

**ALEXANDRE GÓES MARTINI**

**GQ-16, AGONISTA PARCIAL DE PPAR $\gamma$ ,  
DIMINUI PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MESANGIAIS HUMANAS**

**Brasília, 2012**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR**

**ALEXANDRE GÓES MARTINI**

**GQ-16, AGONISTA PARCIAL DE PPAR $\gamma$ ,  
DIMINUI PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MESANGIAIS HUMANAS**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília.

**Orientador:** Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves

**Brasília, 2012**

**ALEXANDRE GÓES MARTINI**

**GQ-16, AGONISTA PARCIAL DE PPAR $\gamma$ ,  
DIMINUI PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MESANGIAIS HUMANAS**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília.

Aprovada em: 02 de OUTUBRO de 2012.

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves**

Universidade de Brasília – UnB (orientador)

**Prof. Dr. Alúzio da Costa e Silva**

SOCLIMED

**Prof. Dr. Guilherme Martins Santos**

Universidade de Brasília – UnB (membro)

**Prof. Dra. Maria de Fátima Borin**

Universidade de Brasília – UnB (suplente)

*À minha mãe, Ana Góes, e às minhas tias por seu amor incondicional e princípios inabaláveis que regem minha vida.*

*À minha querida esposa, Luciana, por seu amor e paciência de ter me dividido com uma tese por dois anos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Muitos foram os empecilhos existentes por toda esta longa trajetória. As dúvidas, as incertezas, o cansaço fizeram-se constantemente de companheiros inseparáveis. Todavia, a certeza da vitória, a paciência nos momentos difíceis e a ajuda incondicional de alguns foram fundamentais.

Dessa forma, agradeço primeiramente a Deus, que manteve minha serenidade, guiando meus pensamentos e passos por esta longa trilha.

Agradeço ao professor Francisco, meu orientador, por seus esforços incessantes para que eu sempre prosseguisse, mesmo quando isto parecia impossível. Pelo exemplo de dedicação e modelo de profissional, me apresentando o mundo da ciência que tanto sonhei.

À amiga Caroline Lima, com sua perseverança e serenidade, dividindo angústias e me fazendo continuar, apesar dos fracassos. Ao amigo Maurício Daher, colega médico, que me ensinou PCR.

À professora Angélica, por sua paciência e conselhos valiosos. À professora Marie Togashi, pela experiência e conhecimentos que tanto admiro. A professora Michela Soares Coelho, pela dedicação e ensinamentos. À Cristina, por sempre me sentir confortável, mesmo em momentos difíceis. A Rilva, pelos primeiros passos em um mundo novo.

E, em especial, a todos os amigos do Farmol, Pedro, Flora, Maíra, Carine, Carol, Mariela, Natália, que dividiram esperanças, decepções, alegrias e tristezas nesta empreitada.

*“A ciência é construída de fatos, assim como uma casa, de pedras. Mas um conjunto de fatos não é ciência, da mesma forma que um montão de pedras não é uma casa.”*

*(Henri Poincaré)*

## RESUMO

As Células Mesangiais – CM participam do controle da filtração glomerular, da depuração de substâncias e produção da matriz extracelular. A proliferação das CMs e aumento de matriz estão associados à fisiopatogenia das glomerulopatias. Sabe-se que o Fator de Necrose Tumoral – TNF- $\alpha$  induz proliferação mesangial e que as Tiazolidinedionas – TZDs, agonistas dos Receptores Proliferadores Peroxisomais Ativados gama – PPAR $\gamma$ , utilizados no tratamento da diabetes mellitus, melhoram a resistência à insulina e são eficazes na prevenção da progressão de doença renal em diferentes modelos experimentais. Esta proteção parece ser secundária ao efeito anti-inflamatório das TZDs. Infelizmente, estes ligantes também apresentam efeitos colaterais indesejáveis, tais como ganho de peso, edema e cardiotoxicidade. Recentemente, foi desenvolvido um novo agonista parcial de PPAR $\gamma$ , o GQ-16 que apresenta atividade anti-diabética semelhante a outras TZDs, mas sem induzir ganho de peso ou edema. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo investigar se o GQ-16 diminui a proliferação mesangial induzida por TNF- $\alpha$ . Nossos resultados mostram que o GQ-16 reduz significativamente a proliferação celular induzida pelo TNF- $\alpha$ , em um padrão de curva dose resposta, semelhante à rosiglitazona e pioglitazona, além de reduzir a atividade transcricional do promotor do TNF- $\alpha$ , também em um padrão de curva dose resposta. Foi avaliado o efeito antifibrótico, pela expressão de mRNA de TGF- $\beta$  e, embora nossos resultados não tenham apresentado significância estatística, foram similares à rosiglitazona. Concluímos que o GQ-16 é um modulador seletivo de PPAR $\gamma$  e apresenta um efeito antiproliferativo, antiinflamatório e, possivelmente, antifibrótico semelhante à rosiglitazona.

**Palavras-chave:** GQ-16; PPAR $\gamma$ ; células mesangiais; rosiglitazona; pioglitazona.

## ABSTRACT

Mesangial cells – MC participate in the control of glomerular filtration, clearance of substances and extracellular matrix production. The proliferation of MCs and increased extracellular matrix are associated with the pathogenesis of glomerulopathies. It is known that the tumor necrosis factor – TNF- $\alpha$  induces mesangial proliferation and thiazolidinediones – TZDs, agonists of peroxisomal proliferator activated receptor gamma – PPAR $\gamma$  used in the treatment of diabetes mellitus, improve insulin resistance and are effective in preventing the progression of renal disease in different experimental models. This protection seems to be secondary to the anti-inflammatory effect of thiazolidinediones. Unfortunately, these ligands also have undesirable side effects such as weight gain, edema and cardiotoxicity. Recently, it was developed a new PPAR $\gamma$  partial agonist, the GQ-16, which has similar anti-diabetic activity to other thiazolidinediones, but without inducing weight gain or edema. Thus, this study aims to investigate whether the GQ-16 decreases mesangial proliferation induced by TNF- $\alpha$ . Our results show that the GQ-16 significantly reduces cell proliferation induced by TNF- $\alpha$  in a standard dose response curve, similar to rosiglitazone and pioglitazone, in addition to reducing the transcriptional activity of the promoter of TNF- $\alpha$ , also in a standard dose response curve. We evaluated the anti-fibrotic effect through the mRNA expression of TGF- $\beta$  and although our results do not have statistical significance, were similar to rosiglitazone. We conclude that GQ-16 is a selective modulator of PPAR $\gamma$  and presents an antiproliferative, antiinflammatory and possibly antifibrotic effect similar to rosiglitazone.

**Keywords:** GQ-16, PPAR $\gamma$ , mesangial cells, rosiglitazone, pioglitazone.

## LISTA DE FIGURAS

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Figura 1 -  | Estrutura esquemática do glomérulo.....   | 16 |
| Figura 2 -  | Estrutura geral dos receptores nucleares, com a representação dos domínios funcionais.....  | 20 |
| Figura 3 -  | Regulação gênica pelo PPAR $\gamma$ .....   | 21 |
| Figura 4 -  | Estrutura química do GQ-16 e outras TZDs.....   | 26 |
| Figura 5 -  | Propriedades GQ-16.....   | 27 |
| Figura 6 -  | Posição e orientação do GQ-16 e rosiglitazona na ligação à região LBD.....  | 28 |
| Figura 7 -  | Vetor de expressão de expressão (TNFRE $_3$ )-TK Luc, que contém três cópias da porção -125/-82 do promotor do TNF- $\alpha$ (sequências de -32/+45) seguido do promotor mínimo da timidina kinase do vírus herpes simples..... | 30 |
| Figura 8 -  | Incorporação de $^3\text{H}$ -timidina.....   | 39 |
| Figura 9 -  | Em células mesangiais GQ-16 reprime a atividade transcricional do promotor do TNF- $\alpha$ .....   | 40 |
| Figura 10 - | Genes alvo (TGF- $\beta$ 1) e controle ( $\beta$ -actina) apresentam eficiência de amplificação equivalente.....  | 42 |
| Figura 11 - | As sequências de <i>primers</i> escolhidos apresentam especificidade de amplificação.....   | 43 |
| Figura 12 - | Expressão relativa de mRNA de TGF- $\beta$ 6 horas após tratamento com rosiglitazona ou GQ-16, na ausência de TNF- $\alpha$ .....   | 44 |
| Figura 13 - | Expressão relativa de mRNA de TGF- $\beta$ 12 horas após tratamento com rosiglitazona ou GQ-16, na ausência de TNF- $\alpha$ .....  | 45 |
| Figura 14 - | Expressão relativa de mRNA de TGF- $\beta$ 6 horas após tratamento com rosiglitazona, GQ-16 e TNF- $\alpha$ .....   | 46 |
| Figura 15 - | Expressão relativa de mRNA de TGF- $\beta$ 12 horas após tratamento com rosiglitazona, GQ-16 e TNF- $\alpha$ .....  | 47 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                 |  |
|-----------------|--|
| $\mu$ U         | - Massa Unitária                                   |
| AGE             | - <i>Advanced Glycation End Products</i>           |
| Ang II          | - Angiotensina II                                  |
| AP-1            | - Proteína Ativadora 1                             |
| BRA             | - Bloqueador do Receptor de Angiotensina II tipo 1 |
| Cdk-5           | - Quinase Ciclina Dependente 5                     |
| cDNA            | - Ácido Desoxirribonucleico complementar           |
| CO <sub>2</sub> | - Gás Carbônico                                    |
| CPM             | - Contagem por Minuto                              |
| Ct              | - <i>Cycle threshold</i>                           |
| DBD             | - Domínio de Ligação ao DNA                        |
| DEPC            | - Dietilpirocarbonato                              |
| dL              | - Decilitro  |
| DM1             | - Diabetes Mellitus tipo 1                         |
| DM2             | - Diabetes Mellitus tipo 2                         |
| DMEM            | - <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>          |
| DMSO            | - Dimetilsulfóxido                                 |
| DNA             | - Ácido Desoxirribonucleico                        |
| ESRD            | - <i>End Stage Renal Disease</i>                   |
| EUA             | - Estados Unidos da América                        |
| FDA             | - <i>Food and Drug Administration</i>              |
| GLUT4           | - Transportador de Glicose tipo 4                  |
| HAS             | - Hipertensão Arterial Sistêmica                   |
| ICAM            | - Molécula de Adesão Intercelular                  |
| IECA            | - Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina    |
| IL              | - Interleucina                                     |
| LBD             | - Domínio de Ligação ao Ligante                    |
| MAPK            | - Proteínas Quinases Ativadoras de Mitose          |
| mg              | - Miligrama  |
| mL              | - Mililitro  |
| mRNA            | - Acido ribonucleico mensageiro                    |

|               |   |
|---------------|---|
| MS            | - Ministério da Saúde                               |
| ND            | - Nefropatia diabética                              |
| nm            | Nanômetro   |
| OMS           | - Organização Mundial de Saúde                      |
| PBS           | - Tampão de Fosfato Salino                          |
| PDGF          | - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas        |
| PIO           | - Pioglitazona                                      |
| PKC           | - Proteína Quinase C                                |
| PPAR          | - Receptor Ativado dos Proliferadores Peroxissomais |
| PPRE          | - Elemento Responsivo do PPAR                       |
| ROSI          | - Rosiglitazona                                     |
| RT-PCR        | - Reação da Cadeia de Polimerase em Tempo Real      |
| RXR           | - Receptor do Ácido Retinóico X                     |
| SFB           | - Soro Fetal Bovino                                 |
| SRA           | - Sistema Renina Angiotensina                       |
| STAT          | - Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição     |
| TGF- $\beta$  | - Fator Transformador de Crescimento- $\beta$       |
| TNF- $\alpha$ | - Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$                |
| TZD           | - Tiazolidinedionas                                 |
| UFPE          | - Universidade Federal de Pernambuco                |
| UnB           | - Universidade de Brasília                          |
| UNIFESP       | - Universidade Federal de São Paulo                 |
| USRDS         | - <i>United States Renal Data System</i>            |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>13</b> |
| 1.1 DIABETES MELLITUS .....  | 13        |
| 1.2 NEFROPATIA DIABÉTICA .....   | 14        |
| 1.3 ANATOMIA E ESTRUTURA FUNCIONAL DO RIM.....                                     | 14        |
| 1.4 TIAZOLIDINEDIONAS .....  | 17        |
| 1.5 RECEPTORES ATIVADOS DE PROLIFERADORES PEROXISSOMAIS.....                       | 19        |
| 1.6 PPAR $\gamma$ E RIM.....   | 22        |
| 1.7 EFEITOS COLATERAIS DOS AGONISTAS DE PPAR $\gamma$ .....                        | 24        |
| 1.8 NOVOS AGONISTAS DE PPAR $\gamma$ .....   | 25        |
| 1.9 GQ-16 .....  | 26        |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....   | <b>29</b> |
| 2.1 OBJETIVO GERAL .....   | 29        |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 29        |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | <b>30</b> |
| 3.1 PLASMÍDEOS.....  | 30        |
| 3.2 CULTURA DE CÉLULAS MESANGIAIS.....   | 30        |
| 3.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR POR INCORPORAÇÃO DE METIL-<br>3H-TIMIDINA ..... | 31        |
| 3.4 TRANSFEÇÃO E ENSAIOS DE GENE REPÓRTER COM A ENZIMA<br>LUCIFERASE .....         | 32        |
| 3.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RNA MENSAGEIRO (mRNA) DE TGF- $\beta$ .              | 33        |
| 3.6 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL .....  | 33        |
| 3.7 QUANTIFICAÇÃO, PUREZA E INTEGRIDADE DO RNA TOTAL .....                         | 34        |
| 3.8 TRANSCRIÇÃO REVERSA E AMPLIFICAÇÃO POR PCR QUANTITATIVO .                      | 34        |
| 3.9 VALIDAÇÃO DOS PRIMERS .....  | 35        |
| 3.9.1 Curva de eficiência relativa dos <i>primers</i> .....                        | 35        |
| 3.9.2 Curva de dissociação dos <i>primers</i> .....                                | 36        |
| 3.10 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO mRNA DO TGF- $\beta$ .....                          | 36        |
| 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....  | 37        |
| <b>4 RESULTADOS</b> .....  | <b>38</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.1 AVALIAÇÃO DO GQ-16 SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MESANGIAIS FRENTE AO TNF- $\alpha$ .....                   | 38        |
| 4.2 EFEITO DO GQ-16 SOBRE O PROMOTOR DO TNF- $\alpha$ (SEQUÊNCIAS DE -32/+45 (TNFRE <sub>3</sub> ) – TK Luc ..... | 39        |
| 4.3 EFEITO DO GQ-16 SOBRE A EXPRESSÃO DO mRNA DO TGF- $\beta$ EM CÉLULAS MESANGIAIS HUMANAS IMORTALIZADAS.....    | 41        |
| 4.3.1 Análise da eficiência relativa dos <i>primers</i> .....   | 41        |
| 4.3.2 Análise da especificidade dos <i>primers</i> .....  | 43        |
| 4.3.3 Análise do efeito do GQ-16 na expressão de mRNA de TGF- $\beta$ .....                                       | 44        |
| <b>5 DISCUSSÃO .....</b>  | <b>48</b> |
| <b>6 SUMÁRIO E CONCLUSÃO .....</b>  | <b>54</b> |
| 6.1 SUMÁRIO .....   | 54        |
| 6.2 CONCLUSÃO .....   | 54        |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>55</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DIABETES MELLITUS

Diabetes Mellitus – DM é um grupo de doenças metabólicas, caracterizado por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. O estado de hiperglicemia crônica está associado a danos a longo termo em vários órgãos, especialmente, os olhos, nervos, rins, coração e vasos sanguíneos [1]. Considera-se hoje que a doença é o estágio final de uma síndrome crônica e progressiva cujas anormalidades na secreção de insulina pela célula beta pancreática e na resistência insulínica muscular, hepática e do tecido adiposo iniciam-se anos antes do diagnóstico clínico e são causados por componentes genéticos e adquiridos do meio ambiente [2].

Nas últimas décadas, o DM tem se tornado um sério e crescente problema de saúde pública em todo o mundo, devido ao aumento de sua prevalência, morbidade e mortalidade [3]. De acordo com a *American Diabetes Association*, a prevalência de DM nos Estados Unidos da América – EUA é de 25,8 milhões de pessoas, correspondendo a 8,3% da população daquele país [4]. Segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS, a prevalência de DM em todo o mundo atingiu a cifra de 346 milhões de pessoas [5]. No Brasil, relatos do Ministério da Saúde – MS mostram uma prevalência de 9,5% da população brasileira acima de 35 anos [6].

Pode-se classificar o DM em dois tipos: I) tipo 1, em que se predomina uma deficiência absoluta de insulina, advinda da destruição das células beta pancreáticas; II) tipo 2, em que há resistência insulínica, com deficiência relativa de insulina [1]. A percentagem de DM tipo 1 é de 5-10%, sendo o tipo II responsável por 90-95% dos casos [7]. A incidência e prevalência da DM tipo 2 têm aumentado em todo o mundo desde a década de 80, enquanto, a de DM tipo 1 está estabilizada há vários anos [8]. A resistência insulínica precede e prediz a DM tipo 2. Embora, exercícios e perda ponderal amenizem a resistência insulínica e possam, em alguns casos, prevenir ou retardar o início da DM, faz-se necessária terapia medicamentosa naqueles que não modifiquem seu estilo de vida [9].

