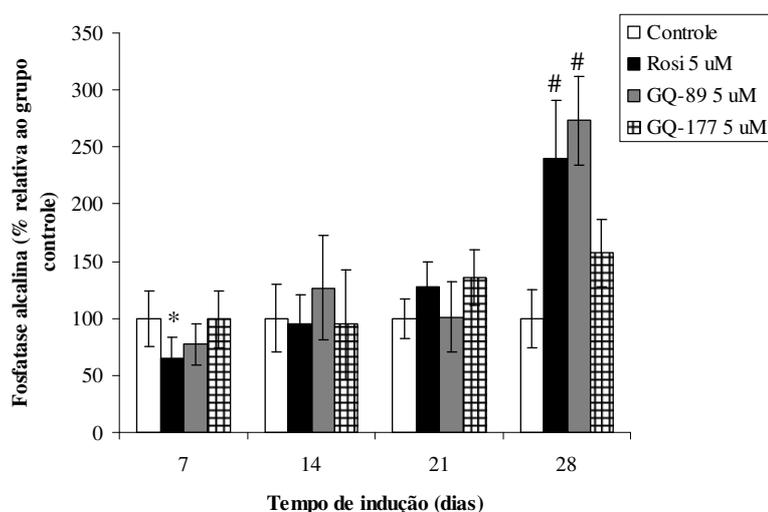


Figura 11: Efeitos das TZDs sobre a atividade de fosfatase alcalina. Células MC3T3-E1 foram cultivadas com indutores osteogênicos (ácido ascórbico 50 μ M, β -glicerofosfato 10 mM e dexametasona 100 nM) durante 7, 14, 21 e 28 dias na presença de TZDs na concentração de 5 μ M. Células cultivadas com indutores osteogênicos e o veículo DMSO (Controle) também tiveram as atividades de fosfatase alcalina avaliadas, que foram expressas em porcentagem relativa ao grupo controle (média \pm SD). Todos os grupos experimentais e controles foram avaliados em replicata (n= 7 a 15), em 2 experimentos independentes. * $p < 0,05$ (vs Controle); # $p < 0,01$ (vs Controle).

Para investigar os mecanismos moleculares responsáveis pela ausência de efeito antiosteoblástico da GQ-89 e da GQ-177, avaliou-se a expressão de genes específicos do fenótipo osteoblástico. Tanto a Rosiglitazona quanto a GQ-89 e a GQ-177 inibiram a expressão de Runx2, um fator de transcrição importante para a osteogênese, no 28º dia de indução (figura 12A). Quando avaliadas as principais proteínas de matriz produzidas e

secretadas por osteoblastos, verificou-se que todas as TZDs inibem de modo significativo a expressão gênica do colágeno no 7º e 28º dias de indução (figura 12B). Por outro lado, a expressão gênica da osteocalcina não foi modificada pela Rosiglitazona nem pela GQ-89, mas de modo interessante, foi aumentada pela GQ-177 no 28º dia de indução (figura 12C).

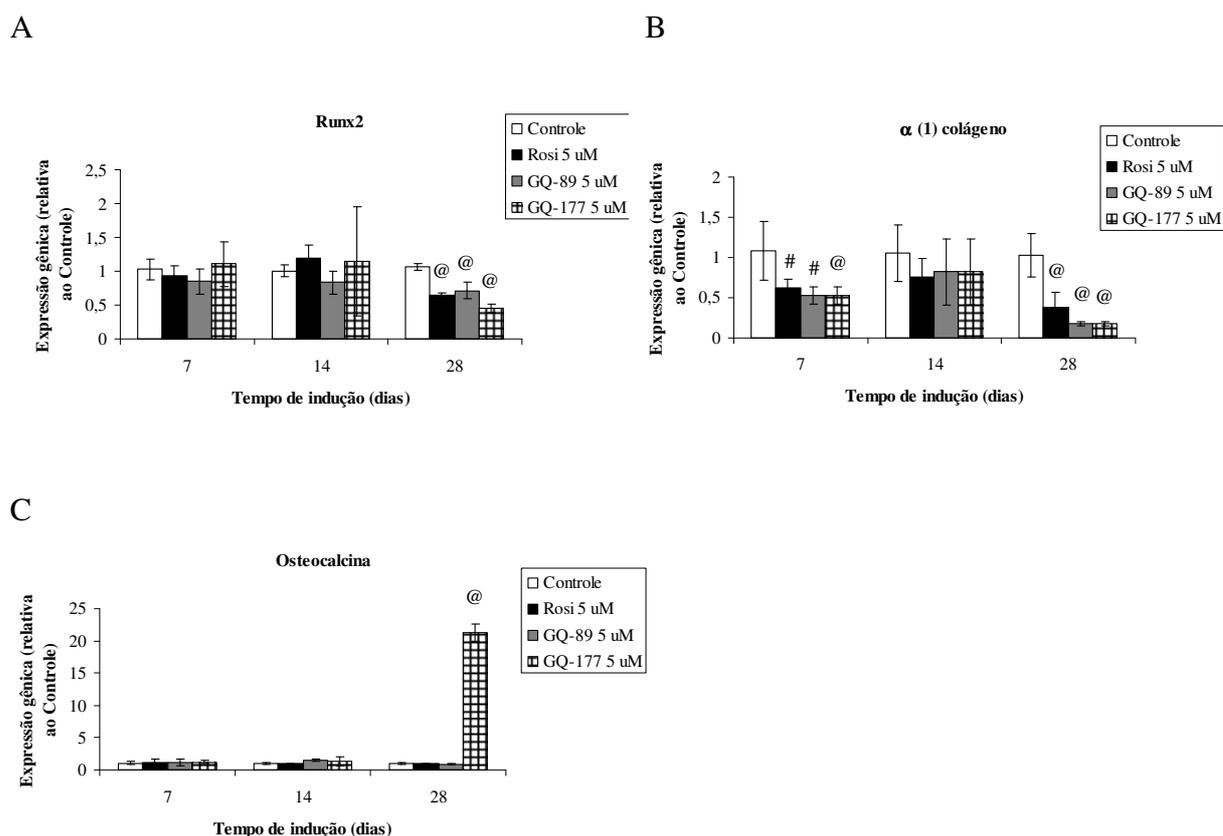


Figura 12: Efeitos das TZDs sobre a expressão de genes específicos do fenótipo osteoblástico. Células MC3T3-E1 foram cultivadas com indutores osteogênicos (ácido ascórbico 50 µM, β-glicerofosfato 10 mM e dexametasona 100 nM) durante 7, 14 e 28 dias na presença de TZD na concentração de 5 µM. Células cultivadas com indutores osteogênicos e o veículo DMSO (Controle) também foram avaliadas quanto à expressão gênica, que foi expressa em relação ao grupo controle (média ± SD). Todos os grupos experimentais e controles foram avaliados em replicata (n= 6) em 2 experimentos independentes. # p<0,01 (vs Controle); @ p<0,001 (vs Controle).

Finalmente, avaliamos a expressão de genes relacionados à via de sinalização de Wnt pela importância dessa via na regulação da diferenciação celular. A ativação da via de sinalização de Wnt estimula a formação óssea por vários mecanismos, incluindo a indução de osteoblastogênese e a proliferação de osteoblastos. Por outro lado, a indução de PPARγ por TZDs suprime esta sinalização, favorecendo a adipogênese em detrimento da osteogênese. Observamos que quando os pré-osteoblastos MC3T3-E1 são estimulados a se diferenciarem em osteoblastos, a expressão gênica de Wnt10b, um membro da família Wnt de glicoproteínas secretadas que ativam esta via de sinalização, não se altera. Entretanto, a expressão gênica de

DKK1, um inibidor da via de sinalização de Wnt, diminui gradualmente, indicando favorecimento da ativação dessa via, o que está coerente com a indução de osteogênese. A adição de Rosiglitazona ao meio de indução osteogênica aumentou a expressão do inibidor DKK1 no 7º dia, sugerindo inibição da via de sinalização de Wnt e, por conseguinte, inibição da osteogênese. Ao contrário, as TZDs GQ-89 e a GQ-177, diminuíram a expressão desse inibidor, sugerindo estímulo da osteogênese (Figura 13A). Por outro lado, a Rosiglitazona aumentou a expressão de Wnt10b no 14º dia, enquanto a GQ-89 e a GQ-177 a diminuíram no 7º dia (Figura 13B).

Como foram observados aumento e diminuição tanto da expressão de Wnt10b, como de DKK1, fez-se necessária a avaliação da proteína β -catenina, mediador intracelular da via de sinalização de Wnt, para verificar qual efeito predomina, se ativação ou inibição dessa via. Em um experimento preliminar, verificamos por Western Blot que os níveis de β -catenina permanecem inalterados com a GQ-89 e a GQ-177, o que demonstra a manutenção da via de sinalização de Wnt e do processo de osteogênese. Ao contrário, a Rosiglitazona inibe essa via de sinalização, conforme evidenciado pela diminuição de β -catenina, prejudicando a osteogênese.

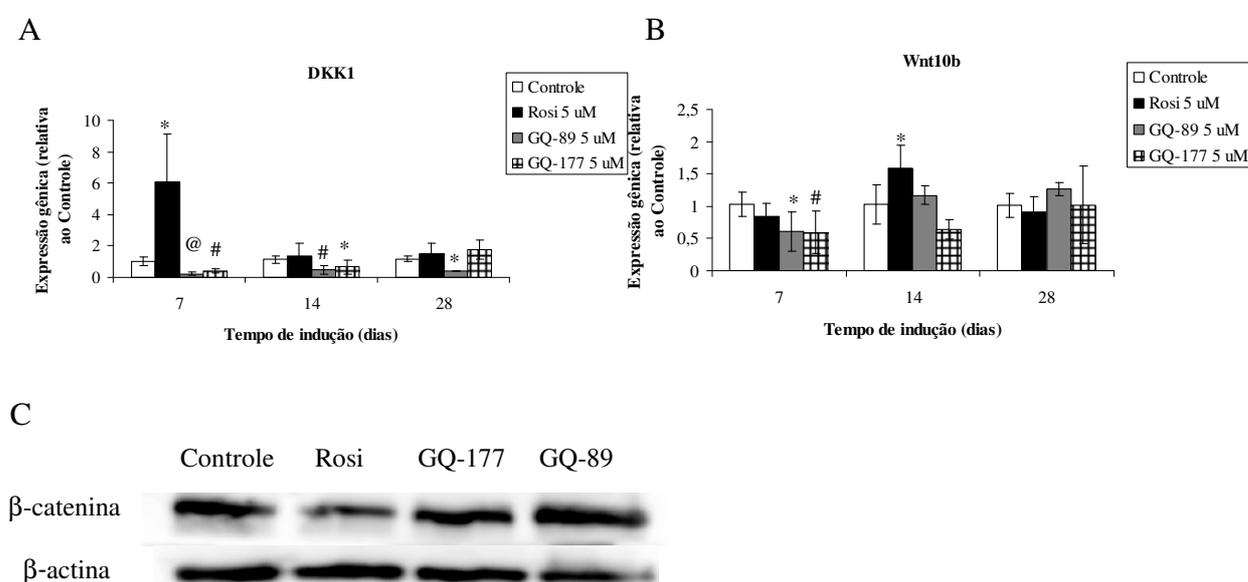


Figura 13: Efeitos das TZDs sobre a expressão de genes específicos da via de sinalização de Wnt. Expressão gênica de DKK1 (A) e Wnt10b (B) avaliada por PCR em tempo real. Western Blot representativo de β -catenina de um experimento preliminar (C). Células MC3T3-E1 foram cultivadas com indutores osteogênicos (ácido ascórbico 50 μ M, β -glicerofosfato 10 mM e dexametasona 100 nM) durante 7, 14 e 28 dias na presença de TZDs na concentração de 5 μ M. Células cultivadas com indutores osteogênicos e o veículo DMSO (Controle) também foram avaliadas quanto à expressão gênica, que foi expressa em relação ao grupo controle (média \pm SD). Todos os grupos experimentais e controles foram avaliados em replicata (n= 6) em 2 experimentos independentes. * p<0,05 (vs Controle); # p<0,01 (vs Controle); @ p<0,001 (vs Controle). Western Blot realizado em duplicata em um experimento preliminar.

5.2 Efeitos das TZDs sobre a diferenciação celular adipogênica

Prosseguindo este estudo, investigamos se os novos derivados de TZDs interferem no processo de diferenciação celular de pré-adipócitos murinos 3T3-L1.

Ao tentarmos reproduzir os protocolos de indução adipogênica mais utilizados, baseados na associação de dexametasona, 3-isobutil-1-metilxantina e insulina, tivemos dificuldades para demonstrar o estabelecido efeito adipogênico da Rosiglitazona. Provavelmente, por tratar-se de um potente coquetel adipogênico, não foi possível observar efeito adipogênico adicional com o uso da Rosiglitazona (Figura 14A). Por esse motivo, foi adotado um protocolo menos potente que o anterior, que exclui a insulina da composição do meio de indução, baseado em estudo realizado por Pantoja e colaboradores (2008), com poucas alterações (PANTOJA; HUFF; YAMAMOTO, 2008). Com este protocolo, foi possível verificar o efeito adipogênico adicional da Rosiglitazona já na concentração de 1 μM (Figura 14B) e, assim, foi padronizado o uso desta concentração nos demais experimentos.

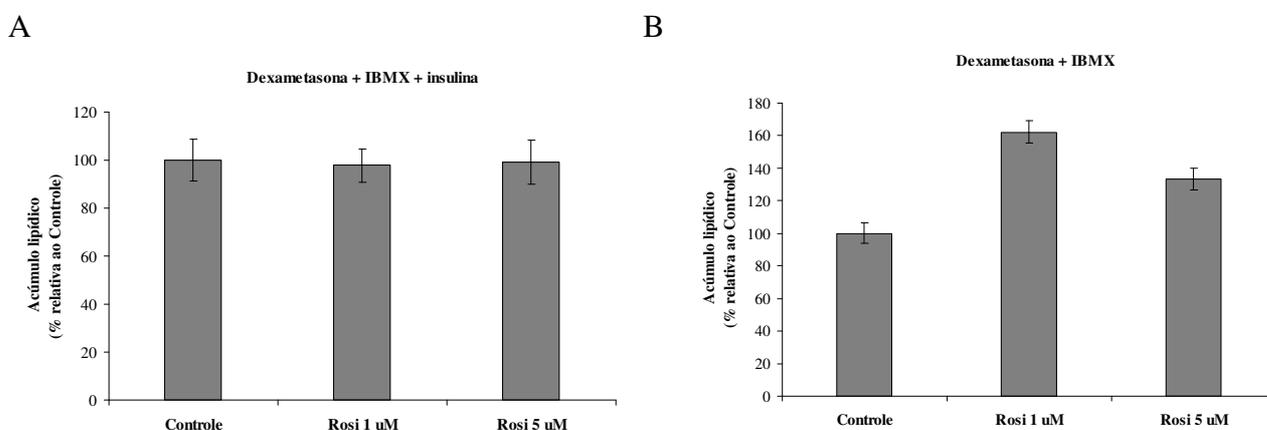


Figura 14: Padronização do protocolo de adipogênese. Células 3T3-L1 foram cultivadas com diferentes meios indutores adipogênicos durante 10 dias. Durante este período, as células foram cultivadas na presença de TZDs na concentração de 1 ou 5 μM . Células cultivadas com indutores adipogênicos e o veículo DMSO (Controle) também foram coradas com oil red O e tiveram o acúmulo intracelular de lipídios estimado pela quantificação do corante extraído dos poços, o qual foi expresso em porcentagem relativa ao grupo controle (média \pm SD). (A) Dexametasona 1 μM , 3-isobutil-1-metilxantina 500 μM e insulina 100 nM; (B) Dexametasona 1 μM e 3-isobutil-1-metilxantina 500 μM . Os grupos experimentais e controles foram avaliados em replicata (n= 8 a 20).

Para selecionarmos as TZDs e as concentrações de trabalho não citotóxicas, realizamos inicialmente o ensaio de viabilidade celular pelo método de redução de MTT a formazana após 24 horas de exposição dos pré-adipócitos às TZDs. Conforme demonstrado na tabela 6, o DMSO não apresentou efeito citotóxico sobre as células 3T3-L1 em todas as

concentrações utilizadas, evidenciando que as alterações observadas na viabilidade celular foram decorrentes da exposição às TZDs e não ao veículo. A Rosiglitazona e três novas TZDs (SF-3, GQ-150 e LYSO-7) apresentaram os menores efeitos citotóxicos nas concentrações de 0,3125 a 5 μM e, por esse motivo, foram selecionadas para a realização dos experimentos de diferenciação adipogênica. A GQ-177 também foi incluída nos experimentos de adipogênese por ter apresentado resultados promissores em outros estudos realizados pelo grupo de pesquisa da Profa Dulcineia Saes Parra Abdalla. Para descartar a hipótese de citotoxicidade após exposição prolongada às TZDs, foi realizada em paralelo a determinação da morte celular avaliando-se as mesmas condições do experimento de adipogênese. Após 6 dias de indução adipogênica com TZDs a 1 μM não houve mudança na porcentagem de morte celular com relação aos grupos controles não tratado e veículo (Figura 15).

