



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

**CHALCONA COMO MODELO DE ESTUDO
NO RECEPTOR ATIVADO POR
PROLIFERADOR PEROXISSOMAL (PPAR)**

DANIELA DA FONSECA HERMES ORNELLAS DE GUSMÃO

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni

Dissertação submetida à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde

Brasília, 2008

Daniela da Fonseca Hermes Ornellas de Gusmão

CHALCONA COMO MODELO DE ESTUDO NO RECEPTOR ATIVADO
POR PROLIFERADOR PEROXISSOMAL (PPAR)

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade
de Brasília para obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni

2008

Trabalho realizado no Laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Dedico esse trabalho a minha avó Fernanda (*in memoriam*),
Aos meus pais, Luiz Guilherme e Maria Teresa, meus irmãos Diego e Débora
e meu avô Ary.

Agradecimentos

Aos meus pais, por toda a dedicação e incentivos incessantes, pelo orgulho de ter uma filha pesquisadora e por todo apoio dado para a finalização desse projeto. Minha eterna gratidão. Aos meus irmãos pelos incentivos. Para o meu pai: Venceremos essa guerra juntos!!!

À minha avó Fernanda (*in memoriam*) que esperou e torceu tanto para a finalização desse projeto. Tenho certeza que esta torcida e orgulho continuam em algum lugar.

Ao meu avô Ary pelas doses de incentivo diário. Obrigado pelo carinho!

Ao meu Orientador Luiz Alberto Simeoni meu grande agradecimento por ter me aceitado como aluna e tornado-se meu orientador. Agradeço pelos ensinamentos, e a oportunidade de convívio que foram tão especiais formando uma parceria atípica, mas que com certeza deu certo. Muito Obrigada de coração.

Ao professor Francisco Neves pelos ensinamentos tão preciosos para elaboração e finalização desse projeto. As professoras Damaris Silveira pela ajuda na elaboração da dissertação e à professora Marie Togashi pelo auxílio nos experimentos.

À minha madrinha Lenise pelo apoio eterno e carinho, que com certeza foram fundamentais para a finalização desse projeto. Aliás, acho que tenho que serei eternamente grata a esse mestrado por ter colocado você na minha vida.

À amiga Adriana Oliveira meu eterno agradecimento. Aprendi que meu motivo de estar aqui não era apenas desenvolver um grande estudo, mas descobrir o real significado da palavra amizade. Obrigada por me incentivar nos momentos difíceis, pelos ensinamentos e por toda a sua presteza que é notável. Obrigada pela sua amizade, minha querida amiga!!!

À amiga Angélica Amato, a qual acabei chamando de Angel, acabou sendo o apelido ideal, já que realmente foi um anjo em todo o meu percurso deste mestrado, além da ajuda e grandes ensinamentos se mostrou pronta a ajudar a qualquer hora e teve papel **essencial** na finalização desse trabalho. Obrigada por tudo, e como sempre te digo obrigada por me dar à oportunidade de conhecer uma pessoa realmente espiritualizada. Thank you, my Angel!

Ao professor Carlos Frederico Castro pela colaboração com o Laboratório por ter cedido as chalconas para os experimentos.

Aos amigos Ranieri e Gustavo pelo ensino e auxílio na execução do ensaio GST!

Às amigas Rilva e Cristina Simeoni pela grande ajuda e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Molecular: Viviane, Karime, Rut, Fanny, Karine, Monalisa, Sócrates, Anderson, Ana Caroline e a aluna de PIBIC Juliana e um

agradecimento especial a Elaine Maria Franzotti por ter me passado todo os ensinamentos e procedimentos no laboratório.

Às amigas: Mariana Borsoi, Anna Carolina, Bianca, Mariana Andrade e Fernanda (minha cunhadinha)!

E especialmente à minha sobrinha e afilhada Letícia que chegou na metade do mestrado mas foi um incentivo sem tamanho! Olhar a sua foto me dava força para continuar e vencer a cada dia! Obrigada por ter vindo para minha vida.

Resumo

Os Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais (PPAR) são conhecidos como fatores de transcrição que regulam a expressão de genes envolvidos em importantes processos fisiológicos como o metabolismo lipídico, homeostase da glicose e atividades inflamatórias. Com isso, o desenvolvimento de ligantes que atuem de forma agonista nesses receptores aponta como um promissor alvo de estudos para o tratamento de desordens como o *Diabetes mellitus*, dispilidemia e arteriosclerose.

Atualmente, no mercado farmacêutico, o uso das tiazolidinadionas (TZD) - ligantes sintéticos do PPAR γ - é bem difundido na prática clínica. Esta classe de fármacos promove sensibilidade à insulina e melhora no *Diabetes mellitus* tipo 2, embora apresente limitações terapêuticas e efeitos indesejáveis. Os flavonóides, mais especificamente as chalconas, também são objeto de grande interesse devido às suas diversas propriedades farmacológicas. Neste estudo, uma série de chalconas sintéticas foi testada para avaliar a possível atividade agonista para PPAR.

Por meio de ensaio de transfecção transitória em cultura de células U937 e ensaios de gene-repórter, os resultados obtidos mostraram que CF1 (desidroxichalcona) e CF3 (4'-metoxichalcona) apresentaram um aumento na transcrição mediada por PPAR γ , além de um efeito sinérgico na presença de troglitazona - ligante sintético de PPAR γ da família das TZD. O mesmo ensaio foi feito com as outras isoformas do PPAR (α e δ), não sendo obtido o mesmo resultado para a atividade agonista, entretanto, apresentaram efeito sinérgico na presença do ligante sintético bezafibrato. Não houve atividade agonista das chalconas CF1 e CF3 nos receptores de estrogênio (Er α e ER β), do hormônio tireoidiano TR β e do ácido *cis*-9-retinóico (RXR), o que sugere uma atividade agonista seletiva destas chalconas em PPAR γ . A atividade agonista da CF1 também foi comprovada *in vitro* por meio de ensaio de GST *pull down*, em que foi observado que a CF1 proporcionou interação entre PPAR γ e o co-ativador SRC1, o que corrobora com os resultados de transfecção.

Os resultados obtidos nesta dissertação mostram chalconas como agonistas promissores para PPAR, e contribuem para futuras pesquisas do desenvolvimento de moléculas agonistas de PPAR para o tratamento de doenças crônicas como o *Diabetes mellitus* e a dispilidemia. Palavras-chave: chalconas, PPAR, *Diabetes mellitus*, TZD

Abstract

Peroxisome proliferators-activated receptors (PPAR) are genes regulators of important physiological processes, such as glucose homeostasis and inflammatory processes. Therefore, the development of ligands which behave as agonist for PPAR, have special interest in the research of the treatment of illnesses such as diabetes mellitus, dislipidemia and arteriosclerosis.

Presently, the usage of troglitazone a synthetic ligant for PPAR- γ from thiazolidinediones (TZD) family is well known in the pharmacological marketplace. This type of drugs causes a sensibility to insulin and the improvement in treatment of diabetes mellitus 2. Despite some therapeutic limitations and some non desirable side effects as well. The flavonoids, more specifically chalcones, are also subject of interest due to their many pharmacological proprieties.

The present thesis aims at the research of some kind chalcones, from the *Helianthus annuus species*, so that to evaluate their performances as possible PPAR agonists. Transfection assay in U937 cell were performed using expression vectors PPAR γ - α and - δ and the PPARE-tk-luc repórter, it has been observed that as CF1 (Chalcone) as CF3 (4' metoxichalcone) presented an increase in the activation of PPAR- γ , besides the synergetic effect related to receptor activator by troglitazone. The same experiment was done with others subtypes PPAR α and PPAR δ . However, the final result was not same. Equally, there was not an increase of the transcription when other receptors such as ER α , ER β , TR β and gal-RXR were used, which demonstrates that CF1 and CF3 actually are selective agonists of PPAR- γ . The agonist activity of CF1 has also been proven *in vitro* by means of GST *pull down* assays, where it was observed that CF1 induced coactivator SRC1 recruitment and transactivation of PPAR- γ , which works accordingly with the transfection assays.

The results of this study demonstrate that chalcones are agonists for PPAR- γ . In short, we hope that the results of the present work shall give a contribution to further researches in the usage of agonist molecules in PPAR in the treatment of chronic diseases such as diabetes mellitus and dislipidemia.

Keywords:chalcone,PPAR,Diabetes,thiazolidinediones

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

9-cis	Ácido <i>cis</i> -9-retinóico
ACC	Acetil CoA carboxilase
AF-1	Função de ativação 1
aP2	Proteína de ligação a ácidos graxos
AR	Receptor de androgênio
ATP	Adenosina-trifosfato
BEZA	Bezafibrato
CMV	Citomegalovírus
CTE	Extensão carboxi-terminal
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DM1	<i>Diabetes mellitus</i> 1
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DR	Repetição direta
E ₂	Estradiol
ER	Receptor de estrogênio
EC ₅₀	Concentração necessária para se obter metade da resposta máxima
FFA	Ácidos graxos livres
FXR	Receptor de farnesóides
GLUT	Transportador para glicose
GR	Receptor de glicocorticóide
GST	Glutathiona-S-Transferase
GST-SRC1	Proteína de fusão entre GST e SRC1
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HRE	Elemento responsivo
IGFR	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-6	Interleucina-6
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato do receptor da insulina

LBD	Domínio de ligação ao ligante
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Luc	Luciferase
MR	Receptor de mineralocorticóide
NH ₂ -t	Região amino-terminal
PBS	Tampão fosfato salino
pGEX	Vetor para expressão de proteína de fusão com GST
PPAR	Receptor ativado por proliferador peroxissomal
PPRE	Elemento responsivo ao PPAR
PR	receptor de progesterona
PXR	Receptor de pregnanos
RAR	Receptor de ácido retinóico
RN	Receptor nuclear
RNA	Ácido ribonucléico
RXR	Receptor do ácido <i>cis</i> -9-retinóico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SMRT	Co-repressor de receptores nucleares
SRC-1	Co-ativador de receptores nucleares
SREBP ou ADD1	<i>sterol regulatory elemen-binding proteins</i>
SUR	Receptor de sulfoniluréias
TGF-β	Fator de crescimento transformador-β
TRO	Troglitazona
TZD	Tiazolidinadionas
Tk	Timidina quinase
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
U937	Células pró-monocíticas humanas
VDR	Receptor da vitamina D

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 - Receptores Nucleares	12
1.1.2 - <i>Mecanismo de ação</i>	16
1.1.3 - <i>Potencial Farmacológico dos receptores nucleares</i>	19
1.2 – PPAR - Receptor Ativado por Proliferador Peroxissomal	20
1.2.1- <i>Fisiologia do PPAR</i>	21
1.3 - Diabetes mellitus	23
1.3.1 - <i>Fisiopatologia do DM2 – Resistência Insulínica e a Síndrome Metabólica</i>	24
1.3.2 - <i>Tratamento farmacológico</i>	26
1.4 - Produtos naturais e receptores nucleares	29
2. OBJETIVOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
2.1 Objetivo Geral	34
2.2 Objetivos Específicos	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Plasmídeos Utilizados	35
3.1.1 - <i>Transformação</i>	35
3.1.2 - <i>Purificação de Plasmídeos</i>	36
3.2 - Cultura de células	36
3.2.1 - <i>Transfecção e Ensaio Gene Repórter</i>	36
3.3 - Síntese (transcrição e tradução) <i>in vitro</i> de Proteínas	37
3.4 - Eletroforese de Proteínas em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	38
3.5 - Expressão e Purificação de Proteínas Recombinantes em <i>Escherichia coli</i>	39
3.6 - Ensaio de interação proteína-proteína em solução (GST <i>Pull Down Assay</i>)	40
3.7 - Análise Estatística	42
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5. CONCLUSÃO	55
6. PERSPECTIVAS	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 - Receptores Nucleares

Receptores nucleares (RN) são proteínas que agem pela regulação da transcrição de genes-alvo, mediando os efeitos dos hormônios nas células. Atuam como fatores de transcrição com as seguintes características: respondem a uma grande variedade de reguladores hormonais ou sinais metabólicos de maneira direta, ou seja, por meio da associação física com os mesmos; integram várias vias de sinalização podendo ser, eles próprios, alvos de modificação pós-traducional; e regulam a atividade de outras cascatas de sinalização (normalmente referidas como transdução de sinal) (HODGKIN, 1999). São essenciais para o desenvolvimento embrionário, para a manutenção da diferenciação de fenótipos celulares, metabolismo e morte celular. A disfunção na sinalização dos RN pode levar a doenças proliferativas, reprodutivas e metabólicas como o câncer, infertilidade, obesidade e *diabetes mellitus* (GRONEMEYER, 2004).

A superfamília dos RN compreende 49 genes que codificam 75 proteínas diferentes (BOOKOUT, 2006) que têm a função de regular a transcrição de genes no interior do núcleo celular. A identificação de receptores em insetos (KOELLE, 1991) como sendo membros da superfamília sugere uma origem comum destes receptores e claramente demonstra que sua evolução antecede a divergência de vertebrados e invertebrados (ESCRIVA, 1997; GERMAIN, 2006).

A análise do genoma humano levou à constatação de que muitos genes que codificam os RN geraram mais de uma isoforma (MANGELSDORF, D. J., 1995b). Baseando-se nas propriedades de ligação ao ligante, os RN podem ser divididos em três classes: **(Figura 1)** (FEIGE, 2007).

a) Receptores clássicos: ligam-se com alta afinidade a moléculas como o glicocorticóide, hormônio tireoideano, ácido retinóico, estrogênio, entre outras. São peças-chave na regulação da homeostase endócrina e a sua ativação está ligada a diversos fatores metabólicos;

b) Receptores nucleares sensores de metabólitos: esta classe inclui receptores que se ligam a uma gama de ligantes, mas com baixa afinidade. Esta ligação é feita com importantes moléculas que muitas vezes são substratos ou o produto final de vias metabólicas como ácidos graxos, eicosanóides e oxiesteróis;

c) Receptores órfãos: possuem a característica estrutural dos RN, contudo os seus ligantes ainda não foram identificados. Com isso, a função de muitos receptores órfãos permanece desconhecida (KLIEWER, 1997).

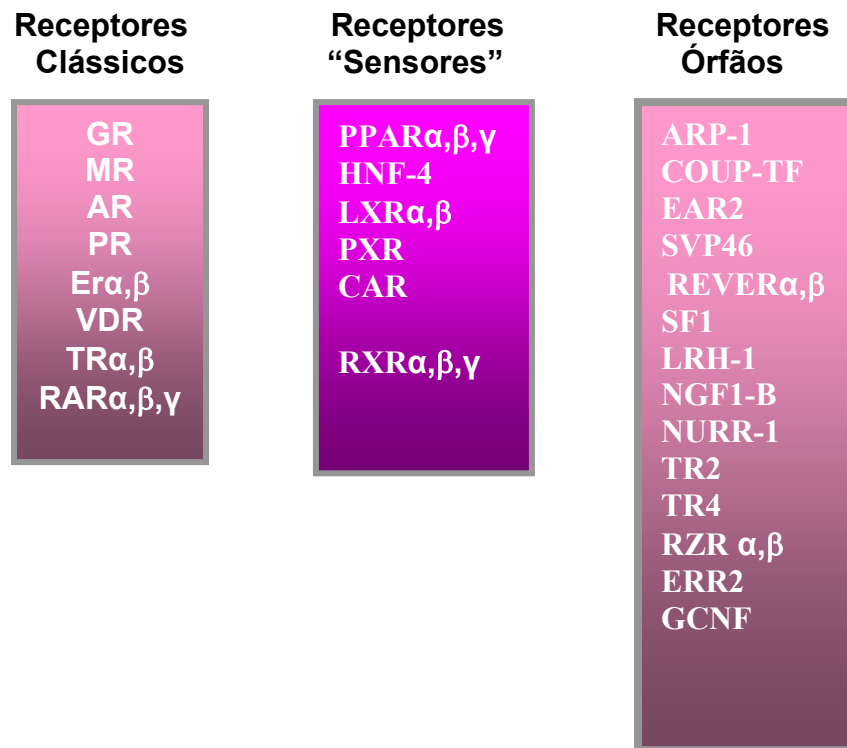


Figura 1: Família dos receptores nucleares.

Divisão em três categorias: receptores clássicos, receptores sensores e receptores órfãos.

Pode ser destacada a função de alguns receptores como, por exemplo, os receptores do estrogênio (ER), progesterona (PR) e androgênio (AR), os quais são importantes na reprodução; receptores do glicocorticóide (GR) relacionados ao metabolismo da glicose e estresse; receptores do hormônio tireoideano (TR) ligados ao metabolismo oxidativo; e os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs)

que exercem função chave no metabolismo lipídico e energético (MANGELSDORF, D. J., 1995b).

A estrutura dos RN é modular apresentando regiões ou domínios distintos (RIBEIRO, R. C., 1998) (**Figura 2**). Os três módulos principais são:

i) Região amino-terminal (NH_2 -t), extremamente variável entre os membros da superfamília, tanto no tamanho quanto na seqüência de aminoácidos. Este domínio contém uma função de ativação transcricional independente do ligante, denominada função de ativação 1 (AF-1) (RIBEIRO, R. C., 1995; WARNMARK, 2003), que é distinta para cada receptor, além de ser responsável pelo reconhecimento de co-ativadores e outros fatores de transcrição (LEE, 1999);

ii) Domínio de ligação ao DNA (DBD) módulo mais bem conservado entre todos os receptores nucleares e tem como função principal a ligação ao DNA. Este domínio situa-se na porção central dos receptores e é composto por duas estruturas conhecidas por *zinc fingers* (dedos de zinco), onde quatro resíduos de cisteína de cada dedo formam complexos coordenados por íons de zinco, formando duas estruturas independentes em forma de alça, seguidas por uma extensão carboxi-terminal (CTE) (MANGELSDORF, D. J., 1995b; KHORASANIZADEH, 2001). A integridade de cada dedo de zinco é crítica, pois deleções ou substituições das unidades cisteínas comprometem a ligação do receptor ao DNA e, conseqüentemente, sua atividade transcricional (YEN, 1995). Os dois dedos de zinco são separados por uma seqüência de 15 a 17 aminoácidos. Três aminoácidos na base do primeiro dedo, região chamada *P-box*, são responsáveis pelo reconhecimento específico do elemento responsivo ao hormônio (HRE) (UMESONO, 1989; ZILLIACUS, 1994; LAUDET, 1997; ROBINSON-RECHAVI, 2003) ao passo que uma seqüência de cinco aminoácidos, entre a primeira e a segunda cisteína na base do segundo dedo, também chamada de *D-box*, é importante para a dimerização do receptor. Os termos *P-box* e *D-box* estão relacionados com a posição proximal e distal destas regiões, funcionalmente distintas, em relação ao domínio amino-terminal do receptor (GLASS, 1994);

iii) Domínio de ligação ao ligante (LBD), menos conservado que o DBD reflete a variedade de ligantes que atuam nestes receptores. Este domínio localiza-se na região carboxi-terminal e participa na dimerização do receptor, localização nuclear, dissociação das proteínas de choque térmico (HSPs) e interação com proteínas co-repressoras

(HORLEIN, 1995; MCKENNA, NEIL. J., 1999) e co-ativadoras (GLASS, 1994; HEERY, 1997; FENG, 1998) que atuam na repressão ou ativação da transcrição (GLASS, 1994; RIBEIRO, R. C., 1995; BOURGUET, 2000; WU, 2001b; MCKENNA, N. J., 2002). A ligação do hormônio a este domínio resulta em mudanças conformacionais nos receptores e influencia a sua associação a proteínas com propriedades na regulação da transcrição (WU, 2001b; NAGY, 2004).