## 1.2 NEFROPATIA DIABÉTICA

A nefropatia diabética é a complicação mais comum do DM, contribuindo com aproximadamente 40% dos casos de Doença Renal Crônica Terminal (em inglês, *End Stage Renal Disease*, ESRD) [10]. É definida como uma síndrome clínica associada com proteinúria (perda de proteínas pela urina, acima de 300 mg/24 horas), Hipertensão Arterial Sistêmica – HAS e declínio da função renal [11]. Sua patogênese é complexa, e a hiperglicemia é um dos fatores mais importantes para ativação das vias patogênicas, que incluem: hiperfiltração glomerular, HAS, formação dos produtos finais de glicosilação avançada (em inglês, *Advanced Glycation End Products*, AGE), vias de poliol, estresse oxidativo, ativação da Proteína Quinase C – PKC e liberação de citocinas e fatores de crescimento [12].

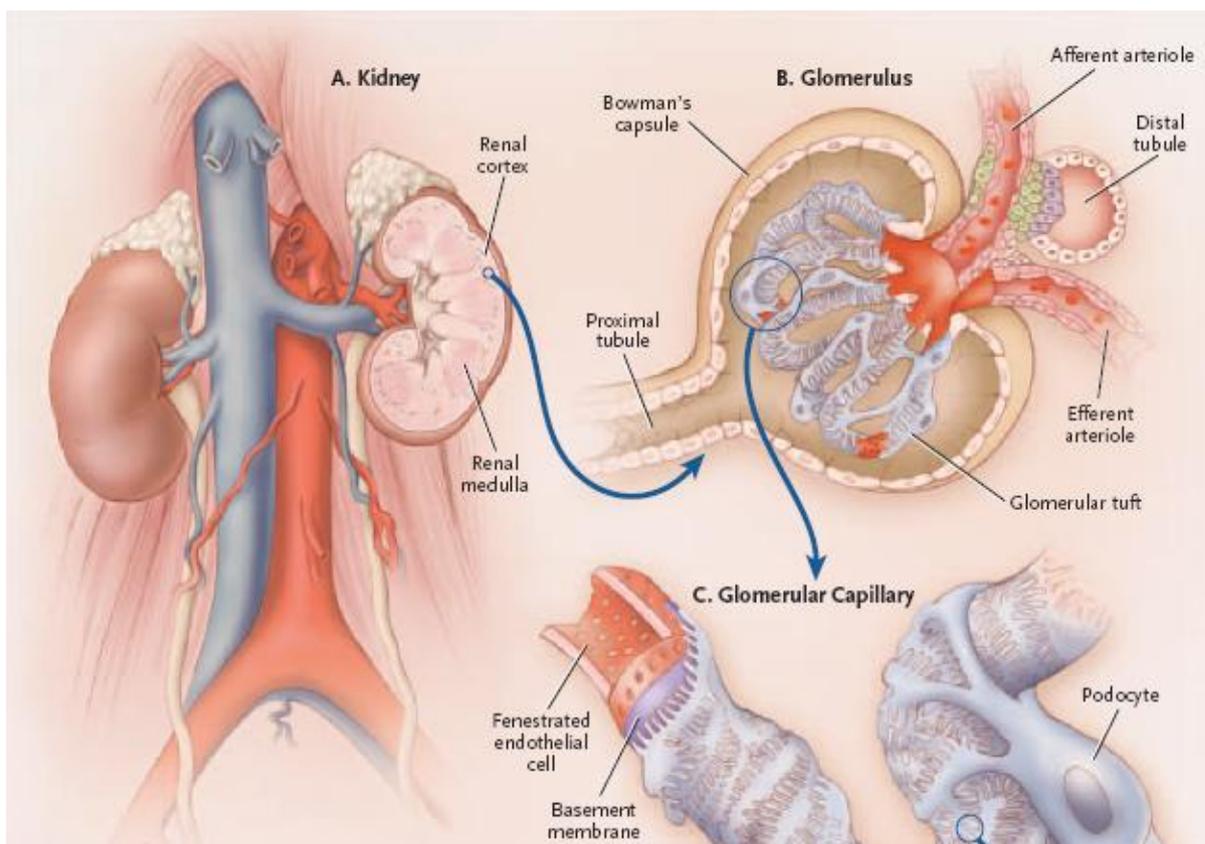
A hiperglicemia persistente provoca a glicosilação não-enzimática de proteínas (reação de Amadori), em que a glicose se liga aos grupos amino das proteínas. Com a progressão do processo, reações químicas lentas e irreversíveis, formam os AGE, que se acumulam em tecidos e células, tais como macrófagos, endotélio e células mesangiais – CM [13]. Estas células, então, passam a sintetizar citocinas, tais como IL-1 (Interleucina 1) e TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral alfa), que estimulam a proliferação das células mesangiais e a produção de matriz extracelular [14]. Foi demonstrado que a aminoguanidina, um inibidor da formação dos produtos finais de glicosilação avançada, previne a expansão mesangial e a progressão da nefropatia diabética nos modelos experimentais de DM [13]. Dachs e colaboradores perceberam que as primeiras alterações na Nefropatia Diabética – ND consistiam de aumento das fibras da matriz mesangial e do número de células mesangiais [15].

## 1.3 ANATOMIA E ESTRUTURA FUNCIONAL DO RIM

O rim é um órgão anatomicamente complexo, constituído de diferentes tipos de células altamente especializadas, organizadas em um padrão tridimensional. Sua unidade funcional é o nefrón, formado pelas seguintes porções: I) corpúsculo glomerular (Malpighi); II) túbulo contorcido proximal; III) alça de Henle; IV) túbulo

contorcido distal; V) túbulo coletor [16]. O corpúsculo de Malpighi se constitui de glomérulo e cápsula de Bowman, sendo responsável pela produção de um ultrafiltrado a partir do plasma sanguíneo, formado por pequenos solutos e água [17] (vide Figura 1).

O glomérulo é composto de um tufo de capilares, interposto entre as arteríolas aferente e eferente, e envolto pela cápsula de Bowman, formado por células contínuas com os próprios capilares glomerulares e as células do túbulo contorcido proximal. Assim, o filtrado glomerular deve atravessar a parede capilar glomerular, composta de três camadas: células endoteliais fenestradas, membrana basal glomerular e células podocitárias ou podócitos. As disfunções desta barreira levam a graus variáveis de proteinúria, podendo evoluir para insuficiência renal crônica [18-19].



A

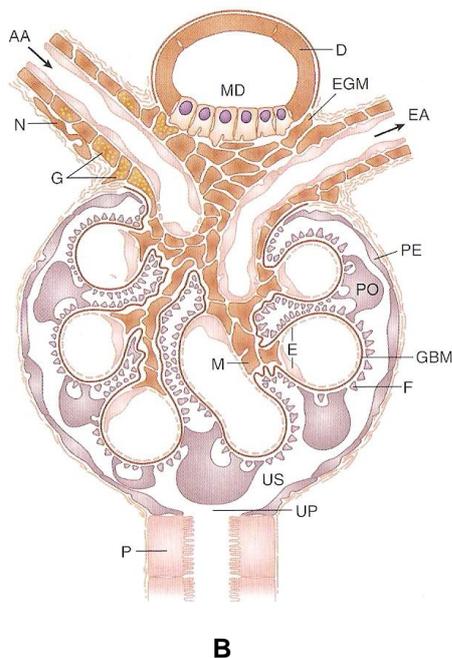


Figura 1 – Estrutura esquemática do glomérulo. Em (A) Corte coronal no rim; (B) Corte transversal no glomérulo. Para: AA – arteríola aferente; D – túbulo distal; E – célula endotelial; EA – arteríola eferente; GMB – membrana basal glomerular; M – célula mesangial; MD – mácula densa; P – túbulo proximal; PO – podócito; UP – polo urinário; US – espaço urinário [16].

Os capilares glomerulares são mantidos em posição por um arcabouço arboriforme de células e matriz que constituem o mesângio. As células mesangiais foram identificadas pela primeira vez por Zimmermann, em 1929, nos espaços intercapilares dos glomérulos. Apresentam um formato irregular, tendo microfilamentos similares a células musculares lisas, compostos de actina, alfa-actina e miosina [12]. Possuem função de suporte estrutural, participando de mecanismos de fagocitose e modulação da filtração glomerular, além de produzir agentes vasoativos, sintetizar e degradar a matriz mesangial [17]. São capazes de funções de reparo e proliferação, secretando fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, de ação autócrina, respondendo, durante injúrias glomerulares imune ou não imune mediadas, com aumento no número de células e matrix mesangial, frequentemente vistos em várias glomerulopatias, incluindo a nefropatia diabética [20-21].

Dentre os mediadores inflamatórios e fatores de crescimento que participam da injúria mesangial, promovendo proliferação mesangial, aumento de sua matriz e, distorção da arquitetura glomerular, destacam-se a IL-1, IL-6 (Interleucina 6), TNF- $\alpha$ , Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas – PDGF e TGF- $\beta$  (Fator de Crescimento Transformador beta) [14, 22-23]. O TNF- $\alpha$  é uma citocina codificada por um único gene, cujo efeito final é ativar fatores de transcrição como Fator Nuclear  $\kappa$ B – NF $\kappa$ B e *c-fos*, os quais induzem a transcrição e a expressão de vários genes relacionados à inflamação [24]. O TGF- $\beta$  é uma citocina multifuncional, envolvida na proliferação celular e na produção de matriz extracelular em um contexto autócrino e/ou parácrino [25]. Sua produção se correlaciona com a progressão de fibrose em diversos órgãos, tais como fígado, pulmão, coração e rim, ao estimular fibroblastos locais a sintetizar excessivamente componentes da matriz extracelular como colágeno e fibronectina [26].

#### 1.4 TIAZOLIDINEDIONAS

As Tiazolidinedionas – TZD ou glitazonas representam uma classe farmacológica atualmente empregada no tratamento da DM tipo 2, exercendo seus efeitos hipoglicemiantes através da redução da resistência a insulina [10]. Por muito tempo, apenas biguanidas como metformina, vinham sendo usadas para o tratamento da resistência insulínica, quando, em 1997, também se tornaram disponíveis as TZDs. Originalmente, foram desenvolvidas em 1980, no Japão, como antioxidantes. A observação de que o controle glicêmico melhorava na ausência de aumento de insulina, e a falta de efeito em animais deficientes de insulina, levou a conclusão de que se tratava de fármacos “sensibilizadores de insulina”. Com o uso das TZDs, os pacientes diabéticos obtinham um decréscimo médio de 40 mg/dL em seus níveis de glicemia de jejum, acompanhado por uma redução da insulinemia de jejum variando de 2 a 10  $\mu$ U/mL [27]. Apresentam, como característica de sua estrutura química, um anel diona, enquanto o restante da molécula difere entre as drogas do grupo, sendo responsável pela especificidade farmacodinâmica e farmacocinética. Atualmente, há somente dois fármacos do grupo disponíveis no mercado: a pioglitazona e a rosiglitazona [28].

Embora o mecanismo exato pelo qual as TZDs melhorem a sensibilidade periférica à insulina e reduzam os níveis de glicemia não seja totalmente compreendido, algumas considerações fazem-se mister. Elas exercem seus efeitos ao se ligarem ao fator de transcrição do receptor ativado por Receptores dos Proliferadores Peroxissomais gama – PPAR $\gamma$  [29]. Estes são essenciais para a diferenciação do adipócito normal, bem como captação e armazenamento de ácidos graxos. As TZDs aumentam o número de pequenos adipócitos e a massa de tecido adiposo subcutâneo em estudos de animais [9]. Baseados em dados de modelos de *knock out* de camundongos, o tecido adiposo é o local mais importante de ação das TZDs [9], com sua ação de sensibilizador de insulina exercida de forma direta, ao evitar o acúmulo de gordura em outros tecidos [30], ou indireta, regulando citocinas (adipocinas) que afetam o metabolismo energético do corpo, promovendo resistência insulínica [31]. A diminuição da expressão e secreção destas adipocinas, entre elas o TNF- $\alpha$ , a IL-6 e a IL-1, ocorre por inibição da atividade transcricional de fatores de transcrição pro inflamatórios, tais como NF $\kappa$ B, Proteína Ativadora 1 (AP-1) e Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição – STAT [32-33].

Além disso, as glitazonas teriam um benefício no metabolismo, ao aumentar os adipócitos em número e forma, incrementando sua capacidade de armazenar lipídeos e protegendo outros tecidos contra os efeitos deletérios das gorduras. Ademais, alterariam a produção de hormônios que regulam parâmetros metabólicos em outros tecidos e órgãos, tais como músculos, fígado e pâncreas [31]. As TZDs também aumentam a utilização de glicose no músculo, ativando a expressão gênica do Transportador de Glicose tipo 4 (GLUT-4), uma proteína de membrana que permite a entrada de glicose para o interior da célula [34]. Elas também reprimem a gliconeogênese hepática, assim como a metformina, mas ao contrário desta, diminuem o teor hepático de gordura [29].

As TZDs têm um amplo espectro de ação, incluindo modulação da homeostase dos glicídeos e lipídeos, inflamação, aterosclerose, remodelamento ósseo e proliferação celular [29]. A descoberta dos PPARs aconteceu em 1990, quando Issemann e Green observaram que certos compostos industriais podiam se ligar a receptores nucleares, causando aumento de volume e densidade em peroxissomos hepáticos de roedores. Embora os ligantes e agonistas de PPARs não induzam proliferação de peroxissomo em humanos, eles têm atraído grande atenção

nos últimos anos, devido a sua regulação transcricional de vias do metabolismo, inflamação e aterosclerose [35-36].

### 1.5 RECEPTORES ATIVADOS DE PROLIFERADORES PEROXISSOMAIIS

Os Receptores Ativados de Proliferadores Peroxissomais (PPARs) são uma subfamília de 48 membros da superfamília dos receptores nucleares, e regulam a expressão gênica em resposta ao acoplamento com ligantes [9]. A estrutura geral dos receptores nucleares é altamente conservada, consistente com um conjunto de domínios funcionais comuns. Há um domínio N-terminal variável – A/B, um domínio DNA-ligante conservado – DBD, que contém estruturas conhecidas como dedos de zinco, uma região de dobradiça – D, e uma região C-terminal – E/F, que contém o Domínio de Ligação ao Ligante – LBD [37]. A estrutura tridimensional do LBD é semelhante à de outros receptores nucleares, e consiste de doze hélices alfa e quatro folhas beta pregueadas (em inglês,  *$\beta$ -sheet*) [38] [39], que delineiam um bolso (*pocket*) de ligação hidrofóbico, em forma de Y [40]. Existem dois sítios funcionais de ativação: AF-1 e AF-2. O primeiro é o domínio N-terminal, ligante independente, enquanto o segundo está localizado no LBD, mais precisamente na hélice alfa 12 (H12), sendo dependente de ligante [37, 40].

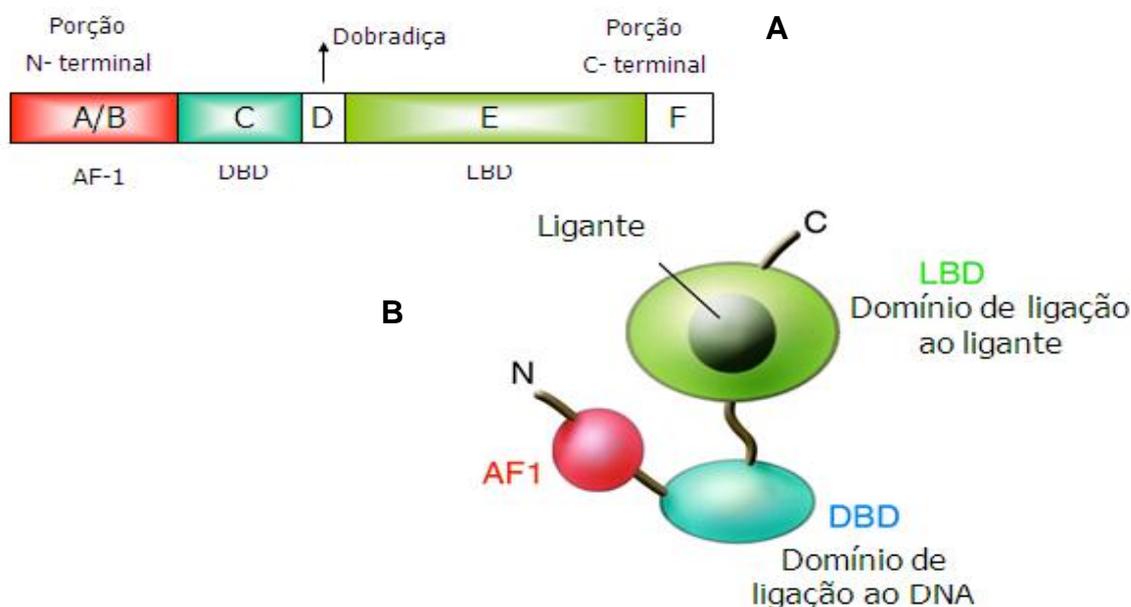


Figura 2 – Estrutura geral dos receptores nucleares, com a representação dos domínios funcionais. Para: A – Estrutura primária, com a representação da região amino-terminal (domínio A/B, em que se encontra o domínio função de ativação 1 ou AF-1, implicado na transativação independente do ligante), domínio de ligação ao DNA (DBD, domínio C), região de dobradiça (hinge, domínio D), região carboxi-terminal ou domínio de ligação ao ligante (LBD, domínio E), e domínio F; B – Estrutura secundária, com a representação das regiões amino (N) e carboxi-terminais (C), AF-1, DBD e LBD [41].