Tabela 6: Viabilidade de pré-adipócitos 3T3-L1 após 24 horas de cultivo com TZDs

	0,003125%	0,00625%	0,0125%	0,025%	0,05%	0,10%	0,20%
	0,3125 μM	0,625 μM	1,25 μM	2,5 μM	5 μM	10 μM	20 μM
DMSO	102,6 \pm 5,4%	99,8 \pm 2,6%	99,2 \pm 4,1%	97,9 \pm 3,5%	99,7 \pm 3,8%	98,6 \pm 3,9%	97,6 \pm 3,6%
Rosi	100,1 \pm 2,7%	97,0 \pm 1,6%	99,1 \pm 2,2%	94,7 \pm 2,7%	95,5 \pm 1,8%	101,5 \pm 1,7%	98,2 \pm 1,0%
SF-3	97,65 \pm 2,6%	98,6 \pm 2,6%	98,3 \pm 3,4%	98,8 \pm 3,1%	93,7 \pm 9,0%	69,9 \pm 1,4%	60,8 \pm 1,2%
SF-5	94,7 \pm 2,6%	91,3 \pm 3,3%	92,3 \pm 2,5%	90,4 \pm 2,4%	84,3 \pm 2,1%	62,8 \pm 3,8%	51,8 \pm 1,1%
SF-20	88,9 \pm 3,2%	91,2 \pm 3,2%	87,7 \pm 3,9%	86,8 \pm 1,4%	84,0 \pm 3,6%	76,2 \pm 1,8%	64,1 \pm 1,6%
SF-23	91,7 \pm 3,5%	88,0 \pm 3,6%	89,2 \pm 4,4%	89,7 \pm 3,1%	89,6 \pm 2,1%	81,4 \pm 6,2%	71,3 \pm 5,0%
GQ-11	79,2 \pm 10,1%	74,9 \pm 3,9%	74,7 \pm 1,1%	74,5 \pm 3,5%	72,6 \pm 2,6%	51,2 \pm 2,1%	47,0 \pm 2,1%
GQ-32	76,8 \pm 2,4%	77,3 \pm 4,7%	91,3 \pm 9,8%	96,4 \pm 6,2%	94,6 \pm 9,1%	81,8 \pm 8,0%	62,9 \pm 7,4%
GQ-89	80,7 \pm 5,4%	74,1 \pm 3,3%	75,8 \pm 4,8%	73,3 \pm 4,9%	72,6 \pm 6,4%	64,0 \pm 8,0%	66,5 \pm 5,7%
GQ-97	83,9 \pm 7,9%	79,9 \pm 5,7%	78,3 \pm 6,5%	80,2 \pm 7,1%	83,5 \pm 3,4%	81,7 \pm 7,8%	61,9 \pm 7,2%
GQ-145	86,0 \pm 3,7%	85,0 \pm 3,5%	81,0 \pm 2,8%	78,8 \pm 1,6%	79,4 \pm 2,6%	80,9 \pm 3,9%	84,3 \pm 7,7%
GQ-150	101,4 \pm 6,3%	99,7 \pm 9,1%	100,1 \pm 8,7%	101,8 \pm 3,2%	102,4 \pm 2,5%	95,6 \pm 2,7%	90,1 \pm 1,1%
GQ-169	82,9 \pm 6,6%	88,8 \pm 6,4%	85,6 \pm 9,9%	89,8 \pm 6,2%	81,2 \pm 9,9%	85,7 \pm 4,1	86,2 \pm 7,7%
GQ-177	86,5 \pm 5,3 %	95,5 \pm 4,1%	92,0 \pm 5,7%	81,8 \pm 6,0%	69,2 \pm 13,1%	73,1 \pm 2,9%	62,3 \pm 2,1%
LYSO-7	87,2 \pm 5,8%	95,9 \pm 6,3%	102,9 \pm 6,4%	100,5 \pm 11,0%	107,7 \pm 6,4%	120,3 \pm 5,9%	122,3 \pm 8,2%

A viabilidade celular foi avaliada espectrofotometricamente (580 nm) pela redução de MTT a formazana. As concentrações equivalentes de veículo (DMSO) utilizadas nas soluções de TZDs 0,3125, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 e 20 μM foram, respectivamente, 0,003125, 0,00625, 0,0125, 0,025, 0,05, 0,10 e 0, 20% (v/v). Os resultados são expressos como média \pm SD de 2 experimentos independentes (n = 16).

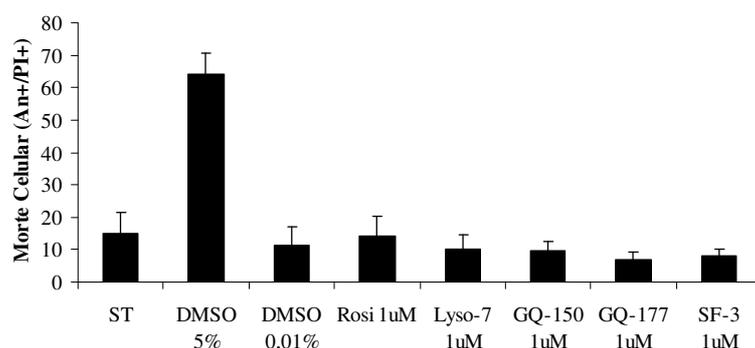
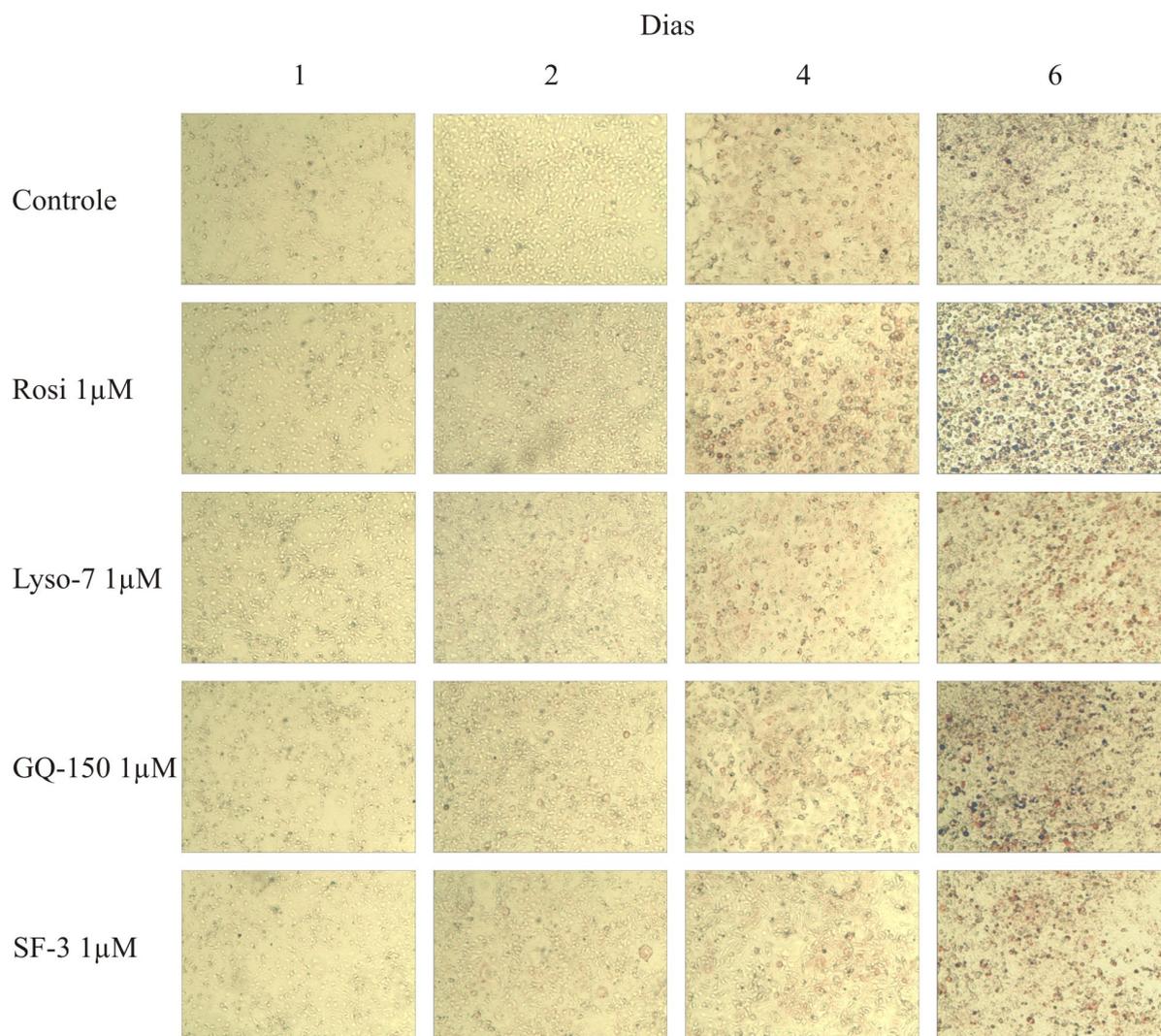


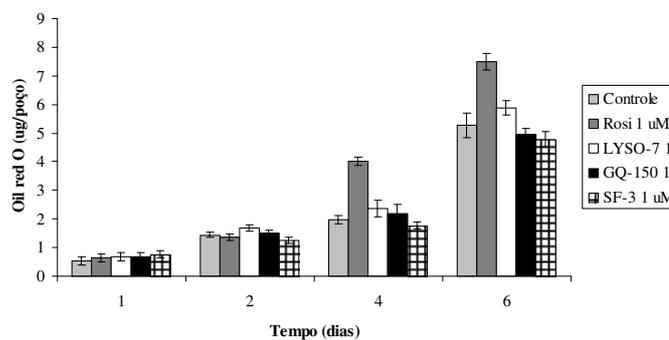
Figura 15: Morte celular de adipócitos após 6 dias de indução adipogênica com TZDs. Células 3T3-L1 foram cultivadas com indutores adipogênicos (dexametasona 1 μM e 3-isobutil-1-metilxantina 500 μM) com TZD 1 μM durante 6 dias, marcadas com PI e anexina V-FITC e avaliadas por citometria de fluxo. Células cultivadas sem tratamento (ST), com o veículo (DMSO 0,01%) ou DMSO 5% também foram avaliadas. Os resultados são expressos como média \pm SD de 2 experimentos independentes (n = 6).

A observação de acúmulo intracelular de lipídios pela coloração dos triacilgliceróis pelo oil red O foi utilizada para confirmar a adipogênese. As figuras 16A e 16B mostram os efeitos das TZDs sobre o acúmulo intracelular de lipídios em células 3T3-L1 induzidas a se diferenciarem em adipócitos durante 1, 2, 4 e 6 dias. A partir do 4^o dia de indução, é possível observar aumento do número de células que passam a produzir e acumular lipídios em seu interior e, como descrito em literatura, este efeito foi acentuado na presença de Rosiglitazona. O 6^o dia de indução adipogênica foi padronizado para esta avaliação por ter apresentado os valores mais elevados de acúmulo lipídico. Após a realização de 3 experimentos independentes, verificou-se que ao final de 6 dias de indução adipogênica a Rosiglitazona estimula marcantemente o acúmulo lipídico, quando comparada com o controle, confirmando seu efeito adipogênico. Interessantemente, as TZDs GQ-150, GQ-177, LYSO-7 e SF-3 não alteraram o acúmulo lipídico (figura 16C e 16D), sugerindo ausência de efeito adipogênico.

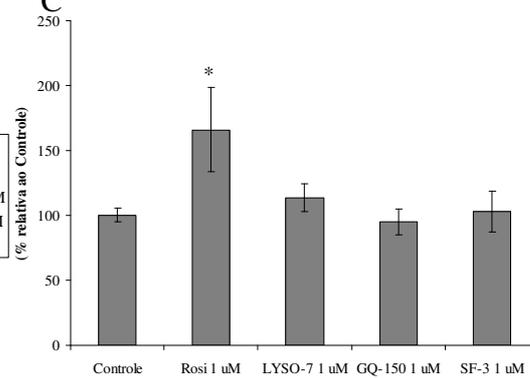
A



B



C



D

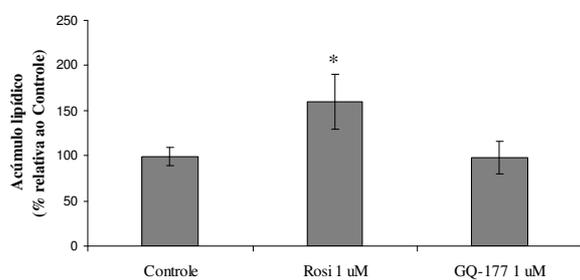
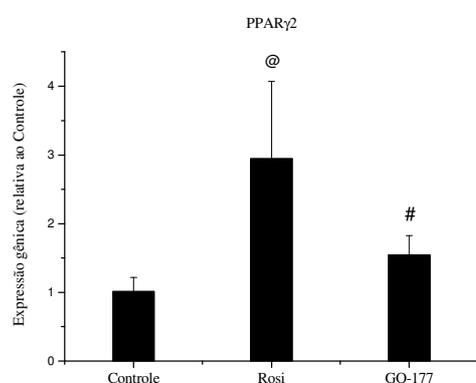


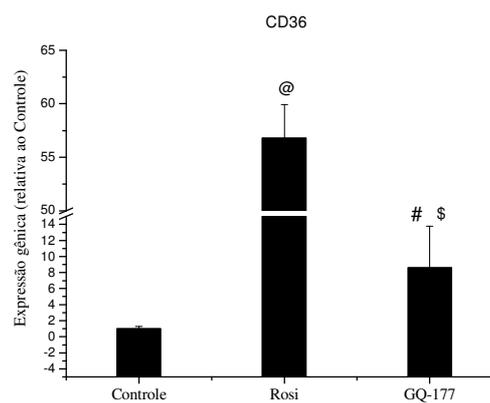
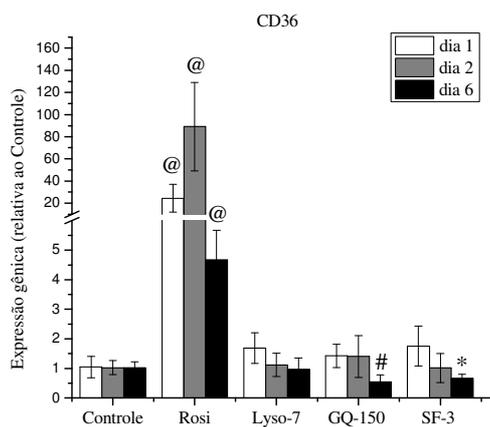
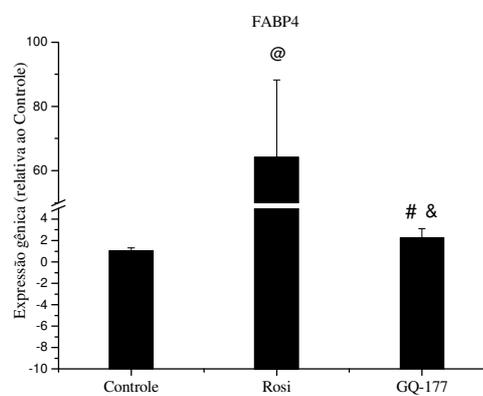
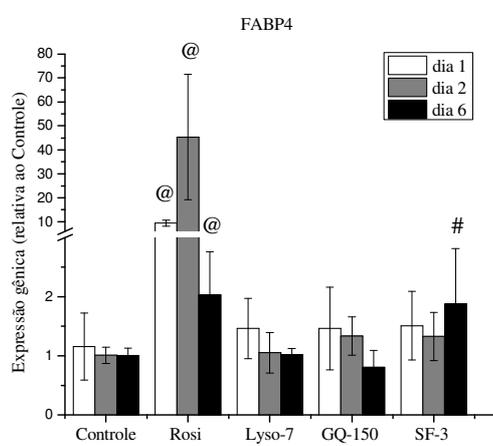
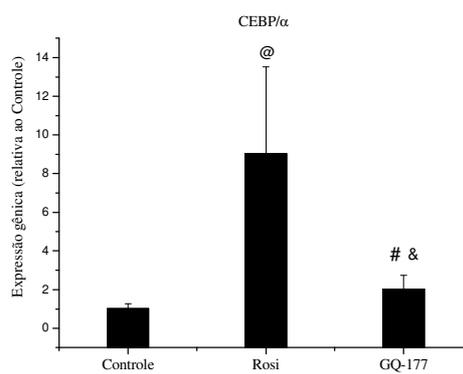
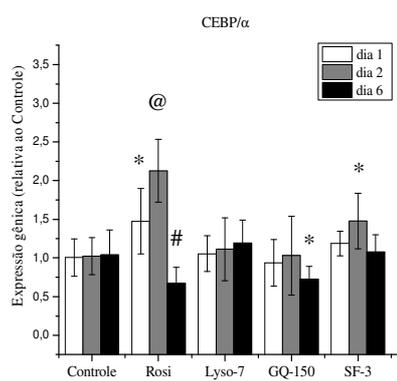
Figura 16: Efeitos das TZDs sobre o acúmulo intracelular de lipídios. Células 3T3-L1 foram cultivadas com indutores adipogênicos (dexametasona 1 μM e 3-isobutil-1-metilxantina 500 μM) por até 6 dias. Durante todo o período de indução, as células foram cultivadas na presença de TZDs na concentração de 1 μM . Células cultivadas com indutores adipogênicos e o veículo DMSO (Controle) também foram coradas com oil red O para verificação do acúmulo intracelular de lipídios. (A) Visualização microscópica do acúmulo intracelular lipídico após 1, 2, 4 e 6 dias de indução adipogênica (Magnificação de 40x). (B) Quantificação de oil red O após os diferentes períodos de indução. Determinações realizadas em replicata (n= 4 a 10). (C e D) Acúmulo intracelular lipídico avaliado após 6 dias de indução adipogênica, expresso em porcentagem relativa ao grupo controle. Os grupos controle e experimentais foram analisados em replicata (n=22 a 32), em 3 experimentos independentes. Os valores representam as médias \pm SD das replicatas. * $p < 0,05$ (vs Controle).

Para investigar os mecanismos moleculares responsáveis pela ausência de efeito adipogênico dos novos derivados de TZDs, avaliou-se a expressão de genes específicos do fenótipo adipogênico e da via de sinalização de Wnt.

A figura 17 mostra os efeitos das TZDs sobre os genes específicos do fenótipo adipogênico. Diferente da Rosiglitazona, a LYSO-7 não modificou a expressão gênica dos fatores de transcrição adipogênicos PPAR γ 2 e C/EBP α . Coerente com estes resultados, a expressão de FABP4 e CD36, genes regulados por PPAR γ 2 e C/EBP α , também não foi alterada pela LYSO-7. A GQ-150 diminuiu a expressão gênica de C/EBP α no 6 $^{\circ}$ dia, que foi acompanhado pela diminuição de CD36, permanecendo inalterada a expressão gênica de FABP4. A SF-3 aumentou a expressão gênica de C/EBP α no 2 $^{\circ}$ dia, refletindo em aumento de FABP4 no 6 $^{\circ}$ dia. Contudo, diminuiu a expressão de CD36. A GQ-177 aumentou a expressão gênica de PPAR γ 2, C/EBP α , FABP4 e CD36, porém de modo menos acentuado que o aumento proporcionado pela Rosiglitazona.