Além dessas funções, o LBD compreende também uma função de ativação transcricional 2, chamada de AF-2, que é dependente da presença do ligante e interage com proteínas auxiliares para se comunicar com o complexo de transcrição (LUIZI, 1995; WU, 2001a). Entre os domínios LBD e DBD há uma região denominada *hinge*, que é pouco conservada e está associada com a localização nuclear dos receptores e associação com co-repressores. O domínio LBD nos PPARs encontra-se em um tamanho maior comparado a outros receptores (BROWN, J. D., 2007), oferecendo maiores vias para dimerização, assim como a interação com proteínas co-reguladoras, o que é extremamente importante para a modulação deste receptor (GELMAN, 2007). Nos PPARs, estes domínios permitem que ajam como sensores de lipídios e xenobióticos

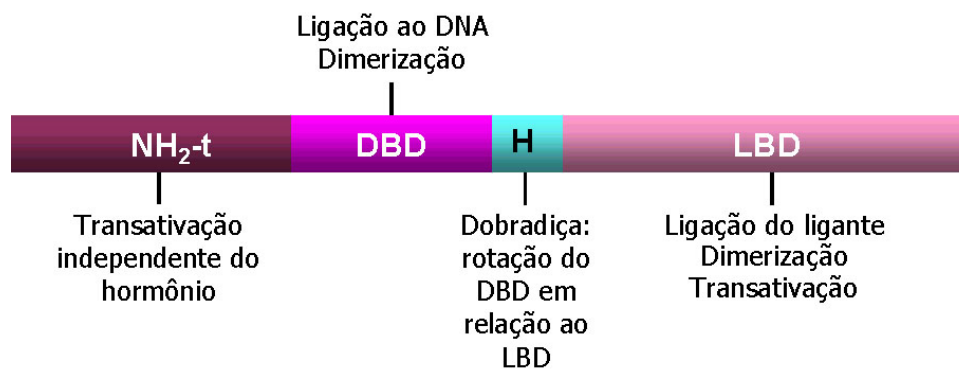


Figura 2: Estrutura linear representando os domínios funcionais dos receptores nucleares e suas funções: domínio amino-terminal (NH₂-t), domínio de ligação ao DNA (DBD), dobradiça (*Hinge*) e domínio de ligação ao ligante (LBD). Fonte: (BARRA, 2004)

1.1.2 - Mecanismo de ação

A sinalização celular entre os receptores nucleares ocorre pela resposta destes às centenas de moléculas sinalizadoras, como proteínas, aminoácidos, esteróides, retinóides, nucleotídeos, etc. Estes receptores são mantidos no núcleo, no estado reprimido, pela ação de co-repressores, entre eles o mediador do silenciamento do receptor do ácido retinóico e do hormônio tireoideano (SMRT). Estes atuam como fortes repressores da transcrição gênica e recrutam histonas desacetilases mantendo a cromatina condensada. Esta forma é chamada de repressão transcricional (YU, 2007). Quando ocorre a interação de agonistas com o seu domínio LBD há uma resposta direta neste receptor que apresenta uma mudança conformacional, além de posterior dissociação do complexo co-repressor e a associação ou recrutamento de co-ativadores.

O receptor PPAR liga-se com outro receptor nuclear, o receptor do ácido *cis*-9-retinóico (RXR), formando um heterodímero. A partir da entrada do ligante este complexo é então translocado ligando-se ao seu elemento responsivo (**Figura 3**) (EVANS, 1988; BEATO, 1991; NAAR, 1991; BARRA, 2004).

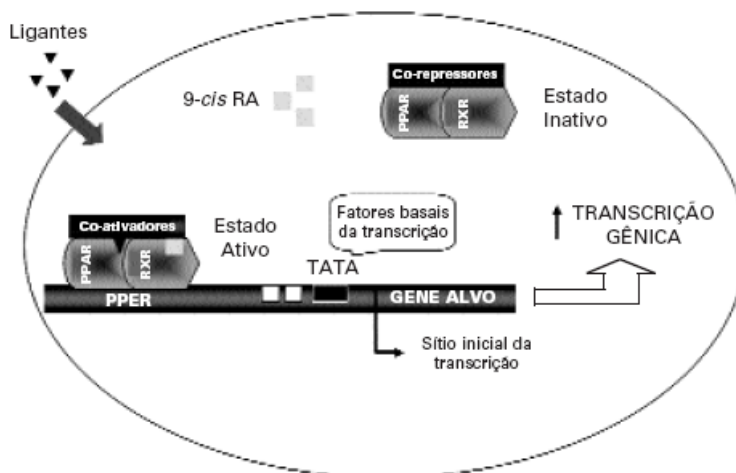


Figura 3: Mecanismo de regulação transcricional do PPAR.

Requer a liberação do complexo co-repressor (atividade desacetilase da histona), feito por um ligante, e o recrutamento de complexo co-ativador (atividade acetiltransferase). O complexo PPAR:RXR ativado liga-se ao PPRE, produzindo alteração na estrutura da cromatina, originando uma estrutura transcricionalmente competente (TAVARES, 2007)

Os HREs localizam-se na região promotora dos genes alvos (RIBEIRO, R. C. J., 1995) e são específicos para cada receptor. Geralmente, os HREs possuem duas cópias imperfeitas de um hexanucleotídeo que podem estar arranjadas em diferentes orientações, com espaçamento e seqüências flanqueadoras diferentes (NAAR, 1991; BARRA, 2004). Os receptores nucleares associam-se aos HREs como monômeros, homodímeros ou heterodímeros (GLASS, 1994; ARANDA, 2001a; KHORASANIZADEH, 2001).

Os receptores para os hormônios esteroidais formam a subclasse de receptores esteroidais ou tipo I da superfamília de receptores nucleares (MANGELSDORF, D. J., 1995b; KHORASANIZADEH, 2001). Na ausência do ligante, os receptores de glicocorticóides (GR), mineralocorticóides (MR), androgênios (AR), estrógeno (ER) e progesterona (PR) estão associados em um complexo com proteínas de choque térmico (HSPs) no citoplasma e em alguns casos no núcleo da célula. A ligação do hormônio dissocia os receptores desse complexo e induz à formação de homodímeros que se dirigem ao núcleo, onde se ligam aos seus respectivos HREs regulando a transcrição gênica (RIBEIRO, R.C., 1992; GERMAIN, 2006). Os receptores de hormônios esteroidais ligam-se na forma de homodímeros a elementos responsivos, constituídos de um palíndromo espaçado por três bases contendo duas cópias do hexanucleotídeo AGAACA, exceto ER que se liga às seqüências AGGTCA também na forma de palíndromo espaçado por três bases (GLASS, 1994; RIBEIRO, R. C. J., 1995; ARANDA, 2001a).

A outra subclasse de receptores não esteroidais ou tipo II da superfamília dos RN é representada pelos receptores dos hormônios tireoideanos (TRs), do ácido retinóico (RAR), da vitamina D (VDR), e os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs), que formam heterodímeros com o RXR (MANGELSDORF, D. J., 1995b; KHORASANIZADEH, 2001). Estes receptores na ausência do hormônio, estão localizados no núcleo associados ao DNA (LAZAR, 2005). Essa subclasse liga-se preferencialmente a repetições diretas (DRs) do hexâmero AGGTCA (AGGTCA N AGGTCA), onde 'N' é o número de bases que separa cada hexâmero e que determina a especificidade da ligação (UMESONO, 1991). A capacidade de cada receptor reconhecer os HREs constituídos por repetições diretas é chamada de regra 1 a 5 (**figura 4**).

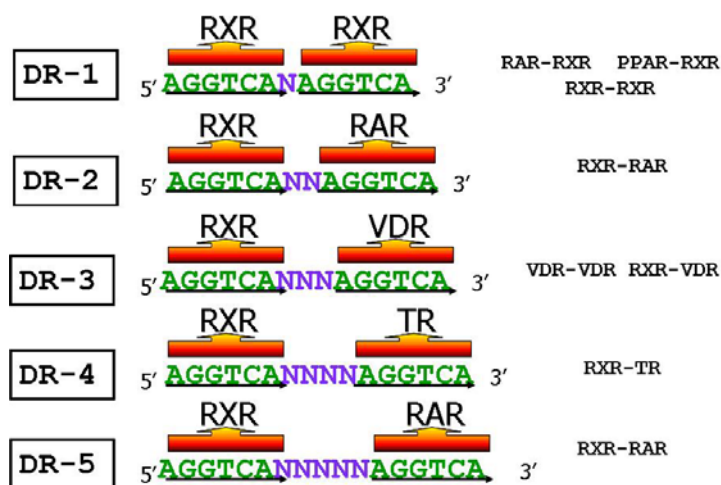


Figura 4: Esquema representando a regra 1 a 5 que especifica a ligação a repetições diretas (DRs), com espaçamentos variáveis (N), pelo RXR e os seus vários parceiros heterodiméricos. (BARRA, 2004)

Dessa forma, o PPAR e o RXR ligam-se a uma DR espaçada por uma base (DR-1), o RAR liga-se a DRs espaçadas por duas ou cinco bases (DR-2 e DR-5), o VDR a uma DR espaçada por três bases (DR-3); e o TR a uma DR espaçada por quatro bases (DR-4) (MANGELSDORF, D. J., 1994; MANGELSDORF, D. J., 1995a; KHORASANIZADEH, 2001). O RAR também pode ligar-se a uma seqüência DR-1 heterodimerizado com o RXR, porém neste elemento o RAR atua como um potente repressor da transcrição ativada pelo homodímero de RXR e seu ligante, o ácido *cis*-9-retinóico, visto que o complexo heterodimérico (RAR/RXR) tem uma maior afinidade por este sítio (MANGELSDORF, D.J., 1991; KUROKAWA, 1995; RASTINEJAD, 2001).

Muitos alvos gênicos de hormônios são silenciados na presença de ligantes, o que caracteriza o processo de transrepressão, onde os receptores, quando ligados a ligantes específicos, recrutam co-repressores e histonas desacetilases ou associam-se a co-ativadores que não se ligam ao DNA, seqüestrando estes e outros fatores de transcrição.

O mecanismo de dimerização tem por objetivo o aumento da afinidade e especificidade da ligação ao elemento responsivo; isto ocorre devido à ligação com o DNA (METZGER, 2005). A heterodimerização do PPAR com o RXR promove uma eficiência da ligação ao DNA, visto que há uma sinalização maior, uma para o ligante do RXR e outra para o ligante do PPAR (ARANDA, 2001b).

1.1.3 - Potencial Farmacológico dos receptores nucleares

Como foi dito anteriormente, os RN estão envolvidos em uma série de importantes processos fisiológicos como: crescimento, metabolismo, diferenciação celular, apoptose e manutenção da homeostase (RENAUD, 2000; ROBINSON-RECHAVI, 2003; TANEJA, 2005). Sabendo que estes mecanismos necessitam de uma ativação pela ação direta de um determinado ligante, os RN tornaram-se importantes alvos farmacológicos.

O PPAR γ é ativado por muitos agonistas naturais como prostaglandina 15-desoxi- Δ^{12} J2 (15d-PGJ2), alguns ácidos graxos poliinsaturados oxidados, fosfolipídeos, fármacos antidiabéticos, como é o caso das tiazolidinonas (TZD), responsáveis pela diminuição da glicose no sangue, fármacos antiesteroideais e antiinflamatórios. Contudo, o grande alvo das indústrias farmacêuticas com relação a esse receptor refere-se aos medicamentos que atuem no controle do diabetes e resistência à insulina.

Outros exemplos são o RAR e o RXR. Os retinóides são moléculas de sinalização que atuam por meio da interação com duas famílias de receptores de retinóides: A do receptor do ácido retinóico (RAR α, β, γ) e a do receptor do ácido *cis*-9-retinóico (RXR α, γ, β). Os receptores de retinóides são de extrema importância, pois regulam importantes e complexos eventos, demonstrando a capacidade de controle da atividade de diferenciação e antiproliferativa. Os retinóides são utilizados em larga escala no tratamento e prevenção de doenças como o câncer (GRONEMEYER, 2001).

O PR possui papel fundamental na manutenção do ciclo menstrual, gravidez e embriogênese (GRAHAM, 2005), assim como o ER, utilizado hoje como grande alvo na terapia de reposição hormonal. Contudo apesar dos efeitos positivos do uso de estrógenos, há evidências que o uso prolongado pode resultar em processo proliferativo de células neoplásicas (HENKE, 2002). Assim, buscam-se hoje medicamentos que mantenham o efeito positivo do estrógeno, mas que bloqueiem essa possível atividade neoplásica.

1.2 – PPAR - Receptor Ativado por Proliferador Peroxissomal

O PPAR é hoje um dos receptores nucleares mais estudados devido à sua associação a processos relacionados com a obesidade, metabolismo lipídico, resistência à insulina e *diabetes mellitus*. Os PPARs desempenham um papel central na regulação do catabolismo e da síntese de lipídeos atuando essencialmente como sensor de ácidos graxos e seus metabólicos intermediários (YU, 2007). O PPAR apresenta três isoformas muito estudadas, com distribuição tecidual e funções distintas.

O PPAR α é predominantemente expresso no fígado, sendo também encontrado no rim, coração, tecido adiposo marrom, endotélio e músculo esquelético. Os genes-alvo do PPAR α pertencem a um grupo relativamente homogêneo, relacionados ao processo do catabolismo lipídico como a oxidação (microsomas, peroxissomos e mitocôndrias), ligação e transporte de ácidos graxos pelas membranas, assim como com o transporte de lipoproteínas e transcrição de fatores inflamatórios (KERSTEN, 2000). Apresenta como ligantes endógenos os ácidos graxos livres e como ligante exógeno de uso clínico os fibratos (DESVERGNE, 1999).

A isoforma γ é muito expressa nos tecidos adiposo branco e marrom, intestino, células beta, endotélio e células hematopoiéticas (AKBIYIK, 2004). Esta isoforma está relacionada com a conservação de energia e adipogênese, neste caso ligada diretamente à diferenciação e maturação de adipócitos maduros. A maioria dos genes regulados pelo PPAR γ é expressa no tecido adiposo, e implica diretamente em vias lipogênicas, o que inclui a lipoproteína lipase (LPL), *adipocyte fatty-acid binding protein* (A-FABP ou AP2), acetil-coenzima A sintetase (acetil-CoA sintetase) e a proteína transportadora de ácidos graxos (FATp). O seu ligante natural ou endógeno é derivado de uma prostaglandina D2 (15 DPGJ2) resultante do metabolismo do ácido araquidônico e os ligantes sintéticos mais utilizados são os da classe das tiazolidinadionas (TZD) (WILLSON, 2000).

A última isoforma até hoje conhecida é o PPAR δ também conhecido como β ou β/δ . A sua distribuição é extremamente variada sendo encontrado no fígado, músculo, intestino e tecido adiposo, todavia o seu papel ainda não foi muito bem estabelecido devido à falta de conexão com manifestações clínicas. Entretanto, sabe-se que está ligado à regulação da expressão da acetil-CoA sintetase 2 no cérebro, verificando uma participação no metabolismo lipídico básico (RICOTE, 2007).

Em suma, cada isoforma do PPAR é codificada por genes de tecidos diferentes, ligações a ligantes específicos e promoção de regulação de genes únicos. A procura por agonistas sintéticos a este receptor é cada vez maior, incluindo agentes que possuam mais de uma isoforma como alvo chamados duplo agonistas ou panagonistas (BALAKUMAR, 2007)

1.2.1- Fisiologia do PPAR

Os PPARs, como já citado, são sensores lipídicos capazes de adaptar a expressão genética à sinalização de várias vias originárias da sinalização lipídica. A fisiologia dos PPARs pode ser melhor compreendida quando são considerados os dois períodos distintos com respeito ao metabolismo energético: o período pré-prandial ou pós-absortivo, e o período pós-prandial (DESVERGNE, 1999) (**Figura 5**).

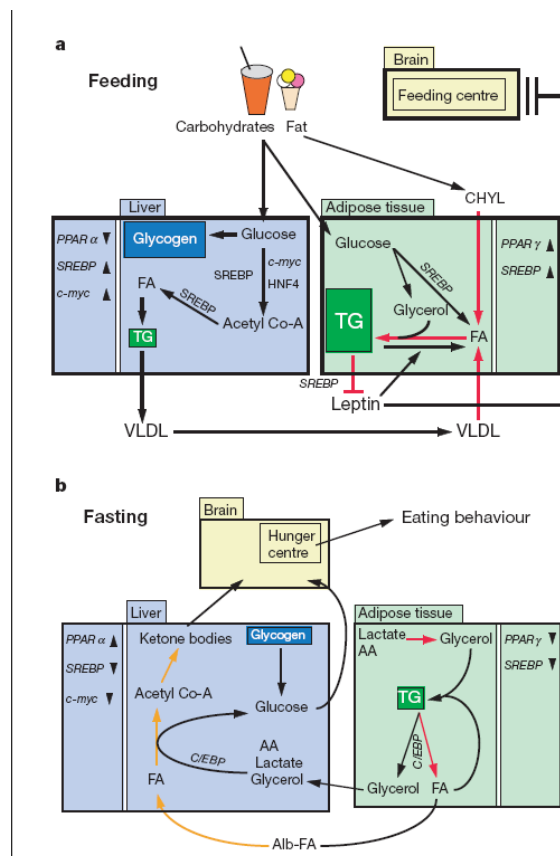


Figura 5: Fisiologia dos receptores PPAR α e PPAR γ nos processos de absorção e pós-absorção (KERSTEN, 2000).