Os PPARs regulam a transcrição gênica principalmente por dois mecanismos: a transativação e a transrepressão [9]. Ao ativar a expressão gênica, eles se heterodimerizam com outro receptor nuclear, o Receptor Retinóide X – RXR [42]. O heterodímero PPAR-RXR se liga a sequências específicas de Ácido Desoxirribonucleico – DNA localizadas na região regulatória ou promotora de genes-alvo, conhecidas como elementos responsivos ao PPAR – PPREs, e, quando ativado por agonistas, estimula a transcrição gênica [43]. Na ausência do ligante, o heterodímero PPAR-RXR está constitutivamente ligado ao PPRE, e associado a proteínas corressoras, que mantêm a cromatina em sua forma enovelada, o que impede o recrutamento da maquinaria de transcrição e resulta em repressão ativa da transcrição gênica, denominada repressão basal [44]. A ligação de um agonista ao receptor altera sua conformação, com estabilização e fechamento da H12 [45], permitindo a dissociação coordenada dos corressores e a associação com proteínas coativadoras, recrutando a maquinaria de transcrição para o promotor do gene-alvo e, assim, o início da transcrição gênica [46-47].

A transrepressão não envolve a ligação direta do receptor a elementos responsivos no DNA [48]. Essa atividade dos PPARs não é completamente compreendida, e diversos mecanismos são propostos para explicá-la, entre eles a inibição da ação de outros fatores de transcrição que estimulam a expressão de genes da resposta inflamatória. Nesse modelo, a interação direta entre os PPARs ativados e esses fatores de transcrição inibiria sua ligação aos elementos responsivos no promotor de genes-alvo e, assim, resultaria em redução da transcrição desses genes. A regulação negativa da expressão gênica é a forma com que os PPARs reprimem a transcrição de genes que codificam proteínas com atividade pró-inflamatórias [46]. Há evidências de que nem todos os ligantes de PPAR estimulem as vias de transativação ou transrepressão de maneira similar, tendo sua importância diferenciada entre os variados tecidos [49].

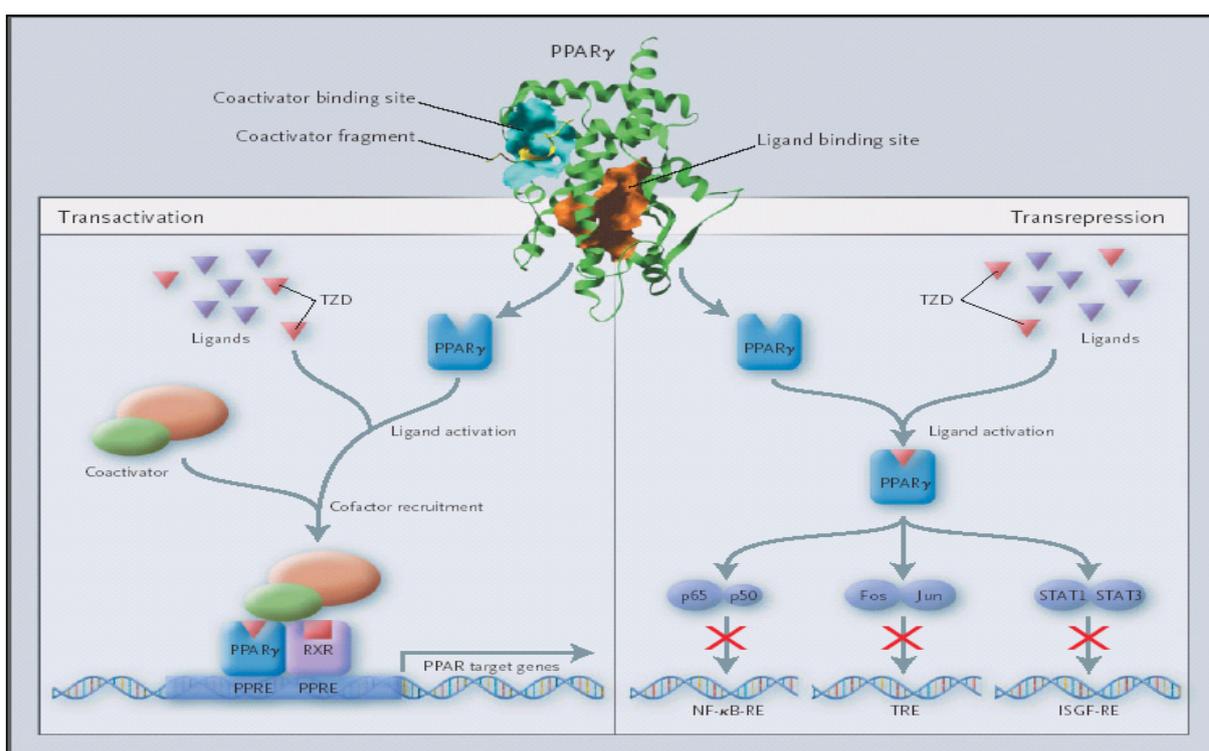


Figura 3 – Regulação gênica pelo PPAR $\gamma$ . Na presença do ligante (TZD) PPAR $\gamma$  promove ativação de genes-alvo, ligando-se diretamente ao DNA (esquerda), repressão de genes-alvo, PPAR $\gamma$ , associando-se a outras proteínas, as quais ligam-se diretamente ao DNA (direita) [9].

Há três isoformas de PPAR:  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$ , cada uma codificada por um gene distinto. Eles variam em sua distribuição por diferentes tecidos, além da responsividade a ligantes, levando à regulação de variados conjuntos de genes [29]. O PPAR $\alpha$  foi o primeiro membro da subfamília de PPAR identificado. Está expresso abundantemente em tecidos com alta atividade de oxidação de ácidos graxos, incluindo fígado, rim, intestino, coração e tecido adiposo marrom [50]. Ligantes endógenos, ácidos graxos poliinsaturados e, sintéticos, os fibratos, ativam o PPAR $\alpha$ , regulando a transcrição de genes envolvidos no metabolismo lipídico e resposta inflamatória [51]. PPAR $\beta/\delta$  parece ser expresso ubiquamente em pequenos níveis em quase todos os tecidos [52], estando envolvido no metabolismo lipídico e no controle metabólico [53]. O PPAR $\gamma$  é expresso predominantemente no tecido adiposo e, em pequenas quantidades no estômago, intestino, bexiga, rim, baço, adrenal, fígado, pulmão, cérebro, coração e vasos sanguíneos [50].

Com todos os possíveis efeitos clínicos dos ligantes sintéticos de PPAR, o papel destes receptores nucleares em várias patologias, inclusive nefropatias, tem sido frequentemente investigado [35] [54]. Todas as três isoformas são funcionalmente expressas no rim. PPAR $\alpha$  é encontrado sobretudo nas células epiteliais do túbulo proximal e porção espessa da alça de Henle, com menores níveis nas células mesangiais. PPAR $\gamma$  é fortemente expresso no epitélio dos dutos coletores, com uma expressão um pouco menor no mesângio, endotélio, podócitos, células do túbulo contorcido proximal e fibroblastos do interstício. Já o PPAR $\beta/\delta$  distribui-se difusamente pelo córtex e medula renal [55] [56].

## 1.6 PPAR $\gamma$ E RIM

Evidências crescentes têm demonstrado efeitos protetores da ativação do PPAR $\gamma$  em diversas doenças renais, inclusive nefropatia diabética [57-58]. Os mecanismos responsáveis por isso, provavelmente estão envolvidos com o controle metabólico sistêmico, além de ações diretas no rim. Os conhecidos efeitos de melhorar a resistência insulínica e diminuir citocinas proinflamatórias traduzem um melhor controle glicêmico no paciente diabético, lentificando, portanto, a progressão da nefropatia diabética [59].

Em vários ensaios clínicos, a terapia com glitazona em pacientes portadores de DM tipo 2 reduziu significativamente a microalbuminúria, uma forma incipiente de proteinúria, considerado um dos sinais mais precoces de disfunções microvasculares, entre elas, a nefropatia diabética [60] [61]. Comparado a outros agentes anti-hiperglicemiantes, as TZDs produziram um controle glicêmico semelhante, mas aparentando prover um maior efeito nefroprotetor, ao induzir uma redução dos níveis de proteinúria em pacientes diabéticos [62]. Curiosamente, um estudo demonstrou que a telmisartana, um bloqueador do receptor 1 de angiotensina II (BRA), um anti-hipertensivo usado no tratamento da nefropatia diabética, é também, um agonista de PPAR $\gamma$ , sugerindo uma nefroproteção adicional dos BRA [63].

A ativação do PPAR $\gamma$  parece exercer um efeito também no controle da pressão arterial sistêmica, através da atenuação de enzimas do Sistema Renina-Angiotensina – SRA, espécies reativas de oxigênio e proteínas quinases ativadoras de mitose – MAPK [64]. Em células mesangiais e endoteliais glomerulares, os agonistas de PPAR $\gamma$  reprimiram a expressão da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), do NF $\kappa$ B e o do TGF- $\beta$ , provendo um efeito anti-inflamatório [65-66]. Em células epiteliais do túbulo contorcido proximal, a ativação do PPAR $\gamma$  exerceu efeitos antifibróticos, ao atenuar o aumento de AP-1, TGF- $\beta$  e fibronectina, uma das proteínas constituintes da matrix mesangial [67].

Um dos efeitos interessantes da ativação do PPAR $\gamma$  veio de estudos em carcinoma renal, onde se constatou que os seus agonistas inibiam a proliferação das células cancerígenas, modificando diretamente a sinalização do ciclo celular [68]. Em células mesangiais, houve um efeito antiproliferativo, quando os agonistas de PPAR $\gamma$  bloquearam substancialmente a atividade da MAPK induzida pelos AGE [69-70]. Além disso, outros estudos com modelos não diabéticos demonstraram que as injúrias podocitárias, relacionadas ou não à esclerose, foram atenuadas sob tratamento com agonistas de PPAR $\gamma$  tanto *in vitro* [71], quanto *in vivo* [72], agindo como regulador positivo da transcrição do gene da nefrina [73].

## 1.7 EFEITOS COLATERAIS DOS AGONISTAS DE PPAR $\gamma$

Desta forma, os agonistas de PPAR $\gamma$  podem reduzir a proteinúria e retardar a progressão da glomerulosclerose em pacientes com DM e em modelos animais de doença renal crônica experimental. Devido a estes efeitos nefroprotetores, o PPAR $\gamma$  representa um alvo farmacológico promissor, no tratamento de doenças glomerulares fibróticas, especialmente a nefropatia diabética. Entretanto, o uso das TZDs têm se associado com diversos efeitos adversos. A troglitazona, a primeira glitazona aprovada para uso clínico, foi retirada do mercado em 1999, devido hepatotoxicidade [9]. Entretanto, estudos posteriores observaram que a toxicidade hepática não era relacionada à classe farmacológica [9].

Em 2007, Nissen e Wolski publicaram um estudo que implicava a rosiglitazona com um maior risco de infarto agudo do miocárdio e morte de causas cardiovasculares [74]. Por conseguinte, o *Food and Drug Administration* – FDA restringiu o uso da rosiglitazona a certos pacientes e adicionou uma etiqueta de alerta sobre seus riscos [75]. Esse estudo acabou por levar a retirada da rosiglitazona do mercado em vários países, inclusive o Brasil [76]. Além dessas, outras complicações foram descritas, tais como: ganho ponderal, edema periférico, insuficiência cardíaca congestiva, fraturas ósseas e câncer de bexiga; este último, com a pioglitazona [29]. Com relação à sobrecarga hídrica, ela se deve, sobretudo a um *up-regulation* dos canais de sódio nos túbulos renais [77], correspondendo a aproximadamente 75% do ganho ponderal durante o uso das TZDs, havendo ainda muitas controvérsias se este efeito pode ser revertido apenas com uso de diuréticos [36, 78]. Outrossim, um consenso da *American Heart Association* e *American Diabetes Association* recomenda que as glitazonas sejam prescritas em pacientes diabéticos sem doença cardíaca estabelecida e, com cautela, nos pacientes com fatores de risco para insuficiência cardíaca congestiva [79].

## 1.8 NOVOS AGONISTAS DE PPAR $\gamma$

Os efeitos metabólicos das glitazonas são primariamente resultado da regulação transcricional nos adipócitos e outros tecidos, incluindo macrófagos, que afetam a sensibilidade à insulina em todo o corpo. Um melhor entendimento das ações desses fármacos pode proporcionar o desenvolvimento de agentes mais seguros, que visem o PPAR $\gamma$ , preservando suas ações sobre a resistência insulínica, sem apresentar efeitos colaterais deletérios [80]. Recentemente, Choi *et al.* relataram que as glitazonas ativam o PPAR $\gamma$  por inibir sua fosforilação no resíduo de serina da posição 273 (S273) do PPAR $\gamma$  pela Quinase Ciclina-Dependente 5 – Cdk5. Assim, de forma diferente que se pensava anteriormente, a ativação de PPAR é causada não somente pelo fechamento da H12, mas também pela inibição da fosforilação na S273, que promove uma alteração funcional do receptor, favorecendo o surgimento de obesidade e resistência insulínica [81]. Mais ainda, esse novo mecanismo de ação de ligantes de PPAR foi capaz de explicar porque alguns agonistas parciais de PPAR $\gamma$  melhoram a sensibilidade à insulina de forma semelhante aos agonistas totais como a rosiglitazona. A melhora depende muito da inibição da fosforilação da serina 273. Esta descoberta fortaleceu a busca pelo desenvolvimento de novas opções de agonistas de PPAR $\gamma$  que inibam a fosforilação.

Como descrito anteriormente, o mecanismo clássico pelo qual as TZDs ativam o PPAR $\gamma$  está bem estabelecido e envolve um fechamento da H12 na região LBD. Esta alteração cria uma fenda hidrofóbica na superfície do receptor, para o recrutamento de coativadores transcricionais de alta afinidade. Embora o mecanismo de ativação transcricional esteja bem elucidado, o raciocínio para a sensibilização à insulina ainda não foi completamente estabelecido [82]. De fato, na busca de novos compostos, inicialmente, desenvolveram-se agonistas de PPAR $\gamma$  mais completos, com melhor afinidade e especificidade, pois se acreditava que os efeitos adversos eram oriundos da ativação de genes não-específicos. Entretanto, uma maior potência aumentava não apenas os efeitos de sensibilização de insulina, como as próprias reações adversas. Os esforços, então, voltaram-se para o desenvolvimento de agonistas parciais, que determinam interação menos eficaz do

heterodímero PPAR-RXR com proteínas coativadoras e, assim, em ativação transcricional menos eficaz [47], os quais possuíssem a magnitude precisa do agonismo do PPAR $\gamma$  [82].

### 1.9 GQ-16

Diante do potencial farmacológico e terapêutico dos agonistas de PPAR $\gamma$ , da escassez de fármacos atualmente disponíveis no mercado, pesquisadores da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE sintetizaram e testaram novos ligantes de PPAR $\gamma$  [83]. Entre eles, o GQ-16 (5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona), uma nova TZD. A estrutura química do GQ-16 e das TZDs clássicas troglitazona, pioglitazona e rosiglitazona está apresentada na Figura 4.

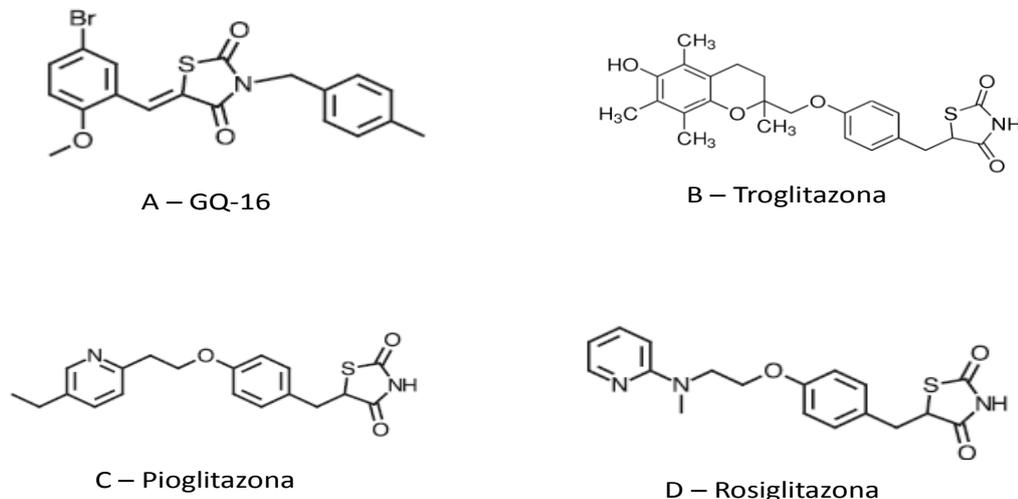


Figura 4 – Estrutura química do GQ-16 e outras TZDs.