A





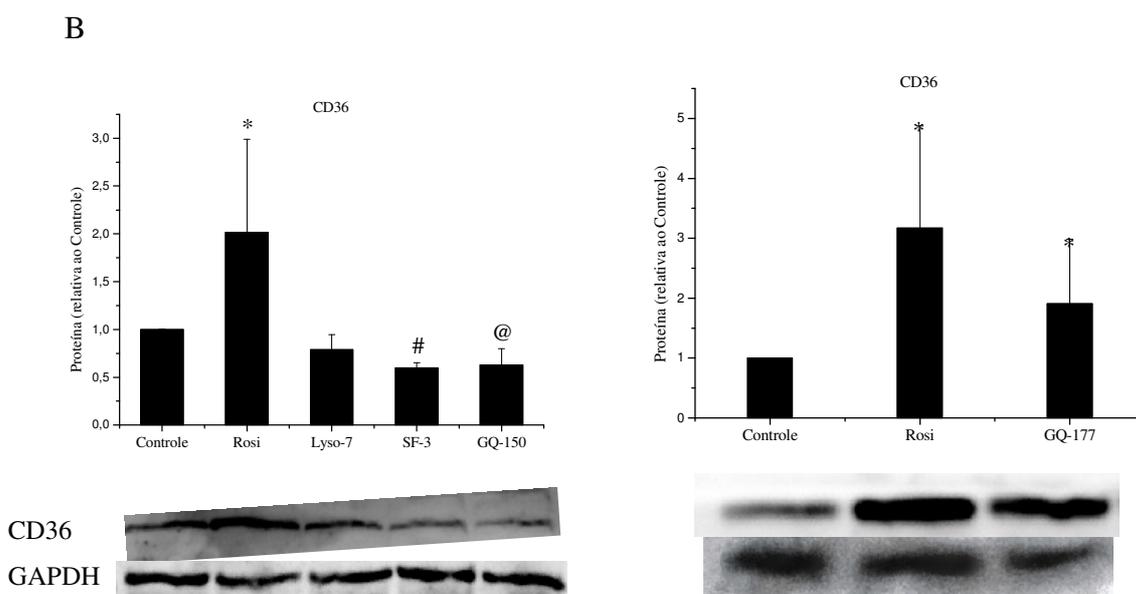
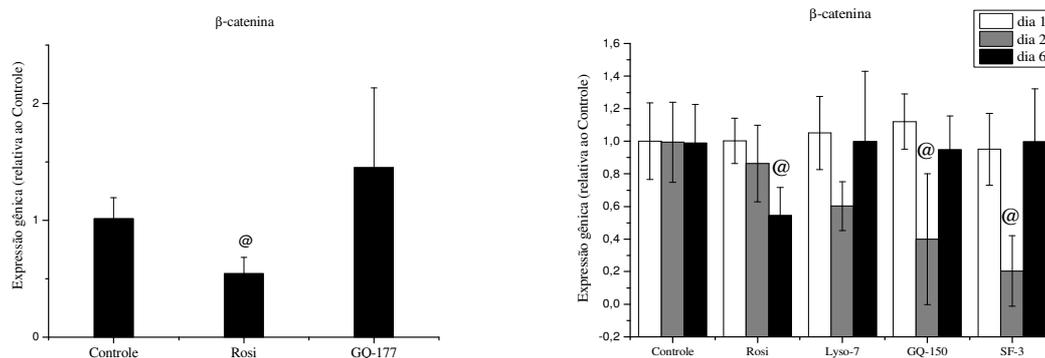


Figura 17: Efeitos das TZDs sobre os marcadores do fenótipo adipogênico. Células 3T3-L1 foram cultivadas com indutores adipogênicos (dexametasona 1 μM e 3-isobutil-1-metilxantina 500 μM) por até 6 dias. Durante todo o período de indução, as células foram cultivadas na presença de TZD na concentração de 1 μM . Células cultivadas com indutores adipogênicos e o veículo DMSO (Controle) também foram avaliadas por PCR em tempo real e por Western Blot. (A) Expressão gênica de PPAR γ 2, CEBP α , FABP4 e CD36. (B) Análise densitométrica e Western Blots representativos de CD36. Os grupos controle e experimentais foram analisados em 3 experimentos independentes (n=9) para LYSO-7, GQ-150 e SF-3, e em um experimento preliminar para a GQ-177 (n=3). Os valores representam as médias \pm SD das replicatas. * p<0,05 (vs Controle); # p<0,01 (vs Controle); @ p<0,001 (vs Controle); & p<0,05 (vs Rosi).

Quando avaliada a via de sinalização de Wnt (figura 18), verificamos que a LYSO-7 e a GQ-177 não modificam a expressão de β -catenina. A GQ-150 e a SF-3 diminuem a expressão gênica de β -catenina no 2º dia de maneira não persistente, retornando ao mesmo nível do grupo controle no 6º dia, permanecendo inalterada o nível da proteína. Diferente da Rosiglitazona, os novos derivados de TZDs preservam a via de sinalização de Wnt, conseqüentemente, afetam menos marcadamente o processo de adipogênese.

A



B

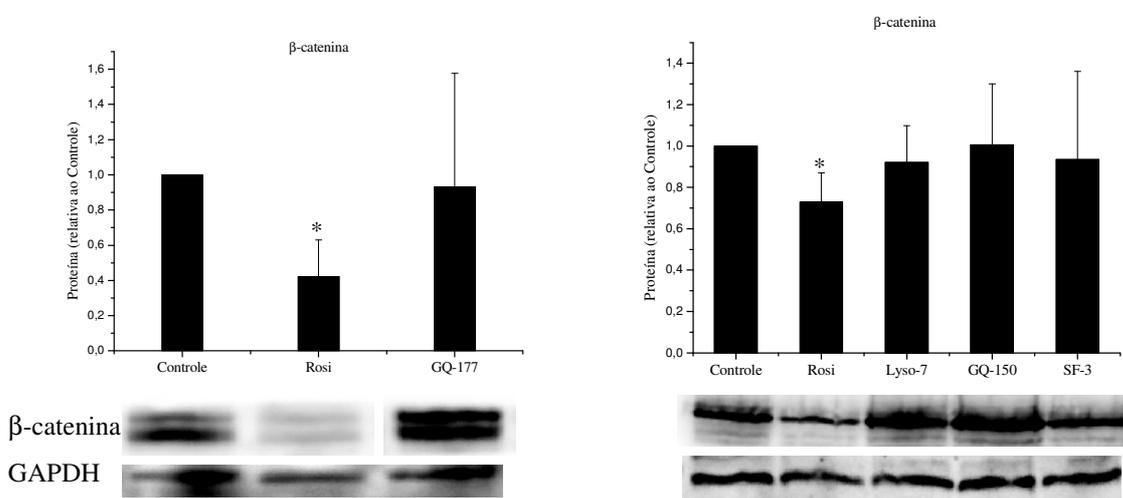


Figura 18: Efeitos das TZDs sobre a via de sinalização de Wnt. Células 3T3-L1 foram cultivadas com indutores adipogênicos (dexametasona 1 μM e 3-isobutil-1-metilxantina 500 μM) por até 6 dias. Durante todo o período de indução, as células foram cultivadas na presença de TZD na concentração de 1 μM . Células cultivadas com indutores adipogênicos e o veículo DMSO (Controle) também tiveram a expressão gênica de β -catenina (A) e os níveis de proteína (B) avaliados. Os resultados foram expressos em relação ao grupo Controle, como média \pm SD de 3 experimentos independentes ($n=9$) para a LYSO-7, GQ-150 e SF-3, e de um experimento preliminar para a GQ-177 ($n=3$). * $p<0,05$ (vs Controle); @ $p<0,001$ (vs Controle).

Investigamos, em seguida, se os novos derivados de TZDs interferem no processo de diferenciação celular de pré-adipócitos humanos da linhagem SGBS. Inicialmente, avaliamos a viabilidade celular após 48 horas de indução adipogênica em presença de diferentes concentrações de TZDs para selecionarmos a concentração não citotóxica. Para descartar a hipótese de efeito citotóxico após período prolongado de exposição às TZDs, observamos, diariamente, até o 14^o dia de indução adipogênica se ocorriam alterações morfológicas. Embora os novos derivados de TZDs tenham diminuído o percentual de redução de MTT a formazana (tabela 7), interpretamos esse efeito como consequência da inibição da atividade

mitocondrial e não por diminuição de viabilidade celular, uma vez que não foram observadas alterações morfológicas sugestivas de morte celular após 14 dias de exposição às TZDs. A concentração de TZDs utilizada nos experimentos de adipogênese foi a de 1 μ M.

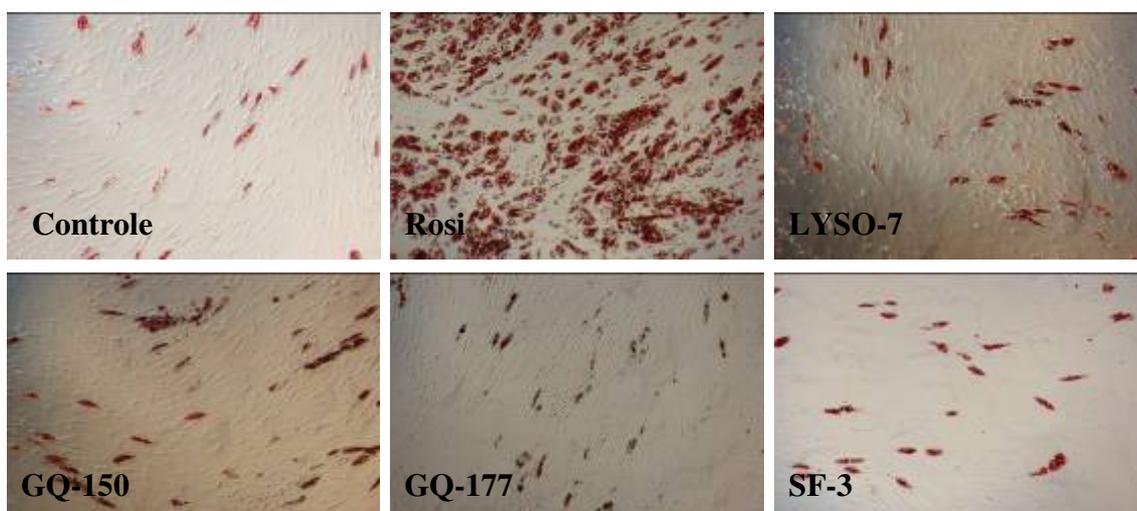
Tabela 7: Viabilidade celular de pré-adipócitos SGBS após 48h de indução adipogênica em presença de TZDs

	0,005%	0,01%	0,02%
DMSO	92,89 \pm 3,67%	96,72 \pm 5,21%	97,98 \pm 3,60%
	0,5 μM	1 μM	2 μM
Rosi	92,09 \pm 8,30%	96,95 \pm 6,19%	94,89 \pm 2,70%
LYSO-7	110,20 \pm 13,42%	122,24 \pm 12,31%	141,72 \pm 11,40%
GQ-150	49,97 \pm 14,09%	43,88 \pm 10,40%	37,91 \pm 9,61%
GQ-177	63,55 \pm 14,19%	45,06 \pm 13,19%	34,98 \pm 12,26%
SF-3	89,73 \pm 4,55%	78,75 \pm 2,66%	54,31 \pm 5,87%

A viabilidade celular foi avaliada espectrofotometricamente (560 nm) pela redução de MTT a formazana. As concentrações equivalentes de veículo (DMSO) utilizadas nas soluções de TZDs 0,5, 1 e 2 μ M foram, respectivamente, 0,005, 0,01 e 0,02% (v/v). Os resultados são expressos como média \pm SD de 3 experimentos independentes (n = 9).

Confirmando os resultados obtidos com a linhagem murina de pré-adipócitos, verificamos que os novos derivados de TZDs não modificam o processo de diferenciação celular de pré-adipócitos humanos, pois foi observada a ausência de efeito sobre o acúmulo intracelular de lipídios e sobre a expressão gênica de marcadores específicos do fenótipo adipogênico (figura 19).

A



B

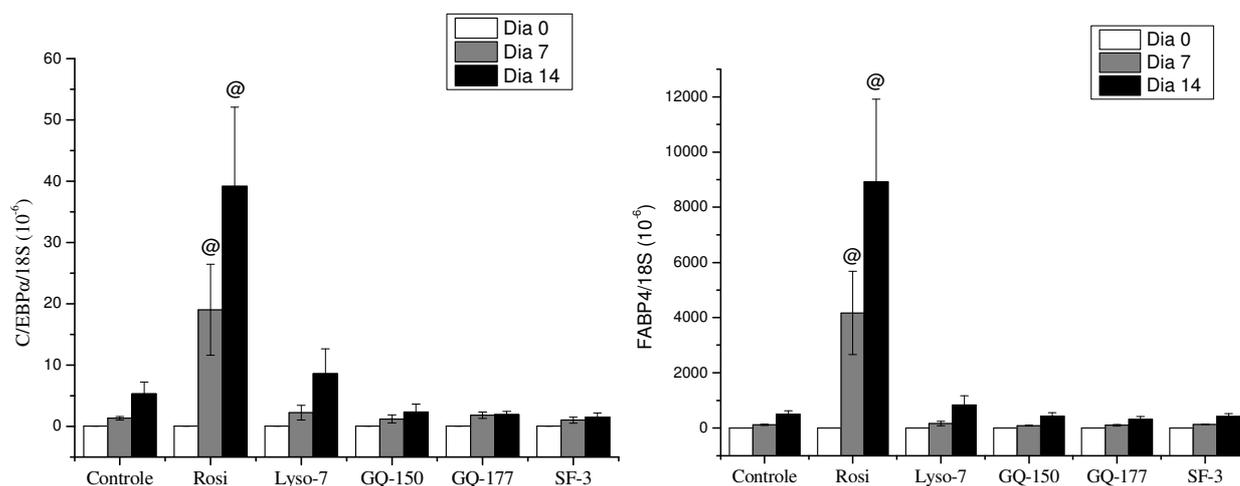


Figura 19: Efeitos das TZDs sobre a diferenciação celular de pré-adipócitos humanos. As células SGBS foram estimuladas a se diferenciarem em meio de cultura suplementado com coquetel adipogênico por até 14 dias. (A) Visualização microscópica do acúmulo intracelular de lipídios após 14 dias de indução de adipogênese, avaliada pela coloração com oil red O. (B) Expressão gênica de marcadores do fenótipo adipogênico avaliada por PCR em tempo real. Os resultados representam a média \pm SD de 5 experimentos independentes ($n=5$). @ $p<0,001$ (vs Controle).

5.3 Efeitos das TZDs sobre a transativação de PPAR γ

Para avaliar se os novos derivados de TZDs atuam como ligantes de PPAR γ , investigamos os efeitos desses compostos na transativação de PPAR γ utilizando o ensaio da luciferase como gene repórter. Como é possível observar na figura 20, nenhum dos novos derivados de TZDs avaliados estimulou a ativação de PPAR γ (figura 20).

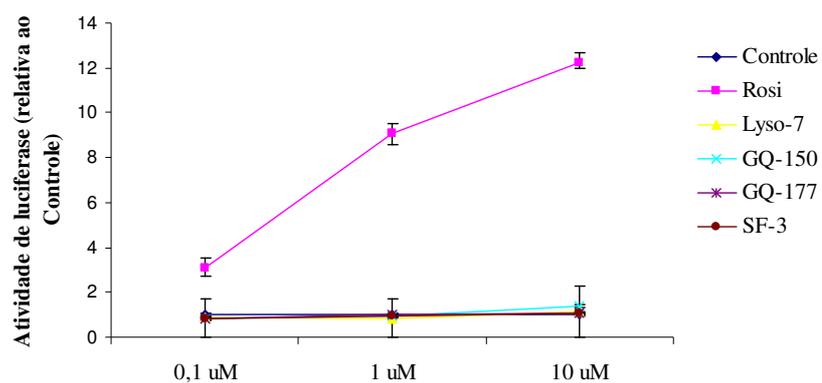


Figura 20: Efeitos das TZDs sobre a ativação de PPAR γ . Células HEK293T foram transfectadas com vetores para pFR Luc (Firefly luciferase), pFA-PPAR γ -LBD-Gal4-DBD e pRL-CMV (Renilla luciferase) por 5 horas e incubadas durante a noite com concentrações variáveis de TZDs (0,1; 1; 10 μ M). Após 24 horas de exposição aos compostos, as células foram lisadas e tiveram as atividades das luciferases quantificadas. A atividade da firefly luciferase foi normalizada pela obtida da renilla luciferase, que foi realizada como um controle interno e de viabilidade celular. Os resultados representam a média \pm SD de um experimento realizado em replicata (n=4).

5.4 Efeitos das TZDs sobre o consumo e a captação de glicose

Para investigar se os novos derivados de TZDs preservam a atividade hipoglicemiante esperada para essa classe de fármacos, avaliamos inicialmente o consumo de glicose por adipócitos 3T3-L1 determinando a concentração de glicose no meio de cultura. Conforme demonstrado na figura 21, as TZDs LYSO-7, GQ-150 e SF3 aumentam significativamente o consumo de glicose quando comparadas com o grupo controle. Para confirmar esse efeito, utilizamos outra metodologia para avaliar a captação de glicose por adipócitos 3T3-L1, baseada na quantificação de ^3H -2DG incorporada pelas células. Verificamos que a GQ-177 aumenta de modo significativo a captação de glicose na presença de insulina, o que não ocorreu na condição basal. Interessantemente, a GQ-177 aumentou a captação de glicose em relação ao grupo controle/insulina/dexametasona, sugerindo que esse novo derivado de TZD pode reverter a resistência insulínica induzida por glicocorticoide (figura 22). Em ensaio piloto, os demais novos derivados de TZDs não mostraram efeito sobre a captação de glicose (dados não mostrados).