Durante uma farta refeição, período pós-prandial, carboidratos e gorduras entram na circulação na forma de glicose e quilomícrons, respectivamente. A maioria da glicose é

captada pelo fígado, o restante será estocado na forma de glicogênio ou direcionado para a lipogênese. A homeostase dos lipídios nas células dos vertebrados é regulada por uma família de fatores de transcrição denominada SREBP (*sterol regulatory element-binding proteins*) (BROWN, M. S., 1997; HORTON, 1999). Eles atuam ativando diretamente em torno de 30 genes relacionados à síntese e captação de colesterol, ácidos graxos, triglicéridios e fosfolípidios, e ainda NADPH. No fígado há uma maior expressão da SREBP1c, a qual aumenta a transcrição de genes envolvidos na síntese de ácido graxo, como a acetil-CoA carboxilase (ACC), que converte acetil-CoA em malonil-CoA (SAKAKURA, 2001).

Quando há excesso de carboidratos, a produção de insulina é estimulada para que se inicie o processo de síntese ácido graxo no fígado. Tem sido sugerido que este efeito da insulina seja mediado pela SERBP-1c (FORETZ, 1999; SHIMOMURA, 1999).

Assim, no período de absorção, é observado que no tecido adiposo há uma elevada expressão de SREBP-1c ou ADD1 e, conseqüentemente, do PPAR γ , visto que os genes-alvo desta proteína são os relacionados ao metabolismo do colesterol e lipogênese como é o caso deste receptor. Os ácidos graxos são convertidos para a forma de triglicérides e estocados como proteínas de baixa densidade (VLDL). Este aumento na expressão de ambos explica-se pela regulação da insulina necessária neste período (FAJAS, 1999).

Os estoques de triglicérides levam a um aumento da produção de leptina no tecido adiposo. Esta proteína é codificada pelo gene *ob* e secretada por adipócitos, sendo responsável pela sensação de saciedade do organismo atuando em uma mecanismo de *feedback* negativo para limitar a ingestão de alimento e ganho de peso exagerado (KERSTEN, 2000). As expressões de PPAR γ e de leptina são aumentadas no período pós-prandial e reduzidas no período pré-prandial; neste último o PPAR γ diminui a expressão da leptina (WANG, 1999).

O período pré-prandial representa a situação que indica a diminuição dos níveis de glicose no sangue e, por conseguinte diminuição da insulina e aumento de glucagon. Para que haja a manutenção do suporte de energia durante este período, o organismo deve apresentar uma lipólise eficiente no tecido adiposo para que ocorra a liberação sistêmica de ácidos graxos e glicerol. Na falta de glicose a quebra de gordura deve ser feita em

todos os tecidos possíveis, promovendo quantidades suficientes de glicose para os tecidos insulino-dependentes como é o caso do cérebro.

Após a absorção dos nutrientes, os estoques de energia apresentam-se no fígado na forma de triglicerídeos e glicogênio, no músculo na forma de glicogênio e no tecido adiposo branco como triglicerídeos. Esta absorção é estimulada diretamente pelo PPAR α , que está com a sua expressão elevada (KERSTEN, 1999), o que leva no fígado, à oxidação de ácidos graxos pela acetil-CoA resultando em corpos cetônicos como acetato e β -hidroxibutiratos. Na ausência da ação do PPAR α , há a formação de elevados níveis plasmáticos de ácidos graxos livres resultando em hipercetonemia, hipertermia e hiperglicemia (LEONE, 1999).

A expressão de SREBP1 e PPAR γ encontra-se diminuída (LIANG, 2002), entretanto o processo de lipogênese continua. Isto ocorre porque o PPAR γ atua controlando positivamente a expressão de efetores da gliconeogênese - formação de glicose por meio de conversão de compostos aglicanos (não açúcares e não carboidratos)-mostrando que a lipogênese é dependente do PPAR mesmo em condições altas de catabolismo, o que ocorre no pré-prandial (KERSTEN, 2000).

1.3 - Diabetes mellitus

Diabetes mellitus é uma doença metabólica crônica caracterizada por um conjunto de distúrbios, dentre as quais podemos destacar: a hiperglicemia e o metabolismo alterado de lipídeos e proteínas associado a complicações crônicas microvasculares e macrovasculares. Essa enfermidade atinge atualmente 170 milhões de pessoas no mundo. Estudos indicam que essa epidemia pode atingir 220 milhões de indivíduos em 2010 e 377 milhões em 2025 (ZIMMET, 2001). Apresenta-se basicamente em duas formas: *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1), *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) (ZIMMET, 2001).

O DM1 inicia-se na infância ou adolescência, onde há um déficit da produção de insulina devido à destruição das células beta do pâncreas por processos auto imunes. O paciente deve receber doses diárias de insulina, uma dieta específica e praticar moderadamente exercícios. O DM2 apresenta-se com maior freqüência na vida adulta, e seu desenvolvimento está relacionado a fatores genéticos e ambientais. Estes últimos incluem a obesidade e o sedentarismo (NEHLIN, 2006). A etiologia da doença é de forma

complexa, visto que pode apresentar múltiplas e intrínsecas causas associadas a outras doenças, onde o histórico familiar e o estilo de vida são muito importantes para o estudo do paciente (BLASCHKE, 2006).

A obesidade e a dislipidemia constituem dois fatores extremamente marcantes para o desenvolvimento da resistência à insulina, onde ocorre uma dificuldade do músculo esquelético em transportar e metabolizar a glicose (LAZAR, 2005). Ainda com relação a obesidade nota-se um grande aumento do tecido adiposo onde este, anteriormente, era visto apenas como um depósito de energia e hoje já é sabido que age como um órgão endócrino, o qual secreta milhares de citocinas extremamente importantes, as quais participam da regulação de importantes processos, como, por exemplo, apetite, balanço energético, homeostase, imunidade, inflamações, metabolismo lipídico e sensibilização à insulina. Essas citocinas são também chamadas de adipocinas (TRAYHURN, 2004). A resistência à insulina pode não somente aumentar o risco de desenvolvimento de diabetes, como também contribui para riscos vasculares relacionados à síndrome metabólica.

1.3.1 - Fisiopatologia do DM2 – Resistência Insulínica e a Síndrome Metabólica

A insulina é um hormônio anabólico, que possui fundamental importância no metabolismo e homeostase da glicose, lipídios e proteínas é o principal responsável pela redução da glicemia (taxa de glicose no sangue). Além disso, também promove o estoque de lipídios, proteínas e carboidratos, inibindo a sua degradação e liberação de volta à circulação (CHANG, 2004). É produzida no pâncreas pelas células beta nas ilhotas de Langerhans, que agem principalmente nos músculos e no tecido adiposo (SALTIEL, 2002).

A ação da insulina estimula o GLUT4 (transportador específico da glicose) a aumentar o transporte da glicose no músculo e tecido adiposo, o que inibe a produção de glicose hepática sendo, assim, caracterizado como o principal regulador inicial da concentração da glicose no sangue (SALTIEL, 2001). Ela estimula a produção de diversas proteínas, quinases fosfatases, além de promover o crescimento e diferenciação celular e ativação ou repressão transcricionais. O receptor da insulina é a tirosina quinase, que irá catalisar a fosforilação de inúmeros substratos intracelulares como GAB-1, proteínas IRS e IRS (SALTIEL, 2002).

A síndrome metabólica compreende um conjunto de fatores de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular, incluindo obesidade central, hipertensão arterial sistêmica, hipertrigliceridemia, níveis reduzidos de colesterol HDL e alterações do metabolismo dos carboidratos, incluindo glicemia de jejum alterada ou *diabetes mellitus*. Embora sua etiologia não esteja completamente estabelecida, há diversas evidências de relação causal com resistência insulínica e obesidade central. É importante ressaltar, no entanto, que nem sempre a obesidade associa-se a comprometimento da ação da insulina, e muitos pacientes obesos podem apresentar sensibilidade insulínica normal. Esse quadro clínico quase sempre está associado à obesidade, porém há casos de pacientes obesos que apresentam ainda uma tolerância à insulina. (MEDINA-GOMEZ, 2007).

Uma explicação para a associação entre síndrome metabólica, obesidade central e resistência insulínica estaria no sensível aumento do tecido adiposo visceral, causando um estado inflamatório crônico, devido ao aumento de citocinas pelos adipócitos ou até mesmo por possíveis macrófagos infiltrados no tecido. Outras citocinas não específicas para adipócitos como TNF α (fator de necrose tumoral) e IL6 (interleucina 6) (LAZAR, 2005), quando liberadas pelo tecido adiposo poderiam, também, atrapalhar a via sinalizadora da insulina (GOMES MDE, 2006).

No primeiro estágio é observado que há altos níveis circulantes de triglicérides e baixos de HDL no sangue. A glicemia no período pós-absorção ou durante a absorção encontra-se normal mostrando a capacidade das células β em secretar insulina para evitar a elevação da glicemia e, de alguma forma, compensar a resistência à ação do hormônio. O segundo estágio da síndrome caracteriza-se pelo grande aumento da glicemia pós-prandial associado ao aumento da insulinemia, o que já mostra sinais de complicação da doença, pois passa a apresentar um grande risco para o desenvolvimento de microangiopatias. No último estágio, o DM2 já está estabelecida, sendo necessário o tratamento farmacológico para controlar os níveis altos da glicemia, a resistência à insulina, dislipidemia e possíveis complicações vasculares.

Enfim, a resistência à insulina é caracterizada pela inabilidade dos tecidos periféricos em responder apropriadamente à insulina, levando ao comprometimento do controle da glicose e do metabolismo lipídico, refletindo em uma diminuição da captação de glicose pelo músculo esquelético, aumento da produção de glicose hepática e hiperglicemia pós-prandial (BAILEY, 2007).

1.3.2 - Tratamento farmacológico

O *Diabetes mellitus* frequentemente apresenta-se em associação com outras disfunções, como hipertensão arterial, microalbuminúria e dislipidemias, aumentando seriamente o risco do paciente apresentar complicações como aterosclerose e doenças cardiovasculares. Há uma vasta gama de medicamentos oferecidos atualmente pelo mercado farmacêutico para o controle glicêmico no DM2, alguns estão mostrados na **figura 6** como: sulfoniluréias (clorpropamida **1**), inibidores da α -glicosidase (acarbose **2**), biguanidas (metformina **3**), tiazolidinonas (troglitazona **4**, pioglitazona **5** e rosiglitazona **6**) e fibratos (bezafibrato **7**) (HAMILTON, 2007).

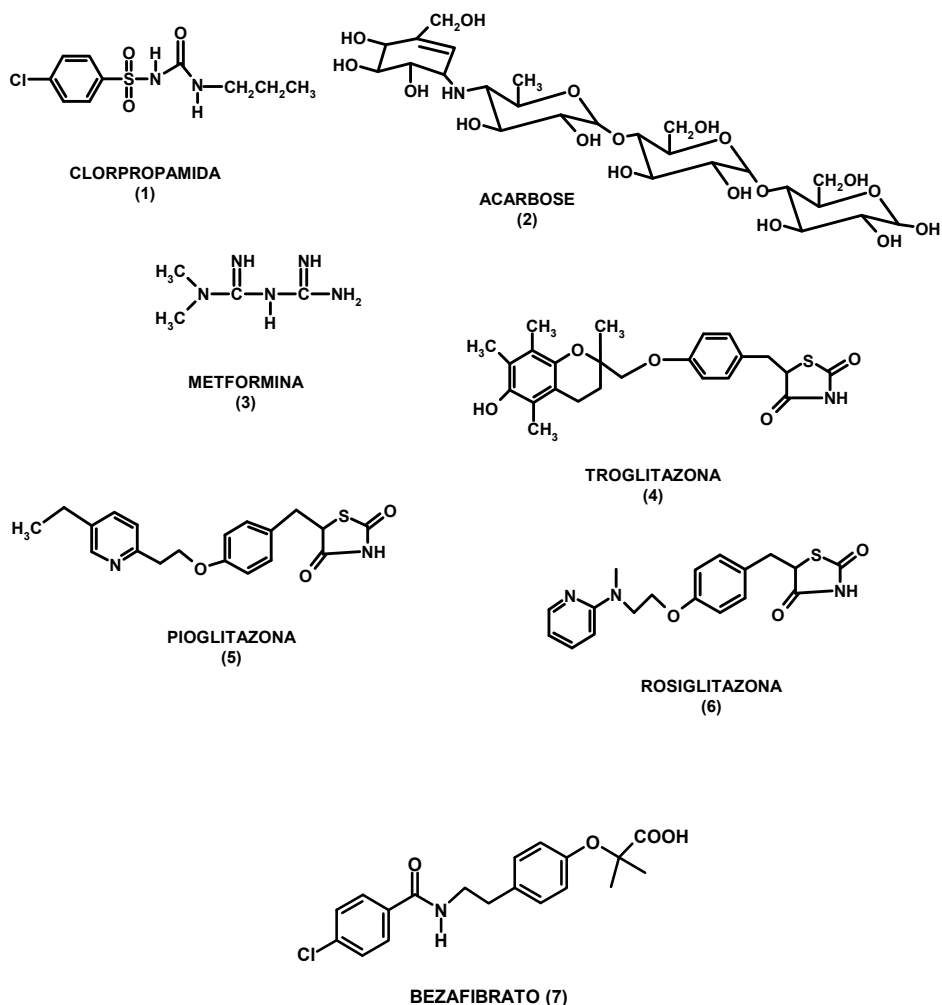


Figura 6: Estruturas químicas de alguns medicamentos encontrados no mercado para o controle glicêmico no DM2.

As sulfoniluréias reduzem a glicemia pós-prandial, por meio da ligação específica ao receptor SUR1 presente nas células β do pâncreas, resultando no bloqueio de canais de potássio, sensíveis à ATP, havendo um aumento do influxo de cálcio para o interior da célula, estimulando a secreção endógena da insulina (INZUCCHI, 2002). Contudo, as sulfoniluréias apresentam efeitos colaterais como hipoglicemia e ganho de peso (MATTHAEI, 2000). Um dos medicamentos muito usado na medicina atualmente é a clorpropamida (1)

Já o inibidor da α -glicosidase também atua na glicemia pós-prandial, porém age diretamente nos carboidratos retardando a sua absorção. Um exemplo deste fármaco é a acarbose (2), entretanto, já foi constatado que a utilização desse fármaco pode provocar distúrbios gastrointestinais (MANZELLA, 2005).

Também muito utilizado nos dias de hoje é a metformina (3), principal exemplo da classe das biguanidas. Sua principal ação está na supressão da gliconeogênese hepática e no aumento à sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos, porém o emprego das biguanidas pode apresentar distúrbios gastrointestinais (NATALI, 2004).

As tiazolidinadionas atuam diretamente nos adipócitos melhorando a sensibilidade à insulina e reduzindo a glicemia, via receptor nuclear PPAR γ por meio do efeito direto sobre os adipócitos. Esta ação ocorre na diferenciação dos pequenos adipócitos, pois esses apresentam uma maior sensibilidade à insulina, e por fim provocam apoptose nos adipócitos maduros responsáveis pela liberação de citocinas e outras moléculas que interferem na via sinalizadora da insulina (GOMES MDE, 2006).

Em resposta a esse efeito há um aumento da lipogênese, diminuição da circulação de citocinas pró-inflamatórias e ácidos graxos livres e, ainda, aumento da secreção de adiponectina. Todos esses efeitos melhoram a sensibilidade dos tecidos periféricos à ação da insulina e, assim resultam em redução da produção hepática de glicose e aumento do transporte de glicose periférica via músculo esquelético (GERVOIS, 2007). Isso interfere na liberação de sinais que agem diretamente no tecido muscular e fígado como, por exemplo, o TNF α (GOMES MDE, 2006) (Figura 7).

Os principais exemplos das TZD são: troglitazona (4), rosiglitazona (5) e pioglitazona (6) (NEHLIN, 2006), embora somente estejam hoje no mercado as duas últimas. Apresentam em sua estrutura química um anel tiazolidinadiona conferindo a atividade anti-hiperglicêmica, todavia dependente da presença de insulina circulante. A

diferença estrutural na molécula entre as três determina a especificidade farmacodinâmica e farmacocinética (FURNSINN, 2002). Atualmente, o uso das TZD está sendo limitado devido aos efeitos colaterais como toxicidade hepática, ganho de peso e formação de edemas (USUI, 2007). Com isso, a procura de novos fármacos que tenham o mesmo efeito das TZD é muito visada, com o objetivo de reduzir os efeitos colaterais, mas tendo a mesma ação .

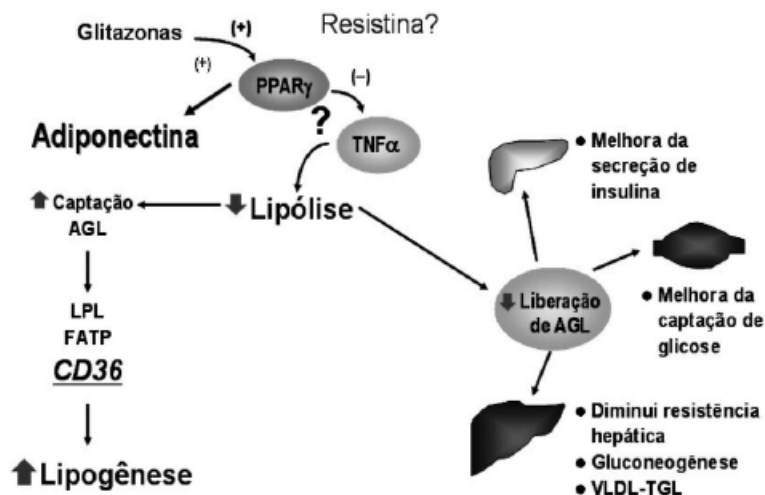


Figura 7 : Mecanismo de ação das glitazonas. As glitazonas agem regulando o PPAR γ positivamente , por conseguinte há um bloqueio na ação do TNF- α resultando em uma menor liberação de AGL melhorando a secreção de insulina pelo pâncreas (GOMES MDE, 2006).