Estudos realizados por Amato e cols demonstraram que GQ-16 é um agonista parcial de PPAR $\gamma$ , com propriedades anti-diabéticas em camundongos submetidos a dietas hiperlipídicas (vide Figuras 5A e 5B). Ademais, chama a atenção que GQ-16 é

específico para PPAR $\gamma$  e não é adipogênico em cultura de células mesenquimais (vide Figura 5E), não promove ganho de peso como a rosiglitazona (vide Figura 5C) e não induz a retenção de água, que por sua vez diminui os valores de hematócrito (vide Figura 5D) [81].

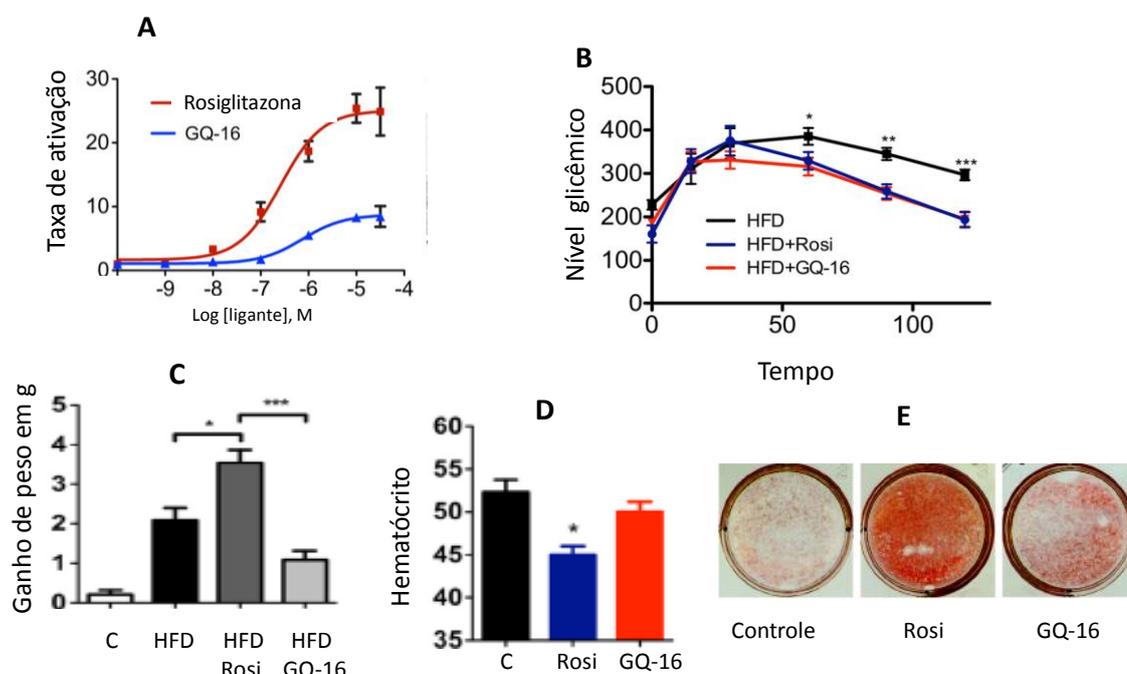


Figura 5 – Propriedades GQ-16. Para: A – Transativação do gene repórter baseado em PPAR $\gamma$  com rosiglitazona e GQ-16; B – Variação dos níveis glicêmicos em camundongos com dieta hiperlipídica (HFD), rosi e GQ-16; C – Alteração de peso promovido em camundongos com HFD e tratamento com rosi ou GQ-16; D – Alteração no hematócrito de camundongos em tratamento com rosi e GQ-16; E – Adipogênese induzida em células mesenquimais murinas, sob tratamento com rosi e GQ-16, indicada por coloração por Oil Red.

Fonte: [82].

É interessante observar que estudos *in vitro*, mostraram que o GQ-16 inibiu a fosforilação da serina 273 e que estudos estruturais evidenciaram que o seu acoplamento com o PPAR $\gamma$  acontece em um padrão bastante diferente da rosiglitazona. Enquanto o GQ-16 se liga ao LBD em uma direção paralela à hélice 3 (H3), a Rosi se liga de forma perpendicular. Esta interação permite ao GQ-16 não

fazer contato direto com nenhum resíduo da H12, uma propriedade reconhecida em agonistas totais (vide Figura 6) [82].

Em particular, o acoplamento do GQ-16 ao LBD do PPAR $\gamma$  foi mais eficiente em estabilizar a H3, a porção inferior da curva formada pelas hélices H11 e H12, bem como as regiões da folha beta pregueada em que se localizam a serina S273. Estes resultados sugerem que a eficácia *in vivo* do GQ-16 reside em sua propriedade de estabilizar tais regiões, protegendo a serina 273 da fosforilação mediada pela Cdk5 [81].

Desta forma, as características diferenciadas do GQ-16 são fundamentais para exibir suas propriedades de sensibilização de insulina, sem elicitar efeitos adversos clássicos de outras TZDs.

Considerando a pontencialidade do GQ-16 em exercer alguns dos efeitos terapêuticos de agonistas de PPAR $\gamma$ , resolvemos investigar se o GQ-16 é capaz de reprimir a atividade transcricional do promotor de TNF- $\alpha$  assim como a proliferação de células mesangiais de forma semelhante à rosiglitazona e pioglitazona.

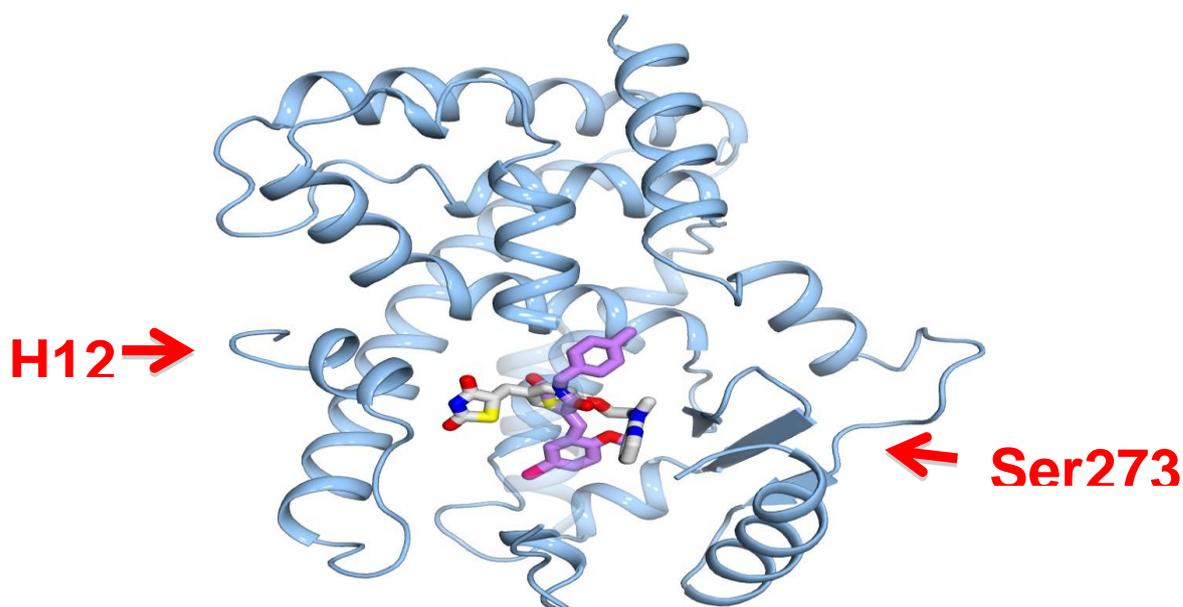


Figura 6 – Posição e orientação do GQ-16 (em lilás) e rosiglitazona (em branco, azul, amarelo e vermelho) na ligação à região LBD. A rosiglitazona se liga perpendicular à hélice 3, enquanto o GQ-16 está paralelo [82].

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito do GQ-16 sobre a atividade transcricional do promotor do Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  – TNF- $\alpha$  e sobre a proliferação de células mesangiais humanas imortalizadas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o efeito do GQ-16 sobre a atividade transcricional do promotor do TNF- $\alpha$ , em células mesangiais humanas;
- Investigar se GQ-16 pode regular a proliferação mesangial estimulada por TNF- $\alpha$ ;
- Estudar o efeito do GQ-16 sobre a expressão de mRNA do Fator Transformador de Crescimento- $\beta$  – TFG- $\beta$  em células mesangiais humanas.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 PLASMÍDEOS

Para os ensaios de gene repórter foram utilizados o vetor de expressão do receptor PPAR $\gamma$  que corresponde ao plasmídeo pcDNA3 (Invitrogen), no qual foram adicionadas as sequências que codificam para o receptor PPAR $\gamma$  dirigido pelo promotor CMV e o vetor de expressão (TNFRE $_3$ )-TK Luc, que contém três cópias da porção -125/-82 do promotor do TNF- $\alpha$  (sequências de -32/+45), seguido do promotor mínimo da timidina kinase do vírus herpes simples. Anteriormente, já havíamos demonstrado [84] que essa região - 125/-82 do promotor do TNF é responsiva ao PPAR $\gamma$  e que a adição de rosiglitazona na presença de PPAR $\gamma$  reprime a transcrição desse promotor. A Figura abaixo mostra a construção desse plasmídeo

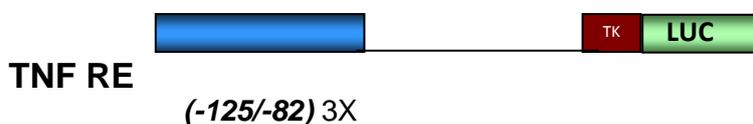


Figura 7 – Vetor de expressão de expressão (TNFRE $_3$ )-TK Luc, que contém três cópias da porção -125/-82 do promotor do TNF- $\alpha$  (sequências de -32/+45) seguido do promotor mínimo da timidina quinase do vírus herpes simples.

#### 3.2 CULTURA DE CÉLULAS MESANGIAIS

Células mesangiais humanas imortalizadas foram obtidas pelo Departamento de Nefrologia da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, e cedidas ao Laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade de Brasília – UnB. Elas foram cultivadas em placas de 150 X 20 mm (Corning®, MA, USA) em meio DMEM (Gibco™, Invitrogen Corporation, CA, USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino – SFB, 100 U/mL de penicilina e 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina, e mantidas em uma atmosfera umidificada a 37 $^{\circ}$ C com 5% de CO $_2$ .

### 3.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR POR INCORPORAÇÃO DE METIL-<sup>3</sup>H-TIMIDINA

Para avaliar se o GQ-16 podia diminuir a proliferação das células mesangiais, induzida por TNF- $\alpha$  (Sigma Aldrich, MO, USA), de forma semelhante à rosiglitazona (Cayman Chemicals, MI, USA) e pioglitazona (Sigma Aldrich), foi realizado o ensaio de incorporação de <sup>3</sup>H-timidina (PerkinElmer, MA, USA). Esse ensaio baseia-se no princípio de que quanto maior for a incorporação do nucleosídeo marcado radiativamente, maior será a síntese de DNA. Dessa forma, assume-se que o grupo que teve maior síntese de DNA, teve também maior proliferação celular.

Inicialmente, aproximadamente 10.000 células mesangiais foram semeadas em placas de doze poços em meio DMEM com 10% de SFB. As células foram incubadas a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> por 4 horas, para permitir a adesão das células ao fundo da placa. Posteriormente, o meio de cultura era trocado para DMEM com SFB 0,5%. Após 24 horas, adicionaram-se os tratamentos com rosiglitazona, pioglitazona e GQ-16 em concentrações crescentes.

O GQ-16 foi gentilmente cedido pelo Instituto de Química da Universidade Federal de Pernambuco. Para realização dos experimentos, ele era diluído, no exato momento do tratamento das células, em dimetilsulfóxido (DMSO) aquecido a 37°C. Após 20 horas da adição dos ligantes, 0,5  $\mu$ Ci/ml de metil-<sup>3</sup>H-timidina foi adicionado às células. Ao término do tratamento, o meio foi descartado e os poços lavados duas vezes com PBS gelado e, mais duas vezes com ácido tricloroacético a 10%. Em seguida, o líquido sobrenadante foi descartado e as células, lisadas com a adição de 0,5ml de hidróxido de sódio 0,5M, por 30 minutos a 37°C. Por fim, ao lisado celular foi adicionado 3 ml de coquetel para cintilação líquida e levado a um contador de emissão de partículas  $\beta$ , localizado no Instituto de Biologia da UnB. A leitura foi dada em Contagem por Minuto – CPM.

Os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados foram expressos em CPM. Para análise dos efeitos da pioglitazona, rosiglitazona e GQ-16 sobre a proliferação induzida por TNF, considerou-se a média do grupo tratado com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) como 100%, e a partir desse número calculou-se a porcentagem

de incorporação dos demais grupos em relação ao primeiro. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  Erro Padrão da Média – EPM.

### 3.4 TRANSFEÇÃO E ENSAIOS DE GENE REPÓRTER COM A ENZIMA LUCIFERASE

Em nosso estudo, o método para a transfecção foi a eletroporação, que se baseia no princípio de gerar poros na membrana plasmática e nuclear por meio da aplicação de pulsos de corrente elétrica. Dessa forma o DNA plasmidial entra no núcleo celular.

Para a transfecção das células mesangiais, inicialmente aspirou-se o meio sobrenadante e as células mesangiais foram coletadas por tripsinização, visto que essas células são aderentes. Nessa etapa retirou-se uma alíquota para a contagem do número de células, obedecendo 8-10 milhões de células por transfecção. Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação, com o *pellet* suspenso em solução de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) contendo dextrose e cálcio. Em seguida 0.5ml das células foram misturadas com 3 $\mu$ g do plasmídeo repórter respectivo e, quando foi o caso, 1.5 $\mu$ g do vetor de expressão do PPAR $\gamma$ . As células e os plasmídeos foram suspensos e transferidos para uma cubeta de 0.4cm de fenda e, após 3 minutos em temperatura ambiente, eletroporadas utilizando-se um gerador de pulso Bio-Rad com voltagem de 0.35 kV e 700  $\mu$ F de capacitância. Posteriormente, as células foram transferidas para tubos cônicos contendo meio DMEM com 10% de soro bovino fetal. Neste meio, as células foram ressuspensas e transferidas para placas de 12 poços. Por fim, as células foram incubadas por 24 horas com concentrações crescentes de rosiglitazona e GQ-16.

Para o ensaio da enzima luciferase, o meio de cultura sobrenadante foi aspirado e adicionou-se 150  $\mu$ L do Tampão de Lise (Promega) em cada poço. Incubou-se por 20 minutos em temperatura ambiente para certificação da lise celular. Por fim, uma pequena alíquota do lisado celular (20  $\mu$ L) foi misturada com luciferina, substrato para a enzima luciferase (20  $\mu$ L) (Luciferase Assay System, Promega), e a medida da atividade desta enzima foi quantificada em um luminômetro (*Turner*). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os

dados aferidos em Unidades de Luz – UL foram normalizados de acordo com a atividade transcricional do promotor (TNFRE<sub>3</sub>)-TK Luc. Para determinação da taxa de inibição da atividade do promotor (TNFRE<sub>3</sub>)-TK Luc pelos ligantes Rosiglitazona e GQ-16, o grupo tratado com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) foi considerado como 100%.

### 3.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RNA MENSAGEIRO (mRNA) DE TGF- $\beta$

Para verificar se o tratamento com GQ-16 interferia na expressão de mRNA de TGF- $\beta$ , semeou-se células mesangiais em placas de 100 mm contendo meio DMEM com 10% de SFB e antibióticos. Aguardei a placa atingir 100% de confluência, quando, realizou-se os tratamentos com veículo – DMSO, rosiglitazona e GQ-16, ambos na concentração de  $10^{-5}$  M, na presença e ausência de TNF- $\alpha$ , 10 ng/mL. Os tempos de tratamento foram de 6 e 12 horas. A expressão de mRNA de TGF- $\beta$  foi avaliada por meio da extração do RNA total, seguida da síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa, e amplificação por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).

### 3.6 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

A extração do RNA total das células foi realizada com o reagente TRIzol® (*Invitrogen*), seguindo as recomendações do fabricante. Após o término do tratamento, cada placa era lavada com PBS gelado e, posteriormente, descartado. Com as placas no gelo, adicionou-se 2mL de TRIzol em cada uma delas, coletando-se as células com ajuda de um pequeno rodo, e transferindo-as para eppendorfs. Estes foram centrifugados e, ao sobrenadante, adicionou-se clorofórmio, para separação das fases formadas.