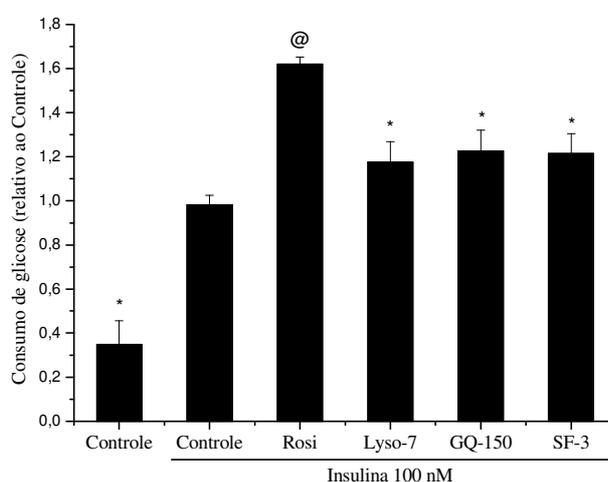


Figura 21: Efeitos das TZDs sobre o consumo de glicose. Células 3T3-L1 foram cultivadas com indutores adipogênicos (dexametasona 1 μM , 3-isobutil-1-metilxantina 500 μM e insulina 1 μM) durante 6 a 9 dias. As células totalmente diferenciadas em adipócitos foram cultivadas na presença de TZD 1 μM , em meio de cultura contendo alta concentração de glicose e insulina, durante 4 dias. O consumo de glicose foi avaliado no meio de cultura e expresso em relação ao grupo controle (média \pm SD). Todos os grupos experimentais e controles foram avaliados em replicata em 2 experimentos independentes (n= 8). * $p < 0,05$ (vs Controle/Insulina); @ $p < 0,001$ (vs Controle/Insulina).

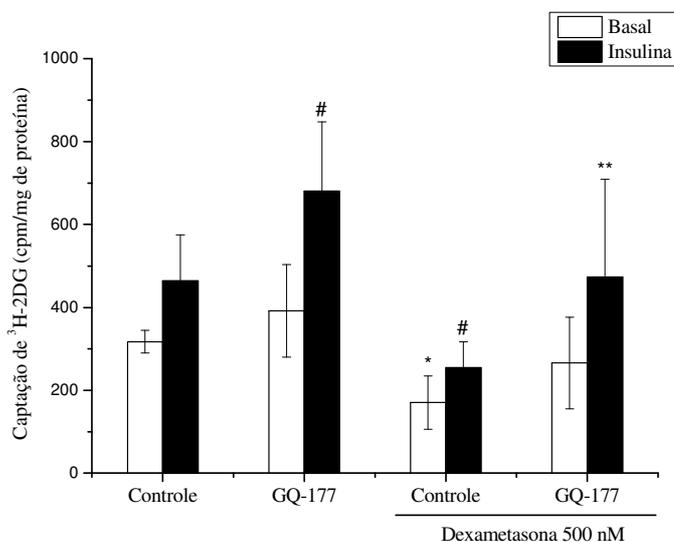


Figura 22: Efeito da GQ-177 sobre a captação de glicose. Células 3T3-L1 receberam estímulo adipogênico por 7 dias. Após esse período, os adipócitos foram expostos a DMSO 0,01% (Controle) ou TZD 1 μ M, na presença ou ausência de dexametasona 500 nM, por 18 horas. As células foram incubadas com tampão de sais de Earle, HEPES 10 nM e albumina sérica bovina 1% (pH 7,4), com ou sem insulina 50 nM, com DMSO 0,01% (Controle) ou TZD 1 μ M por 15 minutos, em banho-maria a 37°C. As células foram incubadas com ³H-2DG (concentração final de 4 nM e 0,25 μ Ci/poço) por 4 minutos, a captação de glicose foi interrompida, as células foram lavadas e lisadas e a radiação emitida mensurada. A captação de ³H-2DG foi expressa em cpm e normalizada pelos valores de proteína total. Os grupos experimental e controle foram avaliados em replicata em 2 experimentos independentes (n= 8). * p<0,05 (vs Controle/Basal); # p<0,05 (vs Controle/Insulina); ** p<0,05 (vs Controle/ Insulina/Dexametasona).

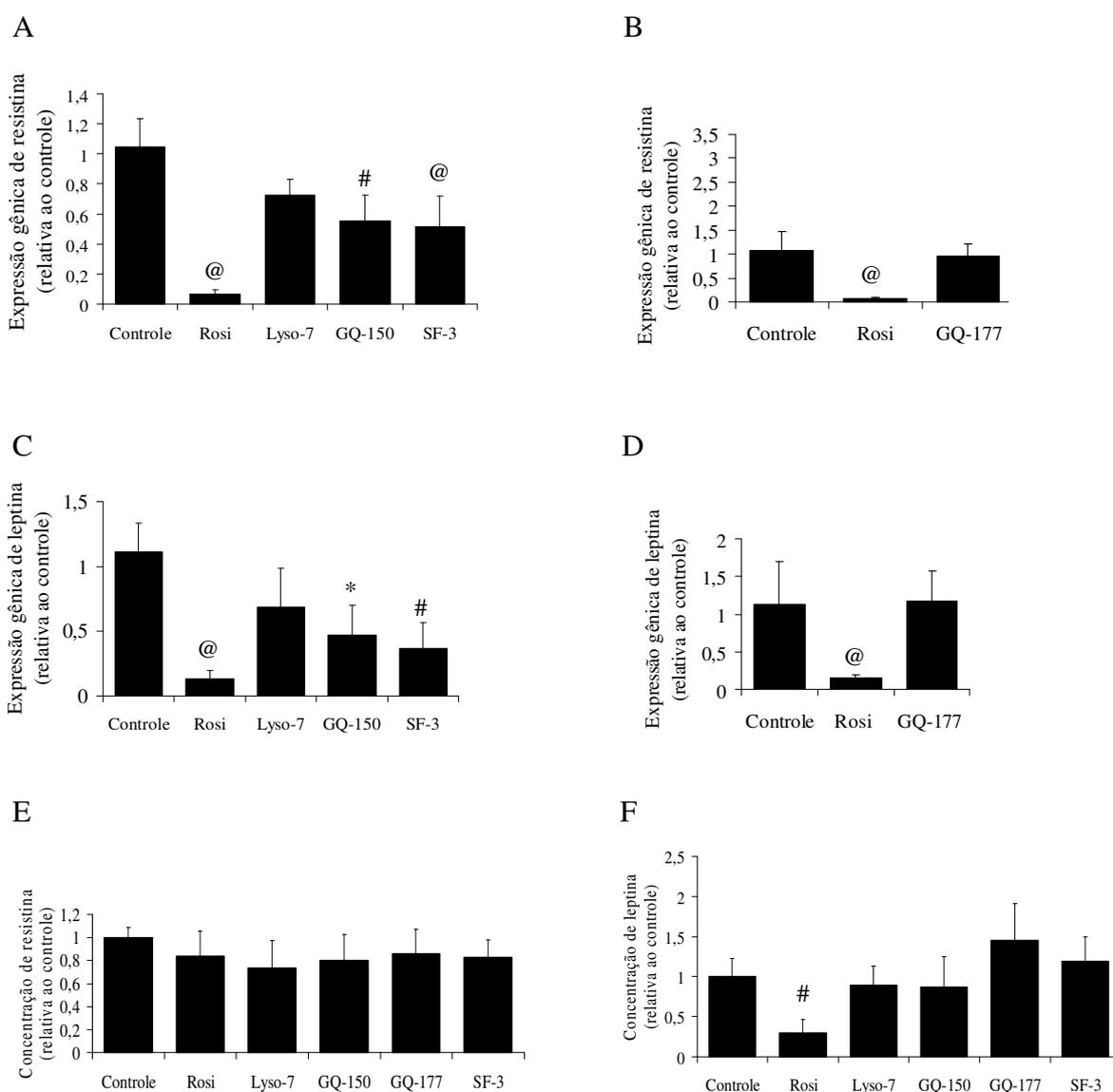
5.5 Efeitos das TZDs sobre a produção de adipocinas

Alterações no perfil de adipocinas, como a diminuição de adiponectina e o aumento de resistina, estão associadas com o desenvolvimento de resistência à insulina no diabetes mellitus tipo 2. Uma vez que a reversão destas alterações pelo uso de TZDs contribui para seus efeitos hipoglicemiantes, investigamos se os novos derivados de TZDs modificam a produção de adipocinas. A leptina também foi avaliada, pois existem estudos que correlacionam a diminuição dessa adipocina com ganho de peso e diminuição de formação óssea.

Como a Rosiglitazona, os novos derivados de TZDs GQ-150 e SF-3 diminuíram de modo significativo a expressão gênica de resistina em adipócitos murinos da linhagem 3T3-L1 (Figura 23A), sugerindo um possível efeito benéfico para a sensibilização insulínica. Porém, esse efeito não foi confirmado pela avaliação de resistina em sobrenadante de cultura celular (Figura 23E). Diferente da Rosiglitazona, a LYSO-7 e a GQ-177 não diminuíram a

expressão gênica de leptina em adipócitos murinos da linhagem 3T3-L1, sugerindo que esses compostos poderiam ser correlacionados à menor incidência de efeitos adversos, tais como ganho de peso e perda óssea.

Embora os novos derivados de TZDs GQ-150 e SF-3 tenham diminuído a expressão gênica de leptina, sua concentração no sobrenadante de cultura celular não foi diferente do grupo controle. Desse modo, confirmamos que os compostos avaliados não modificam de modo significativo a produção de leptina (Figura 23F). Em ensaios preliminares, os novos derivados de TZDs LYSO-7, GQ-150 e SF-3 mostraram diminuir a expressão gênica da adiponectina em adipócitos humanos da linhagem SGBS, não sendo modificada pela GQ-177 (Figura 23G).



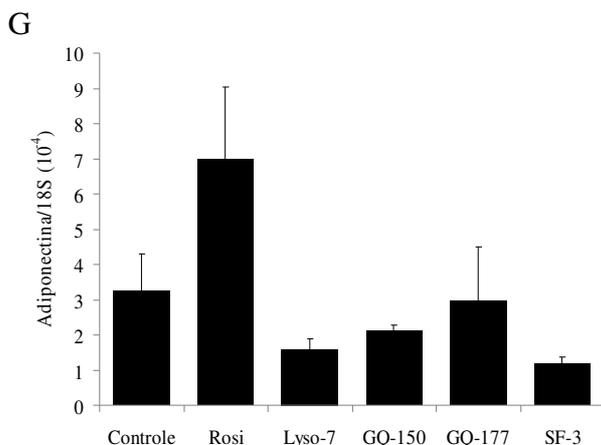


Figura 23: Efeitos das TZDs sobre a expressão de adipocinas. (A, B, C e D) Expressão gênica de resistina e leptina em adipócitos 3T3-L1 determinada por PCR em tempo real. (E e F) Concentração de resistina e leptina no sobrenadante de cultura celular de adipócitos 3T3-L1. (G) Expressão gênica de adiponectina em adipócitos SGBS, avaliada por PCR em tempo real. O período de tempo de exposição às TZDs para a determinação da expressão gênica e da concentração de adipocinas foi de 4 dias para os adipócitos 3T3-L1 e de 24 horas para os adipócitos SGBS. A concentração de TZD utilizada nos experimentos foi de 1 μ M. Os resultados expressam a média \pm SD de 2 experimentos independentes (n=6, para os adipócitos 3T3-L1; n=2, para os adipócitos SGBS). *p<0,05 (vs Controle); # p<0,01 (vs Controle); @ p<0,001 (vs Controle).

5.6 Efeitos das TZDs sobre os mediadores pró-inflamatórios

Sabe-se que o efeito sensibilizador de insulina das TZDs se deve, em parte, aos seus efeitos anti-inflamatórios. Para elucidar se os novos derivados de TZDs preservam a atividade anti-inflamatória, avaliamos a expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios sob duas condições: (1) adipócitos murinos estimulados com LPS e (2) macrófagos humanos estimulados com ácido palmítico.

Conforme ilustrado na figura 24A, os novos derivados de TZDs não foram capazes de modificar a expressão gênica de IL-6 e CCL2/MCP-1 em adipócitos murinos da linhagem 3T3-L1 estimulados previamente com LPS.

Para o estudo utilizando macrófagos humanos, realizamos inicialmente a avaliação da viabilidade celular, incubando as células com diferentes concentrações de TZDs para definirmos a concentração de trabalho. Conforme apresentado na tabela 8, uma diminuição do percentual de redução de MTT a formazana foi observado em presença de concentrações mais altas dos novos derivados de TZDs. Porém, uma vez que não foram observadas alterações morfológicas sugestivas de morte celular, interpretamos esse efeito como consequência da

inibição da atividade mitocondrial e não por diminuição de viabilidade celular. Desse modo, a concentração de 1 μM e 10 μM e o período de 24 horas de incubação foram adotados nos experimentos com macrófagos.

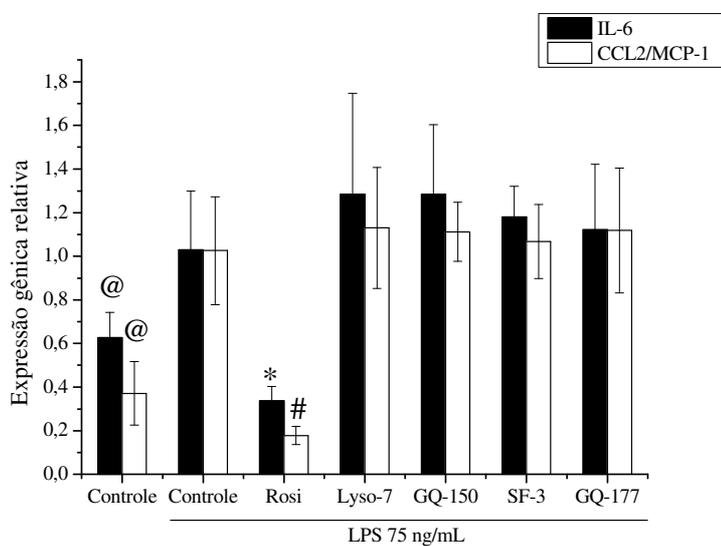
Tabela 8: Viabilidade celular de macrófagos THP-1 após 24h e 48h de cultivo com TZDs

	<i>24h</i>		<i>48h</i>		
	0,01%	0,1%	0,005%	0,01%	0,02%
DMSO	ND	109,47 \pm 19,83%	96,65 \pm 5,57%	105,50 \pm 12,71%	110,10 \pm 24,57%
	1 μM	10 μM	0,5 μM	1 μM	2 μM
Rosi	106,38 \pm 10,32%	100,19 \pm 14,69%	103,05 \pm 8,11%	101,00 \pm 10,18%	96,73 \pm 13,96%
LYSO-7	104,59 \pm 4,80%	115,16 \pm 2,82%	113,15 \pm 19,69%	108,34 \pm 14,51%	115,98 \pm 8,87%
GQ-150	100,00 \pm 11,37%	78,24 \pm 5,81%	95,26 \pm 8,09%	91,42 \pm 7,15%	78,79 \pm 10,69%
GQ-177	98,72 \pm 14,79%	52,76 \pm 7,75%	97,67 \pm 25,36%	65,18 \pm 12,53%	43,43 \pm 12,39%
SF-3	132,76 \pm 2,21%	73,61 \pm 1,47%	95,27 \pm 4,89%	99,78 \pm 10,88%	100,47 \pm 18,48%

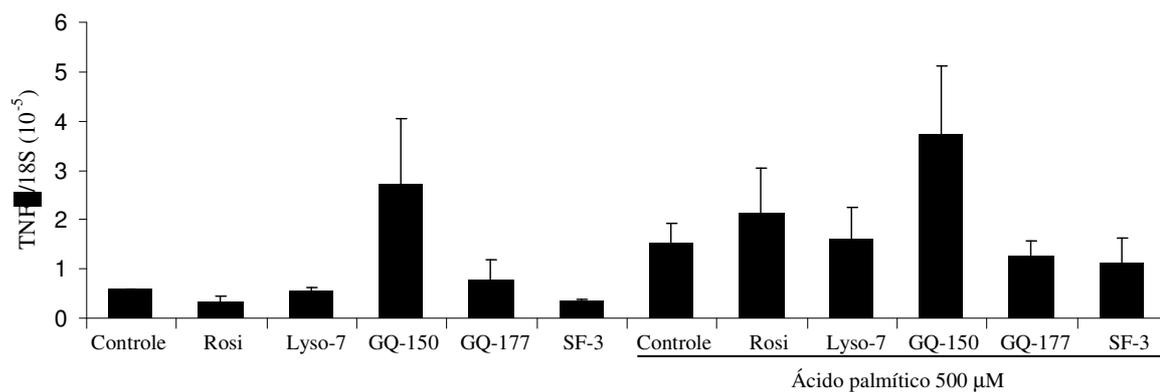
A viabilidade celular foi avaliada espectrofotometricamente (560 nm) pela redução de MTT a formazana. As concentrações equivalentes de veículo (DMSO) utilizadas nas soluções de TZD 0,5, 1, 2 e 10 μM foram, respectivamente, 0,005, 0,01, 0,02 e 0,1% (v/v). Os resultados são expressos como média \pm SD de 1 experimento (24h, n=3) ou de 3 experimentos independentes (48h, n = 9). ND: não determinado.

Em macrófagos humanos da linhagem THP-1, ensaios preliminares sugerem que a TZD GQ-150 estimula a expressão gênica de TNF- α , enquanto o tratamento com as TZDs LYSO-7, GQ-177 e SF-3 não apresentam qualquer alteração na expressão dessa citocina (figura 24B). De modo similar, a incubação com as TZDs (na concentração de 1 e 10 μM) não alterou a atividade de c-Jun N-terminal quinase uma vez que não foi observado efeito dos novos derivados de TZDs sobre os níveis de fosforilação dessa proteína (figura 24C e D).