Uma medicação frequentemente utilizada na prática clínica tem outra isoforma de PPAR como alvo farmacológico e benéfica no tratamento do DM2, e que frequentemente aparece no contexto da síndrome metabólica e, portanto associado à dislipidemia. Os fibratos também têm como alvo um receptor nuclear agindo como agonista, só que neste caso é o PPAR α . Agem como um regulador lipídico, promovendo o catabolismo dos ácidos graxos e o transporte reverso do colesterol, resultando na diminuição de triglicerídeos e aumento do nível de HDL (BOULANGER, 2006). Além disso, também diminuem os níveis de triglicerídeos pelo aumento da ação de uma lipoproteína, a lipase, a qual está responsável pela indução da lipólise (STAELS, 1998)

1.4 - Produtos naturais e receptores nucleares

A utilização de plantas com características medicinais e seus derivados tem sido cada vez maior nas indústrias farmacêuticas. O conhecimento popular das plantas medicinais gera hoje um grande interesse no mundo científico, visto que muitas substâncias utilizadas para tratamentos diversos hoje em dia são oriundas de registros passados (ELVIN-LEWIS, 2001). O uso de plantas medicinais pela população mundial tem sido extremamente significativo nos últimos tempos. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que cerca de 80 % da população mundial fazem uso de algum tipo de planta medicinal, contudo menos da metade é por indicação médica.

O emprego terapêutico das plantas exige agora um conhecimento deste grupo para a avaliação da potencialidade terapêutica e tóxica (ALVES, 2003). Com o incremento da pesquisa e do reconhecimento da importância dos fitoterápicos para a saúde pública, tem sido observado que nos últimos anos a produção de fitoterápicos aumentou vertiginosamente. Esse aumento na produção também é reflexo do aumento da procura por essa opção terapêutica, que a população acredita apresentar uma menor incidência de efeitos colaterais. A ocorrência de efeitos colaterais com o uso de plantas medicinais não é muito comum, desde que observadas as recomendações necessárias, pois muitas vezes por pensar que o medicamento é natural o paciente excede-se da indicação recomendada conferindo alguma injúria ao organismo (ELVIN-LEWIS, 2001).

Geralmente as plantas medicinais apresentam mais de um princípio ativo responsável pela resposta farmacológica, com isso o isolamento das substâncias presentes nas plantas é de suma importância, já que cada grupo apresenta características próprias. Por meio da fitoquímica é possível identificar a estrutura química da molécula e, até mesmo as suas atividades biológicas (ALVES, 2003). Os principais grupos conhecidos são: alcalóides, glicosídeos, óleos essenciais, saponinas, fitoesteróis e flavonóides.

Há indicações recentes de que vários compostos derivados de produtos naturais atuam em receptores nucleares, dentre estes o taxol (ação agonista para o receptor de esteroide e xenobiótico – SXR) (SYNOLD, 2001) e a hiperforina, extraída da erva de São João, que é utilizada como antidepressivo e conhecida como o Prozac da Natureza (MOORE, 2000). Estudos epidemiológicos mostraram que fitoestrógenios como a genisteína (ação agonista estrogênica), a daidzeína e a biochanina A, encontrados

principalmente em alimentos derivados da soja, são responsáveis pela menor incidência de osteoporose, doença cardiovascular e cânceres de mama e de endométrio em mulheres asiáticas que consomem uma dieta a base de soja (CLARKSON, 1998; PIKE, 1999).

Além destes efeitos benéficos, os fitoestrogênios também reduziram a incidência de câncer de mama (INGRAM, 1997) sugerindo que estes compostos possuem um perfil terapêutico superior ao dos estrogênios e mostrando que produtos naturais encontrados em plantas podem constituir uma excelente alternativa para o tratamento de inúmeras condições patológicas como osteoporose, doença cardiovascular e o *diabetes mellitus* (MACIEL, 2000).

Algumas plantas medicinais têm sido alvo de estudos por apresentarem propriedades hipoglicemiantes em modelos experimentais, como é o caso de *Trigonella foenum-graecum* (ABDEL-BARRY, 1997) e *Punica granatum* (JAFRI, 2000). Trabalhos recentes têm demonstrado a presença de compostos com atividade agonista para o PPAR γ em extratos de plantas medicinais. Por exemplo, ácido desidrotrametenólico foi isolado do extrato de *Poria cocos* Wolf, planta utilizada popularmente na medicina chinesa, e demonstrou aumentar a sensibilidade à insulina em modelos de DM2 via ativação do PPAR γ (SATO, 2002). O extrato etanólico de *Glycyrrhiza uralensis* apresentou redução dos níveis de glicose em modelos animais com DM2 via PPAR γ (KURODA, 2003; MAE, 2003).

Nesta dissertação foi dado mais ênfase ao estudo dos flavonóides. O nome flavonóide é derivado de *flavus*, que significa amarelo seu principal pigmento. São compostos fenólicos, responsáveis pela maior parte da coloração amarela, alaranjada, vermelha, violeta e azul de flores e frutos. Usualmente são encontrados na forma de heterosídeos, ou seja, possuem uma ou mais unidades de açúcar ligado a uma fração não-glicosídica (aglicona) (ALVES, 2003). Ocorrem nos vegetais superiores atuando não só na função de pigmentação, mas também na diferenciação celular, e como compostos antimicrobianos (HARBORNE, 2000).

O interesse pelas propriedades farmacológicas e bioquímicas destes compostos tem crescido bastante, e dentre essas atividades podem ser citadas a ação

antiinflamatória, estabilizadora do endotélio vascular, ou seja, proporciona a melhora da função endotelial celular diminuindo a permeabilidade, ação antiespasmódica e promove uma melhor distribuição do sangue periférico, melhorando o fluxo arterial (ALVES, 2003). Atualmente são subdivididos em: flavanóis (8), flavonóis (9), flavonas (10), flavanonas (11), antocianinas (12) e chalconas (13). Exemplos destas sub-classes estão mostrados na **Figura 8**. Essa divisão baseou-se nas diferenças no núcleo fundamental dos flavonóides (14) (MIDDLETON, 2000; WINKEL-SHIRLEY, 2001).

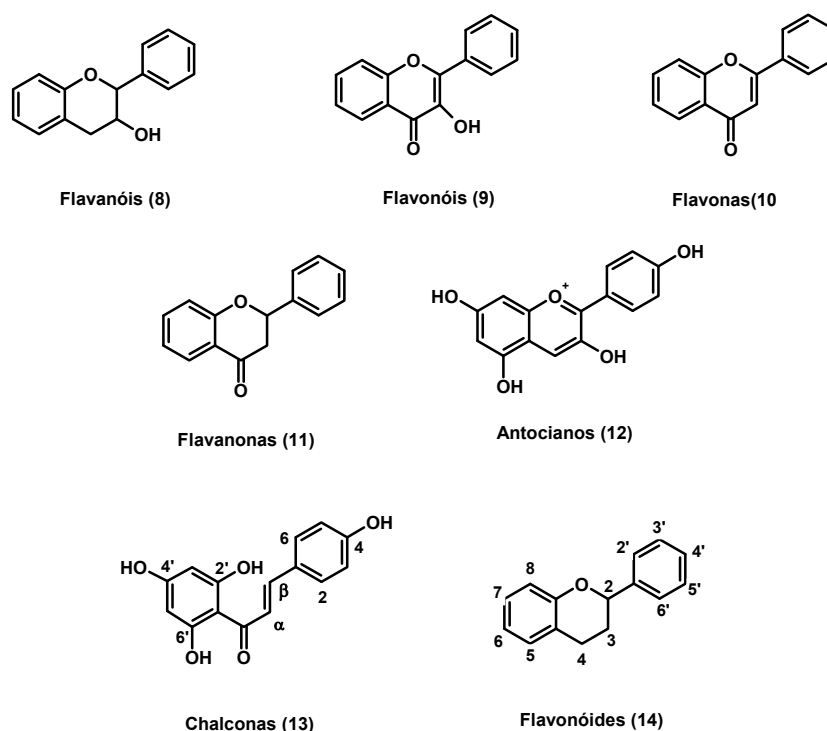


Figura 8: Núcleo fundamental flavoídico (14) e suas sub-classes: flavanóis (8), flavonóis (9), flavonas (10), flavanonas (11), antocianos (12) e chalconas (13)

Vários estudos são feitos atualmente sobre as chalconas (13) e seus derivados. Isso se deve, principalmente, às suas aplicações na medicina e farmácia. As chalconas são moléculas pertencentes à família dos flavonóides e quimicamente podem ser definidas como cetonas α - β -insaturadas onde tanto a carbonila quanto a porção olefínica estão ligadas a grupamentos aromáticos (WALTER, 2007). Apresentam um variado leque de funções biológicas tais como atividades: antimalárica (CHEN, 1994), antiinflamatória

(MACIAS, 1997; HSIEH, 1998), antioxidante (MORA, 1990; ANTO, 1995); anticancerígena (SHIBATA, 1994; ZHU, 2005; CABRERA, 2007) e bacteriostática (GAFNER, 1996). A posição em que se encontram os grupos substituintes nos dois anéis aromáticos determina essa variedade de propriedades farmacológicas e biológicas (KO, 2003).

A ação antiinflamatória das chalconas está relacionada com a regulação do óxido nítrico (NO) e da produção de citocinas nos macrófagos (ALCARAZ, 2004; BAN, 2004), além de promover a prevenção da formação de TNF- α e LPL induzidas pelos neutrófilos (MADAN, 2000). Esses dados são extremamente importantes, visto que a disfunção endotelial é a causa de complicações macro e microvascular em pacientes diabéticos (DE VRIESE, 2000), onde o tônus vascular é mantido pelo balanço entre a vasodilatação e a vasoconstrição e o óxido nítrico é um importante mediador desse processo regulador (LOSCALZO, 1995).

Além dessa ação antiinflamatória, atualmente as chalconas são alvos farmacológicos como novos ligantes para os receptores nucleares como o PPAR, agindo de forma agonista, possibilitando um efeito hipoglicêmico (LIM, 2001; JUNG, 2007) e hipolipidêmico (LIM, 2001; LI, X. H., 2007). Como exemplos podem ser citadas chalconas isoladas da espécie *Angelica keiskei* que demonstraram uma forte atividade reduzindo o risco de desenvolvimento de *diabetes mellitus* em camundongos kk-Ay (modelo de estudo para o Diabetes) via PPAR γ (ENOKI, 2007).

A família Asteraceae compreende a maior família das angiospermas com aproximadamente 23.000 espécies, 1535 gêneros e representa aproximadamente 10% da flora mundial. Nos últimos anos tem sido estudada em diversas áreas tais como anatomia, morfologia, ecologia, ontogenia, fitoquímica, estrutura macromolecular e citogenética (ØYVIND M. ANDERSEN, 2006). As plantas dessa família podem apresentar poliacetilenos, lactonas sesquiterpênicas, óleos essenciais voláteis terpenóides, monoterpenos voláteis, alcalóides, látex com triterpenos e flavonóides (LI, J. T., 2007). Estudos fitoquímicos realizados em espécie *Helianthus annuus* (girassol) mostraram uma prevalência de flavonóides, mais especificadamente de chalconas (MACÍAS, 1997).

Devido à constatação da importância das chalconas como modelo de fármacos, e considerando a necessidade de novos ligantes que ajam de forma agonista nos receptores nucleares PPAR surge com isso um grande campo de estudo. Desta forma, uma série de chalconas (CF1, CF3, CF4, CF7 e CF10) foi sintetizada (**figura 9**), no âmbito da

colaboração entre o Laboratório de Farmacologia Molecular e o Curso de Química da Universidade Católica de Brasília (UCB). Esses compostos foram sintetizados pelo aluno Rafael Carvalho Ribeiro e cedidos pelo professor Carlos Camiza Fortes para a investigação da atividade destes no PPAR.

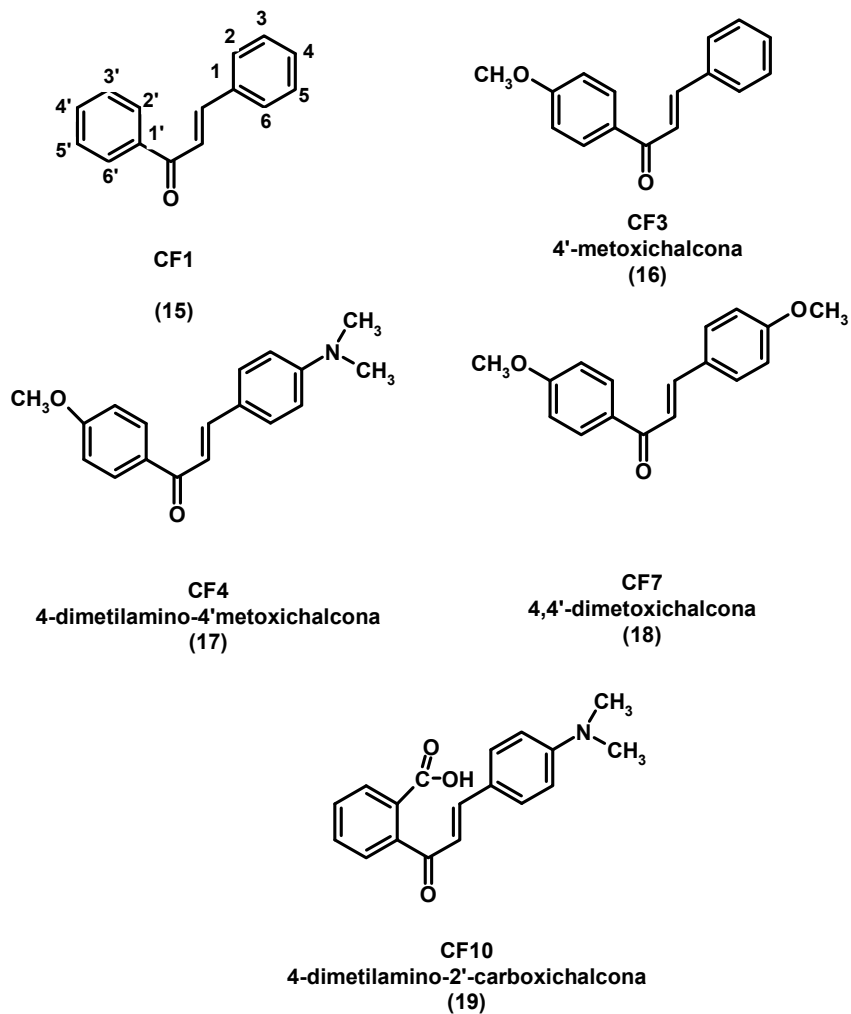


Figura 9: Estrutura química das chalconas
CF1 (15), CF3 (16), CF4 (17), CF7 (18), CF10 (19).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Estudar a atividade das chalconas sintéticas no receptor nuclear PPAR.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar se as chalconas estudadas são capazes de aumentar a atividade transcricional do PPAR (γ, α, δ), por meio de ensaio de transfecção e gene repórter em células U937;
- Avaliar se essa resposta é dose-dependente;
- Investigar a especificidade das chalconas estudadas para o PPAR, realizando ensaio de gene repórter em outros receptores (receptor de estrogênio, receptor de hormônio tireoideano e receptor do ácido retinóico).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Plasmídeos Utilizados

Os plasmídeos de expressão utilizados para os ensaios de transfecção foram: CMV-luc, PPAR γ , PPAR α e PPAR δ e PPRE-tk-luc. Esses plasmídeos contêm as seqüências de cDNA que codificam os respectivos receptores, sob o controle dos promotores do citomegalovírus (CMV).

Os plasmídeos-repórter utilizados nos ensaios possuem o elemento responsivo para o PPAR (DR-1), ER (palíndromo) e TR (DR4), clonados imediatamente acima do promotor mínimo (-32/+45) da timidina quinase (tk), ligado à seqüência que codifica o gene da luciferase, resultando nas construções : PPRE-tk-luc, ERE-tk.luc, TRE-tk-luc . Além disso o promotor do citomegalovírus foi fusionado ao gene que codifica a enzima luciferase (CMV-luc), gerando um plasmídeo produzindo luciferase constitutivamente. Todos os plasmídeos foram gentilmente cedidos pelo Dr. John Baxter do *Metabolic Research Unit, University of California (UCSF), USA*.

3.1.1 - Transformação

Processo utilizado para que haja a introdução de um plasmídeo em uma célula procariótica. Para a replicação dos plasmídeos de interesse foram utilizadas cepas de bactérias *Escherichia coli* DH5 α .

Em um tubo de microcentrifuga, 100-1000 ng do plasmídeo a ser transformado foram incubados com 50 μ L da cepa de bactérias durante 30 minutos em gelo. Posteriormente, as células foram submetidas a um choque térmico quando colocadas em um banho-maria a 42°C por 2 minutos. Esse processo provoca a abertura dos poros da parede celular bacteriana, permitindo a entrada do plasmídeo na célula. Em seguida, adicionou-se 500 μ L de meio de cultura LB (5g de extrato de levedura, 10g de triptona e 10g de NaCl (Sigma[®]) em 1 L de água destilada) sem antibiótico. Esta cultura celular foi incubada por 1 hora a 37°C em BOD (Biologic Oxygen Demand).

Após este período, 50 μ L da transformação foram plaqueados em uma placa de Petri contendo meio de cultura LB com 1,5% de ágar e 0,1 mg/mL de ampicilina foi incubada por

16 horas a 37°C em BOD. As células que expressaram o gene de resistência a ampicilina foram transformadas e formaram colônias.

3.1.2 - Purificação de Plasmídeos

Após o processo de transformação, uma colônia resistente da cepa de bactérias foi selecionada e colocada para crescer em 5 mL de meio LB, contendo 5 µL de ampicilina (100 mg/mL) por um período de 4-6 horas a 37°C em incubadora com agitação - *shaker*. Em seguida, estas bactérias foram inoculadas em 500 mL do mesmo meio de cultura e colocadas para crescer por 16 horas a 37°C sob agitação em *shaker*.

Ao término do período de crescimento da cultura, as bactérias foram separadas por centrifugação e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi mantido para extração e purificação dos plasmídeos que foi feito de acordo com o protocolo do Quiagen Plasmid Maxi Kit. A purificação dos plasmídeos por esse kit se baseia na afinidade do DNA por uma coluna de troca aniônica, onde a sua carga negativa interage com a carga positiva da resina desta mesma coluna.

3.2 - Cultura de células

Foram utilizadas células derivadas de promonócitos humanos (U937) obtidas do Centro de Cultura de Células da Universidade da Califórnia, São Francisco (UCSF – *University of California, San Francisco*). Estas foram cultivadas em meio RPMI 1640 (GIBCO®), contendo 10% de soro de recém-nato bovino com 2mM de glutamina 50 µL/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina e mantidas em uma incubadora a 37°C com 5 % de CO₂.