A fase superior (aquosa), onde se encontrava o RNA, de cada tubo foi transferida para outros eppendorfs, onde se adicionou isopropanol, para precipitação do RNA quando submetido à centrifugação. O pellet formado foi, então, suspenso em álcool etílico 75% (v/v) gelado, novamente centrifugado e, agora, ressuspendido

em água deionizada – mili Q estéril tratada com 0,1% de Dietilpirocarbonato – DEPC.

### 3.7 QUANTIFICAÇÃO, PUREZA E INTEGRIDADE DO RNA TOTAL

A quantificação e o grau de pureza das amostras de RNA total foram determinados por espectrofotometria, utilizando-se o aparelho *NanoVue Plus* (*GE Healthcare Life Sciences, UK*). As amostras foram desnaturadas a 60°C durante 10 minutos e, em seguida, 1 µL de RNA total foi transferido para o espectrofotômetro. A quantificação foi realizada no comprimento de onda de 260 nm e expressa em µg/µL. O grau de contaminação por proteínas foi verificado por meio da razão entre os comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. Razões entre 1,7 e 2,2 foram consideradas adequadas.

A integridade do RNA total foi verificada por eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídeo, e examinado sob luz ultravioleta, a fim de se avaliar a qualidade das subunidades 28S e 18S do RNA.

### 3.8 TRANSCRIÇÃO REVERSA E AMPLIFICAÇÃO POR PCR QUANTITATIVO

Os primers direto e reverso para TGF-β e β-actina foram retirados de artigos da literatura e sintetizados pela Integrated DNA Technologies (IDT, USA). As sequências utilizadas para o TGF-β foram: **R** 5' GTC AAT GTA CAG CTG CCG CA 3' e **F** 5' CCC AGC ATC TGC AAA GCT C 3'; para a β-actina: **R** 5' AAG GTG TGG TGC CAG ATT TTC T 3' e **F** 5' CGG CAT CGT CAC CAA CTG 3'. O gene constitutivo da β-actina foi usado como controle endógeno.

A transcrição reversa e amplificação por PCR quantitativo foram realizados sincronicamente, através do kit Power SYBR® Green RNA-to-C<sub>t</sub> 1-Step (Applied Biosystems, CA, USA), seguindo normas do fabricante. Após tratamento das amostras com RNA com DNase (Sigma Aldrich), no intuito de se extinguir quaisquer possíveis contaminações por DNA genômico, as reações foram preparadas em placas de 96 poços, para um volume final de 10 µL, com os seguintes reagentes:

0,08 µL de enzima transcriptase reversa – RT, 5 µL Power SYBR® Green RT-PCR, 0,2 µL de cada primer (F e R) e 1ng de RNA. O volume foi completado com água livre de DNA e RNA.

As condições da reação foram as mesmas para todos os experimentos de RT-PCRq: 30 minutos a 48°C para realização da reação de transcrição reversa; 10 minutos a 95°C para ativação da enzima DNA polimerase; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação e 60°C por 1 minuto para anelamento do primer e extensão.

Todos os experimentos de RT-PCRq foram realizados no equipamento *Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* e os dados obtidos foram analisados com o programa *Software StepOne v2.1*.

### 3.9 VALIDAÇÃO DOS PRIMERS

#### 3.9.1 Curva de eficiência relativa dos primers

Para determinar se as reações de amplificação do gene alvo e do controle apresentam a mesma eficiência, inicialmente foi feito uma curva de diluição seriada, denominada curva padrão, para cada par de primers, partindo-se de uma amostra de 5 ng de RNA e diluindo-se sequencialmente para 1 ng, 0,2 ng e 0,04 ng (fator de diluição 5). As diluições foram realizadas em triplicata. Em seguida, foram obtidos os valores de Ct (*cycle threshold*) de cada amostra. Em PCR, o Ct é definido como o número de ciclos necessário para que o sinal de fluorescência cruze a linha de base, iniciando a fase exponencial de amplificação.

As médias dos valores dos Ct do alvo, gerados para cada diluição, foram subtraídas pelas médias dos valores dos Ct do controle, e estas variações ( $\Delta Ct$ ), foram colocadas em gráfico em comparação ao log da diluição correspondente para criar uma regressão linear semi-log. Para ser equivalente, a inclinação da reta, correspondente ao valor “a” da equação da

reta ( $y = ax + b$ ) deve ser  $< 0,1$ . A curva de eficiência relativa foi realizada com o programa *Microsoft Excel*, versão 2010.

### 3.9.2 Curva de dissociação dos *primers*

Curvas de dissociação do produto de amplificação (curvas de *melting*) foram realizadas para cada par de *primers*, a fim de se verificar sua especificidade, confirmando a ausência de formação de dímeros e/ou de produtos inespecíficos, o que poderia interferir na quantificação real do transcrito alvo. As curvas foram feitas após a reação de PCR, aumentando-se gradativamente a temperatura (acréscimos de 0,3 °C) de 60 °C até 95 °C. Neste procedimento, à medida que a temperatura aumenta, a fluorescência decresce. O ponto correspondente ao decaimento mais acelerado do sinal de fluorescência é denominado de temperatura de dissociação  $T_m$  (*melting temperature*) e determina o momento em que o produto de PCR apresenta-se 50% em fita dupla e 50% em fita simples. A  $T_m$  é específica para cada sequência de DNA amplificada. Assim, espera-se que apenas um pico de decaimento seja detectado para cada par de *primers* utilizado. Os dados obtidos foram analisados em um gráfico da derivada da fluorescência em função da temperatura.

### 3.10 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO mRNA DO TGF- $\beta$

Após validação, as reações de RT-PCR foram realizadas para o gene TGF- $\beta$  nas amostras tratadas ou não tratadas (calibrador) com rosiglitazona, utilizando-se 1 ng de RNA de cada uma. Os valores dos Ct obtidos para todas as amostras foram normalizados em função do controle endógeno ( $\beta$ -actina) por meio da subtração do Ct do alvo pelo Ct do controle ( $\Delta Ct$ ). A quantificação relativa da expressão do mRNA do TGF- $\beta$  foi feita utilizando-se o método de comparação de Ct ou  $\Delta\Delta Ct$ . Por este método, a expressão relativa do gene corresponderá ao valor obtido pela fórmula aritmética  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{amostras} - \Delta Ct_{calibrador}$ .

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise de variância (ANOVA), seguido do teste de comparação múltiplo de Dunnett foi utilizada para comparar os valores da taxa de incorporação de timidina e o teste de comparação múltiplo de Newman-Keuls para a comparação entre os valores da expressão relativa do mRNA do TGF- $\beta$

Os resultados do ensaio de gene repórter comparando Rosiglitazona e GQ-16 na repressão do promotor do TNF foram analisados por teste t de *student*.

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e foram considerados significantes os valores de  $p < 0,05$ .

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa *GraphPad*, versão 5.02 para *Windows*.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DO GQ-16 SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MESANGIAIS FRENTE AO TNF- $\alpha$

Inicialmente com o intuito de investigar o efeito do GQ-16 sobre a proliferação de células mesangiais, realizaram-se ensaios de incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina, em que o grau de proliferação celular é mensurado a partir da taxa de incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina. Os resultados foram expressos em percentagem em relação ao tratamento apenas com TNF- $\alpha$ .

O tratamento, por 24 horas, com rosiglitazona (Rosi), pioglitazona (Pio) e doses crescentes de GQ-16 provocou uma diminuição na taxa de incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina e, conseqüentemente, na proliferação de células mesangiais. A Rosi na concentração de  $10^{-5}$  M reduziu a proliferação em 35% ( $\pm 8,7\%$ ). A Pio e o GQ-16, na mesma concentração, também provocaram uma redução em torno de 39% ( $\pm 9,2\%$ ) e 45,5% ( $\pm 16,1\%$ ), respectivamente. Na concentração de  $5 \times 10^{-5}$  M, o GQ-16 reduziu a proliferação em 52% ( $\pm 7\%$ ). Desta forma, o GQ-16 induziu repressão na proliferação das células mesangiais em um padrão de curva dose-resposta, embora apenas as concentrações de  $10^{-5}$  M e  $5 \times 10^{-5}$  M tenham sido capazes de obter relevância estatística (vide Figura 8).

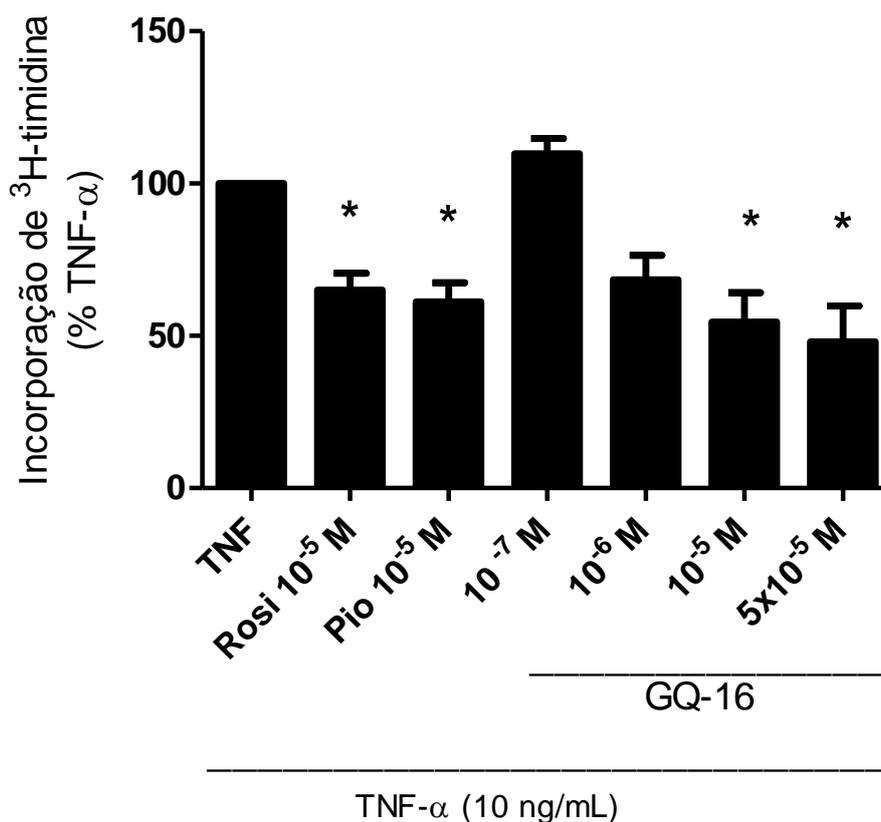


Figura 8 – Incorporação de <sup>3</sup>H-timidina. Dados expressos como média ± erro padrão da média (EPM) do percentual de incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina em relação ao TNF-α, de 12 experimentos independentes realizados em triplicata. \* Relevância estatística (p < 0,05), por método de ANOVA, seguido de teste de comparação múltiplo de Dunnett.

#### 4.2 EFEITO DO GQ-16 SOBRE O PROMOTOR DO TNF-α (SEQUÊNCIAS DE -32/+45 (TNFRE<sub>3</sub>) – TK Luc

Considerando que GQ-16 é um agonista parcial de PPAR<sub>γ</sub> que reprime de forma semelhante à rosiglitazona a fosforilação da serina 273 e a proliferação mesangial induzida por TNF-α, resolvemos comparar a regulação da transcrição do promotor do TNF-α mediada por PPAR<sub>γ</sub> ligado a rosiglitazona e GQ-16. Para isso co-transfectamos células mensangiais humanas com PPAR<sub>γ</sub> e o gene repórter TNFRE<sub>3</sub>-TK Luc que, contém três cópias da porção -125/-82 do promotor do TNF-α (sequências de -32/+45) seguido do promotor mínimo da timidina kinase do vírus herpes simples. Nossos resultados demonstraram que o tratamento dessas células com doses crescentes de GQ-16 levou a uma repressão dose dependente do

promotor do TNF- $\alpha$  com a mesma eficácia que a rosiglitazona, apesar de ter apresentado um IC<sub>50</sub> 96 vezes maior (IC<sub>50</sub> Rosi 3,56 versus 91,98 nM do GQ-16) (vide Figura 9). Nas doses de  $5 \times 10^{-5}$  M, o GQ-16 reprimiu significativamente a transcrição do promotor do TNF- $\alpha$ , atingindo valores semelhantes à Rosiglitazona.

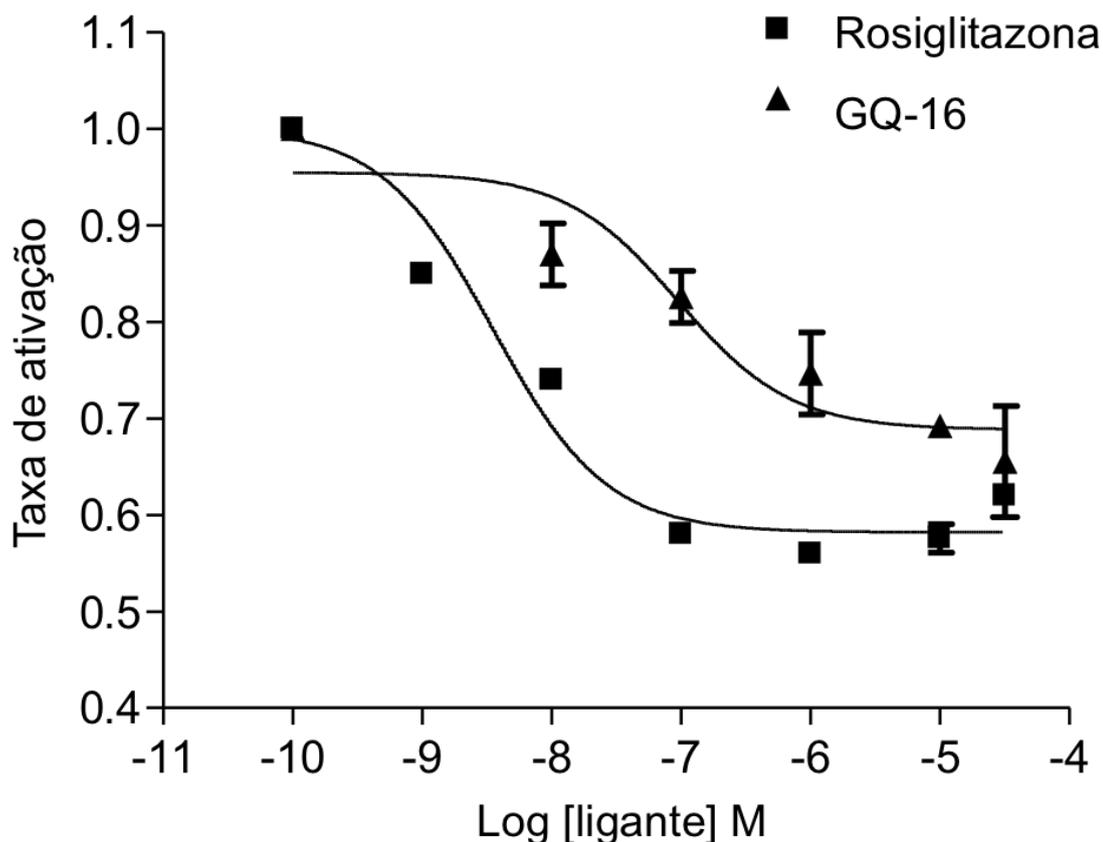


Figura 9 – Em células mesangiais GQ-16 reprime a atividade transcricional do promotor do TNF- $\alpha$ . O gene repórter (TNFRE<sub>3</sub>)-TK Luc que contém três cópias da porção -125/-82 do promotor do TNF- $\alpha$  seguido do promotor mínimo da timidina quinase do vírus herpes simples foi co-transfectado com PPAR $\gamma$  e tratadas durante 24 horas com Rosiglitazona ou GQ-16. Observa-se que a repressão máxima induzida por GQ-16 foi semelhante à observada com rosiglitazona.

### 4.3 EFEITO DO GQ-16 SOBRE A EXPRESSÃO DO mRNA DO TGF- $\beta$ EM CÉLULAS MESANGIAIS HUMANAS IMORTALIZADAS

A avaliação da expressão do mRNA do TGF- $\beta$  em células mesangiais humanas imortalizadas em resposta ao tratamento com GQ-16 foi precedida de extração do RNA total celular, análise de sua qualidade e integridade, e validação da PCR (análise da eficiência e especificidade dos *primers*).

#### 4.3.1 Análise da eficiência relativa dos *primers*

A análise da expressão gênica relativa pela técnica de PCR, utilizando-se o método de comparação  $\Delta\Delta C_t$ , requer que as eficiências de amplificação do gene alvo e do gene referência sejam equivalentes.