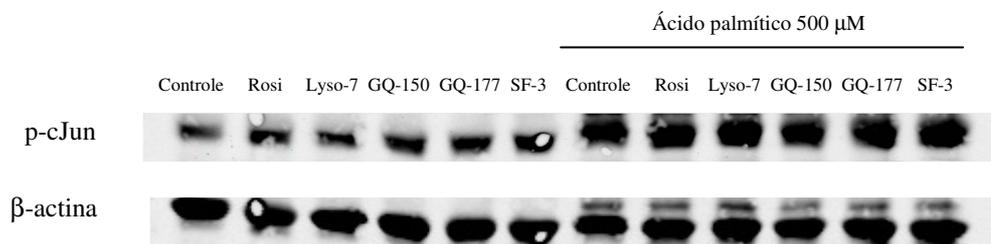
A



B



C



D

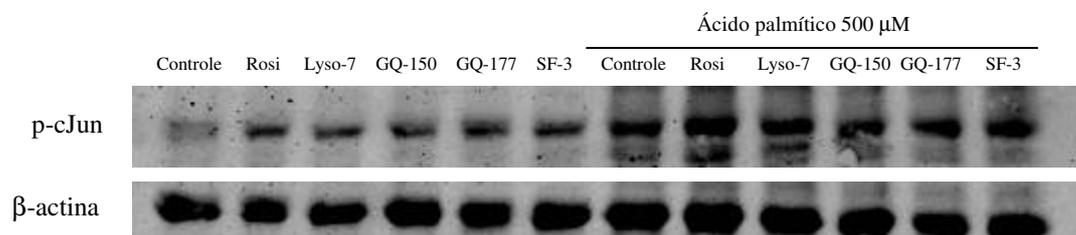
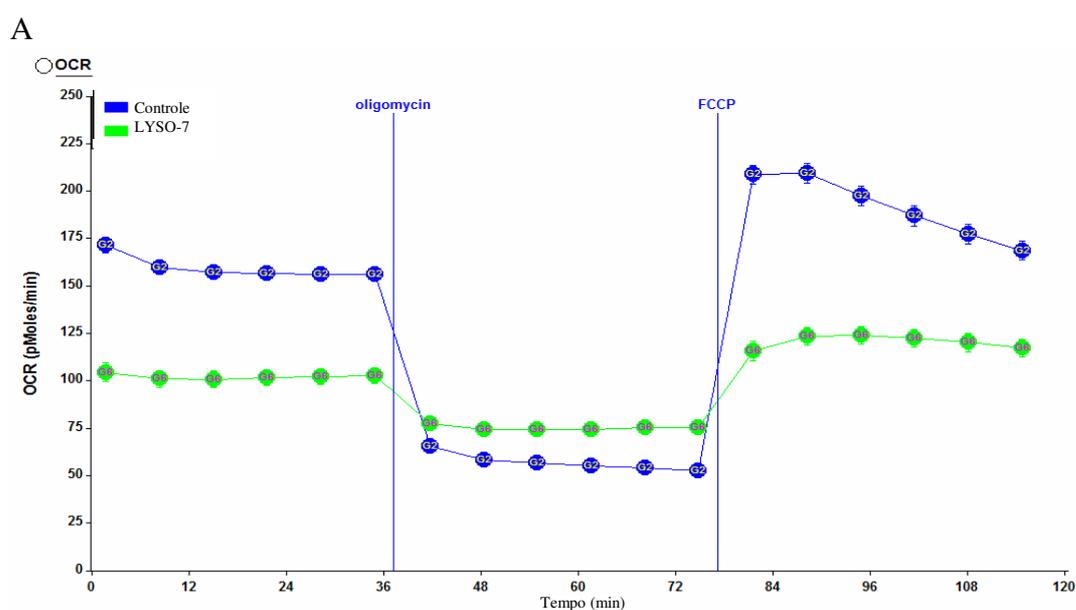


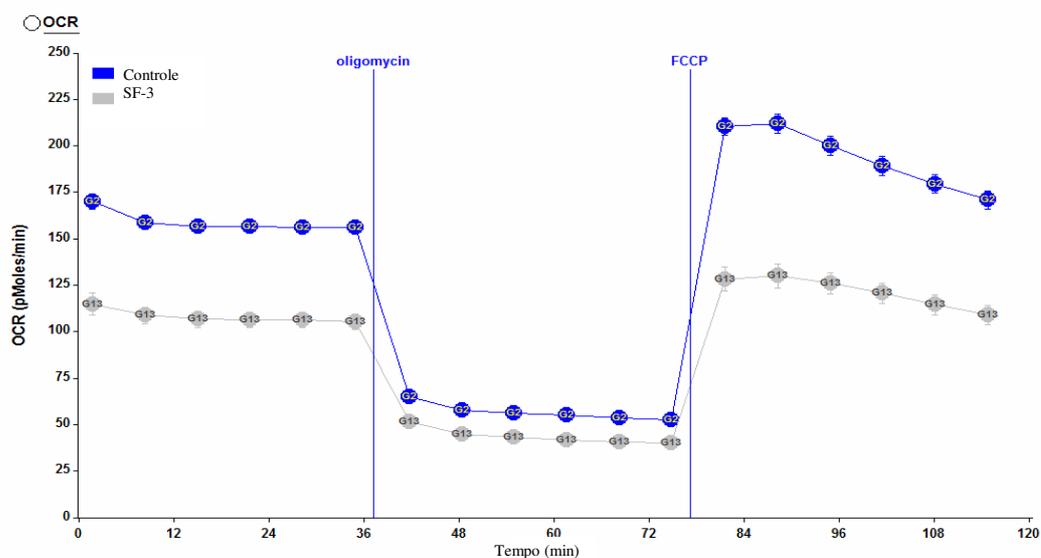
Figura 24: Efeitos das TZDs sobre a expressão de mediadores pró-inflamatórios. Expressão gênica de IL-6 e CCL2/MCP-1 em adipócitos 3T3-L1 estimulados com LPS (A). Expressão gênica de TNF- α em macrófagos THP-1 estimulados com ácido palmítico (B). Western Blots representativos de p-cJun em macrófagos THP-1 estimulados com ácido palmítico, previamente incubados com TZD 1 μ M (C) ou 10 μ M (D). Os adipócitos foram incubados com TZD 1 μ M por 3 dias e, em seguida, por mais 24h com LPS 75ng/mL em presença de TZD 1 μ M para a avaliação de IL-6 e CCL2/MCP-1 por PCR em tempo real. Os macrófagos foram incubados com TZD por 24h e, após esse período, por 3h em presença de TZD e ácido palmítico 500 μ M. A expressão de TNF- α foi avaliada por PCR em tempo real e a de p-cJun por Western Blot. Para a avaliação de TNF- α foi utilizada a concentração de 1 μ M de TZD e para p-cJun, TZD a 1 ou 10 μ M. Os resultados representam a média \pm SD de 2 experimentos independentes (n=6 para os adipócitos e n=2 para os macrófagos. * p<0,05 (vs Controle/LPS); # p<0,01 (vs Controle/LPS); @ p<0,001 (vs Controle/LPS).

5.7 Efeitos das TZDs sobre o consumo de oxigênio e a taxa de acidificação extracelular

Para uma avaliação mais específica do metabolismo mitocondrial em macrófagos, também utilizamos o ensaio XF de fluxo extracelular (Seahorse Bioscience), que entre outros parâmetros permite avaliar o consumo de oxigênio e a acidificação extracelular em tempo real. A Rosiglitazona não afetou a respiração celular nas concentrações de 1 e 10 μ M (resultados não apresentados). Entretanto, a LYSO-7 e a SF-3 inibiram marcadamente a respiração celular basal na concentração de 10 μ M, conforme demonstrado pela diminuição do consumo de oxigênio (figura 25A e B). Por outro lado, ao avaliarmos a taxa de acidificação extracelular, verificamos que a SF-3 inibe a glicólise, enquanto a LYSO-7 a estimula (figura 25C).



B



C

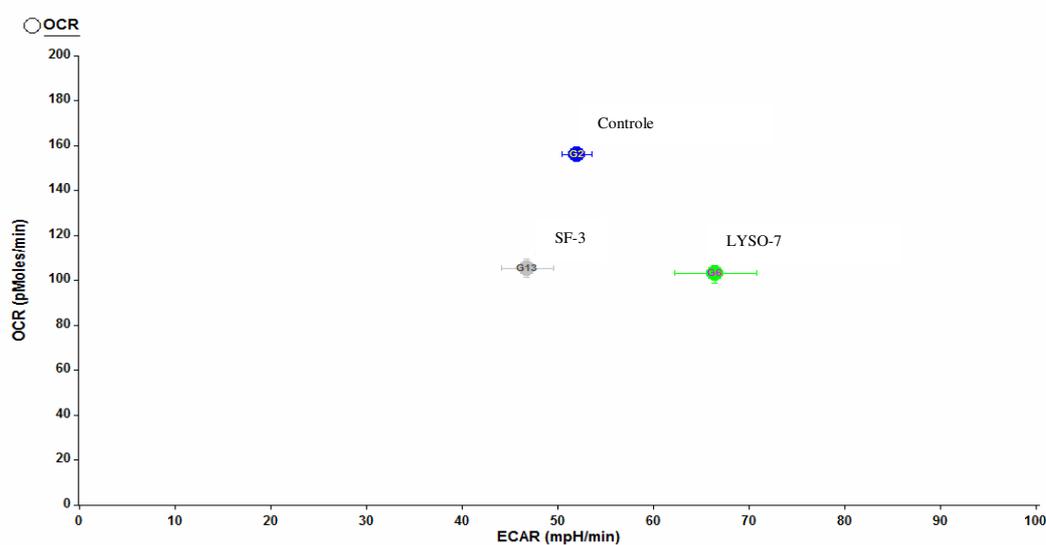


Figura 25: Efeitos das TZDs sobre a função mitocondrial de macrófagos THP-1. (A e B) Consumo de oxigênio. (C) Taxa de acidificação extracelular. Os macrófagos foram cultivados com TZDs a 10 μ M durante 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi removido e foram adicionados 200 μ L de DMEM suplementado com glicose 11 mM. As placas foram incubadas em ambiente livre de CO_2 por pelo menos 1 hora antes de iniciar as determinações de OCR e ECAR. Durante as determinações, foram injetadas soluções de oligomicina 1 μ M (inibidor e ATPase) ou FCCP 1 μ M (desacoplador da fosforilação oxidativa). Os resultados representam a média \pm SD de 2 experimentos independentes (n=16).

5.8 Efeitos das TZDs sobre a via de sinalização de AMPK

Alterações na função da mitocôndria podem ativar a via de sinalização de AMPK que, entre seus efeitos benéficos, melhora a resposta tecidual à insulina. Considerando que em adipócitos (tabela 7) e macrófagos (tabela 8) foi observado diminuição da atividade

mitocondrial com os novos derivados de TZDs, investigamos se esses compostos atuam como ativadores de AMPK. Em dois experimentos realizados utilizando as concentrações de 1 e 10 μM de TZDs, os resultados não foram reprodutíveis, não sendo conclusivos quanto à atividade das TZDs sobre a via de AMPK.

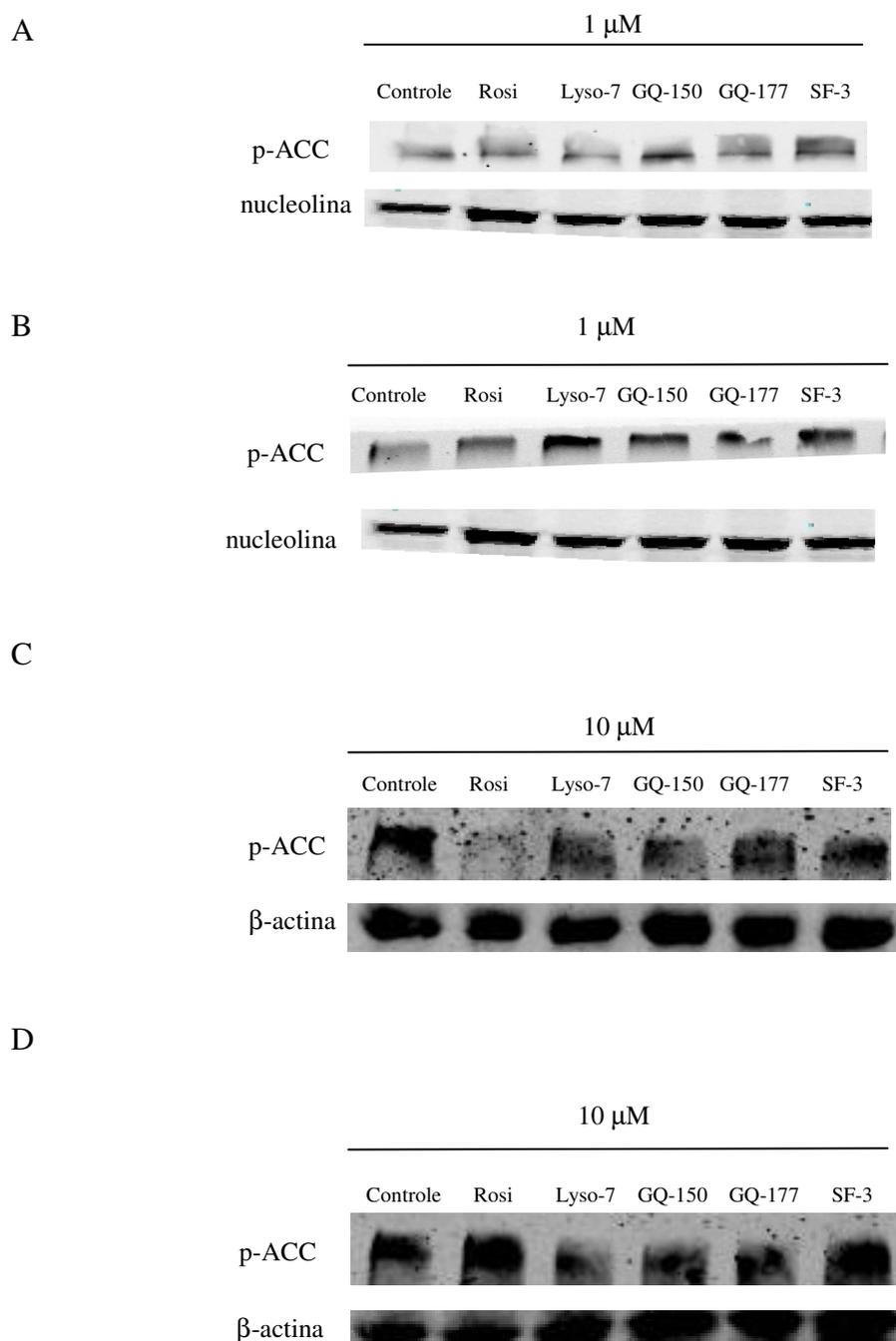


Figura 26: Efeitos das TZDs sobre a via de sinalização de AMPK. Os macrófagos THP-1 foram incubados com TZDs 1 μM (A e B) ou com TZDs 10 μM (C e D) por 24 horas para a detecção por Western Blot de p-ACC, um marcador de ativação da via de AMPK. Foram realizados 2 experimentos independentes para cada concentração de TZD.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstramos que os novos derivados de TZDs LYSO-7, GQ-150, GQ-177 e SF-3 não atuam como ligantes de PPAR γ . Como consequência disso, esses compostos interferem menos intensamente na via de sinalização de Wnt, causando menos prejuízos ao processo de diferenciação celular de pré-osteoblastos e pré-adipócitos. A principal observação que fizemos foi que apesar de não atuarem como agonistas totais de PPAR γ , estimulam a utilização de glicose em adipócitos de modo dependente de insulina.

As TZDs clássicas são ligantes de PPAR γ e a ativação suprafisiológica desse receptor nuclear pode provocar importantes efeitos adversos incluindo ganho de peso, aumento da massa adiposa, edema (FONSECA, 2003), insuficiência cardíaca congestiva (HOME, 2011), perda óssea e risco aumentado de fraturas (GREY, 2009). Vários estudos em pacientes têm relatado o efeito prejudicial das TZDs clássicas sobre o esqueleto (BERBEROGLU et al., 2007; GREY et al., 2007; KAHN et al., 2006; KAHN et al., 2008; SCHWARTZ et al., 2006; SOLOMON et al., 2009; YATURU et al., 2007). A observação de perda óssea e maior risco de fraturas em pacientes que utilizam TZDs é muito preocupante, considerando que a população para quem estes fármacos são destinados, os diabéticos, já apresentam fragilidade óssea, conforme demonstrado em alguns estudos (CUNDY et al., 1985; JANGHORBANI et al., 2007; KATAYAMA et al., 1996; MIAO et al., 2005; MIYATA et al., 1997; SCHWARTZ et al., 2002; VESTERGAARD et al., 2009; ZHOU et al., 2006).

PPAR γ é descrito como um fator de transcrição essencial para o processo de adipogênese (TONTONNOZ; SPIEGELMAN, 2008). De modo importante, adipócitos e osteoblastos derivam de um precursor mesenquimal comum na medula óssea e evidências apontam que o processo de maturação de células tronco mesenquimais na medula óssea é alterado pelas TZDs. De fato, tem sido proposto que quando o programa de diferenciação adipogênica é iniciado por PPAR γ , a diferenciação osteoblastogênica seria reprimida, causando um desequilíbrio na homeostase óssea. Assim, os efeitos deletérios ao esqueleto associados ao uso das TZDs podem ser conseqüentes do aumento da adipogênese em detrimento da osteoblastogênese. Diversos trabalhos corroboram essa hipótese com resultados provenientes de estudos *in vitro* (HASEGAWA et al., 2008; JEON et al., 2003; KHAN; ABU-AMER, 2003; LECKA-CZERNIK et al., 1999; LECKA-CZERNIK et al., 2002) e *in vivo* (ALI et al., 2005; SOROCEANU et al., 2004; SYVERSEN et al., 2009).