3.2.1 - Transfecção e Ensaio Gene Repórter

Os ensaios de transfecção e gene repórter são métodos utilizados na pesquisa e identificação de ligantes para receptores nucleares (CHIELLINI, 1998). As células U937 foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em 0,5 mL de solução PBS (Phosphate Buffered Saline) contendo 0,1% dextrose. Em seguida foram misturadas a

3,0 µg do plasmídeo repórter e a 2,0 µg do plasmídeo de expressão sendo transferidas para cuvetas (Gene Pulser[®] cuvette Bio-Rad), as quais foram eletroporadas utilizando um eletroporador (gerador de pulso Bio-Rad) com voltagem de 300 mV e 960 µF.

Após o processo de eletroporação, as células foram transferidas para recipientes contendo meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino. Neste meio, as células foram ressuspendidas, colocadas em triplicatas em placas de 12 poços Corning[®] (1,0 mL/ poço) e tratadas com veículo (DMSO:ETOH 2:3) usado como o controle negativo e troglitazona 10⁻⁵M (Sigma[®]) ou bezafibrato 10⁻⁴M (Sigma[®]) respectivamente como controles positivos (agonistas) para PPAR γ e PPAR δ,α e as chalconas (10⁻⁵M) a serem testadas, sendo incubadas por um período de 18-24h.

Para o ensaio de gene-repórter foi utilizado o *kit luciferase assay system with reporter lysis buffer* (Promega). Após período de incubação, as células foram transferidas para microtubos de centrífuga tipo *ependorf* de 1,5 mL e centrifugadas por 1 minuto a 13.000 rpm. O sobrenadante foi aspirado e descartado, enquanto que, ao precipitado celular formado, foram adicionados 150µL do tampão de lise do *kit repórter lysis buffer 5X* (Promega), posteriormente agitado em *vortex* e incubado a -80°C por, no mínimo, 20 minutos. Após o descongelamento das amostras, foram colocados 20 µL em placas de 96 poços próprias para o contador de quimioluminescência (Microbeta-Trilux, Perkin-Elmer) onde foi medida a atividade da enzima luciferase.

A luciferina é um substrato para a enzima luciferase. A emissão de luz gerada pela reação enzimática entre luciferina e luciferase é quantificada pelo contador, o qual gera resultados em unidades relativas de luz. A taxa de ativação do receptor em questão, ou seja, quantas vezes o receptor foi ativado por um determinado ligante foi calculada pela divisão dos valores obtidos pelas amostras tratadas com as chalconas ou com os agonistas (controles), pelos valores das amostras tratadas com o veículo. Os ensaios foram realizados, no mínimo, três vezes e em triplicata.

3.3 - Síntese (transcrição e tradução) *in vitro* de Proteínas.

Os receptores utilizados para os ensaios de *GST pull down* foram sintetizados utilizando-se o *kit* de transcrição e tradução *in vitro* (TNT T7-Quick coupled Transcription/Translation System-Promega). Nesta técnica, plasmídeos contendo o cDNA

do PPAR regulados pelo promotor da RNA polimerase do bacteriófago T7 são adicionados a um sistema que contém toda a maquinaria necessária para a transcrição e tradução de proteínas. Esse sistema consiste de um lisado de reticulócitos de coelho suplementado com 40 uM de $ZnCl_2$ e aminoácidos (exceto a metionina), RNA polimerase do bacteriófago T7, ribonucleotídeos, e um inibidor de RNase (RNAsin). A metionina radiomarcada com enxofre 35 (^{35}S -Met, Amershan. Pharmacia) foi adicionada somente no momento da reação de síntese dos receptores. As reações foram realizadas em microtubos de centrifuga de 1,5 mL com adição de 1-2 μ g do plasmídeo aos componentes necessários para a transcrição e tradução, seguindo-se uma incubação em banho-maria a 30°C por 90 minutos. Após o término da reação, foram coletadas amostras (1-2uL) para a realização da eletroforese de proteínas para verificação da eficiência da síntese em SDS-PAGE.

3.4 - Eletroforese de Proteínas em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

A eletroforese de proteínas, em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes - na presença de SDS -, foi utilizada para confirmar a eficiência da síntese protéica *in vitro*, tamanho das proteínas sintetizadas e o ensaio *GST pull down*. As proteínas foram submetidas à separação eletroforética segundo protocolo descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970). Após a corrida eletroforética, para a análise das proteínas radiomarcadas ou das reações de GST, o gel foi fixado em uma solução de 30% de metanol e 10% de ácido acético glacial durante 30 minutos, sendo em seguida colocado pelo mesmo período de tempo em uma solução amplificadora (Amplify, Amershan), utilizada para intensificar a transmissão da energia radioativa e secado a seguir a vácuo sob uma folha de papel de filtro a 80°C por 40 minutos (Geldryer, Biorad). O gel, já seco, foi colocado em uma placa radiográfica juntamente com um filme de raio-X (Kodak) e submetido a autoradiografia a - 80°C por um período de 12 horas para análise da eficiência da síntese de proteínas, e por 12-96 horas para análise do ensaio *GST pull down*.

3.5 - Expressão e Purificação de Proteínas Recombinantes em *Escherichia coli*

Nesse trabalho as proteínas de fusão com glutathione-s-transferase (GST) utilizadas foram expressas em *E. coli* e purificadas segundo protocolo descrito abaixo. Essas proteínas de fusão com GST são proteínas quiméricas, onde o gene que codifica a proteína de interesse é clonado na mesma fase de leitura do gene que codifica a proteína GST no plasmídeo pGEX. Ao ser expresso, esta fusão de genes dá origem a uma única proteína composta pelo GST na sua porção amino-terminal e pela proteína de interesse na carboxi-terminal.

Para isto, 50 μ L de bactérias *E. coli*, cepa BL21, foram transformados com 1-2 μ g de um dos plasmídeos, PGEX e PGEX-SRC1 (381-882), que expressam os fragmentos das proteínas GST e GST-SRC1. Para tanto, as bactérias e o DNA plasmidial foram incubados no gelo por 30 min, logo em seguida a 42°C por 2 min, e imediatamente transferidas e incubadas em gelo por mais 2 min. O número indicado entre parênteses representa o número inicial e final dos aminoácidos das respectivas proteínas. Esses fragmentos contêm a região da proteína capaz de se interagir com os receptores nucleares. A colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio de cultura 2x LB (pré-inóculo) e colocadas para crescer por 6-10 horas a 22°C para que a proteína de fusão fosse expressa. Após o término desse período, 5 mL do pré-inóculo foram transferidos para dois frascos de 500 mL de 2X LB com ampicilina. Ao final desse período, o meio contendo as bactérias foi centrifugado a 5700 x g por 20 min, o sedimento foi ressuspensionado com 10 mL de tampão TST 1X (Tris 50 mM, NaCl (Sigma) 150 mM e Tween-20 0,05%). Foram adicionados 500 μ L de lisozima (10 mg/mL) em cada suspensão de bactérias e o volume final foi incubado a 4°C por 20 min sob agitação para lise celular. Em seguida, o lisado foi colocado em disruptor celular (Ultrasonic Processor, Sonics) em ciclos de 20s no nível 5,5 com intervalo de 5 minutos entre cada pulso, num total de 4 ciclos e separado por centrifugação a 12.000 rpm por 30 minutos. Concomitantemente, 665 μ L de microesferas de sefarose (*beads*) de glutathione foram preparados para serem misturados ao lisado. Para isto, as microesferas foram lavadas com 5 volumes de TST 1X e separadas por centrifugação rápida (5000 rpm por 2 minutos). Em seguida, para que pudessem interagir com o GST da proteína, essas microesferas foram ressuspensas em 500 μ L de TST 1X e

adicionados ao sobrenadante da cultura. Essa incubação foi mantida a temperatura de 4°C durante 2 horas. As microesferas foram separadas e coletadas por centrifugação 5000 rpm por 5 minutos e lavadas 3 vezes com 20 mL de TST 1X. Após as lavagens as microesferas foram ressuspensas em 600 µL de TST 1X contendo 1 mM de DTT, 0,5 mM de PMSF, 1:1000 de coquetel inibidor de protease (SIGMA) e 1 mL de glicerol. As microesferas contendo as proteínas de fusão foram armazenadas a -20°C até o momento da sua utilização nos ensaios de interação proteína-proteína em solução.

3.6 - Ensaio de interação proteína-proteína em solução (GST Pull Down Assay)

O ensaio de *GST Pull Down*, simplificado e chamado de GST, é utilizado para verificar a capacidade de duas proteínas se interagirem *in vitro*. Para isto, utilizam-se duas proteínas, sendo que uma delas necessita estar fusionada à GST e a outra deve estar radiomarcada, neste caso o PPAR γ marcado. A proteína fusionada à GST funcionará como uma “isca” e a proteína radiomarcada será a “presa” a ser “pescada”. A proteína de fusão funciona como uma isca porque está fixada a uma partícula pesada de aproximadamente 45-165 µm - microesferas de sefarose (*beads*), com moléculas de glutationa (substrato da proteína GST) na superfície -, que facilita sua precipitação e separação da solução estudada. O preparo da proteína de fusão fixada a uma partícula pesada utiliza-se do próprio processo de purificação da proteína de fusão, conforme foi descrito no item anterior.

Desta forma, esse ensaio consiste em incubar a isca (microesferas-GST-proteína de fusão, no caso específico, proteínas co-reguladoras) com a proteína radiomarcada sintetizada *in vitro* (PPAR), no tampão de ligação (GBB - TST 1X, 0,1% Triton X-100, 0,1% NP-40, 1mM DTT, 0,5 mM PMSF e 1:1000 de coquetel de inibidores de protease - SIGMA) por um período de 2 h a 4°C. Após esse período, as microesferas com a proteína de fusão associada ou não às proteínas sintetizadas *in vitro*, foram centrifugadas e o material precipitado lavado 6 vezes com tampão de ligação, para remoção de proteínas que fizeram ligações inespecíficas, ou seja, onde a proteína radiomarcada não se ligou às microesferas contendo glutationa. Caso a proteína radiomarcada fosse capaz de se interagir com a proteína de interesse esta seria precipitada. Se não ocorresse a interação, não seria possível “pescar” nenhuma proteína, pois esta seria eliminada durante as lavagens (**FIGURA 11**).

Ao final da última centrifugação, foi adicionado um tampão para desnaturação das proteínas (Tris 0,25M, pH 6,8, SDS 4%, glicerol 40%, β -mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol 0,005%) e colocadas em água em ebulição por 5min e aplicadas em gel de poliacrilamida a 10% e submetidas à eletroforese. Os géis são secos em um *Gel Dryer* (BioRad), e uma vez secos foram expostos a filme radiográfico (Kodak) e revelados após o período de 5 a 15 dias.

Além disto, com a finalidade de verificar-se quanto da proteína sintetizada *in vitro* interagiu com a proteína de fusão, no momento da análise da reação de GST em SDS-PAGE, é aplicado, em um poço separadamente, 10 a 33% da quantidade total de proteína radiomarcada utilizada em cada reação. Esse poço é denominado de *input* e nada mais é do que uma quantidade conhecida de PPAR aplicada diretamente no SDS-PAGE.

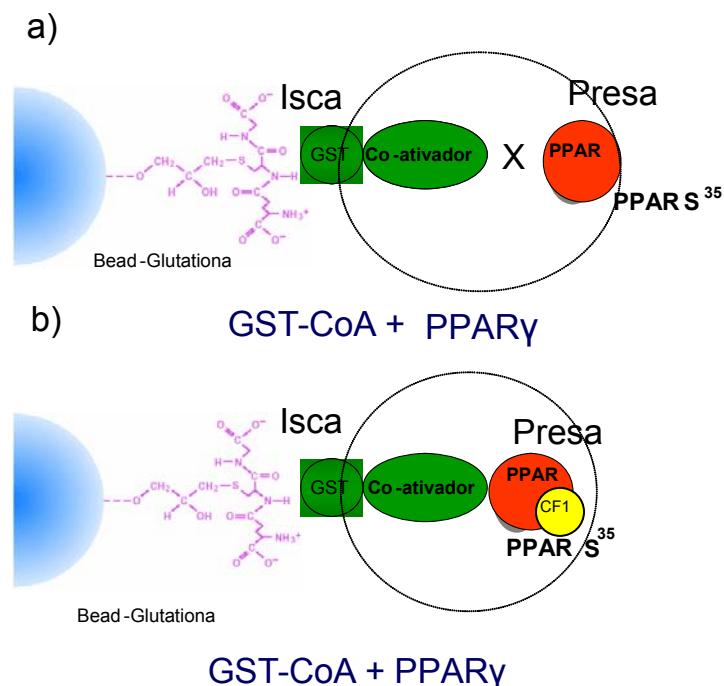


Figura 11: Desenho esquemático do ensaio de GST com co-ativadores. Neste exemplo foi utilizado o co-ativador GST-SRC1 para avaliar a capacidade de ligação do PPAR γ (radiomarcado com ³⁵S) a esta proteína, na ausência (a) e na presença (b) de CF1. Nota-se que, na ausência do ligante, o PPAR não interage com o co-ativador e a adição de CF1 promove esta interação.

3.7 - Análise Estatística

Os dados apresentados representam as médias dos experimentos \pm erro padrão de pelo menos três ensaios em triplicata. Os dados foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) utilizando as múltiplas comparações seguido de Newman-Keuls Multiple Comparison por meio do software GraphPad Prism 3.0.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fornecimento de substâncias de origem vegetal com aplicação no tratamento de doenças tem sido de grande interesse na medicina tradicional. O promissor mercado de fitoterápicos atinge na Europa e na Ásia aproximadamente sete bilhões e quatro bilhões de dólares ao ano respectivamente, mas o maior crescimento de utilização de fitoterápicos é observado nos Estados Unidos, aonde cerca de 60 milhões de americanos fazem uso dos mesmos

Sabe-se ainda que grande parte dos fármacos de origem sintética está estruturalmente relacionada a compostos isolados de origem vegetal. Tais dados demonstram a importância do estudo farmacológico de extratos de plantas na medicina (ØYVIND M. ANDERSEN, 2006).

O isolamento de chalconas, um importante grupo dos flavonóides tem sido vastamente estudado pelas suas variadas atividades medicinais (STEVENS, 2000), dentre essas antiinflamatória (HERENCIA, 1998), antioxidante (HARAGUCHI, 1998) e inibidora da atividade contra o diabetes (LIM, 2000). Estudos feitos em modelos animais com *Diabetes mellitus* mostraram que chalconas sintéticas foram capazes de reduzir a agregação plaquetária e diminuição de aldose redutase (marcadores do diabetes), embora o processo molecular não tenha sido completamente elucidado (LIM, 2000), com isso a procura pela resposta do mecanismo pelo qual as moléculas atuam torna-se cada vez maior.

Pelas características anteriormente citadas com relação às chalconas, vê-se que estas mostram um grande potencial para agirem em receptores nucleares PPAR, isso se dá por estes estarem ligados diretamente a processos do metabolismo lipídico e a sua disfunção podem gerar enfermidades como o diabetes e processos inflamatórios. Considerando os dados relatados acima, chalconas foram investigadas para avaliar se estas poderiam apresentar algum tipo de atividade no receptor PPAR (α , γ e β).

Para verificar a ação das chalconas sintéticas nos receptores PPAR α , γ e δ foram realizados experimentos com células U937, as quais foram co-transfectadas do modo já descrito em materiais e métodos anteriormente. Estas células foram escolhidas de acordo

com a literatura, pois se mostram um modelo efetivo no estudo da regulação transcricional mediada pelos PPARs (HORNUNG, 2001).

Primeiramente foi construída uma curva-dose resposta para o ligante sintético do PPAR γ , a troglitazona (TRO), para verificar o funcionamento adequado do ensaio de gene-repórter. Pode-se depreender da **figura 12** que a troglitazona ativou o receptor, e apresentou um EC₅₀ de $4,5 \times 10^{-7}$ M. Este resultado está de acordo com a literatura (HERMAN, 2002). Assim, foi determinado que a concentração a ser utilizada nos experimentos do presente trabalho seria 10^{-5} M, que promoveu a máxima ativação do PPAR γ .

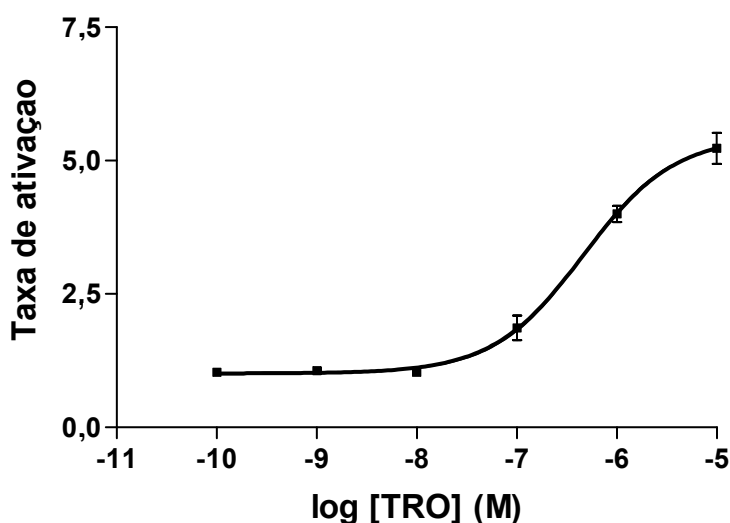


Figura 12: Curva dose resposta do ligante no receptor PPAR γ .

As células U937 foram co-transfectadas com 2 μ g do vetor de expressão PPAR γ e 3 μ g do gene-repórter da luciferase dirigido pelo PPRE-tk-luc, e incubadas durante 24h com concentrações crescentes de troglitazona. Dados apresentados como média \pm erro padrão de três experimentos realizados em triplicata.

Em seguida, foi estudada a possibilidade de as chalconas apresentarem um efeito agonista sobre o PPAR γ . Para tanto as células U937 foram tratadas com doses crescentes (10^{-9} M a 10^{-5} M) de soluções das chalconas (**Figura 13**).

Como pode ser observado, quando as células foram tratadas com CF1 (**Figura 13a**) ou CF3 (**figura 13b**) houve ativação dose-dependente no PPAR γ . A CF1 ativou o receptor com potência semelhante ($4,1 \pm 0,5$) e a CF3 com potência inferior ($2,8 \pm 0,5$ vezes) à da TRO ($4,6 \pm 0,5$ vezes). As chalconas CF4, CF7 e CF10, em contraste, não apresentaram atividade agonista. Observou-se que a concentração onde ocorreu a maior atividade foi 10^{-5} M para todas as chalconas testadas.