Dessa forma, inicialmente, uma curva de diluição seriada foi realizada para cada par de *primers* (vide Figuras 10A e 10B). Em seguida, os valores dos  $C_t$  obtidos para cada diluição foram utilizados para determinar a equivalência da eficiência de amplificação, por meio de sua representação gráfica (log da diluição x  $\Delta C_t$ ). A equivalência foi determinada pela inclinação da reta gerada ao se comparar a eficiência do gene alvo (TGF- $\beta$ ) com a do gene controle ( $\beta$ -actina). Pela equação obtida, pode ser observado que a inclinação foi  $< 0,1$  (0,0671), possibilitando, portanto, a utilização do método de comparação aritmético (vide Figura 10C).

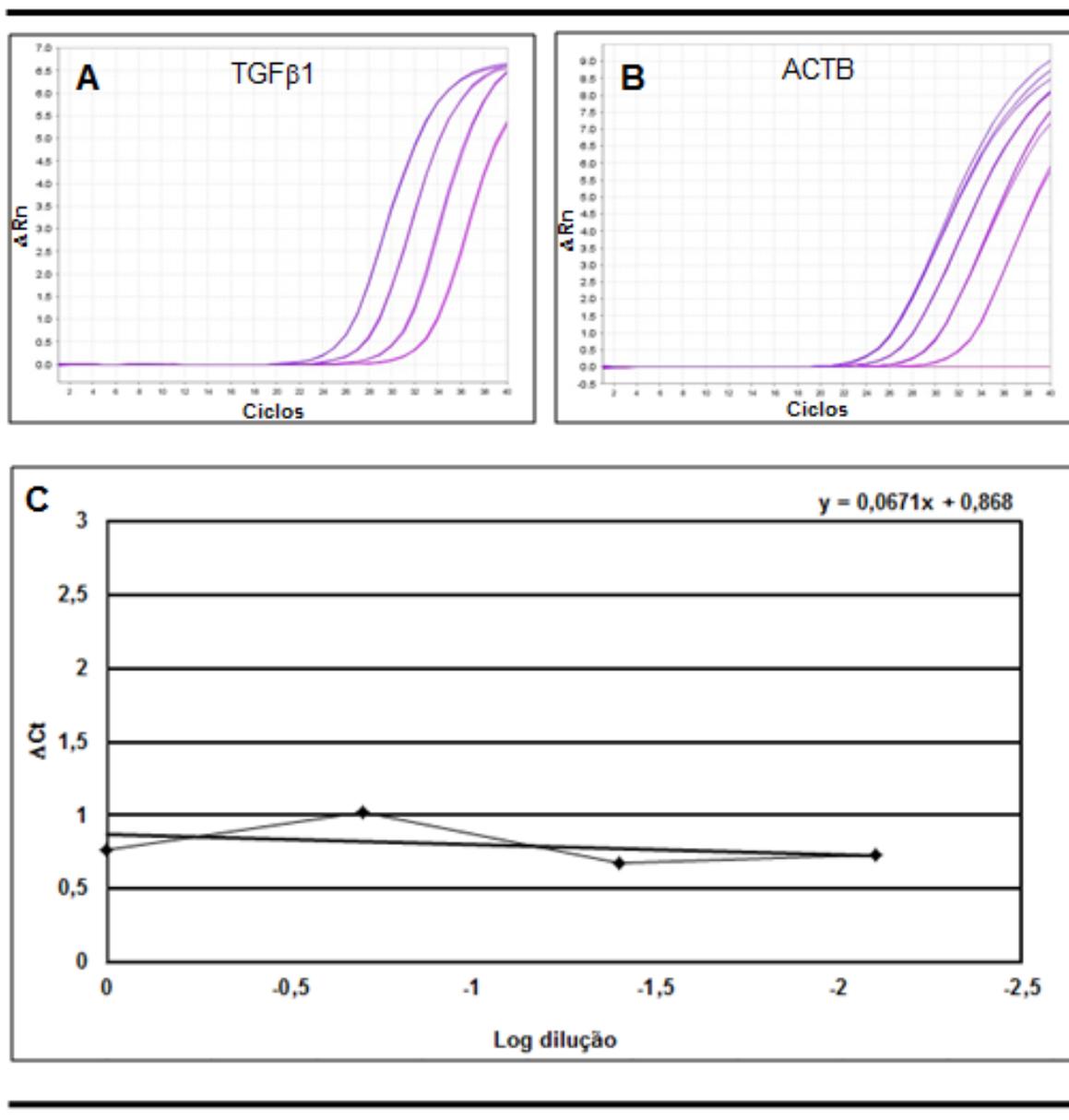


Figura 10 – Genes alvo (TGF- $\beta$ 1) e controle ( $\beta$ -actina) apresentam eficiência de amplificação equivalente. Curvas de diluição seriada foram feitas para cada par de *primers*, partindo-se de uma amostra de RNA de 5 ng e diluindo-se sequencialmente para 1 ng, 0,2 ng e 0,04 ng (A e B). As diluições foram feitas em triplicata e as médias dos valores dos Ct do gene alvo, obtidas para cada diluição, foram subtraídas pelas médias dos valores dos Ct do controle. Estas variações ( $\Delta Ct$ ) foram representadas graficamente em função do log da diluição correspondente (C). A inclinação (0,067) da reta obtida por regressão linear demonstra que as eficiências de amplificação dos dois pares de *primers* é equivalente ( $< 0,1$ ).

### 4.3.2 Análise da especificidade dos *primers*

O fluoróforo presente no sistema SYBR® Green para detecção da amplificação liga-se a qualquer DNA fita-dupla. Assim, a presença de produtos inespecíficos de amplificação ou a formação de dímeros de *primers* podem comprometer os resultados da quantificação relativa do gene de interesse. Considerando-se esses aspectos, os *primers* foram avaliados quanto a sua especificidade por meio da curva de dissociação do produto de amplificação (curva de *melting*). A presença de apenas um pico na curva indica uma amplificação específica de um único fragmento de DNA e ausência de dímeros de *primer* (vide Figura 11).

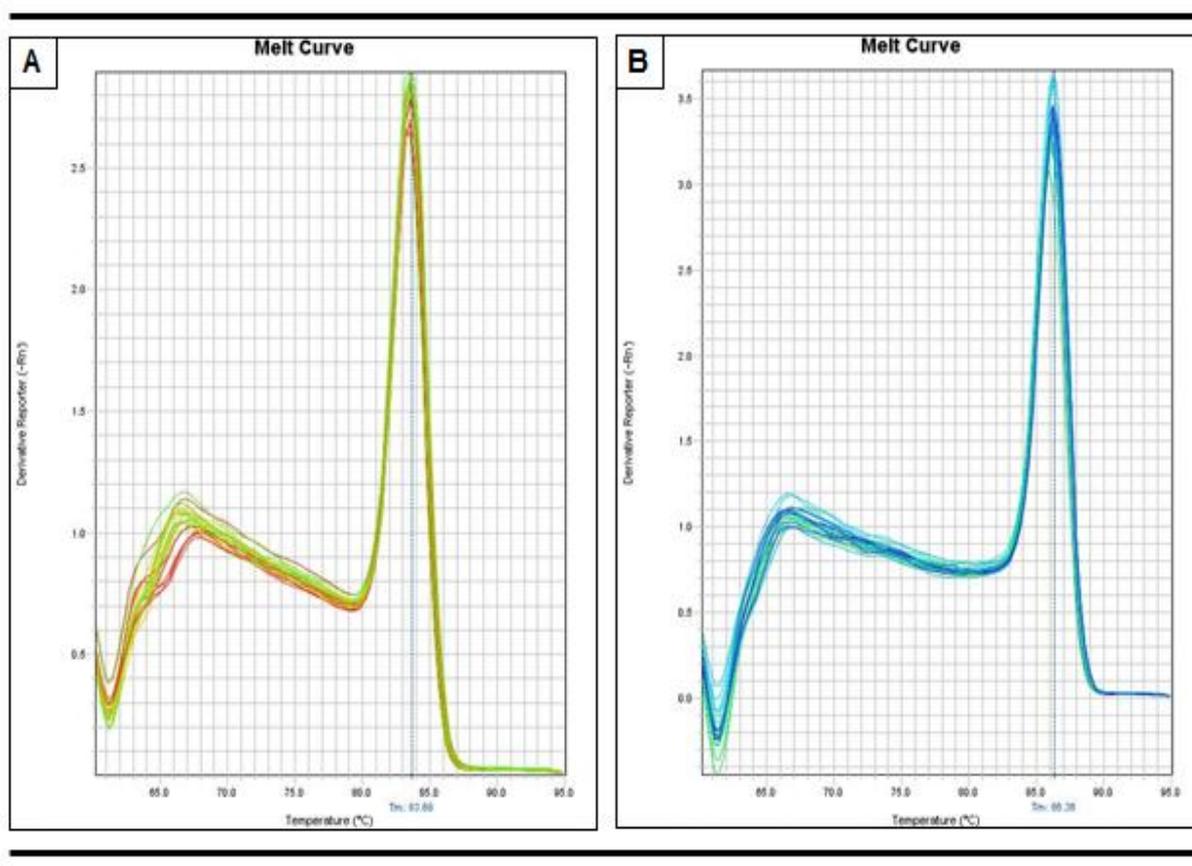


Figura 11 – As sequências de *primers* escolhidos apresentam especificidade de amplificação. Os *primers* dos genes alvo (TGF- $\beta$ 1) e de referência ( $\beta$ -actina) foram avaliados quanto à sua especificidade de amplificação por meio de curvas de dissociação do produto de amplificação (curvas de *melting*), realizadas após reação de PCR, aumentando-se gradativamente a temperatura (acréscimos de 0,3 °C) de 60 °C para 95 °C. A presença de apenas um pico nas curvas demonstra a ausência de formação de dímeros ou de produtos inespecíficos de amplificação. A, TGF- $\beta$ 1; B,  $\beta$ -actina.

### 4.3.3 Análise do efeito do GQ-16 na expressão de mRNA de TGF- $\beta$

A expressão de mRNA de TGF- $\beta$  em células mesangiais humanas imortalizadas foi avaliada na presença e ausência de TNF- $\alpha$ , 10 ng/mL, acrescentadas de rosiglitazona ou GQ-16, na concentração de  $10^{-5}$  M e, em dois tempos diferentes, 6 e 12 horas após o tratamento. A análise foi feita por RT-PCR e, comparada com os respectivos controles: DMSO ou TNF- $\alpha$ .

A expressão de mRNA de TGF- $\beta$  tendeu a diminuir 6 horas após tratamento com rosiglitazona e GQ-16 na concentração de  $10^{-5}$  M, em relação ao DMSO (veículo), nos tempos de 6 e 12 horas. Após 6 horas de tratamento, sob as condições descritas na metodologia, ocorreu uma redução na expressão relativa de mRNA de TGF- $\beta$  em torno de 7,73% ( $\pm$  0,67%) no grupo tratado com rosiglitazona e, de 32,23% ( $\pm$  23,48%), no grupo do GQ-16. Os resultados não apresentaram relevância estatística (vide Figura 12).

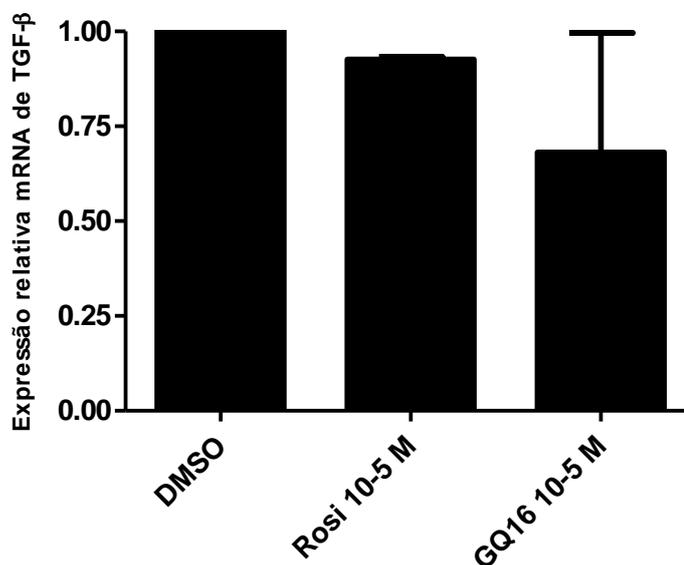


Figura 12 – Expressão relativa de mRNA de TGF- $\beta$  6 horas após tratamento com rosiglitazona ou GQ-16, na ausência de TNF- $\alpha$ . Células mesangiais humanas imortalizadas foram semeadas em placa de 100 mm com meio DMEM. Ao atingir 100% de confluência, o meio foi trocado e acrescentado rosi ou GQ-16 na concentração de  $10^{-5}$  M. Após seis horas, o RNA total dos grupos experimentais foi obtido e a expressão de mRNA de TGF- $\beta$  analisada por RT-PCR. Verificou-se uma redução do nível de expressão de mRNA do TGF- $\beta$  tanto na presença de rosi, quanto GQ-16. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM, consistindo de três experimentos independentes proferidos em triplicata.

Resultados semelhantes aos anteriores também foram verificados sob o tempo de tratamento de 12 horas. Constatou-se uma redução na expressão de mRNA de TGF- $\beta$  nas células mesangiais tratadas com rosiglitazona em torno de 26,93% ( $\pm$  16,63%) e, no grupo do GQ-16, de 27,78% ( $\pm$  4,6%). Os resultados não apresentaram relevância estatística (vide Figura 13).

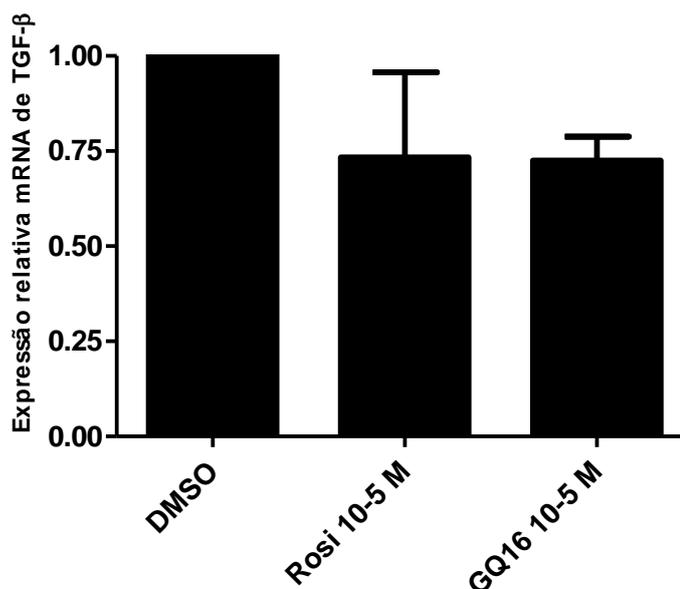


Figura 13 – Expressão relativa de mRNA de TGF- $\beta$  12 horas após tratamento com rosiglitazona ou GQ-16, na ausência de TNF- $\alpha$ . Células mesangiais humanas imortalizadas foram semeadas em placa de 100 mm com meio DMEM. Ao atingir 100% de confluência, o meio foi trocado e acrescentado rosi ou GQ-16 na concentração de  $10^{-5}$  M. Após doze horas, o RNA total dos grupos experimentais foi obtido e a expressão de mRNA de TGF- $\beta$  analisada por RT-PCR. Verificou-se uma redução do nível de expressão de mRNA do TGF- $\beta$  tanto na presença de rosi, quanto GQ-16. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM, consistindo de três experimentos independentes preferidos em triplicata.

A expressão de mRNA de TGF- $\beta$  tendeu a diminuir 6 horas após tratamento com TNF, 10 ng/mL, associado com rosiglitazona e GQ-16 na concentração de  $10^{-5}$  M. Na presença de rosi, a redução observada foi de 50%, enquanto, com GQ-16, a redução observada foi de 52% (vide Figura 14).

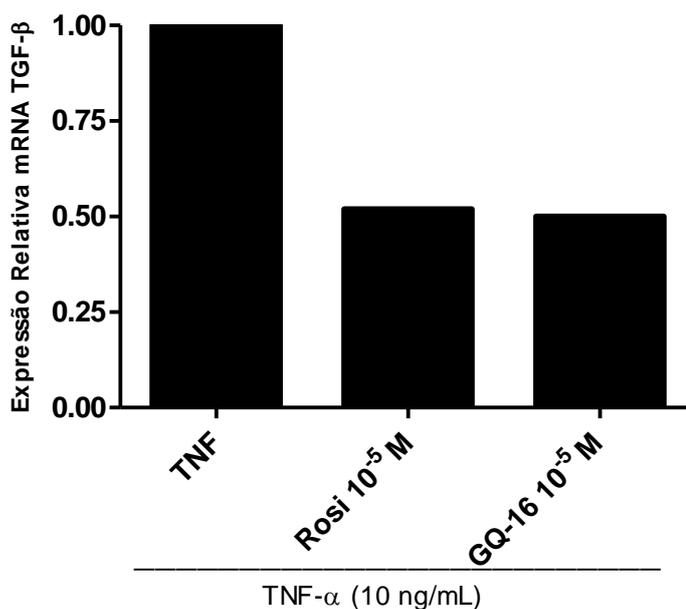


Figura 14 – Expressão relativa de mRNA de TGF- $\beta$  6 horas após tratamento com rosiglitazona, GQ-16 e TNF- $\alpha$ . Células mesangiais humanas imortalizadas foram semeadas em placa de 100 mm com meio DMEM. Ao atingir 100% de confluência, o meio foi trocado e acrescentado TNF- $\alpha$  (10 ng/mL), mais rosi ou GQ-16 na concentração de  $10^{-5}$  M. Após seis horas, o RNA total dos grupos experimentais foi obtido e a expressão de mRNA de TGF- $\beta$  analisada por RT-PCR. Verificou-se uma redução do nível de expressão de mRNA do TGF- $\beta$  tanto na presença de rosi, quanto GQ-16. Dados não apresentados como média  $\pm$  EPM, pois representa um único experimento em triplicata.