Recentemente, Gustafson et al. (2010) sugeriram um provável mecanismo pelo qual agonistas de PPAR γ , como as TZDs, inibiriam a osteoblastogênese. Segundo os autores, o uso de TZDs promove o aumento de DKK1, um inibidor da via de sinalização de Wnt, com a conseqüente atenuação desta via em células precursoras, levando à supressão da osteoblastogênese e ao aumento de adipogênese (GUSTAFSON et al., 2010). De fato, existe uma clara relação entre a sinalização de Wnt com massa óssea em pacientes bem como modelos animais. Por sua vez, a sinalização canônica de Wnt pode promover a formação óssea por mecanismos diversos, incluindo a renovação de células tronco, o aumento na proliferação de osteoblastos e a indução de osteoblastogênese (KATO et al., 2002; NUTTALL; GIMBLE, 2004; REYA; CLEVERS, 2005).

Além disso, tratamentos farmacológicos que aumentam a sinalização de Wnt em células tronco mesenquimais estimulam a osteoblastogênese e inibem a adipogênese. A explicação para isso seria que mediadores gerados pela sinalização de Wnt poderiam bloquear a indução dos fatores de transcrição adipogênicos, tais como C/EBP α e PPAR γ (BENNETT et al., 2002; TAKADA, I. et al., 2007). Desse modo, a supressão da sinalização de Wnt estimula a adipogênese (BENNETT et al., 2002), como o observado pela indução de PPAR γ (LIU; FARMER, 2004; MOLDES et al., 2003; ROSS et al., 2000). Assim, esses estudos sugerem que candidatos a fármacos seguros com relação à homeostase óssea não devem inibir a via de sinalização de Wnt. Por essa razão, essa via foi investigada em nosso estudo. Como demonstrado, ao contrário da Rosiglitazona, os novos derivados de TZDs não afetam a via de sinalização de Wnt, o que foi confirmado pela manutenção dos níveis de β -catenina similares ao grupo controle durante o processo de diferenciação de pré-adipócitos e pré-osteoblastos murinos. Condizente com esse achado, a adipogênese sofreu poucas alterações com os novos compostos, conforme avaliado pela expressão de genes relacionados ao fenótipo de adipócitos, não sendo observado modificação no acúmulo lipídico. Adicionalmente, a mineralização de matriz e a atividade da fosfatase alcalina também não foram inibidas em pré-osteoblastos, apesar de ter sido observado um fraco efeito anti-osteoblástico pela supressão de alguns genes relacionados ao fenótipo de osteoblastos (Runx2 e colágeno). Por outro lado, foi observado um aumento na expressão gênica de osteocalcina em presença da TZD GQ-177, o que pode ter compensado a diminuição de colágeno, mantendo a mineralização de matriz em níveis similares ao do grupo controle.

Interessantemente, verificamos que os novos derivados de TZDs não modificam a produção de leptina em adipócitos murinos, ao contrário da Rosiglitazona, que a diminui

marcantemente. Pelo fato da leptina ser um hormônio que exerce importantes ações na regulação do estoque energético e do metabolismo ósseo, podemos supor que a manutenção de seus níveis fisiológicos pelos novos derivados de TZDs seja uma vantagem em relação às TZDs clássicas. De fato, a diminuição dos níveis séricos de leptina pode estar associada com o ganho de peso em pacientes diabéticos que fazem uso de TZDs, possivelmente por causar aumento do apetite (FONSECA, 2003). Além disso, verificou-se que os níveis séricos de leptina também estão diminuídos em mulheres com fraturas vertebrais (YAMAUCHI et al., 2001).

Apesar de não existirem estudos conclusivos que demonstrem a associação entre níveis diminuídos de leptina e risco aumentado de fraturas ósseas, evidências experimentais descrevem os benefícios da leptina para o esqueleto. Interessantemente, estudos mostram que a administração de leptina aumenta a massa óssea em camundongos ob/ob (STEPPAN et al., 2000) e atenua a perda óssea em ratas ovariectomizadas (BURGUERA et al., 2001). Adicionalmente, outro estudo demonstrou que a adição de leptina à cultura de células murinas provocou um aumento da proliferação de osteoblastos e a inibição da osteoclastogênese, enquanto que a administração de leptina a camundongos diminui a fragilidade óssea (CORNISH et al., 2002). A promoção da osteoblastogênese induzida pela leptina também foi evidenciada em linhagem celular humana (THOMAS et al., 1999). Então, é possível que a ausência de efeito inibitório sobre a produção de leptina também seja um fator que colabore para a maior segurança dos compostos avaliados em nosso estudo. Entretanto, é importante ressaltar que o nosso estudo não foi delineado especificamente para investigar se as TZDs também afetam a osteoblastogênese indiretamente, via tecido adiposo modificando a produção de leptina. Portanto, mais estudos são necessários para elucidar essa questão.

Desse modo, temos demonstrado de maneira consistente que os novos derivados de TZDs apresentam vantagens terapêuticas com relação às TZDs clássicas do ponto de vista de segurança por afetarem menos intensamente a diferenciação celular de pré-adipócitos e pré-osteoblastos. Comprovamos, também, que isso se deve ao fato dos compostos não atuarem como ligantes de PPAR γ e por preservarem inalterada a via de sinalização de Wnt/ β -catenina. Embora muitos dos efeitos benéficos das TZDs sejam atribuídos à ativação de PPAR γ , seus efeitos adversos também se devem à ativação excessiva desse receptor. Nesse sentido, alguns estudos têm sugerido o planejamento de agonistas parciais de PPAR γ como uma estratégia para minimizar os efeitos indesejáveis, preservando suas propriedades terapêuticas (AMATO et al., 2012; BERGER et al., 2003; FUKUI et al., 2000). Por outro lado, não pode ser

excluída a possibilidade de que alguns dos efeitos das TZDs ocorram de maneira independente da ativação de PPAR γ . Na verdade, alguns estudos *in vitro* comprovam que efeitos antiproliferativos (HAN; ROMAN, 2006; HAZRA et al., 2007), anti-inflamatórios (CROSBY et al., 2005), antioxidante (FERGUSON et al., 2009; LEVONEN et al., 2001) e aqueles relacionados ao balanço energético e à função mitocondrial (FEINSTEIN et al., 2005; KONRAD et al., 2005) ocorrem de maneira independente da ativação de PPAR γ . Nesse estudo, apresentamos novos derivados de TZDs que não atuam como ligantes de PPAR γ , mas que preservam a atividade sensibilizadora de insulina associada a essa classe de fármacos. A LYSO-7, GQ-150 e SF-3 aumentaram a utilização de glicose em adipócitos murinos, enquanto a GQ-177 além de aumentar a captação de glicose em presença de insulina, reverteu a diminuição da captação de glicose causada pela dexametasona.

O envolvimento de mediadores pró-inflamatórios (DE FILIPPO et al., 2014; HOTAMISLIGIL; PERALDI; BUDAVARI, 1996; SADASHIV et al., 2014) e da modificação do perfil de adipocinas, particularmente da diminuição de adiponectina e do aumento de resistina (ANTUNA-PUENTE et al., 2008; ARNER, 2003) é descrito no desenvolvimento da resistência insulínica e do diabetes. Sabe-se também que as TZDs clássicas podem aumentar a sensibilidade insulínica por diminuírem o processo inflamatório e melhorarem o perfil de adipocinas (BASTARD et al., 2006; SCHAALAN, 2012). Em nosso estudo, os novos derivados de TZDs não foram capazes de induzir qualquer alteração sobre a produção de adiponectina e resistina. Adicionalmente, não observamos efeito anti-inflamatório em adipócitos murinos estimulados com LPS e em macrófagos de linhagem humana estimulados com ácido palmítico, conforme demonstrado pela ausência de efeito sobre a expressão de IL-6, CCL2/MCP-1, TNF- α e p-cJun. Contrariamente ao que observamos, um estudo prévio demonstrou que a LYSO-7 apresenta atividade anti-inflamatória em macrófagos murinos pela diminuição da expressão gênica de CCL2/MCP-1, COX-2, iNOS e VCAM, reduzindo a área de lesão aterosclerótica em camundongos LDLr^{-/-} submetidos a dieta hipercolesterolêmica (CÉSAR, 2013). No mesmo estudo, efeitos semelhantes foram encontrados com a GQ-177, tanto pela diminuição de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos, como pela diminuição das lesões ateroscleróticas em camundongos. Adicionalmente, Santin et al. (2013) demonstraram a atividade anti-inflamatória da LYSO-7 em camundongos submetidos à lesão gástrica induzida por etanol/HCl (SANTIN; DAUFENBACK; et al., 2013). Em outro estudo, os autores confirmaram o efeito anti-inflamatório da LYSO-7 pela diminuição da produção de IL-1 β e

de NO por neutrófilos murinos. Demonstraram, ainda, que a LYSO-7 apresenta atividade pan-agonista (ativação de PPAR γ , PPAR α e PPAR β/δ) e que os efeitos anti-inflamatórios são eliminados pelo GW9962, um antagonista específico de PPAR γ , sugerindo que os efeitos anti-inflamatórios da LYSO-7 são decorrentes da ativação desse receptor (SANTIN; UCHOA; et al., 2013). César (2013) também constatou a ativação de PPAR α e PPAR γ pela LYSO-7 e ativação de PPAR γ pela GQ-177. Em nosso estudo, porém, não foi observada a ativação de PPAR γ no ensaio de gene repórter com nenhuma das TZDs avaliadas. Esse resultado pode ser explicado por termos utilizado vetores que continham apenas o domínio de ligação de PPAR γ . Portanto, nossos resultados apontam que os novos derivados de TZDs não atuariam como ligantes desse receptor nuclear.

Embora não tenhamos observado que a GQ-177 atua como um ligante de PPAR γ , verificamos que aumenta a expressão de genes-alvo de PPAR γ em pré-adipócitos murinos em processo de diferenciação celular. De fato, a adição de GQ-177 à cultura celular de pré-adipócitos induziu o aumento significativo da expressão gênica de PPAR γ 2, C/EBP α , FABP4 e CD36 e do nível protéico de CD36. Por outro lado, em linhagem humana de pré-adipócitos, verificamos ausência de efeito adipogênico com a GQ-177. Essas diferenças de resultados podem ser explicadas de modo plausível pelas diferenças experimentais entre o nosso estudo e os demais citados anteriormente. Em nosso estudo, trabalhamos com linhagens murinas e humanas de adipócitos e linhagem humana de macrófagos, utilizando como estímulo pró-inflamatório o LPS ou o ácido palmítico, enquanto nos demais estudos trabalhou-se com macrófagos e neutrófilos de linhagens murinas, utilizando como estímulos LPS isoladamente ou em associação com IFN- γ . Além disso, os outros estudos também investigaram os efeitos anti-inflamatórios *in vivo*, utilizando modelos complexos, enquanto realizamos somente estudos *in vitro*. É possível, ainda, que diferenças nos lotes de GQ-177 possam ter contribuído para as diferenças encontradas no nosso estudo com relação aos resultados de expressão de marcadores de fenótipo adipogênico em linhagem murina e humana de pré-adipócitos. Diferenças entre os diferentes lotes de síntese de LYSO-7 também poderiam explicar as diferenças entre os resultados de ativação de PPAR γ e atividade anti-inflamatória em comparação com os estudos de César (2013) e Santin et al. (2013).

Outra observação interessante que fizemos foi que os novos derivados de TZDs modificam a atividade mitocondrial em adipócitos e macrófagos de linhagem humana. A LYSO-7 aumentou a redução de MTT a formazana, enquanto GQ-150, GQ-177 e SF-3 a inibiram em ambas as linhagens celulares. Ao investigarmos a função mitocondrial utilizando

o ensaio de fluxo extracelular, verificamos que a LYSO-7 e a SF-3 inibem de modo significativo a respiração celular em macrófagos de linhagem humana. Houve diminuição do consumo de oxigênio e modificação da taxa de glicólise, sugerindo que a relação ATP/ADP também poderia ser alterada por tais compostos. Baixos níveis de ATP estimulam a via de sinalização de AMPK, que funciona como um sensor de energia celular, reconhecidamente importante para a regulação de vários processos celulares, como metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, proliferação e morte celulares e homeostase cardiovascular. De fato, a inibição da função mitocondrial pelas TZDs tem sido relatada como um efeito que ocorre de maneira independente da ativação de PPAR γ em diferentes tipos celulares. Além disso, a via de AMPK tem sido apontada como um fator-chave relacionando a inibição da mitocôndria com os efeitos sobre o metabolismo de glicose e lipídios que se seguem após o uso de TZD (BRUNMAIR et al., 2004; SANZ et al., 2011; SCATENA et al., 2004). Adicionalmente, no estudo realizado por César (2013), foram observados efeitos sobre o metabolismo de lipídios e glicose em camundongos LDLr $^{-/-}$ após tratamento com LYSO-7 ou GQ-177. LYSO-7 diminuiu as concentrações plasmáticas de colesterol total e triacilgliceróis, enquanto a GQ-177 aumentou as concentrações plasmáticas de HDL-colesterol. Considerando as similaridades entre os efeitos metabólicos da ativação da via de AMPK e os apresentados pelos novos derivados de TZDs avaliados em nosso estudo (aumento da utilização de glicose) e pelos estudos de César (2013) – efeitos anti-inflamatórios e melhoria do perfil sérico lipídico – e de Santin et al. (2013) – efeitos anti-inflamatórios – nos questionamos se esses compostos poderiam atuar como ativadores de AMPK. Condizente com essa hipótese, nos dois primeiros experimentos utilizando macrófagos humanos, observamos um aumento da fosforilação de ACC, o que sugere ativação de AMPK pela LYSO-7 e SF-3 na concentração de 1 μ M. Entretanto, não observamos ativação de AMPK nos experimentos seguintes utilizando a concentração de 10 μ M de TZD. Uma explicação possível para a variação dos resultados seria a precipitação dos compostos na concentração de 10 μ M quando adicionados no meio de cultura. Além disso, o grau de precipitação variou bastante entre os experimentos, o que também pode explicar a variação dos resultados. Apesar de nossos resultados com relação à ativação de AMPK pelos novos derivados de TZDs não serem conclusivos, esta é uma questão que merece mais investigação. A avaliação da atividade dos novos derivados de TZDs sobre a função mitocondrial e via de AMPK em linhagem de hepatócitos, assim como o estudo dos efeitos de tais compostos sobre os níveis séricos de lipoproteínas e de glicose em

um modelo murino de síndrome metabólica poderão contribuir para a elucidação dos mecanismos pelos quais os novos derivados de TZDs exercem seus efeitos benéficos *in vivo*.

Em conclusão, apresentamos novos derivados de TZDs que não atuam como ligantes de PPAR γ e que afetam menos intensamente a diferenciação de adipócitos e osteoblastos. Além disso, tais compostos parecem inibir a respiração celular, conforme demonstrado pela diminuição do consumo de oxigênio em macrófagos, e retêm a atividade sensibilizadora de insulina em adipócitos murinos. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos responsáveis por esses efeitos, bem como para estabelecer se os novos derivados de TZDs são mais seguros *in vivo*, com relação ao risco de fraturas ósseas e ganho de massa adiposa. Se existe relação entre a inibição da função da mitocôndria, via de AMPK, as propriedades antiaterogênicas e melhoria do perfil lipídico e glicêmico pelos novos derivados de TZDs *in vivo*, este é um assunto que permanece a ser elucidado e para isso mais estudos são necessários.

7 CONCLUSÕES

- GQ-89 apresentou menores efeitos antiosteoblásticos quando comparado com a Rosiglitazona. Apesar da diminuição da expressão gênica de Runx2 e colágeno, a GQ-89 não interferiu na via de sinalização de Wnt/ β -catenina, aumentou a atividade da fosfatase alcalina e manteve a mineralização de matriz comparável à apresentada pelo Controle;
- GQ-177 manteve o efeito sensibilizador de insulina, com menores efeitos antiosteoblásticos e adipogênicos em linhagens celulares murinas e com ausência de efeitos adipogênicos em linhagem celular humana. A GQ-177 demonstrou não ser um ligante de PPAR γ , mas estimulou em menor magnitude genes-alvos desse receptor (C/EBP α , FABP4, CD36) em pré-adipócitos murinos e estimulou a expressão de PPAR γ 2. A GQ-177 aumentou a expressão gênica de osteocalcina, manteve a atividade da fosfatase alcalina e a mineralização de matriz comparáveis às apresentadas pelo Controle, apesar de ter diminuído a expressão gênica de Runx2 e colágeno como a Rosiglitazona. Por não ter se comportado como um ligante de PPAR γ e a ausência de efeito sobre a via de sinalização de Wnt/ β -catenina podem explicar os menores efeitos antiosteoblásticos e adipogênicos da GQ-177. Não foi observado efeito da GQ-177 sobre a produção de adipocinas em adipócitos de ambas as linhagens murina e humana, e de mediadores pró-inflamatórios em adipócitos murinos e em linhagem humana de macrófagos. Apesar de inibir a atividade enzimática mitocondrial de adipócitos e macrófagos de linhagens humanas, seu efeito sobre a via de sinalização de AMPK foi inconclusivo. Assim, os mecanismos responsáveis pelo aumento da captação de glicose com a GQ-177 permanecem a ser determinados;
- LYSO-7 não apresentou atividade ligante em PPAR γ , o que pode explicar a ausência de efeito sobre a via de sinalização de Wnt/ β -catenina em pré-adipócitos murinos e a ausência de efeito adipogênico em pré-adipócitos murinos e de linhagem humana.