Esses resultados sugerem que CF1 e CF3 atuem de forma agonista em PPAR γ , pois o tratamento das células U937 aumentou de forma dose-dependente a atividade transcricional do gene-repórter PPRE-tk-luc sobre PPAR γ .

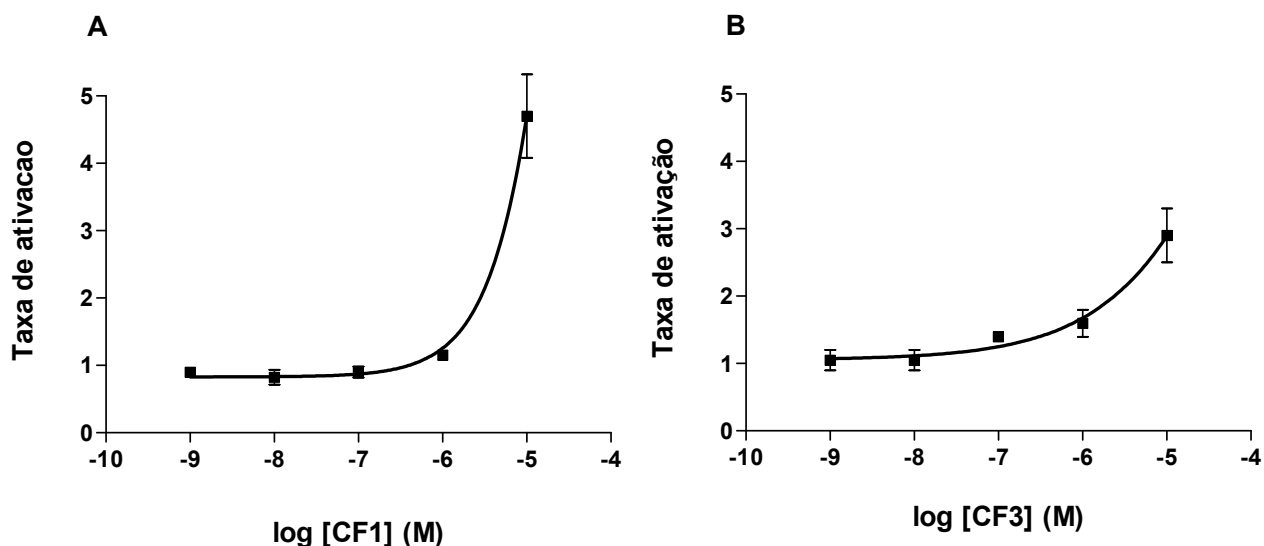


Figura 13: Curva dose-resposta da CF1 (a) e CF3 (b) no receptor PPAR γ .

Células U937 foram co-transfectadas com 2 μ g do vetor de expressão PPAR γ e 3 μ g do gene-repórter da luciferase dirigido pelo PPRE-tk-luc, e incubadas durante 24h com concentrações crescentes de CF1 ou CF3. Dados apresentados como média \pm erro padrão de três experimentos realizados em triplicata.

As soluções de chalconas foram também avaliadas em ensaios de gene-repórter em que células U937 foram transfectadas com o plasmídeo que contém o gene-repórter da luciferase dirigido pelo promotor do citomegalovírus (CMV-luc). Esse promotor é ativo constitutivamente, e não tem sua atividade influenciada por agonistas de PPAR.

Nenhuma das chalconas testadas modificou a atividade transcricional do promotor do CMV na concentração 10^{-5} M (**Figura 14**). Entretanto, na concentração de 10^{-4} M de CF1 e CF3, houve diminuição da atividade transcricional do promotor do CMV, e diante desses resultados essa concentração não foi testada nos ensaios de gene repórter para avaliar a atividade do PPAR γ .

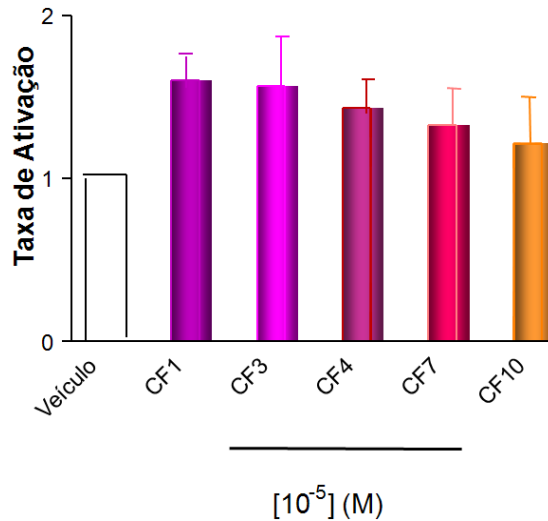


Figura 14: Ausência do efeito tóxico das chalconas nas células U937.

Células U937 foram transfectadas com 2,5 µg do vetor CMV-luc, e incubadas por 24 horas com as chalconas na concentração 10^{-5} M. Dados apresentados como média \pm erro padrão de três experimentos realizados em triplicata.

Posteriormente, foram realizados ensaios na ausência e presença do receptor PPAR γ , visando avaliar se a resposta obtida por CF1 e CF3 não decorreram de uma ativação inespecífica do promotor PPRE-tk-luc. Na **Figura 15** observa-se que na ausência de PPAR γ transfectado, troglitazona não ativou a transcrição de PPRE-tk-luc, CF1 apresentou uma pequena ativação de $2,6 \pm 0,2$. Contudo quando as células foram co-transfectadas com o gene-repórter PPRE-tk-luc e o vetor de expressão para o receptor PPAR γ , a troglitazona, CF1 e CF3 apresentaram uma taxa de ativação de $4,5 \pm 0,2$, $4,2 \pm 0,5$ e $3,6 \pm 0,5$, respectivamente. Esses resultados sugerem que os efeitos de CF1 e CF3 sobre a transcrição ocorrem por meio da ativação do PPAR γ . Dessa forma, pôde-se verificar que a atividade de CF1 e CF3 não ocorre de forma inespecífica ao PPAR γ , pois apesar de observar uma atividade de CF1 na ausência do receptor PPAR γ , a adição do receptor promoveu uma ativação significativamente maior da transcrição (ativação de $4,6 \pm 0,5$).

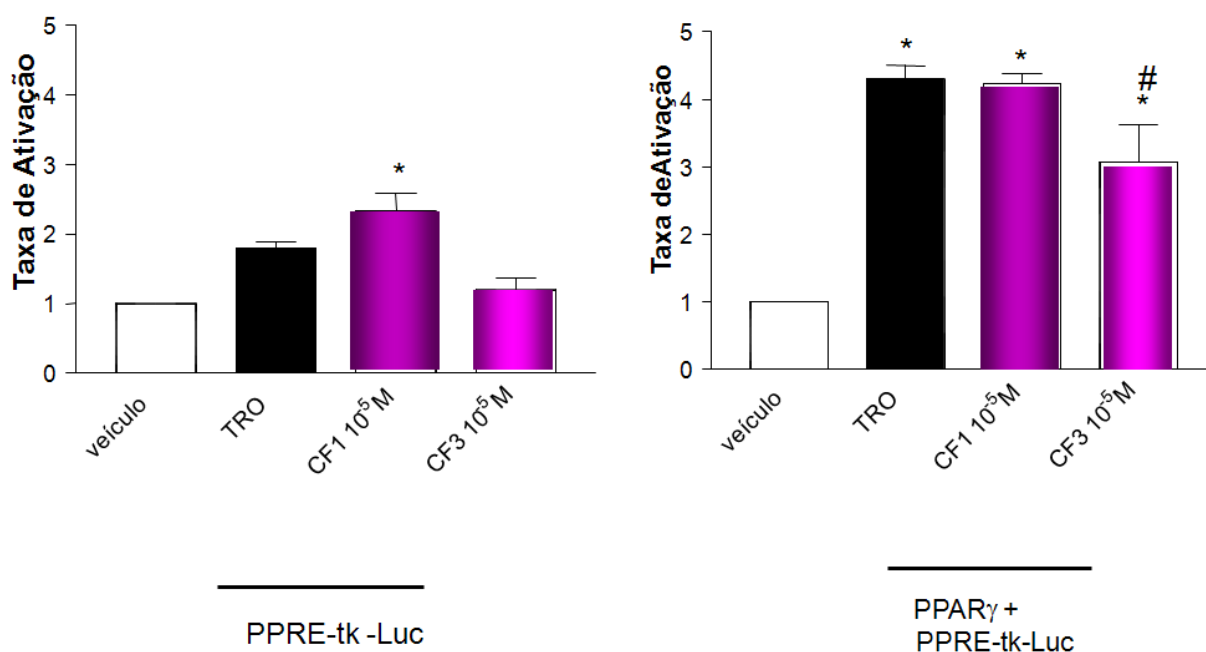


Figura 15: Atividade da CF1 e CF3 na presença e ausência do receptor PPAR γ .

Células U937 foram co-transfectadas com 3 μ g do gene repórter da luciferase dirigido pelo PPRE-tk-luc na ausência e presença de 2 μ g do vetor de expressão PPAR γ , e incubadas durante 24h com veículo, TRO 10⁻⁵ M, CF1 e CF3 10⁻⁵ M. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,01$ vs veículo; # $p < 0,005$ vs CF1 na ausência de transfecção do vetor de expressão do PPAR γ .

As células U937 expressam PPAR γ , e o receptor endógeno poderia explicar esta pequena ativação da transcrição mediada por PPAR γ de CF1, pois apesar de mostrar-se diferente estatisticamente do controle negativo (veículo) não houve diferença em relação ao controle positivo TRO.

Para avaliar se as chalconas promoveriam uma atividade antagonista da ativação promovida pela TRO no PPAR γ , as células U937 foram tratadas com as chalconas na concentração 10⁻⁵ M na ausência ou presença do ligante sintético TRO na concentração 10⁻⁵ M (**Figura 16**).

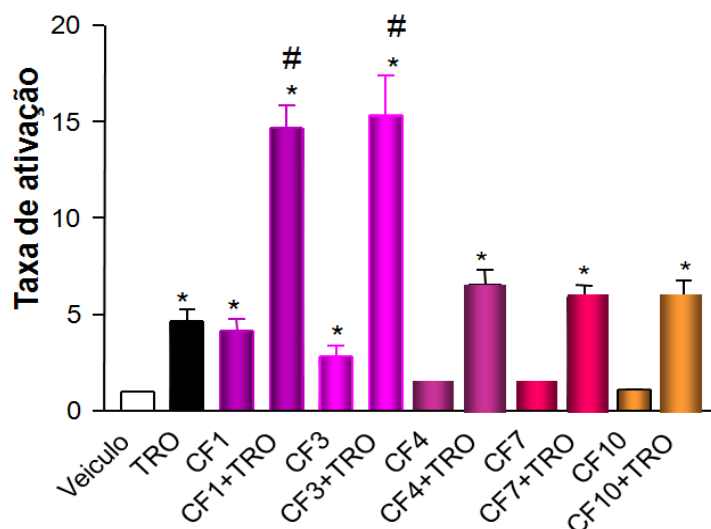


Figura 16: Atividade das chalconas na ausência ou presença de TRO no receptor PPAR γ .

Células U937 foram transfectadas com 2 μg do vetor de expressão e 3 μg do gene-repórter da luciferase dirigido pelo PPRE-tk-luc e incubadas durante 24h com veículo, TRO 10^{-5}M , chalconas 10^{-5}M ou TRO 10^{-5}M com as chalconas 10^{-5}M . Dados apresentados como média \pm erro padrão de três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,001$ vs veículo, # $p < 0,001$ vs TRO.

Apenas as chalconas CF1 e CF3 (10^{-5}M), corroborando com os resultados das curvas dose-respostas obtidas (**figura 13**), apresentaram atividade agonistas no receptor PPAR γ . As taxas de ativação foram CF1 $4,6 \pm 0,3$ e CF3 $3,4 \pm 0,2$ em relação ao controle TRO (10^{-5}M) ($5,4 \pm 0,2$). Como pode ser observado na **figura 16**, não houve efeito antagonista das chalconas no receptor PPAR γ , todavia, as chalconas CF1 e CF3, ao serem adicionadas às células, na presença do ligante TRO, apresentaram um efeito sinérgico na atividade. As taxas de ativação de CF1 e CF3 (10^{-5}M) na presença de TRO (10^{-5}M) foram, respectivamente, $14,7 \pm 0,6$ e $15,3 \pm 0,8$ em relação ao controle TRO ($5,4 \pm 0,2$).

Ligantes sintéticos de PPAR γ , como a troglitazona, apresentam atividade hipoglicemiante (CHOU, 2007), além de estarem envolvidas com atividade antiinflamatória devido à inibição de citocinas (JIANG, 1998) e inibição de macrófagos (RICOTE, 1998). Estudos mostram que TZD contendo anéis do tipo flavonoídicos possuem atividade antidiabética (BOZDAG, 2000). Compostos sintetizados mimetizando uma parte da molécula de TZD e outra parte de chalconas mostraram aumentar essa atividade biológica

(JUNG, 2007). Com isso, observamos que o efeito sinérgico sugerido por CF1 e CF3 na **Figura 16** consiste em importante resultado, pois além de apresentarem um efeito agonista no receptor essas moléculas apresentam um grande potencial para formar uma nova molécula com as TZD.

Uma nova classe de fármacos esta sendo desenvolvida onde o alvo seria ativar as isoformas α e γ no intuito de produzir simultaneamente efeito antidiabético e promover a proteção cardiovascular, por meio da diminuição dos triglicerídeos, aumento dos níveis de HDL promovendo um aumento da proteção cardíaca e melhora da sensibilidade à insulina (FIEVET, 2006; HUMPHRIES, 2006; KENDALL, 2006). Um exemplo deste agonista é o ragaglitazar (CHAKRABARTI, 2003) que apresentou uma melhora na hiperglicemia, hiperinsulinemia e nas anormalidades do metabolismo lipídico em animais Zucker, porém apresentou efeitos indesejados como: anemia, ganho de peso, formação de edema além de propensão ao desenvolvimento de câncer urotelial, o que levou a retirada deste medicamento do mercado (BALAKUMAR, 2007).

Os pan-agonistas também estão sendo alvo de estudo, onde as três isoformas (α , γ e β) atuam em conjunto, e são capazes de aumentar a sensibilidade à insulina, inibir a arteriosclerose e prevenir isquemia cardíaca (TENENBAUM, 2005a; TENENBAUM, 2005b; NAGASAWA, 2006), como exemplo tem-se o GW-625019 e PLX-204 que ainda encontram-se em fase de testes para o tratamento do diabetes e complicações cardiovasculares (POURCET, 2006).

Os agonistas duplos, compostos que possuem a seletividade e a atividade agonista balanceadas, podem no futuro ser uma opção na terapêutica do diabetes e complicações cardiovasculares, assim com os pan-agonistas (BALAKUMAR, 2007).

Nesse sentido, nesta dissertação, foi investigada a possibilidade das chalconas ativarem de forma agonista as outras isoformas como foi visto no PPAR γ . Foi avaliado o efeito das chalconas sobre as isoformas α e δ do PPAR, utilizando-se como controle positivo da ativação do receptor o ligante sintético bezafibrato (BEZA). Como pode ser observado na **figura 17** o BEZA ativou o PPAR α (**A**) com EC_{50} $5,5 \times 10^{-5}M$ e o PPAR δ (**B**) com EC_{50} $9,2 \times 10^{-7}M$. A máxima ativação das duas isoformas foi observada quando as células foram incubadas com $10^{-4}M$ de BEZA, essa foi a concentração do ligante utilizada nos experimentos subsequentes.

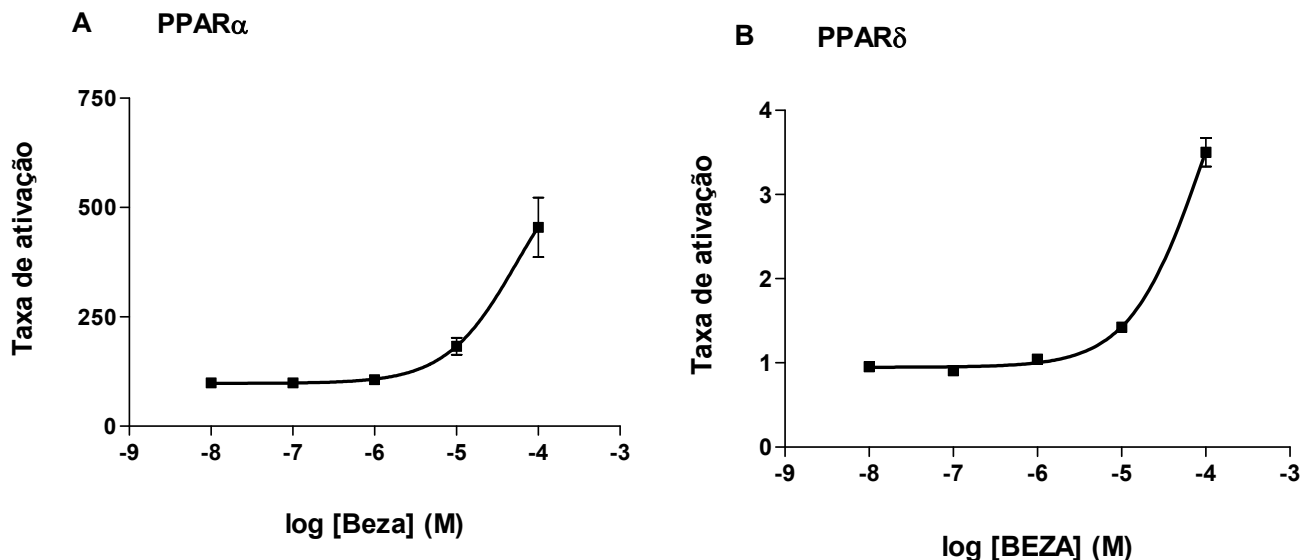


Figura 17: Curva dose-resposta do bezafibrato no receptor PPAR α (A) e PPAR δ (B). Células U-937 foram co-transfectadas com 2 μ g do vetor de expressão do PPAR α ou δ e 3 μ g do gene-repórter da luciferase dirigido pelo PPRE-tk-luc, e incubadas durante 24h com concentrações crescentes de bezafibrato. Dados apresentados como média \pm erro padrão de três experimentos realizados em triplicata.

A mesma avaliação feita em PPAR γ (**Figura 16**) foi repetida, porém no receptor PPAR α . Os resultados apresentados na **Figura 18** mostram que não houve ativação das chalconas no receptor PPAR α .