Nas mesmas condições, mas com um tempo de tratamento de 12 horas, constatou-se uma aumento na expressão de mRNA de TGF- $\beta$  com TNF, 10 ng/mL, associado com rosiglitazona em torno de 11,7% ( $\pm$  23,4%), enquanto, no grupo do GQ-16, houve uma redução de 21,67% ( $\pm$  38%). Os resultados não apresentaram relevância estatística (vide Figura 15).

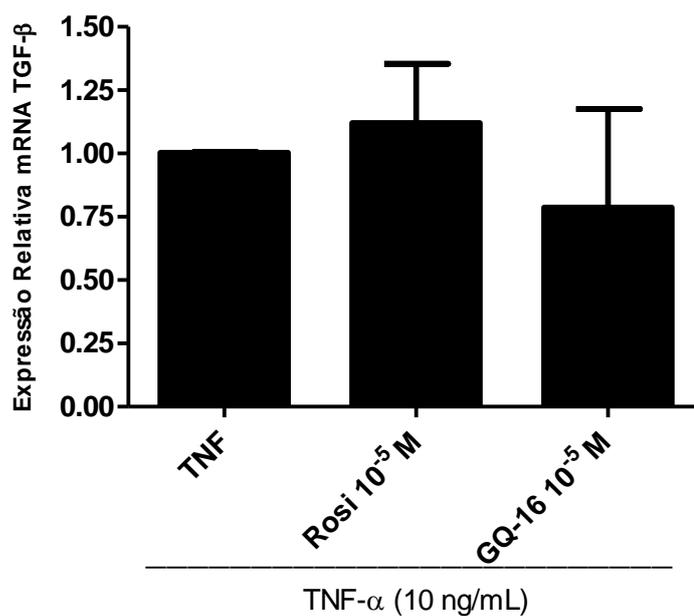


Figura 15 – Expressão relativa de mRNA de TGF- $\beta$  12 horas após tratamento com rosiglitazona, GQ-16 e TNF- $\alpha$ . Células mesangiais humanas imortalizadas foram semeadas em placa de 100 mm com meio DMEM. Ao atingir 100% de confluência, o meio foi trocado e acrescentado TNF- $\alpha$  (10 ng/mL), mais rosi ou GQ-16 na concentração de  $10^{-5}$  M. Após doze horas, o RNA total dos grupos experimentais foi obtido e a expressão de mRNA de TGF- $\beta$  analisada por RT-PCR. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM, consistindo de três experimentos independentes proferidos em triplicata.

## 5 DISCUSSÃO

As glomerulopatias são frequentemente encontradas na prática clínica e compreendem uma importante causa de doença renal em estágio final em todo o mundo [85]. De acordo com o *United States Renal Data System* – USRDS, os gastos com pacientes em ESRD em 2009 aumentaram 3,1%, atingindo a cifra de US\$ 29 bilhões ao ano [86]. Neste grupo, somente a nefropatia diabética representa 40% dos casos de ESRD, com um custo bastante elevado ao sistema de saúde americano [10].

A fisiopatologia da nefropatia diabética é complexa e multifatorial. A alta concentração de glicose plasmática gera os *Advanced Glycation End Products* – AGE, ativando diversas vias, entre elas o Sistema Renina Angiotensina – SRA. Este desempenha importante papel na progressão da nefropatia diabética, visto que o seu bloqueio por Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina – IECA ou bloqueadores do receptor de angiotensina II tipo I – BRA foi capaz de prevenir a progressão da nefropatia em estudos com modelos experimentais e ensaios clínicos [87-88].

Nossos primeiros resultados utilizando células mesangiais humanas imortalizadas confirmaram resultados anteriores do nosso laboratório de que agonistas de PPAR $\gamma$  como a pioglitazona, reprimem a proliferação das células mesangiais estimulada por TNF- $\alpha$ . Além disso, o GQ-16 foi capaz de reprimir a proliferação mesangial de uma forma muito semelhante à pioglitazona e rosiglitazona e, o padrão de repressão apresentado, foi de curva dose-resposta, tendo o maior efeito ocorrido na concentração de  $5 \times 10^{-5}$  M, conforme visto na Figura 8. Doses maiores não foram utilizadas porque levaram a formação de precipitados. Esses achados demonstram claramente que o GQ-16 apresenta um efeito farmacológico similar às outras TZDs, apesar de ser um agonista parcial.

O envolvimento do TNF- $\alpha$  nas patologias glomerulares também foi verificado quando se constatou que modelos animais de glomerulonefrite apresentam níveis aumentados dessa citocina no glomérulo [89]. Outro estudo mostrou que o pico de produção glomerular de TNF- $\alpha$  neste mesmo modelo coincide com o pico de inflamação e injúria local [90]. Outra evidência que reforça o envolvimento do TNF- $\alpha$

na promoção de glomerulopatias, é o fato da administração do receptor solúvel do TNF- $\alpha$ , proteína que irá sequestrar citocinas circulantes, prevenir a glomerulonefrite em modelos murinos [91]. Nossos resultados de repressão de proliferação promovidos pelo GQ-16 frente ao estímulo com TNF- $\alpha$  se assemelham ao observado por Menezes *et al.*, que observou que a pioglitazona era capaz de reprimir a proliferação de células mesangiais estimuladas por TNF- $\alpha$  [84]. Interessante observar que o GQ-16 apesar de ser um agonista parcial em elementos responsivos positivos, em concentrações maiores apresentou uma resposta transrepressora tão eficaz quanto à rosiglitazona [82]. Esses resultados demonstram claramente que o GQ-16 pode ser classificado como um modulador seletivo de PPAR $\gamma$ . Um ligante pode ser classificado como modulador seletivo quando for capaz de elicitar diferentes ações de PPAR em variados tecidos, podendo desempenhar atividade ora de agonista parcial, ora de total.

Com o objetivo de investigarmos se o efeito transrepressor do GQ-16 poderia se estender a outros marcadores moleculares de inflamação e fibrose, nós examinamos o efeito do GQ-16 sobre a expressão de mRNA do TGF $\beta$  de células mesangiais tratadas ou não com TNF- $\alpha$ . Como foi descrito anteriormente, nossos resultados demonstraram que na ausência de TNF- $\alpha$ , tanto a rosiglitazona quanto GQ-16 não modificaram a expressão de mRNA de TGF- $\beta$ , apesar de ter ocorrido uma discreta diminuição com a adição de GQ-16, conforme Figuras 12 e 13. Quando administramos TNF- $\alpha$ , observamos que tanto o tratamento com rosiglitazona quanto GQ-16 levaram a uma diminuição na expressão do mRNA de TGF- $\beta$  (vide Figuras 14 e 15), apesar desses valores não terem alcançado significância estatística, provavelmente por termos ainda um n muito reduzido. Novos ensaios são necessários para obtermos um resultado mais significativo.

Um subgrupo funcional único de macrófagos, denominados de M2 ou macrófagos alternativamente ativados, têm sido implicados na patogênese da fibrose [92]. De fato, fármacos que modulem o estado de ativação desta população de macrófagos poderiam emergir como estratégia terapêutica no combate à fibrose, visto que a ativação das referidas células amenizam a sua progressão [26]. Em macrófagos inflamados, há uma maior síntese de PPAR $\gamma$  e PPAR $\alpha$ , e evidenciou-se que seus agonistas foram capazes de inibir o desenvolvimento de fibrose, por induzir a diferenciação de macrófagos M2 e reduzir a produção de citocinas pró-

inflamatórias [33]. Os ligantes de PPAR também inibem diretamente a ativação de fibroblastos induzida por TGF- $\beta$  [93]. Diversos estudos comprovaram que os agonistas de PPAR apresentam eficácia na prevenção da fibrose, em modelos experimentais de fibrose cardíaca induzida por HAS, fibrose hepática por ligadura do duto biliar, fibrose pulmonar induzida por bleomicina e fibrose renal induzida por obstrução ureteral unilateral [94-96].

A proliferação de células mesangiais, juntamente com o aumento da biosíntese da matriz extracelular e diminuição de sua degradação, são característicos da maioria das doenças renais em estágios iniciais, entre elas, a nefropatia diabética [97]. Concomitantemente, fatores de crescimento e citocinas, tais como TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  são conhecidos agentes etiológicos implicados com a progressão da nefropatia diabética e outras glomerulopatias [98]. O TNF- $\alpha$  induz injúria em células mesangiais por estimular sua proliferação e acúmulo de matriz mesangial [99]. Por sua vez, o TGF- $\beta$  é implicado como um dos fatores de crescimento mais importantes neste processo, conduzindo à fibrose e ESRD [100]. Nossos achados sugerem que o GQ-16 poderá apresentar um efeito positivo no tratamento das glomerulopatias, diabética ou não.

Atualmente, sabe-se que o TNF- $\alpha$  é um dos fatores etiopatogênicos da resistência insulínica em pacientes obesos e com DM tipo II [9]. As glitazonas, como sensibilizadores de insulina, mostraram-se eficientes em diminuir os níveis sanguíneos de glicose e insulina, fortes indutores da síntese de TGF- $\beta$  pelas células mesangiais e, conseqüentemente, proveram um efeito anti-fibrótico [101]. Entretanto, independentemente dos níveis da glicemia e da insulinemia, alguns estudos demonstraram que diversas TZDs como, por exemplo, ciglitazona, troglitazona e rosiglitazona foram capazes de reduzir a expressão de TGF- $\beta$  e a proliferação de células mesangiais [57, 102]. Outras ações propostas como renoprotetoras implicam que os agonistas de PPAR $\gamma$  poderiam interferir com as propriedades mecânicas glomerulares, ao reverter a disfunção contrátil do mesângio, evocada pela hiperglicemia [103].

Em estudos conduzidos no laboratório de farmacologia molecular da Universidade de Brasília, Menezes et al, observaram que a pioglitazona reduz a proliferação de células mesangiais estimuladas por TNF- $\alpha$  e reprime a transcrição do promotor do TNF- $\alpha$  [84]. Desta forma, decidimos investigar primeiramente se o GQ-16 era capaz de exercer um efeito semelhante ao da pioglitazona, sobre a proliferação de células mesangiais. Dessa forma, em células mesangiais, GQ-16 apresentou um efeito anti-inflamatório similar à pioglitazona, conforme evidenciado na Figura 9.

No intuito de avaliar a ação do GQ-16 sobre o promotor do TNF- $\alpha$ , realizou-se ensaios de gene repórter, com a luciferase sobre o controle do promotor do TNF- $\alpha$ , comparando-se com a rosiglitazona. Não há relatos na literatura sobre a influência do GQ-16 sobre o promotor do TNF- $\alpha$ , estando relatada a influência da pioglitazona, que reprime a transcrição do promotor do TNF- $\alpha$ , sobretudo entre 125 e 82bp [84]. Os resultados proferidos por Amato e col indicam que o GQ-16, assim como a pioglitazona, também reprimiu a atividade transcricional do promotor do TNF- $\alpha$  e, em um padrão de curva dose-resposta. O IC<sub>50</sub> apresentado foi de 91,98 nM, 26 vezes maior que o valor da rosiglitazona, 3,46 nM.

Assim como descrito previamente, investigamos se o GQ-16 era capaz de reduzir a expressão de TGF- $\beta$  nas células mesangiais. Nossos resultados mostraram uma tendência à redução na expressão relativa de TGF- $\beta$  na presença e ausência de TNF- $\alpha$ . Entretanto, os dados não apresentaram relevância estatística. É bem definido na literatura que os agonista de PPAR $\gamma$  são capazes de reduzir a expressão gênica de TGF- $\beta$ , sendo utilizados, inclusive, em modelos experimentais de fibrose. Outrossim, não há relatos na literatura acerca da influência do GQ-16 sobre a expressão de TGF- $\beta$ . Nem mesmo a rosiglitazona, utilizada como controle positivo, apresentou resultados satisfatórios. Entretanto, nossos resultados tiveram um número pequeno de experimentos, que comprometeram a análise estatística. Não se pode tirar nenhuma conclusão, fazendo-se mister a realização de mais experimentos.

A soma dos nossos resultados demonstra que GQ-16 é um modulador seletivo de PPAR $\gamma$ , pois quando comparado à rosiglitazona em ensaios de gene repórter, ativa somente 30% da ativação induzida pela Rosi. Contudo, GQ-16 induz uma repressão de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  similar à rosiglitazona. A chamada modulação seletiva de PPAR $\gamma$  provavelmente reside na capacidade deste receptor nuclear em

se ligar de forma distinta ao LBD e recrutar diferentes cofatores, o que deflagra padrões de expressão gênicos diferenciados [104]. Esta propriedade pode gerar a descoberta de novos compostos e, inclusive, explica algumas diferenças de ação verificadas entre rosiglitazona e pioglitazona [29], em que estudos de microarranjo mostraram sobreposição na expressão somente de um grupo de genes, enquanto existem expressões variadas em outros [80]. Essas diferenças podem ser explicadas pela conformação estrutural final que o receptor ligado apresentará. Contudo, cabe observar que apesar de ocorrer mudanças conformacionais, algumas propriedades do receptor devem ser mantidas. Nesse sentido, o PPAR $\gamma$ , por exemplo, para ser um sensibilizador da insulina, necessita manter, mesmo que parcialmente, o fechamento da hélice 12 e a estabilização da Cdk5. À luz das proposições expostas por Choi et al, os efeitos de sensibilização à insulina não estão relacionadas totalmente à clássica atividade agonista dos ligantes de PPAR $\gamma$ , mas a um segundo efeito, a inibição da fosforilação da serina 273, pela Cdk5 [81]. Nesse estudo, Choi e col demonstraram que essa fosforilação acontece pela ação da Cdk5, uma enzima ativada por citocinas pró-inflamatórias que estão elevadas no tecido adiposo de indivíduos obesos, e em resposta ao consumo de dieta hiperlipídica. Foi verificado que em camundongos expostos a essa dieta, a Cdk5 era ativada, e a fosforilação resultante naquele resíduo de serina alterava a atividade transcricional do PPAR $\gamma$ , originando uma disfunção na expressão de um vasto número de genes, sobretudo aqueles relacionados à obesidade.

Recentemente, foi descrito um composto com propriedades de antagonista de PPAR $\gamma$ , mas que era capaz de inibir a fosforilação da serina 273. Os resultados demonstraram que este ligante diminuiu a fosforilação em doses crescentes, mas não apresentou mudanças consideráveis nos níveis glicêmicos, sem exibir o efeito de sensibilidade à insulina. [105]. Tais resultados sugerem que certa atividade agonista relacionada à estabilização da H12 é importante em um composto que pretende ser utilizado para o tratamento do DM por apresentar efeito anti-inflamatório e anti-hiperglicemiante. Tais propriedades foram vislumbradas recentemente por Amato e col em modelos animais tratados com GQ-16, ao verificar redução dos níveis glicêmicos comparável à rosiglitazona. Ademais, não foram contemplados ganho ponderal e retenção hídrica, efeitos classicamente descritos com outras TZDs.

Desta forma, o GQ-16, assim como rosiglitazona e pioglitazona, é capaz de inibir a fosforilação da serina 273 na região LBD do PPAR $\gamma$ . Entretanto, a sua habilidade em ativar a região AF-2 é diferente das outras TZDs, estando relacionado ao seu modo de acoplamento ao LBD, aparentemente único, com uma ativação clássica mínima, o que lhe rende um padrão de sensibilidade à insulina, com menor potencial de efeitos adversos. Entretanto, em detrimento destas novas descobertas, muitos questionam a utilidade de se desenvolver novos ligantes de PPAR $\gamma$ , visto a presença de outros fármacos anti-hiperglicemiantes e aos efeitos adversos. Todavia, a possibilidade de se separar efeitos terapêuticos de adversos, aliado à escassez de TZDs disponíveis atualmente no mercado e à capacidade de regular múltiplos genes de forma diferente em vários tecidos, impulsionam as pesquisas para a busca de novos ligantes e, que a utilização desses fármacos possa ser extrapolada a outras patologias, além de DM.