Aumentou o consumo de glicose em adipócitos murinos, mas esse efeito não foi confirmado no ensaio de captação de glicose. Não mostrou apresentar efeitos sobre a produção de adipocinas em adipócitos de linhagens murina e humana, assim como de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos de linhagem humana. Apesar de modificar a função mitocondrial (aumento da atividade enzimática em adipócitos e macrófagos de linhagens humanas, aumento da taxa de glicólise e diminuição do consumo de oxigênio em macrófagos de linhagem humana), seu efeito sobre a via de sinalização de AMPK foi inconclusivo;

- GQ-150 mostrou não atuar como ligante de PPAR γ . Interferiu na expressão gênica de β -catenina de maneira não persistente, sem modificar seus níveis protéicos, preservando a via de sinalização de Wnt/ β -catenina similar à do Controle. Inibiu a expressão gênica de C/EBP α , reduziu a expressão gênica e os níveis protéicos de CD36, sem modificar o acúmulo lipídico em pré-adipócitos murinos durante o processo de diferenciação celular. Aumentou o consumo de glicose em adipócitos murinos, mas esse efeito não foi confirmado no ensaio de captação de glicose. Não mostrou apresentar efeitos sobre a produção de adipocinas em adipócitos de linhagens murina e humana, bem como de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos de linhagem humana. Apesar de inibir a atividade enzimática mitocondrial de adipócitos e macrófagos de linhagens humanas, seu efeito sobre a via de sinalização de AMPK foi inconclusivo;

- SF-3 não demonstrou agir como um ligante de PPAR γ . Interferiu na expressão gênica de β -catenina de maneira não persistente, sem modificar seus níveis protéicos, preservando a via de sinalização de Wnt/ β -catenina similar à do Controle. Estimulou a expressão gênica de C/EBP α de maneira não persistente, aumentou a expressão gênica de FABP4, inibiu a expressão gênica e os níveis protéicos de CD36, sem modificar o acúmulo lipídico em pré-adipócitos murinos durante o processo de diferenciação celular. Aumentou o consumo de glicose em adipócitos murinos, mas esse efeito não foi confirmado no ensaio de captação de glicose. Não mostrou apresentar efeitos sobre a produção de adipocinas em adipócitos de linhagens murina e humana, bem

como de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos de linhagem humana. Apesar de modificar a função mitocondrial (inibição da atividade enzimática em adipócitos e macrófagos de linhagens humanas, assim como diminuição do consumo de oxigênio e da taxa de glicólise), seu efeito sobre a via de sinalização de AMPK foi inconclusivo.

REFERÊNCIAS

- AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol Metab**, v. 11, n. 8, p. 327-32, Oct 2000.
- AKUNE, T. et al. PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. **J Clin Invest**, v. 113, n. 6, p. 846-55, Mar 2004.
- ALI, A. A. et al. Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1226-35, Mar 2005.
- ALJADA, A. et al. PPAR gamma ligands, rosiglitazone and pioglitazone, inhibit bFGF- and VEGF-mediated angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 11, n. 4, p. 361-7, 2008.
- AMATO, A. A. et al. GQ-16, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligand, promotes insulin sensitization without weight gain. **J Biol Chem**, v. 287, n. 33, p. 28169-79, Aug 10 2012.
- ANGHEL, S. I. et al. Adipose tissue integrity as a prerequisite for systemic energy balance: a critical role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **J Biol Chem**, v. 282, n. 41, p. 29946-57, Oct 12 2007.
- ANTUNA-PUENTE, B. et al. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. **Diabetes Metab**, v. 34, n. 1, p. 2-11, Feb 2008.
- ARKAN, M. C. et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nat Med**, v. 11, n. 2, p. 191-8, Feb 2005.
- ARNER, P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. **TRENDS in Endocrinology and Metabolism**, v. 14, n. 3, p. 137-45, Apr 2003.
- ARONOFF, S. et al. Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: a 6-month randomized placebo-controlled dose-response study. The Pioglitazone 001 Study Group. **Diabetes Care**, v. 23, n. 11, p. 1605-11, Nov 2000.
- BALAKUMAR, P. et al. PPAR dual agonists: are they opening Pandora's Box? **Pharmacol Res**, v. 56, n. 2, p. 91-8, Aug 2007.
- BASTARD, J. P. et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **Eur Cytokine Netw**, v. 17, n. 1, p. 4-12, Mar 2006.
- BENNETT, C. N. et al. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. **J Biol Chem**, v. 277, n. 34, p. 30998-1004, Aug 23 2002.

BERBEROGLU, Z. et al. Rosiglitazone decreases serum bone-specific alkaline phosphatase activity in postmenopausal diabetic women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 9, p. 3523-30, Sep 2007.

BERGER, J. P. et al. Distinct properties and advantages of a novel peroxisome proliferator-activated protein [gamma] selective modulator. **Mol Endocrinol**, v. 17, n. 4, p. 662-76, Apr 2003.

BLASCHKE, F. et al. Obesity, peroxisome proliferator-activated receptor, and atherosclerosis in type 2 diabetes. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 1, p. 28-40, Jan 2006.

BODEN, G. et al. Thiazolidinediones upregulate fatty acid uptake and oxidation in adipose tissue of diabetic patients. **Diabetes**, v. 54, n. 3, p. 880-5, Mar 2005.

BRASIL. Alerta SNVS/Anvisa/Nuvig/Gfarm nº 04, de 29 de Setembro de 2010. Brasília., 2010.

_____. **Vigitel Brasil 2012: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. D. V. E. S., DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DE DOENÇAS E AGRAVOS NÃO TRANSMISSÍVEIS E PROMOÇÃO DE SAÚDE. Brasília 2013.

BRUNMAIR, B. et al. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? **Diabetes**, v. 53, n. 4, p. 1052-9, Apr 2004.

BURGUERA, B. et al. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. **Endocrinology**, v. 142, n. 8, p. 3546-53, Aug 2001.

CABRERO, A.; LAGUNA, J. C.; VAZQUEZ, M. Peroxisome proliferator-activated receptors and the control of inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 1, n. 3, p. 243-8, Sep 2002.

CAI, D. et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. **Nat Med**, v. 11, n. 2, p. 183-90, Feb 2005.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 277-359, Jan 2004.

CAREY, D. G. et al. Effect of rosiglitazone on insulin sensitivity and body composition in type 2 diabetic patients [corrected]. **Obes Res**, v. 10, n. 10, p. 1008-15, Oct 2002.

CÉSAR, F. A. **Propriedades antiaterogênicas de novas tiazolidinono-2,4-dionas**. 2013. 162f Tese (Doutorado em Farmácia, área de Análises Clínicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CHAN, B. Y. et al. PPAR agonists modulate human osteoclast formation and activity in vitro. **Bone**, v. 40, n. 1, p. 149-59, Jan 2007.

CHO, D. H. et al. Nitric oxide production and regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by prolonged treatment with Troglitazone: evidence for involvement of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma-dependent and PPARgamma-independent signaling pathways. **J Biol Chem**, v. 279, n. 4, p. 2499-2506, Oct 2004.

COLETTA, D. K. et al. Pioglitazone stimulates AMP-activated protein kinase signalling and increases the expression of genes involved in adiponectin signalling, mitochondrial function and fat oxidation in human skeletal muscle in vivo: a randomised trial. **Diabetologia**, v. 52, n. 4, p. 723-32, Apr 2009.

CORNISH, J. et al. Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo. **J Endocrinol**, v. 175, n. 2, p. 405-15, Nov 2002.

CROSBY, M. B. et al. Peroxisome proliferation-activated receptor (PPAR)gamma is not necessary for synthetic PPARgamma agonist inhibition of inducible nitric-oxide synthase and nitric oxide. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 312, n. 1, p. 69-76, Jan 2005.

CUNDY, T. F.; EDMONDS, M. E.; WATKINS, P. J. Osteopenia and metatarsal fractures in diabetic neuropathy. **Diabet Med**, v. 2, n. 6, p. 461-4, Nov 1985.

DAVIDSON, M. H. et al. Safety considerations with fibrate therapy. **Am J Cardiol**, v. 99, n. 6A, p. 3C-18C, Mar 19 2007.

DE FILIPPO, G. et al. Interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 complex and insulin resistance in obese children and adolescents. **J Endocrinol Invest**, v. Epub ahead of print, Sep 2014.

DELERIVE, P. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. **J Biol Chem**, v. 274, n. 45, p. 32048-54, Nov 5 1999.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J Immunol Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-7, May 22 1986.

FAINE, L. A. et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of a new arylidene-thiazolidinedione in macrophages. **Curr Med Chem**, v. 18, n. 22, p. 3351-60, 2011.

FEINSTEIN, D. L. et al. Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: is mitochondrial function the key? **Biochem Pharmacol**, v. 70, n. 2, p. 177-88, Jul 15 2005.

FERGUSON, H. E. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands induce heme oxygenase-1 in lung fibroblasts by a PPARgamma-independent, glutathione-dependent mechanism. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 297, n. 5, p. L912-9, Nov 2009.

FERNANDEZ-REAL, J. M.; RICART, W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. **Endocr Rev**, v. 24, n. 3, p. 278-301, Jun 2003.

FISCHER-POSOVSZKY, P.; WABITSCH, M.; HOCHBERG, Z. Endocrinology of adipose tissue - an update. **Horm Metab Res**, v. 39, n. 5, p. 314-21, May 2007.

FLOWER, L. et al. Stimulation of interleukin-6 release by interleukin-1beta from isolated human adipocytes. **Cytokine**, v. 21, n. 1, p. 32-7, Jan 7 2003.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. [The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 50, n. 2, p. 216-29, Apr 2006.

FONSECA, V. Effect of thiazolidinediones on body weight in patients with diabetes mellitus. **Am J Med**, v. 115 Suppl 8A, p. 42S-48S, Dec 8 2003.

FRUHBECK, G. et al. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 280, n. 6, p. E827-47, Jun 2001.

FRYER, L. G. D.; PARBU-PATEL, A.; CARLING, D. The anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate protein kinase through distinct signaling pathways. **J Biol Chem**, v. 277, n. 28, p. 25226-32, May 2002.

FUJISAWA, K. et al. TZDs reduce mitochondrial ROS production and enhance mitochondrial biogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 379, n. 1, p. 43-8, Jan 2009.

FUKUI, Y. et al. A new thiazolidinedione, NC-2100, which is a weak PPAR-gamma activator, exhibits potent antidiabetic effects and induces uncoupling protein 1 in white adipose tissue of KKAY obese mice. **Diabetes**, v. 49, n. 5, p. 759-67, May 2000.

GIL-CAMPOS, M.; CANETE, R. R.; GIL, A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. **Clin Nutr**, v. 23, n. 5, p. 963-74, Oct 2004.

GILES, T. D.; SANDER, G. E. Effects of thiazolidinediones on blood pressure. **Curr Hypertens Rep**, v. 9, n. 4, p. 332-7, Aug 2007.

GIMBLE, J. M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation by thiazolidinediones induces adipogenesis in bone marrow stromal cells. **Mol Pharmacol**, v. 50, n. 5, p. 1087-94, Nov 1996.

GLASS, C. K.; SAIJO, K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 5, p. 365-76, May 2010.

GOOSSENS, G. H. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. **Physiol Behav**, v. 94, n. 2, p. 206-18, May 23 2008.

GRAHAM, T. L. et al. The PPARdelta agonist GW0742X reduces atherosclerosis in LDLR(-/-) mice. **Atherosclerosis**, v. 181, n. 1, p. 29-37, Jul 2005.

GREGORY, C. A. et al. An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 329, n. 1, p. 77-84, Jun 2004.

GREY, A. Skeletal consequences of thiazolidinedione therapy. **Osteoporos Int**, v. 19, n. 2, p. 129-37, Feb 2008.

_____. Thiazolidinedione-induced skeletal fragility--mechanisms and implications. **Diabetes Obes Metab**, v. 11, n. 4, p. 275-84, Apr 2009.

GREY, A. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone decreases bone formation and bone mineral density in healthy postmenopausal women: a randomized, controlled trial. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 4, p. 1305-10, Apr 2007.

GUERRE-MILLO, M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. **J Biol Chem**, v. 275, n. 22, p. 16638-42, Jun 2 2000.

GUSTAFSON, B.; ELIASSON, B.; SMITH, U. Thiazolidinediones increase the wingless-type MMTV integration site family (WNT) inhibitor Dickkopf-1 in adipocytes: a link with osteogenesis. **Diabetologia**, v. 53, n. 3, p. 536-40, Mar 2010.

GUSTAFSON, B.; SMITH, U. Cytokines promote Wnt signaling and inflammation and impair the normal differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. **J Biol Chem**, v. 281, n. 14, p. 9507-16, Apr 7 2006.

HAN, S.; ROMAN, J. Rosiglitazone suppresses human lung carcinoma cell growth through PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent signal pathways. **Mol Cancer Ther**, v. 5, n. 2, p. 430-7, Feb 2006.

HARRINGTON, W. W. et al. The Effect of PPARalpha, PPARdelta, PPARgamma, and PPARpan Agonists on Body Weight, Body Mass, and Serum Lipid Profiles in Diet-Induced Obese AKR/J Mice. **PPAR Res**, v. 2007, p. 97125, 2007.

HASEGAWA, T. et al. The PPARgamma-selective ligand BRL-49653 differentially regulates the fate choices of rat calvaria versus rat bone marrow stromal cell populations. **BMC Dev Biol**, v. 8, p. 71, 2008.

HAUNER, H. The new concept of adipose tissue function. **Physiol Behav**, v. 83, n. 4, p. 653-8, Dec 30 2004.

HAZRA, S. et al. Pioglitazone and rosiglitazone decrease prostaglandin E2 in non-small-cell lung cancer cells by up-regulating 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. **Mol Pharmacol**, v. 71, n. 6, p. 1715-20, Jun 2007.

HEMMERYCKX, B. et al. Does rosiglitazone affect adiposity and cardiac function in genetic diabetic mice? **Eur J Pharmacol**, v. 700, n. 1-3, p. 23-31, Jan 2013.

HIGGINS, L. S.; DEPAOLI, A. M. Selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) modulation as a strategy for safer therapeutic PPARgamma activation. **Am J Clin Nutr**, v. 91, n. 1, p. 267S-272S, Jan 2010.

HOME, P. Safety of PPAR agonists. **Diabetes Care**, v. 34 Suppl 2, p. S215-9, May 2011.

HOSOKAWA, M. et al. Troglitazone inhibits bicarbonate secretion in rat and human duodenum. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 290, n. 3, p. 1080-4, Sep 1999.

HOTAMISLIGIL, G. S.; PERALDI, P.; BUDAVARI, A. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. **Science**, v. 271, n. 5249, p. 665-8, Feb 1996.

JANGHORBANI, M. et al. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. **Am J Epidemiol**, v. 166, n. 5, p. 495-505, Sep 1 2007.

JEON, M. J. et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts. **J Biol Chem**, v. 278, n. 26, p. 23270-7, Jun 27 2003.

JONES, I. R. et al. Lowering of plasma glucose concentrations with bezafibrate in patients with moderately controlled NIDDM. **Diabetes Care**, v. 13, n. 8, p. 855-63, Aug 1990.

KAHN, S. E. et al. Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. **N Engl J Med**, v. 355, n. 23, p. 2427-43, Dec 7 2006.

KAHN, S. E. et al. Rosiglitazone-associated fractures in type 2 diabetes: an Analysis from A Diabetes Outcome Progression Trial (ADOPT). **Diabetes Care**, v. 31, n. 5, p. 845-51, May 2008.

KAJITA, K. et al. Pioglitazone enhances small-sized adipocyte proliferation in subcutaneous adipose tissue. **Endocr J**, v. 59, n. 12, p. 1107-14, Dec 2012.

KANDA, H. et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **J Clin Invest**, v. 116, n. 6, p. 1494-505, Jun 2006.

KATAYAMA, Y. et al. Role of nonenzymatic glycosylation of type I collagen in diabetic osteopenia. **J Bone Miner Res**, v. 11, n. 7, p. 931-7, Jul 1996.

KATO, M. et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. **J Cell Biol**, v. 157, n. 2, p. 303-14, Apr 15 2002.

KAWAGUCHI, H. et al. Distinct effects of PPARgamma insufficiency on bone marrow cells, osteoblasts, and osteoclastic cells. **J Bone Miner Metab**, v. 23, n. 4, p. 275-9, 2005.

KAWAMATSU, Y. et al. Studies on antihyperlipidemic agents. II. Synthesis and biological activities of 2-chloro-3-arylpropionic acids. **Arzneimittelforschung**, v. 30, n. 4, p. 585-9, 1980.

KAWAMATSU, Y. et al. Studies on antihyperlipidemic agents. III. Synthesis and biological activities of 2-chloro-3-arylpropionic acids containing a quaternary carbon atom. **Arzneimittelforschung**, v. 30, n. 5, p. 751-8, 1980.

KAWAMATSU, Y. et al. Studies on antihyperlipidemic agents. I. Synthesis and hypolipidemic activities of phenoxyphenyl alkanolic acid derivatives. **Arzneimittelforschung**, v. 30, n. 3, p. 454-9, 1980.

KHAN, E.; ABU-AMER, Y. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits differentiation of preosteoblasts. **J Lab Clin Med**, v. 142, n. 1, p. 29-34, Jul 2003.

KONRAD, D. et al. Troglitazone causes acute mitochondrial membrane depolarisation and an AMPK-mediated increase in glucose phosphorylation in muscle cells. **Diabetologia**, v. 48, n. 5, p. 954-66, May 2005.

LALLOYER, F.; STAELS, B. Fibrates, glitazones, and peroxisome proliferator-activated receptors. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 30, n. 5, p. 894-9, May 2010.

LAW, R. E. et al. Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells. **Circulation**, v. 101, n. 11, p. 1311-8, Mar 21 2000.

LAZAR, M. A. PPAR gamma, 10 years later. **Biochimie**, v. 87, n. 1, p. 9-13, Jan 2005.

LAZARENKO, O. P. et al. Netoglitazone is a PPAR-gamma ligand with selective effects on bone and fat. **Bone**, v. 38, n. 1, p. 74-84, Jan 2006.

LEBRASSEUR, N. K. et al. Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 291, n. 1, p. E175-81, Jul 2006.

LECKA-CZERNIK, B. et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) by rosiglitazone suppresses components of the insulin-like growth factor regulatory system in vitro and in vivo. **Endocrinology**, v. 148, n. 2, p. 903-11, Feb 2007.

LECKA-CZERNIK, B. et al. Inhibition of Osf2/Cbfa1 expression and terminal osteoblast differentiation by PPARgamma2. **J Cell Biochem**, v. 74, n. 3, p. 357-71, Sep 1 1999.

LECKA-CZERNIK, B. et al. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. **Endocrinology**, v. 143, n. 6, p. 2376-84, Jun 2002.

LEE, C. H. et al. PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 9, p. 3444-9, Feb 28 2006.

LEFEBVRE, A. M. et al. Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. **Diabetes**, v. 47, n. 1, p. 98-103, Jan 1998.