Com o intuito de verificar a atividade antagonista, ao adicionar-se as chalconas ao PPAR α na presença do ligante BEZA, o resultado observado foi que nenhuma chalcona apresentou efeito antagonista. Porém CF1 apresentou um efeito sinérgico quando adicionada ao PPAR α na presença de BEZA (atividade de BEZA 10^{-4} M $4,4 \pm 0,4$ e atividade da CF1 10^{-5} M na presença de BEZA $11,2 \pm 0,1$). Entretanto, a chalcona CF3, também na presença de BEZA, apresentou uma ativação maior ($6,8 \pm 0,8$) do que o controle positivo, mas bem menor do que a chalcona CF1 na presença de BEZA.

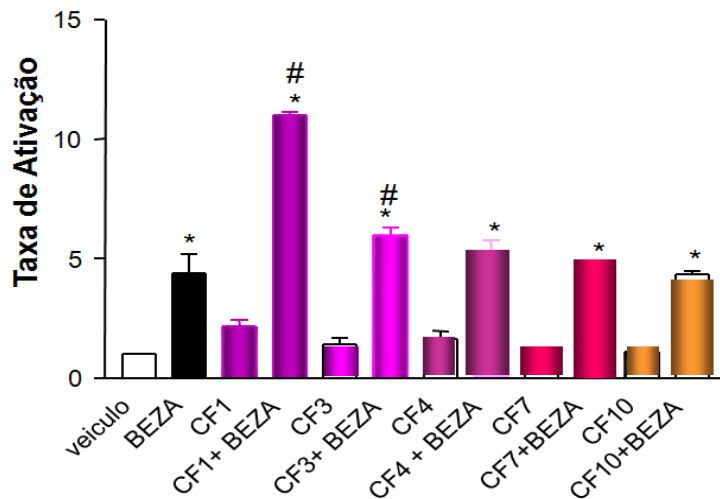


Figura 18: Atividade das chalconas sobre o PPAR α na ausência ou presença de bezafibrato.

Células U937 foram co-transfectadas com 2 μ g do vetor de expressão do PPAR α e 3 μ g do gene-repórter da luciferase dirigido pelo PPRE-tk-luc e incubadas durante 24h com veículo, bezafibrato (10^{-4} M), apenas as chalconas (10^{-5} M) ou chalconas na presença de bezafibrato. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs veículo; # $p < 0,01$ vs BEZA.

Apesar de CF1 não ter apresentado um efeito agonista em PPAR α , apresentou um efeito sinérgico na presença de BEZA. Estudos mostraram que a combinação dos fibratos com chalconas sintéticas em PPAR α derivaram um grupo de ligantes que proporcionaram um efeito hipolipidêmico (LI, X. H., 2007). Assim a possibilidade da construção de um composto bezafibrato e chalcona seria interessante para disfunções como a dispilidemia.

Na **figura 19** pode-se depreender que nenhuma chalcona apresentou atividade no receptor PPAR δ . Entretanto, na presença do ligante BEZA, CF1 teve a mesma ação sinérgica como mostrada anteriormente para o PPAR α (**figura 18**). CF1 e CF3 na concentração 10^{-5} M apresentaram um efeito sinérgico da atividade transcricional quando o tratamento das células U937 foi feito em conjunto com o ligante BEZA 10^{-4} M. A ativação do ligante BEZA foi de $4,5 \pm 0,2$ e das CF1 e CF3 na presença de BEZA foram, respectivamente, $11,2 \pm 0,8$ e $6,5 \pm 1,1$.

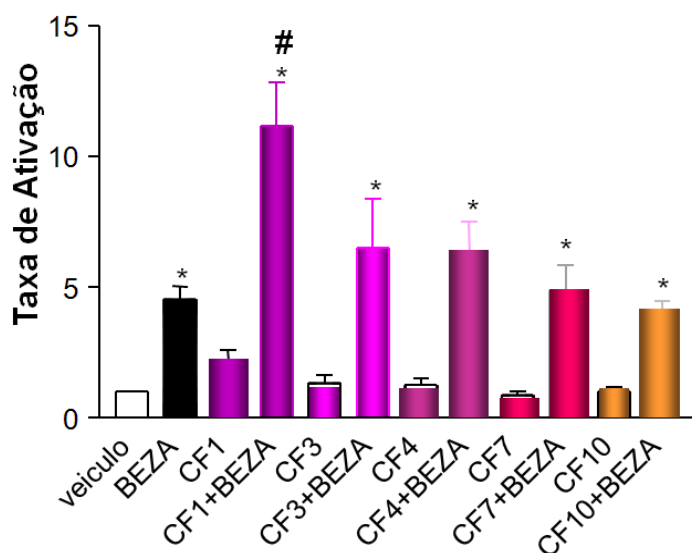


Figura 19: Atividade das chalconas na ausência e presença do bezafibrato no receptor PPAR δ .

Células U937 foram co-transfectadas com 2 μ g do vetor de expressão do PPAR δ e 3 μ g do gene-repórter da luciferase dirigido pelo PPRE-tk-luc e incubadas durante 24h com veículo, bezafibrato (10^{-4} M), apenas as chalconas (10^{-5} M) ou chalconas na presença de bezafibrato. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs veículo; # $p < 0,01$ vs BEZA.

Especificidade de CF1 e CF3 por PPAR γ

Com o objetivo de avaliar a especificidade da CF1 e CF3 para PPAR γ , foram testadas estas moléculas em diferentes receptores nucleares. Não foi observada atividade dessas chalconas, na concentração de 10^{-5} M no receptor de estrogênio (isoformas α e β), receptor do hormônio tireoideano (isoforma β) e sobre o gal-RXR (**Tabela 1**).

	Controle	Conc. controle	Ativação	CF1 (10^{-5} M)	CF3 (10^{-5} M)
ERα	Estradiol	10-7M	4,9 \pm 0,4	1,6 \pm 0,4	1,4 \pm 0,1
ERβ		10-7M	2,4 \pm 0,3	1,4 \pm 0,3	1,4 \pm 0,2
TRβ	T3	10-7M	5,6 \pm 0,5	1,7 \pm 0,3	1,5 \pm 0,1
Gal-RXR	9-cis	10-6M	10,8 \pm 2,8	1,4 \pm 0,2	1,2 \pm 0,4

Tabela 1: Ativação das chalconas CF1 e CF3 e dos controles positivos nos respectivos receptores.

Dessa maneira, os resultados sugerem que CF1 e CF3 atuem de forma específica para o receptor PPAR γ (Figura 20). Para excluir a possibilidade de os efeitos das chalconas terem decorrido de ativação do RXR, uma vez que a ativação da transcrição pelo PPAR γ envolve sua heterodimerização, as células U937 foram co-transfectadas com o vetor de expressão da proteína GAL-RXR, constituída pelo DBD do fator de transcrição de leveduras GAL4 e o LBD do PPAR γ , e o elemento responsivo ao GAL5 dirigindo o promotor da luciferase. Não houve ativação do LBD do RXR pelas chalconas, indicando que esses compostos não atuam como agonistas de RXR.

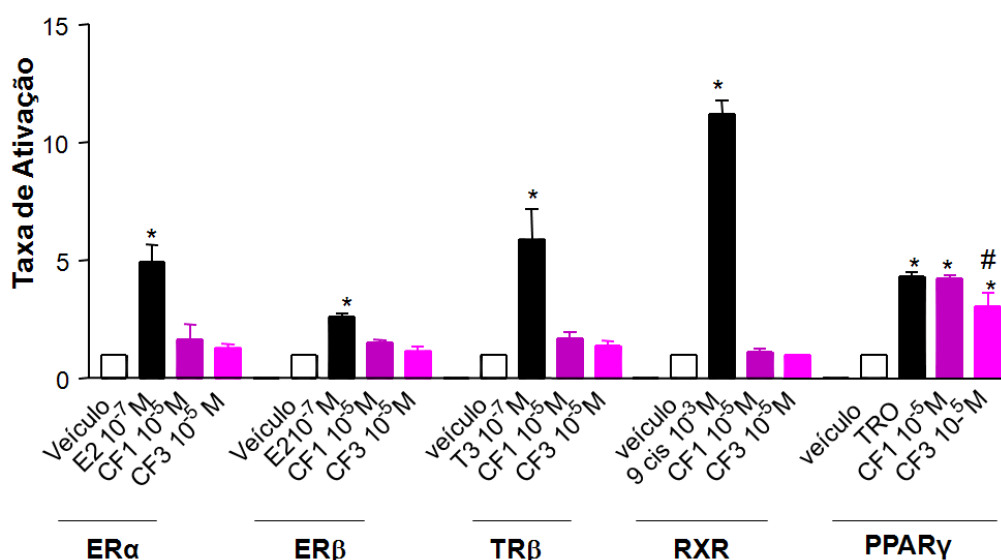


Figura 20: Atividade de CF1 e CF3 em diferentes receptores nucleares.

Células U937 foram co-transfectadas com 2 μ g do plasmídeo de expressão para ER α , ER β , TR β e gal-RXR, e com 3 μ g do plasmídeo repórter ERE-tk-luc, TER-tk-luc, gal-RXR. As células foram tratadas por 24 horas com veículo, 10⁻⁷M E2, 10⁻⁷M T3 e 10⁻⁶M de 9-cis retinóico. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de três experimentos. * $p < 0,05$ vs veículo; # $p < 0,05$ vs TRO.

CF1 e suas interações com proteínas co-reguladoras

Considerando que a ativação da transcrição gênica mediada pelo PPAR γ ativado ocorre por meio da interação com proteínas co-ativadoras e os resultados dos ensaios de gene-repórter indicaram atividade agonista da CF1 sobre o receptor, foi avaliada a interação *in vitro* entre o PPAR γ e o co-ativador SRC1 na presença da CF1 10⁻⁵M.

Para isso, foram realizados ensaios *GST pull down* (MUKHERJEE, 2000), (**Figura 21**) e foi verificado que a CF1 foi capaz de promover a interação entre ^{35}S PPAR γ e GST-SRC1 de forma idêntica à troglitazona. A interação entre o receptor e o co-ativador foi mais acentuada na presença simultânea de troglitazona e CF1 do que na presença de cada um dos compostos isoladamente. Esses resultados corroboram àqueles observados nos ensaios de gene-repórter e indicam a possibilidade de a ativação da transcrição pelo PPAR γ na presença de CF1 ocorrer por meio do recrutamento de proteínas co-ativadoras.

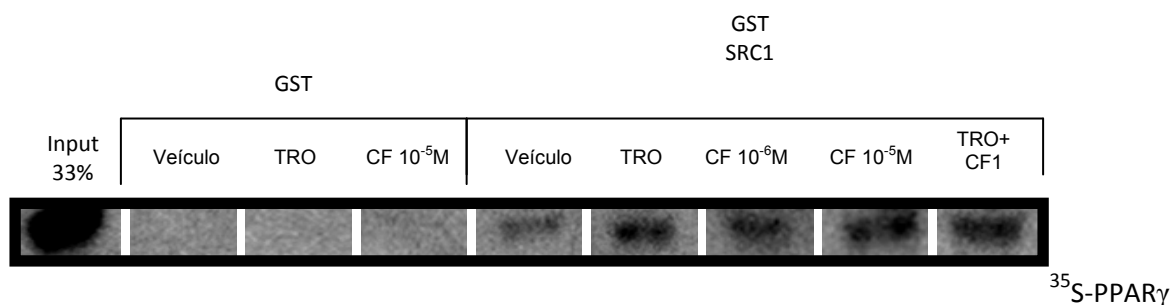


Figura 21: CF-1 promove interação direta do PPAR γ com o coativador SRC-1.

Experimentos de GST pull-down avaliando a interação entre ^{35}S PPAR γ e GST-SRC1 na presença de veículo, troglitazona 10^{-5}M , CF1 10^{-5}M ou troglitazona e CF1 10^{-5}M e proteínas nucleares fusionadas à GST (GST-SRC1).

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta dissertação mostram que CF1 e CF3 na concentração estudada de 10^{-5} M apresentaram atividade agonista apenas para a isoforma PPAR γ e, ainda, essa atividade ocorreu de forma dose-dependente desses compostos e específica para o PPAR γ , já que não apresentaram atividade nos receptores de estrogênio, do hormônio tireoideano e do ácido retinóico. Estudos posteriores mais aprofundados de Relação Estrutura-Atividade Quantitativa (QSAR) poderão viabilizar o desenho de moléculas agonistas de PPAR γ para utilização no tratamento de condições crônicas como o *Diabetes mellitus* e a dislipidemia.

6. PERSPECTIVAS

- ❖ Estudos posteriores do mecanismo molecular do sinergismo de CF1 e CF3 com Troglitazona ou Bezafibrato.
- ❖ Cristalização do complexo protéico CF1 ou CF3 e PPAR γ .
- ❖ Estudo envolvendo o desenvolvimento de uma nova molécula com CF1 ou CF3 com Troglitazona ou Bezafibrato.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-BARRY, J. A.; ABDEL-HASSAN, I. A.; AL-HAKIEM, M. H. Hypoglycaemic and antihyperglycaemic effects of *Trigonella foenum-graecum* leaf in normal and alloxan induced diabetic rats. **J Ethnopharmacol**, v.58, n.3, Nov, p.149-55. 1997.

AKBIYIK, F.; RAY, D. M.; GETTINGS, K. F.; BLUMBERG, N.; FRANCIS, C. W.; PHIPPS, R. P. Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPAR γ , and PPAR γ agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes. **Blood**, v.104, n.5, Sep 1, p.1361-8. 2004.

ALCARAZ, M. J.; VICENTE, A. M.; ARAICO, A.; DOMINGUEZ, J. N.; TERCENIO, M. C.; FERRANDIZ, M. L. Role of nuclear factor-kappaB and heme oxygenase-1 in the mechanism of action of an anti-inflammatory chalcone derivative in RAW 264.7 cells. **Br J Pharmacol**, v.142, n.7, Aug, p.1191-9. 2004.

ALVES, D. L.; SILVA, C. R. D., Eds. Fitohormônios- Abordagem natural da Terapia Hormonal. Medina Natural. São Paulo: Atheneu, v.1, p.105, Medina Natural ed. 2003.

ANTO, R. J.; SUKUMARAN, K.; KUTTAN, G.; RAO, M. N.; SUBBARAJU, V.; KUTTAN, R. Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds. **Cancer Lett**, v.97, n.1, Oct 20, p.33-7. 1995.

ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. **Physiol Rev**, v.81, n.3, p.1269-304. 2001a.

_____. Nuclear hormone receptors and gene expression. **Physiol Rev**, v.81, n.3, Jul, p.1269-304. 2001b.

BAILEY, C. J. Treating insulin resistance: future prospects. **Diab Vasc Dis Res**, v.4, n.1, Mar, p.20-31. 2007.

BALAKUMAR, P.; ROSE, M.; GANTI, S. S.; KRISHAN, P.; SINGH, M. PPAR dual agonists: Are they opening Pandora's Box? **Pharmacol Res**, Mar 14. 2007.

BAN, H. S.; SUZUKI, K.; LIM, S. S.; JUNG, S. H.; LEE, S.; JI, J.; LEE, H. S.; LEE, Y. S.; SHIN, K. H.; OHUCHI, K. Inhibition of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha by 2'-hydroxychalcone derivatives in RAW 264.7 cells. **Biochem Pharmacol**, v.67, n.8, Apr 15, p.1549-57. 2004.

BARRA, G. B.; VELASCO, L. F.; PESSANHA, R. P.; CAMPOS, A. M.; MOURA, F. N.; DIAS, S. M.; POLIKARPOV, I.; RIBEIRO, R. C.; SIMEONI, L. A.; NEVES, F. A. [Molecular mechanism of thyroid hormone action]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.48, n.1, Feb, p.25-39. 2004.

BEATO, M. Transcriptional control by nuclear receptors. **Faseb J**, v.5, n.7, p.2044-51. 1991.

BLASCHKE, F.; TAKATA, Y.; CAGLAYAN, E.; LAW, R. E.; HSUEH, W. A. Obesity, peroxisome proliferator-activated receptor, and atherosclerosis in type 2 diabetes. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.26, n.1, Jan, p.28-40. 2006.

BOOKOUT, A. L.; JEONG, Y.; DOWNES, M.; YU, R. T.; EVANS, R. M.; MANGELSDORF, D. J. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. **Cell**, v.126, n.4, Aug 25, p.789-99. 2006.

BOULANGER, H.; MANSOURI, R.; GAUTIER, J. F.; GLOTZ, D. Are peroxisome proliferator-activated receptors new therapeutic targets in diabetic and non-diabetic nephropathies? **Nephrol Dial Transplant**, v.21, n.10, Oct, p.2696-702. 2006.

BOURGUET, W.; GERMAIN, P.; GRONEMEYER, H. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. **Trends Pharmacol Sci**, v.21, n.10, Oct, p.381-8. 2000.

BOZDAG, O.; VERSPOHL, E. J.; ERTAN, R. Synthesis and hypoglycemic activity of some new flavone derivatives. 3rd communication: 3'-flavonyl-2,4-thiazolidinediones. **Arzneimittelforschung**, v.50, n.7, Jul, p.626-30. 2000.

BROWN, J. D.; PLUTZKY, J. Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets. **Circulation**, v.115, n.4, Jan 30, p.518-33. 2007.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. **Cell**, v.89, n.3, May 2, p.331-40. 1997.

CABRERA, M.; SIMOENS, M.; FALCHI, G.; LAVAGGI, M. L.; PIRO, O. E.; CASTELLANO, E. E.; VIDAL, A.; AZQUETA, A.; MONGE, A.; DE CERAIN, A. L.; SAGRERA, G.; SEOANE, G.; CERECETTO, H.; GONZALEZ, M. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: biological evaluation and structure-activity relationships. **Bioorg Med Chem**, v.15, n.10, May 15, p.3356-67. 2007.

CHAKRABARTI, R.; VIKRAMADITHYAN, R. K.; MISRA, P.; HIRIYAN, J.; RAICHUR, S.; DAMARLA, R. K.; GERSHOME, C.; SURESH, J.; RAJAGOPALAN, R. Ragaglitazar: a novel PPAR alpha PPAR gamma agonist with potent lipid-lowering and insulin-sensitizing efficacy in animal models. **Br J Pharmacol**, v.140, n.3, Oct, p.527-37. 2003.

CHANG, L.; CHIANG, S. H.; SALTIEL, A. R. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. **Mol Med**, v.10, n.7-12, Jul-Dec, p.65-71. 2004.