## 6 SUMÁRIO E CONCLUSÃO

### 6.1 SUMÁRIO

- 1) GQ-16 reduz a proliferação mesangial de maneira dose dependente, atingindo valores semelhantes à rosiglitazona e pioglitazona, sob estímulo de TNF- $\alpha$ .
- 2) GQ-16 reprime a ativação transcricional do promotor do TNF- $\alpha$ .
- 3) Em células mesangiais humanas imortalizadas tratadas com GQ-16:
  - Ocorreu diminuição da expressão de mRNA de TGF- $\beta$  semelhante à rosiglitazona na presença de TNF- $\alpha$  ;
  - Ocorreu diminuição da expressão de mRNA de TGF- $\beta$  semelhante à rosiglitazona na ausência de TNF- $\alpha$ .

### 6.2 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que o GQ-16 é um modulador seletivo de PPAR $\gamma$  e apresenta um efeito antiproliferativo, anti-inflamatório e, possivelmente, antifibrótico semelhante à rosiglitazona.

## REFERÊNCIAS

1. ADA, *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Diabetes Care, 2004. **27**(supplement 1): p. S5-S10.
2. Ferrannini E, G.A., Miyazaki Y, Matsuda M, Mari A, DeFronzo RA,  *$\beta$  - cell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: a new analysis*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**: p. 493-500.
3. Wild S, R.G., Green A, Sicree R, King H., *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. Diabetes Care, 2004. **27**(5): p. 1047-53.
4. ADA. *Diabetes Statistics*. 2011 Acessado em setembro 2012]; Available from: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diabetes-statistics/>.
5. OMS. *Diabetes*. 2011 Acessado em setembro 2012]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>.
6. DATASUS. *Taxa de prevalência de diabetes melito*. 2009 Acessado em setembro 2012]; Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabnet.exe?idb2010/g01.def>.
7. NIH. *National Diabetes Information Clearinghouse (NDIC)*. Acessado em setembro 2012]; Available from: <http://diabetes.niddk.nih.gov/dm/pubs/overview/>.
8. Mokdad, A.H., et al., *Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001*. JAMA, 2003. **289**(1): p. 76-9.
9. Yki-Jarvinen H, *Thiazolidinediones*. N Engl J Med, 2004. **351**(11): p. 1106-1118.
10. Sarafidis, P.A. and G.L. Bakris, *Protection of the kidney by thiazolidinediones: an assessment from bench to bedside*. Kidney Int, 2006. **70**(7): p. 1223-33.
11. Schrier, R.W., *Diseases of the Kidney and Urinary Tract*. 8 ed. Vol. 3. 2007, Philadelphia: LWW.
12. J C Jennette, J.O., Melvin Schwartz, Fred Silva, *Heptinstall's Pathology of the Kidney*. Vol. I. 2007, Philadelphia: LWW.
13. Barros RT, A.M., Dantas M, Kirsztajn G, Sens YAS, *Glomerulopatias: Patogenia, Clínica e tratamento*. 2 ed. 2006: Sarvier.
14. Sterzel RB, S.-L.E., Marx M, *Cytokines and mesangial cells*. Kidney Int Suppl, 1993. **39**: p. S26-31.
15. DACHS S, C.J., MAUTNER W, GRISHMAN E., *DIABETIC NEPHROPATHY*. Am J Pathol, 1964. **44**: p. 155-68.
16. Greenberg, A., *Primer on Kidney Diseases*. 5 ed. 2009, Philadelphia: Elsevier Saunders.
17. Riella, M.C., *Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrolíticos*. 4 ed. 2003: Guanabara Koogan.

18. Burton Rose, T.P., *Clinical Physiology of Acid-Base and Electrolyte Disorders*. 5 ed. 2001: McGraw-Hill.
19. Karl Tryggvason, J.P., Jorma Wartiovaara, *Hereditary Proteinuria Syndromes and Mechanisms of Proteinuria*. N Engl J Med, 2006. **354**: p. 1387-401.
20. Schleicher ED, O.B., *Glomerular changes in diabetes mellitus* Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1992. **10**(30): p. 635-40.
21. Mene P, S.M., Dunn MJ, *Physiology of the Mesangial Cell* Physiol Rev, 1989. **69**: p. 1347.
22. HW, S., *TGF-beta signal transduction and mesangial cells fibrogenesis*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **284**(2): p. F243-52.
23. L, B., *Tumor necrosis factor alfa and mesangial cells*. Kidney Int, 1992. **41**(3): p. 600-603.
24. Bazzoni, F. and B. Beutler, *The tumor necrosis factor ligand and receptor families*. N Engl J Med, 1996. **334**(26): p. 1717-25.
25. Border, W.A. and N.A. Noble, *Targeting TGF-beta for treatment of disease*. Nat Med, 1995. **1**(10): p. 1000-1.
26. Wynn, T.A. and T.R. Ramalingam, *Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease*. Nat Med, 2012. **18**(7): p. 1028-40.
27. Stumvoll, M. and H.U. Haring, *Glitazones: clinical effects and molecular mechanisms*. Ann Med, 2002. **34**(3): p. 217-24.
28. Gomes, M.d.B., *Glitazonas e síndrome metabólica: mecanismos de ação, fisiopatologia e indicações terapêuticas*. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, 2006. **50**: p. 271-280.
29. Cariou, B., B. Charbonnel, and B. Staels, *Thiazolidinediones and PPARgamma agonists: time for a reassessment*. Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(5): p. 205-15.
30. Yamauchi, T., et al., *The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance*. J Biol Chem, 2001. **276**(44): p. 41245-54.
31. Camp, H.S., D. Ren, and T. Leff, *Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes*. Trends Mol Med, 2002. **8**(9): p. 442-7.
32. Peraldi, P., M. Xu, and B.M. Spiegelman, *Thiazolidinediones block tumor necrosis factor-alpha-induced inhibition of insulin signaling*. J Clin Invest, 1997. **100**(7): p. 1863-9.
33. Ricote, M., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 79-82.
34. Iglesias, P. and J.J. Diez, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in renal disease*. Eur J Endocrinol, 2006. **154**(5): p. 613-21.
35. Vamecq, J. and N. Latruffe, *Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors*. Lancet, 1999. **354**(9173): p. 141-8.

36. Mao, Z. and A.C. Ong, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in kidney disease--future promise, present fears*. *Nephron Clin Pract*, 2009. **112**(4): p. c230-41.
37. Gomperts BD, K.I., Tatham PER, *Sigan1 Transduction*. 2009, London: Elsevier.
38. Nolte, R.T., et al., *Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*. *Nature*, 1998. **395**(6698): p. 137-43.
39. Michalik, L., et al., *International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors*. *Pharmacol Rev*, 2006. **58**(4): p. 726-41.
40. Xu, H.E., et al., *Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors*. *Mol Cell*, 1999. **3**(3): p. 397-403.
41. Glass, C.K., *Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(3): p. 556-60.
42. Sonoda, J., L. Pei, and R.M. Evans, *Nuclear receptors: decoding metabolic disease*. *FEBS Lett*, 2008. **582**(1): p. 2-9.
43. Rosen, E.D. and B.M. Spiegelman, *PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(41): p. 37731-4.
44. Rosenfeld, M.G., V.V. Lunyak, and C.K. Glass, *Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response*. *Genes Dev*, 2006. **20**(11): p. 1405-28.
45. Nagy, L. and J.W. Schwabe, *Mechanism of the nuclear receptor molecular switch*. *Trends Biochem Sci*, 2004. **29**(6): p. 317-24.
46. Ricote, M. and C.K. Glass, *PPARs and molecular mechanisms of transrepression*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1771**(8): p. 926-35.
47. Berger, J. and D.E. Moller, *The mechanisms of action of PPARs*. *Annu Rev Med*, 2002. **53**: p. 409-35.
48. Pascual, G. and C.K. Glass, *Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression*. *Trends Endocrinol Metab*, 2006. **17**(8): p. 321-7.
49. Thomas, M.C., K.A. Jandeleit-Dahm, and C. Tikellis, *The renoprotective actions of peroxisome proliferator-activated receptors agonists in diabetes*. *PPAR Res*, 2012. **2012**: p. 456529.
50. Mukherjee, R., et al., *Human and rat peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) demonstrate similar tissue distribution but different responsiveness to PPAR activators*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1994. **51**(3-4): p. 157-66.
51. Peters, J.M., et al., *Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(43): p. 27307-12.
52. Bookout, A.L., et al., *Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network*. *Cell*, 2006. **126**(4): p. 789-99.

53. Wang, Y.X., et al., *Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity*. Cell, 2003. **113**(2): p. 159-70.
54. Guan, Y. and M.D. Breyer, *Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease*. Kidney Int, 2001. **60**(1): p. 14-30.
55. Guan, Y., et al., *Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in urinary tract of rabbits and humans*. Am J Physiol, 1997. **273**(6 Pt 2): p. F1013-22.
56. Yang, T., et al., *Expression of peroxisomal proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the kidney*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 2): p. F966-73.
57. Isshiki, K., et al., *Thiazolidinedione compounds ameliorate glomerular dysfunction independent of their insulin-sensitizing action in diabetic rats*. Diabetes, 2000. **49**(6): p. 1022-32.
58. Baylis, C., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor [gamma] agonist provides superior renal protection versus angiotensin-converting enzyme inhibition in a rat model of type 2 diabetes with obesity*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **307**(3): p. 854-60.
59. Wu, J., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptors and renal diseases*. Front Biosci, 2009. **14**: p. 995-1009.
60. Garg, J.P. and G.L. Bakris, *Microalbuminuria: marker of vascular dysfunction, risk factor for cardiovascular disease*. Vasc Med, 2002. **7**(1): p. 35-43.
61. Bakris, G., et al., *Rosiglitazone reduces urinary albumin excretion in type II diabetes*. J Hum Hypertens, 2003. **17**(1): p. 7-12.
62. Nakamura, T., et al., *Comparative effects of pioglitazone, glibenclamide, and voglibose on urinary endothelin-1 and albumin excretion in diabetes patients*. J Diabetes Complications, 2000. **14**(5): p. 250-4.
63. Yoshida, T., et al., *Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, inhibits advanced glycation end-product (AGE)-elicited hepatic insulin resistance via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation*. J Int Med Res, 2008. **36**(2): p. 237-43.
64. Diep, Q.N., et al., *Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*. Circulation, 2002. **105**(19): p. 2296-302.
65. Ohga, S., et al., *Thiazolidinedione ameliorates renal injury in experimental diabetic rats through anti-inflammatory effects mediated by inhibition of NF-kappaB activation*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(4): p. F1141-50.
66. Zheng, F., et al., *Upregulation of type I collagen by TGF-beta in mesangial cells is blocked by PPARgamma activation*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **282**(4): p. F639-48.
67. Panchapakesan, U., et al., *PPARgamma agonists exert antifibrotic effects in renal tubular cells exposed to high glucose*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(5): p. F1153-8.

68. Yuan, J., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is frequently underexpressed in renal cell carcinoma*. *Int J Urol*, 2006. **13**(3): p. 265-70.
69. Chang, P.C., et al., *Advanced glycosylation end products induce inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression via a p38 MAPK-dependent pathway*. *Kidney Int*, 2004. **65**(5): p. 1664-75.
70. Okada, T., et al., *Thiazolidinediones ameliorate diabetic nephropathy via cell cycle-dependent mechanisms*. *Diabetes*, 2006. **55**(6): p. 1666-77.
71. Zhu, C., et al., *Mitochondrial dysfunction mediates aldosterone-induced podocyte damage: a therapeutic target of PPARgamma*. *Am J Pathol*, 2011. **178**(5): p. 2020-31.
72. Yang, H.C., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist is protective in podocyte injury-associated sclerosis*. *Kidney Int*, 2006. **69**(10): p. 1756-64.
73. Benigni, A., et al., *Transcriptional regulation of nephrin gene by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist: molecular mechanism of the antiproteinuric effect of pioglitazone*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(6): p. 1624-32.
74. Nissen, S.E. and K. Wolski, *Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes*. *N Engl J Med*, 2007. **356**(24): p. 2457-71.
75. FDA. *Safety Announcement 2011* Acessado em setembro de 2012]; Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm241411.htm>.
76. Cardiology, A.C.o. *ANVISA proibe o uso de rosiglitazona*. Acessado em setembro 2012]; Available from: [http://cientifico.cardiol.br/cardiosource2/noticias/int\\_noticia20.asp](http://cientifico.cardiol.br/cardiosource2/noticias/int_noticia20.asp).
77. Guan, Y., et al., *Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPARgamma stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption*. *Nat Med*, 2005. **11**(8): p. 861-6.
78. Basu, A., et al., *Effects of pioglitazone versus glipizide on body fat distribution, body water content, and hemodynamics in type 2 diabetes*. *Diabetes Care*, 2006. **29**(3): p. 510-4.
79. Nesto, R.W., et al., *Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. October 7, 2003*. *Circulation*, 2003. **108**(23): p. 2941-8.
80. Kahn, B.B. and T.E. McGraw, *Rosiglitazone, PPARgamma, and type 2 diabetes*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(27): p. 2667-9.
81. Choi, J.H., et al., *Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5*. *Nature*, 2010. **466**(7305): p. 451-6.
82. 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*, 2012. **287**(33): p. 28169-79.

83. Mourao, R.H., et al., *Synthesis and biological activity of novel acridinylidene and benzylidene thiazolidinediones*. Eur J Med Chem, 2005. **40**(11): p. 1129-33.
84. Menezes, T.d.O., *Efeito da Pioglitazona sobre a atividade transcricional do promotor do TNF em células mesangiais in Faculdade de Medicina*. 2005, Universidade de Brasilia: Brasilia.
85. Hricik, D.E., M. Chung-Park, and J.R. Sedor, *Glomerulonephritis*. N Engl J Med, 1998. **339**(13): p. 888-99.
86. USRDS. *2011 USRDS Annual Report*. 2011 Setembro 2012]; Available from: [http://www.usrds.org/2011/view/v2\\_11.asp](http://www.usrds.org/2011/view/v2_11.asp).
87. Zatz, R., et al., *Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension*. J Clin Invest, 1986. **77**(6): p. 1925-30.
88. Kohlmann Jr, O., et al., *Tratamento medicamentoso*. Jornal Brasileiro de Nefrologia, 2010. **32**: p. 29-43.
89. Camussi, G., et al., *Effect of leukocyte stimulation on rabbit immune complex glomerulonephritis*. Kidney Int, 1990. **38**(6): p. 1047-55.
90. Tipping, P.G., T.W. Leong, and S.R. Holdsworth, *Tumor necrosis factor production by glomerular macrophages in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in rabbits*. Lab Invest, 1991. **65**(3): p. 272-9.
91. Karkar, A.M., J. Smith, and C.D. Pusey, *Prevention and treatment of experimental crescentic glomerulonephritis by blocking tumour necrosis factor-alpha*. Nephrol Dial Transplant, 2001. **16**(3): p. 518-24.
92. Wynn, T.A. and L. Barron, *Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis*. Semin Liver Dis, 2010. **30**(3): p. 245-57.
93. Kulkarni, A.A., et al., *PPAR-gamma ligands repress TGFbeta-induced myofibroblast differentiation by targeting the PI3K/Akt pathway: implications for therapy of fibrosis*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e15909.
94. Kawai, T., et al., *PPAR-gamma agonist attenuates renal interstitial fibrosis and inflammation through reduction of TGF-beta*. Lab Invest, 2009. **89**(1): p. 47-58.
95. Yang, L., et al., *Effectiveness of the PPARgamma agonist, GW570, in liver fibrosis*. Inflamm Res, 2010. **59**(12): p. 1061-71.
96. Aoki, Y., et al., *Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, suppresses bleomycin-induced acute lung injury and fibrosis*. Respiration, 2009. **77**(3): p. 311-9.
97. Wolf, G., U. Butzmann, and U.O. Wenzel, *The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology*. Nephron Physiol, 2003. **93**(1): p. P3-13.
98. Schrijvers, B.F., A.S. De Vriese, and A. Flyvbjerg, *From hyperglycemia to diabetic kidney disease: the role of metabolic, hemodynamic, intracellular factors and growth factors/cytokines*. Endocr Rev, 2004. **25**(6): p. 971-1010.

99. Guo, G., et al., *Contributions of angiotensin II and tumor necrosis factor-alpha to the development of renal fibrosis*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **280**(5): p. F777-85.
100. Nicholas, S.B., *Advances in pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2003. **49**(8): p. 1319-25.
101. Anderson, P.W., et al., *Insulin and angiotensin II are additive in stimulating TGF-beta 1 and matrix mRNAs in mesangial cells*. Kidney Int, 1996. **50**(3): p. 745-53.
102. Ghosh, S.S., et al., *PPARgamma ligand attenuates PDGF-induced mesangial cell proliferation: role of MAP kinase*. Kidney Int, 2003. **64**(1): p. 52-62.
103. Ueta, M., et al., *PPARgamma ligands attenuate mesangial contractile dysfunction in high glucose*. Kidney Int, 2004. **65**(3): p. 961-71.
104. Amato, A.A. and F. de Assis Rocha Neves, *Idealized PPARgamma-Based Therapies: Lessons from Bench and Bedside*. PPAR Res, 2012. **2012**: p. 978687.
105. Choi, J.H., et al., *Antidiabetic actions of a non-agonist PPARgamma ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation*. Nature, 2011. **477**(7365): p. 477-81.