LEHRKE, M.; LAZAR, M. A. The many faces of PPARgamma. **Cell**, v. 123, n. 6, p. 993-9, Dec 16 2005.

LEVONEN, A. L. et al. Biphasic effects of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) on glutathione induction and apoptosis in human endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, n. 11, p. 1846-51, Nov 2001.

LI, A. C. et al. Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. **J Clin Invest**, v. 114, n. 11, p. 1564-76, Dec 2004.

LIRA, F. S. et al. Supplementing alpha-tocopherol (vitamin E) and vitamin D3 in high fat diet decrease IL-6 production in murine epididymal adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes following LPS stimulation. **Lipids Health Dis**, v. 10, p. 10-37, 2011.

LIU, J.; FARMER, S. R. Regulating the balance between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin signaling during adipogenesis. A glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation-defective mutant of beta-catenin inhibits expression of a subset of adipogenic genes. **J Biol Chem**, v. 279, n. 43, p. 45020-7, Oct 22 2004.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C (T)) method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

MAGGS, D. G. et al. Metabolic effects of troglitazone monotherapy in type 2 diabetes mellitus. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Ann Intern Med**, v. 128, n. 3, p. 176-85, Feb 1 1998.

MAMTANI, R. et al. Association between longer therapy with thiazolidinediones and risk of bladder cancer: a cohort study. **J Natl Cancer Inst**, v. 104, n. 18, p. 1411-21, Sep 2012.

MANCINI, F. P. et al. Fenofibrate prevents and reduces body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats. **FEBS Lett**, v. 491, n. 1-2, p. 154-8, Feb 23 2001.

MANDARD, S.; MULLER, M.; KERSTEN, S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. **Cell Mol Life Sci**, v. 61, n. 4, p. 393-416, Feb 2004.

MATSUZAWA, Y. Therapy Insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med**, v. 3, n. 1, p. 35-42, Jan 2006.

MBALAVIELE, G. et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathway inhibits osteoclast differentiation. **J Biol Chem**, v. 275, n. 19, p. 14388-93, May 12 2000.

MEHTA, J. L. et al. Pioglitazone inhibits LOX-1 expression in human coronary artery endothelial cells by reducing intracellular superoxide radical generation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 12, p. 2203-8, Dec 2003.

MIAO, J. et al. Elevated hip fracture risk in type 1 diabetic patients: a population-based cohort study in Sweden. **Diabetes Care**, v. 28, n. 12, p. 2850-5, Dec 2005.

MIYATA, T. et al. Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles. **J Am Soc Nephrol**, v. 8, n. 2, p. 260-70, Feb 1997.

- MIYAZAKI, Y. et al. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 6, p. 2784-91, Jun 2002.
- MOHANTY, P. et al. Evidence for a potent antiinflammatory effect of rosiglitazone. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 6, p. 2728-35, Jun 2004.
- MOLDES, M. et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis. **Biochem J**, v. 376, n. Pt 3, p. 607-13, Dec 15 2003.
- MOURAO, R. H. et al. Synthesis and biological activity of novel acridinylidene and benzylidene thiazolidinediones. **Eur J Med Chem**, v. 40, n. 11, p. 1129-33, Nov 2005.
- MURUGANANDAN, S.; ROMAN, A. A.; SINAL, C. J. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 2, p. 236-53, Jan 2009.
- MUTO, S. et al. Troglitazone stimulates basolateral rheogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransport activity in rabbit proximal straight tubules. **Exp Nephrol**, v. 9, n. 3, p. 191-7, 2001.
- NAMGALADZE, D. et al. AICAR inhibits PPAR γ during monocyte differentiation to attenuate inflammatory responses to atherogenic lipids. **Cardiovascular Research**, v. 98, n. 3, p. 479-87, 2013.
- NAMMI, S. et al. Obesity: an overview on its current perspectives and treatment options. **Nutr J**, v. 3, p. 3, Apr 14 2004.
- NUTTALL, M. E.; GIMBLE, J. M. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. **Curr Opin Pharmacol**, v. 4, n. 3, p. 290-4, Jun 2004.
- OGDEN, C. L. et al. Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. **JAMA**, v. 311, n. 8, p. 806-14, Feb 2014.
- OKAZAKI, R. et al. Thiazolidinediones inhibit osteoclast-like cell formation and bone resorption in vitro. **Endocrinology**, v. 140, n. 11, p. 5060-5, Nov 1999.
- OKUNO, A. et al. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. **J Clin Invest**, v. 101, n. 6, p. 1354-61, Mar 15 1998.
- OLEFSKY, J. M.; SALTIEL, A. R. PPAR γ and the treatment of insulin resistance. **Trends Endocrinol Metab**, v. 11, n. 9, p. 362-8, Nov 2000.
- PANIGRAHY, D. et al. PPAR γ ligands inhibit primary growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. **J Clin Invest**, v. 110, n. 7, p. 923-32, Oct 2002.
- PANTOJA, C.; HUFF, J. T.; YAMAMOTO, K. R. Glucocorticoid signaling defines a novel commitment state during adipogenesis in vitro. **Mol Biol Cell**, v. 19, n. 10, p. 4032-41, Oct 2008.

PASCERI, V. et al. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. **Circulation**, v. 101, n. 3, p. 235-8, Jan 25 2000.

PETERS, J. M. et al. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 14, p. 5119-28, Jul 2000.

QIN, X. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta induces insulin-induced gene-1 and suppresses hepatic lipogenesis in obese diabetic mice. **Hepatology**, v. 48, n. 2, p. 432-41, Aug 2008.

QUEIROZ, J. C. et al. [Control of adipogenesis by fatty acids]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 53, n. 5, p. 582-94, Jul 2009.

REAVEN, G. M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, n. 12, p. 1595-607, Dec 1988.

REDDY, J. K.; KRISHNAKANTHA, T. P. Hepatic peroxisome proliferation: induction by two novel compounds structurally unrelated to clofibrate. **Science**, v. 190, n. 4216, p. 787-9, Nov 21 1975.

REGINATO, M. J.; LAZAR, M. A. Mechanisms by which Thiazolidinediones Enhance Insulin Action. **Trends Endocrinol Metab**, v. 10, n. 1, p. 9-13, Dec 1999.

REIFEL-MILLER, A. et al. A peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma dual agonist with a unique in vitro profile and potent glucose and lipid effects in rodent models of type 2 diabetes and dyslipidemia. **Mol Endocrinol**, v. 19, n. 6, p. 1593-605, Jun 2005.

REYA, T.; CLEVERS, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. **Nature**, v. 434, n. 7035, p. 843-50, Apr 14 2005.

RICHE, D. M.; TRAVIS KING, S. Bone loss and fracture risk associated with thiazolidinedione therapy. **Pharmacotherapy**, v. 30, n. 7, p. 716-27, Jul 2010.

RONTI, T.; LUPATTELLI, G.; MANNARINO, E. The endocrine function of adipose tissue: an update. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 64, n. 4, p. 355-65, Apr 2006.

ROSEN, E. D. et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. **Mol Cell**, v. 4, n. 4, p. 611-7, Oct 1999.

ROSS, S. E. et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. **Science**, v. 289, n. 5481, p. 950-3, Aug 11 2000.

SADASHIV et al. IL-6 gene expression in adipose tissue of postmenopausal women and its association with metabolic risk factors. **Mol Cell Endocrinol**, v. Epub ahead of print, Oct 2014.

SAMARASINGHE, S. P. et al. Altering PPARgamma ligand selectivity impairs adipogenesis by thiazolidinediones but not hormonal inducers. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17, n. 5, p. 965-72, May 2009.

SANTIN, J. R. et al. Role of an indole-thiazolidine molecule PPAR-pan-agonist and COX inhibitor on inflammation and microcirculatory damage in acute gastric lesions. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76894, Oct 2013.

SANTIN, J. R. et al. Chemical synthesis, docking studies and biological effects of a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist and cyclooxygenase inhibitor. **Eur J Pharm Sci**, v. 48, n. 4-5, p. 689-97, Mar 2013.

SANZ, M. N. et al. Acute mitochondrial actions of glitazones on the liver: a crucial parameter for their antidiabetic properties. **Cell Physiol Biochem**, v. 28, n. 5, p. 899-910, 2011.

SARTIPY, P.; LOSKUTOFF, D. J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 12, p. 7265-70, Jun 10 2003.

SCATENA, R. et al. Mitochondrial respiratory chain dysfunction, a non-receptor-mediated effect of synthetic PPAR-ligands: biochemical and pharmacological implications. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 319, n. 3, p. 967-73, Jul 2 2004.

SCHAALAN, M. F. Effects of pioglitazone and/or simvastatin on circulating TNF α and adiponectin levels in insulin resistance. **J Immunotoxicol**, v. 9, n. 2, p. 201-9, Apr-Jun 2012.

SCHERNTHANER, G.; CHILTON, R. J. Cardiovascular risk and thiazolidinediones--what do meta-analyses really tell us? **Diabetes Obes Metab**, v. 12, n. 12, p. 1023-35, Dec 2010.

SCHWARTZ, A. V. et al. Older women with diabetes have a higher risk of falls: a prospective study. **Diabetes Care**, v. 25, n. 10, p. 1749-54, Oct 2002.

SCHWARTZ, A. V. et al. Thiazolidinedione use and bone loss in older diabetic adults. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 9, p. 3349-54, Sep 2006.

SGRO, C.; ESCOUSSE, A. [Side effects of fibrates (except liver and muscle)]. **Therapie**, v. 46, n. 5, p. 351-4, Sep-Oct 1991.

SHAO, D.; LAZAR, M. A. Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. **J Biol Chem**, v. 272, n. 34, p. 21473-8, Aug 22 1997.

SHIMIZU, H. et al. Troglitazone reduces plasma leptin concentration but increases hunger in NIDDM patients. **Diabetes Care**, v. 21, n. 9, p. 1470-4, Sep 1998.

SMITH, U.; HAMMARSTEDT, A. Antagonistic effects of thiazolidinediones and cytokines in lipotoxicity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1801, n. 3, p. 377-80, Mar 2010.

SOLOMON, D. H. et al. A cohort study of thiazolidinediones and fractures in older adults with diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 8, p. 2792-8, Aug 2009.

- SOROCEANU, M. A. et al. Rosiglitazone impacts negatively on bone by promoting osteoblast/osteocyte apoptosis. **J Endocrinol**, v. 183, n. 1, p. 203-16, Oct 2004.
- SPALDING, K. L. et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. **Nature**, v. 453, n. 7196, p. 783-7, Jun 5 2008.
- SPIEGELMAN, B. M. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. **Diabetes**, v. 47, n. 4, p. 507-14, Apr 1998.
- STAELS, B. et al. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. **Circulation**, v. 98, n. 19, p. 2088-93, Nov 10 1998.
- STEPPAN, C. M. et al. Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. **Regul Pept**, v. 92, n. 1-3, p. 73-8, Aug 25 2000.
- STIENSTRA, R. et al. PPARs, Obesity, and Inflammation. **PPAR Res**, v. 2007, p. 95974, 2007.
- SUGII, S. et al. PPARgamma activation in adipocytes is sufficient for systemic insulin sensitization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 52, p. 22504-9, Dec 2009.
- SYVERSEN, U. et al. Different skeletal effects of the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)alpha agonist fenofibrate and the PPARgamma agonist pioglitazone. **BMC Endocr Disord**, v. 9, p. 10, 2009.
- SZAPARY, P. O. et al. Effects of pioglitazone on lipoproteins, inflammatory markers, and adipokines in nondiabetic patients with metabolic syndrome. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 1, p. 182-8, Jan 2006.
- SZNAIDMAN, M. L. et al. Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)--synthesis and biological activity. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 13, n. 9, p. 1517-21, May 5 2003.
- TAKADA, I.; KOUZMENKO, A. P.; KATO, S. Molecular switching of osteoblastogenesis versus adipogenesis: implications for targeted therapies. **Expert Opin Ther Targets**, v. 13, n. 5, p. 593-603, May 2009.
- TAKADA, I. et al. A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. **Nat Cell Biol**, v. 9, n. 11, p. 1273-85, Nov 2007.
- TAKADA, J. et al. Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. **Metabolism**, v. 56, n. 7, p. 977-84, Jul 2007.
- THOMAS, T. et al. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. **Endocrinology**, v. 140, n. 4, p. 1630-8, Apr 1999.

TONTONOZ, P. et al. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. **Genes Dev**, v. 8, n. 10, p. 1224-34, May 15 1994.

TONTONOZ, P.; SPIEGELMAN, B. M. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. **Annu Rev Biochem**, v. 77, p. 289-312, 2008.

VESTERGAARD, P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes--a meta-analysis. **Osteoporos Int**, v. 18, n. 4, p. 427-44, Apr 2007.

VESTERGAARD, P.; REJNMARK, L.; MOSEKILDE, L. Diabetes and its complications and their relationship with risk of fractures in type 1 and 2 diabetes. **Calcif Tissue Int**, v. 84, n. 1, p. 45-55, Jan 2009.

VIJAY, S. K. et al. Effect of pioglitazone and rosiglitazone on mediators of endothelial dysfunction, markers of angiogenesis and inflammatory cytokines in type-2-diabetes. **Acta Diabetol**, v. 46, n. 1, p. 27-33, Mar 2009.

WANG, Y. X. et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. **Cell**, v. 113, n. 2, p. 159-70, Apr 18 2003.

YAMAUCHI, M. et al. Plasma leptin concentrations are associated with bone mineral density and the presence of vertebral fractures in postmenopausal women. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 55, n. 3, p. 341-7, Sep 2001.

YATURU, S.; BRYANT, B.; JAIN, S. K. Thiazolidinedione treatment decreases bone mineral density in type 2 diabetic men. **Diabetes Care**, v. 30, n. 6, p. 1574-6, Jun 2007.

YKI-JARVINEN, H. Ectopic fat accumulation: an important cause of insulin resistance in humans. **J R Soc Med**, v. 95 Suppl 42, p. 39-45, 2002.

_____. Thiazolidinediones. **N Engl J Med**, v. 351, n. 11, p. 1106-18, Sep 9 2004.

_____. The PROactive study: some answers, many questions. **Lancet**, v. 366, n. 9493, p. 1241-2, Oct 8 2005.

YOSHIMOTO, T. et al. Antihypertensive and vasculo- and renoprotective effects of pioglitazone in genetically obese diabetic rats. **Am J Physiol**, v. 272, n. 6 Pt 1, p. E989-96, Jun 1997.

ZHANG, B. B. et al. Characterization of protein-DNA interactions within the peroxisome proliferator-responsive element of the rat hydratase-dehydrogenase gene. **J Biol Chem**, v. 268, n. 17, p. 12939-45, Jun 1993.

ZHANG, H. et al. Collecting duct-specific deletion of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks thiazolidinedione-induced fluid retention. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 26, p. 9406-11, Jun 28 2005.

ZHOU, Z. et al. Regulation of osteoclast function and bone mass by RAGE. **J Exp Med**, v. 203, n. 4, p. 1067-80, Apr 17 2006.

ANEXOS

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 6963173/1 - Cristiane Akemi Iamamoto Saito

Email: caiamamoto@usp.br
Data de Nascimento: 14/08/1981
Cédula de Identidade: RG - 001103227 - MS
Local de Nascimento: Estado do Mato Grosso do Sul
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade Estadual de Londrina - Paraná - Brasil - 2003
Mestrado: Mestre em Patologia Experimental (1) - Universidade Estadual de Londrina - Paraná - Brasil - 2007

Curso: Doutorado
Programa: Farmácia (Análises Clínicas)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 14/07/2009
Início da Contagem de Prazo: 14/07/2009
Data Limite para o Depósito: 11/11/2014
Orientador: Prof(a). Dr(a). Dulcineia Saes Parra Abdalla - 14/07/2009 até o presente. E.Mail: dspa@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 21/10/2010
Trancamento(s): 365 dias
 Período de 11/11/2013 a 10/11/2014
Prorrogação: 120 dias
 Período de 14/07/2013 a 11/11/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 14/09/2011
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Doutorado em 14/07/2009
 Mudança de Regulamento em 06/08/2009
 Prorrogação em 11/07/2013
 Trancado de 11/11/2013 até 10/11/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013)

Última ocorrência: Trancado de 11/11/2013 até 10/11/2014

Impresso em: 30/10/14 08:49:10



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 6963173/1 - Cristiane Akemi Iamamoto Saito

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5757-2/1	Tópicos em Análises Clínicas II	17/08/2009	29/11/2009	30	2	100	A	N	Concluída
BMB5804-2/2	O Órgão Adiposo como Centro Regulador do Metabolismo (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	25/09/2009	06/11/2009	60	4	90	A	N	Concluída
FBC5748-3/2	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	02/03/2010	12/04/2010	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5793-9/2	Tópicos em Análises Clínicas I	08/03/2010	21/06/2010	30	2	100	A	N	Concluída
EDM5791-5/4	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	17/03/2010	30/06/2010	120	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBA5728-2/11	Aprimoramento Didático	20/04/2010	17/05/2010	60	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
VPS5717-4/5	Preparação Pedagógica (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	06/08/2010	15/10/2010	30	0	0	-	N	Matrícula cancelada
EDM5791-5/5	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	18/08/2010	30/11/2010	120	8	100	A	N	Concluída
QBQ5767-2/1	Perspectivas na Pesquisa com Células-Tronco (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	20/09/2010	27/09/2010	30	2	100	A	N	Concluída
BTC5780-1/2	Diferenciação de Células Tronco (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	04/05/2011	07/06/2011	60	4	90	A	N	Concluída
BMB5818-1/2	Praticando Análise de Proteínas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/08/2011	01/09/2011	60	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
MCM5716-5/3	Atualização em Diabetes Mellitus Tipo 1 e 2 e Síndrome Metabólica (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	26/09/2011	30/10/2011	75	0	0	-	N	Matrícula cancelada
QBQ5747-6/3	Animais de Laboratório (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	21/11/2011	30/11/2011	15	1	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	27
Estágios:			
Total:	0	20	27

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria nº 2878, de 26.08.2005.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Trancado de 11/11/2013 até 10/11/2014

Impresso em: 30/10/14 08:49:10