CHEN, M.; THEANDER, T. G.; CHRISTENSEN, S. B.; HVIID, L.; ZHAI, L.; KHARAZMI, A. Licochalcone A, a new antimalarial agent, inhibits in vitro growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and protects mice from *P. yoelii* infection. **Antimicrob Agents Chemother**, v.38, n.7, Jul, p.1470-5. 1994.

CHIELLINI, G.; APRILETTI, J. W.; YOSHIHARA, H. A.; BAXTER, J. D.; RIBEIRO, R. C.; SCANLAN, T. S. A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor. **Chem Biol**, v.5, n.6, Jun, p.299-306. 1998.

CHOU, F. S.; WANG, P. S.; KULP, S.; PINZONE, J. J. Effects of thiazolidinediones on differentiation, proliferation, and apoptosis. **Mol Cancer Res**, v.5, n.6, Jun, p.523-30. 2007.

CLARKSON, T. B.; ANTHONY, M. S.; WILLIAMS, J. K.; HONORE, E. K.; CLINE, J. M. The potential of soybean phytoestrogens for postmenopausal hormone replacement therapy. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.217, n.3, Mar, p.365-8. 1998.

DE VRIESE, A. S.; VERBEUREN, T. J.; VAN DE VOORDE, J.; LAMEIRE, N. H.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction in diabetes. **Br J Pharmacol**, v.130, n.5, Jul, p.963-74. 2000.

DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. **Endocr Rev**, v.20, n.5, Oct, p.649-88. 1999.

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies. **J Ethnopharmacol**, v.75, n.2-3, May, p.141-64. 2001.

ENOKI, T.; OHNOGI, H.; NAGAMINE, K.; KUDO, Y.; SUGIYAMA, K.; TANABE, M.; KOBAYASHI, E.; SAGAWA, H.; KATO, I. Antidiabetic activities of chalcones isolated from a Japanese Herb, *Angelica keiskei*. **J Agric Food Chem**, v.55, n.15, Jul 25, p.6013-7. 2007.

ESCRIVA, H.; SAFI, R.; HANNI, C.; LANGLOIS, M. C.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; STEHELIN, D.; CAPRON, A.; PIERCE, R.; LAUDET, V. Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.94, n.13, Jun 24, p.6803-8. 1997.

EVANS, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science**, v.240, p.889-895. 1988.

FAJAS, L.; SCHOONJANS, K.; GELMAN, L.; KIM, J. B.; NAJIB, J.; MARTIN, G.; FRUCHART, J. C.; BRIGGS, M.; SPIEGELMAN, B. M.; AUWERX, J. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. **Mol Cell Biol**, v.19, n.8, Aug, p.5495-503. 1999.

FEIGE, J. N.; AUWERX, J. Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis. **Trends Cell Biol**, v.17, n.6, Jun, p.292-301. 2007.

FENG, W.; RIBEIRO, R. C. J.; WAGNER, R. L.; NGUYEN, H.; APRILETTI, J. W.; FLETTERICK, R. J.; BAXTER, J. D.; KUSHNER, P. J.; WEST, B. L. Hormone-Dependent Coactivator Binding to a Hydrophobic Cleft on Nuclear Receptors. **Science**, v.280, n.5370, p.1747-1749. 1998.

FIEVET, C.; FRUCHART, J. C.; STAELS, B. PPARalpha and PPARgamma dual agonists for the treatment of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. **Curr Opin Pharmacol**, v.6, n.6, Dec, p.606-14. 2006.

FORETZ, M.; GUICHARD, C.; FERRE, P.; FOUFELLE, F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, n.22, Oct 26, p.12737-42. 1999.

FURNSINN, C.; WALDHAUSL, W. Thiazolidinediones: metabolic actions in vitro. **Diabetologia**, v.45, n.9, Sep, p.1211-23. 2002.

GAFNER, J.; WOLFENDER, S.; HORTETTMANN, K. Antifungal and Antibacterial chalcones from *Myrica serrata* **Planta Medica**, v.62, p.67-9. 1996.

GELMAN, L.; FEIGE, J. N.; DESVERGNE, B. Molecular basis of selective PPARgamma modulation for the treatment of Type 2 diabetes. **Biochim Biophys Acta**, Mar 16. 2007.

GERMAIN, P.; STAELS, B.; DACQUET, C.; SPEDDING, M.; LAUDET, V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. **Pharmacol Rev**, v.58, n.4, Dec, p.685-704. 2006.

GERVOIS, P.; FRUCHART, J. C.; STAELS, B. Drug Insight: mechanisms of action and therapeutic applications for agonists of peroxisome proliferator-activated receptors. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab**, v.3, n.2, Feb, p.145-56. 2007.

GLASS, C. K. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. **Endocr Rev**, v.15, n.3, Jun, p.391-407. 1994.

GOMES MDE, B. [Glitazones and the metabolic syndrome: mechanism of action, pathophysiology and therapeutic indications]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.50, n.2, Apr, p.271-80. 2006.

GRAHAM, J. M., JR.; SHAW, G. M. Gene-environment interactions in rare diseases that include common birth defects. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v.73, n.11, Nov, p.865-7. 2005.

GRONEMEYER, H.; GUSTAFSSON, J. A.; LAUDET, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. **Nat Rev Drug Discov**, v.3, n.11, Nov, p.950-64. 2004.

GRONEMEYER, H.; MITURSKI, R. Molecular mechanisms of retinoid action. **Cell Mol Biol Lett**, v.6, n.1, p.3-52. 2001.

HAMILTON, S. J.; CHEW, G. T.; WATTS, G. F. Therapeutic regulation of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. **Diab Vasc Dis Res**, v.4, n.2, Jun, p.89-102. 2007.

HARAGUCHI, H.; ISHIKAWA, H.; MIZUTANI, K.; TAMURA, Y.; KINOSHITA, T. Antioxidative and superoxide scavenging activities of retrochalcones in *Glycyrrhiza inflata*. **Bioorg Med Chem**, v.6, n.3, Mar, p.339-47. 1998.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, n.6, Nov, p.481-504. 2000.

HEERY, D. M.; KALKHOVEN, E.; HOARE, S.; PARKER, M. G. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. **Nature**, v.387, n.6634, p.733-6. 1997.

HENKE, B. R.; CONSLER, T. G.; GO, N.; HALE, R. L.; HOHMAN, D. R.; JONES, S. A.; LU, A. T.; MOORE, L. B.; MOORE, J. T.; ORBAND-MILLER, L. A.; ROBINETT, R. G.; SHEARIN, J.; SPEARING, P. K.; STEWART, E. L.; TURNBULL, P. S.; WEAVER, S. L.; WILLIAMS, S. P.; WISELY, G. B.; LAMBERT, M. H. A new series of estrogen receptor modulators that display selectivity for estrogen receptor beta. **J Med Chem**, v.45, n.25, Dec 5, p.5492-505. 2002.

HERENCIA, F.; FERRANDIZ, M. L.; UBEDA, A.; DOMINGUEZ, J. N.; CHARRIS, J. E.; LOBO, G. M.; ALCARAZ, M. J. Synthesis and anti-inflammatory activity of chalcone derivatives. **Bioorg Med Chem Lett**, v.8, n.10, May 19, p.1169-74. 1998.

HERMAN, J. R.; DETHLOFF, L. A.; MCGUIRE, E. J.; PARKER, R. F.; WALSH, K. M.; GOUGH, A. W.; MASUDA, H.; DE LA IGLESIA, F. A. Rodent carcinogenicity with the thiazolidinedione antidiabetic agent troglitazone. **Toxicol Sci**, v.68, n.1, Jul, p.226-36. 2002.

HODGKIN, J. Sex, cell death, and the genome of *C. elegans*. **Cell**, v.98, n.3, Aug 6, p.277-80. 1999.

HORLEIN, A. J.; NAAR, A. M.; HEINZEL, T.; TORCHIA, J.; GLOSS, B.; KUROKAWA, R.; RYAN, A.; KAMEL, Y.; SODERSTROM, M.; GLASS, C. K.; ROSENFELD, M. G. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. **Nature**, v.377, n.6548, p.397-404. 1995.

HORNUNG, D.; WAITE, L. L.; RICKE, E. A.; BENTZIEN, F.; WALLWIENER, D.; TAYLOR, R. N. Nuclear peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma have opposing effects on monocyte chemotaxis in endometriosis. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, n.7, Jul, p.3108-14. 2001.

HORTON, J. D.; SHIMOMURA, I. Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. **Curr Opin Lipidol**, v.10, n.2, Apr, p.143-50. 1999.

HSIEH, H. K.; LEE, T. H.; WANG, J. P.; WANG, J. J.; LIN, C. N. Synthesis and anti-inflammatory effect of chalcones and related compounds. **Pharm Res**, v.15, n.1, Jan, p.39-46. 1998.

HUMPHRIES, P. S.; ALMADEN, J. V.; BARNUM, S. J.; CARLSON, T. J.; DO, Q. Q.; FRASER, J. D.; HESS, M.; KIM, Y. H.; OGILVIE, K. M.; SUN, S. Pyridine-2-propanoic acids: Discovery of dual PPARalpha/gamma agonists as antidiabetic agents. **Bioorg Med Chem Lett**, v.16, n.23, Dec 1, p.6116-9. 2006.

INGRAM, D.; SANDERS, K.; KOLYBABA, M.; LOPEZ, D. Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer. **Lancet**, v.350, n.9083, Oct 4, p.990-4. 1997.

INZUCCHI, S. E. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review. **Jama**, v.287, n.3, Jan 16, p.360-72. 2002.

JAFRI, M. A.; ASLAM, M.; JAVED, K.; SINGH, S. Effect of Punica granatum Linn. (flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. **J Ethnopharmacol**, v.70, n.3, Jun, p.309-14. 2000.

JIANG, C.; TING, A. T.; SEED, B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, v.391, n.6662, Jan 1, p.82-6. 1998.

JUNG, S. J.; KIM, D. H.; HONG, Y. H.; LEE, J. H.; SONG, H. N.; RHO, Y. D.; BAEK, N. I. Flavonoids from the flower of Rhododendron yedoense var. poukhanense and their antioxidant activities. **Arch Pharm Res**, v.30, n.2, Feb, p.146-50. 2007.

KENDALL, D. M.; RUBIN, C. J.; MOHIDEEN, P.; LEDEINE, J. M.; BELDER, R.; GROSS, J.; NORWOOD, P.; O'MAHONY, M.; SALL, K.; SLOAN, G.; ROBERTS, A.; FIEDOREK, F. T.; DEFRONZO, R. A. Improvement of glycemic control, triglycerides, and HDL cholesterol levels with muraglitazar, a dual (alpha/gamma) peroxisome proliferator-activated receptor activator, in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin monotherapy: A double-blind, randomized, pioglitazone-comparative study. **Diabetes Care**, v.29, n.5, May, p.1016-23. 2006.

KERSTEN, S.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Roles of PPARs in health and disease. **Nature**, v.405, n.6785, May 25, p.421-4. 2000.

KERSTEN, S.; SEYDOUX, J.; PETERS, J. M.; GONZALEZ, F. J.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. **J Clin Invest**, v.103, n.11, Jun, p.1489-98. 1999.

KHORASANIZADEH, S.; RASTINEJAD, F. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. **Trends Biochem Sci**, v.26, n.6, Jun, p.384-90. 2001.

KLIEWER, S. A.; SUNDSETH, S. S.; JONES, S. A.; BROWN, P. J.; WISELY, G. B.; KOBLE, C. S.; DEVCHAND, P.; WAHLI, W.; WILLSON, T. M.; LENHARD, J. M.; LEHMANN, J. M. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.94, n.9, Apr 29, p.4318-23. 1997.

KO, H.; TGAO, L.; YU, K.; LIU, C.; WANG, J.; LIN, C. Structure-activity relationship studies on chalcone derivatives: The potent inhibition of chemical mediators release **Bioorg Med Chem Lett**, v.11, p.105-111. 2003.

KOELLE, M. R.; TALBOT, W. S.; SEGRAVES, W. A.; BENDER, M. T.; CHERBAS, P.; HOGNESS, D. S. The Drosophila EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. **Cell**, v.67, n.1, p.59-77. 1991.

KURODA, M.; MIMAKI, Y.; SASHIDA, Y.; MAE, T.; KISHIDA, H.; NISHIYAMA, T.; TSUKAGAWA, M.; KONISHI, E.; TAKAHASHI, K.; KAWADA, T.; NAKAGAWA, K.; KITAHARA, M. Phenolics with PPAR-gamma ligand-binding activity obtained from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* roots) and ameliorative effects of glycyrrin on genetically diabetic KK-A(y) mice. **Bioorg Med Chem Lett**, v.13, n.24, Dec 15, p.4267-72. 2003.

KUROKAWA, R.; SODERSTROM, M.; HORLEIN, A.; HALACHMI, S.; BROWN, M.; ROSENFELD, M. G.; GLASS, C. K. Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor [see comments]. **Nature**, v.377, n.6548, p.451-4. 1995.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.259, p.680-5. 1970.

LAUDET, V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. **J Mol Endocrinol**, v.19, n.3, Dec, p.207-26. 1997.

LAZAR, M. A. How obesity causes diabetes: not a tall tale. **Science**, v.307, n.5708, Jan 21, p.373-5. 2005.

LEE, S. K.; KIM, H. J.; KIM, J. W.; LEE, J. W. Steroid receptor coactivator-1 and its family members differentially regulate transactivation by the tumor suppressor protein p53. **Mol Endocrinol**, v.13, n.11, Nov, p.1924-33. 1999.

LEONE, T. C.; WEINHEIMER, C. J.; KELLY, D. P. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, n.13, Jun 22, p.7473-8. 1999.

LI, J. T.; YANG, J.; CHEN, D. C.; ZHANG, X. L.; TANG, Z. S. An optimized mini-preparation method to obtain high-quality genomic DNA from mature leaves of sunflower. **Genet Mol Res**, v.6, n.4, p.1064-71. 2007.

LI, X. H.; ZOU, H. J.; WU, A. H.; YE, Y. L.; SHEN, J. H. Structure-based drug design of a novel family of chalcones as PPARalpha agonists: virtual screening, synthesis, and biological activities in vitro. **Acta Pharmacol Sin**, v.28, n.12, Dec, p.2040-52. 2007.

LIANG, G.; YANG, J.; HORTON, J. D.; HAMMER, R. E.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. **J Biol Chem**, v.277, n.11, Mar 15, p.9520-8. 2002.

LIM, S. S.; JUNG, S. H.; JI, J.; SHIN, K. H.; KEUM, S. R. Inhibitory effects of 2'-hydroxychalcones on rat lens aldose reductase and rat platelet aggregation. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v.48, n.11, Nov, p.1786-9. 2000.

_____. Synthesis of flavonoids and their effects on aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. **J Pharm Pharmacol**, v.53, n.5, May, p.653-68. 2001.

LOSCALZO, J. Nitric oxide and vascular disease. **N Engl J Med**, v.333, n.4, Jul 27, p.251-3. 1995.

LUISE, B.; FREEDMAN, L. Nuclear receptors. Dimer, dimer binding tight. **Nature**, v.375, n.6530, p.359-60. 1995.

MACIAS, F.; MOLINILLO, J.; TORRES, A.; VARELA, R.; CASTELLANO, D. Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus cultivars*. **Phytochemistry**, v.45, p.638-87. 1997.

MACÍAS, F. A.; M.G.MOLINILLOS, J.; TORRES, A.; M.VARELA, R.; CASTELLANO, D. Bioactive Flavonoids from *Helianthus annuus cultivars*. **Phytochemistry**, v.45, n.4, p.683-687. 1997.

MACIEL, M. A.; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C.; PAMPLONA, S. G.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F.; COLUS, I. M.; FARIAS, R. A.; LUNA COSTA, A. M.; RAO, V. S. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **J Ethnopharmacol**, v.70, n.1, Apr, p.41-55. 2000.

MADAN, B.; BATRA, S.; GHOSH, B. 2'-hydroxychalcone inhibits nuclear factor-kappaB and blocks tumor necrosis factor-alpha- and lipopolysaccharide-induced adhesion of neutrophils to human umbilical vein endothelial cells. **Mol Pharmacol**, v.58, n.3, Sep, p.526-34. 2000.

MAE, T.; KISHIDA, H.; NISHIYAMA, T.; TSUKAGAWA, M.; KONISHI, E.; KURODA, M.; MIMAKI, Y.; SASHIDA, Y.; TAKAHASHI, K.; KAWADA, T.; NAKAGAWA, K.; KITAHARA, M. A licorice ethanolic extract with peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand-binding activity affects diabetes in KK-Ay mice, abdominal obesity in diet-induced obese C57BL mice and hypertension in spontaneously hypertensive rats. **J Nutr**, v.133, n.11, Nov, p.3369-77. 2003.

MANGELSDORF, D. J. Vitamin A receptors. **Nutr Rev**, v.52, n.2 Pt 2, p.S32-44. 1994.

MANGELSDORF, D. J.; EVANS, R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors. **Cell**, v.83, n.6, p.841-50. 1995a.

MANGELSDORF, D. J.; THUMMEL, C.; BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHUTZ, G.; UMESONO, K.; BLUMBERG, B.; KASTNER, P.; MARK, M.; CHAMBON, P.; EVANS, R. M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v.83, n.6, p.835-9. 1995b.

MANGELSDORF, D. J.; UMESONO, K.; KLIEWER, S. A.; BORGMEYER, U.; ONG, E. S.; EVANS, R. M. A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. **Cell**, v.66, p.555-561. 1991.

MANZELLA, D.; GRELLA, R.; ABBATECOLA, A. M.; PAOLISSO, G. Repaglinide administration improves brachial reactivity in type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v.28, n.2, Feb, p.366-71. 2005.

MATTHAEI, S.; STUMVOLL, M.; KELLERER, M.; HARING, H. U. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. **Endocr Rev**, v.21, n.6, Dec, p.585-618. 2000.

MCKENNA, N. J.; LANZ, R. B.; O'MALLEY, B. W. Nuclear receptor coregulators: Cellular and Molecular Biology. **The Endocrine Society**, v.20, n.3, p.321-344. 1999.

MCKENNA, N. J.; O'MALLEY, B. W. Minireview: nuclear receptor coactivators--an update. **Endocrinology**, v.143, n.7, Jul, p.2461-5. 2002.

MEDINA-GOMEZ, G.; GRAY, S. L.; YETUKURI, L.; SHIMOMURA, K.; VIRTUE, S.; CAMPBELL, M.; CURTIS, R. K.; JIMENEZ-LINAN, M.; BLOUNT, M.; YEO, G. S.; LOPEZ, M.; SEPPANEN-LAAKSO, T.; ASHCROFT, F. M.; ORESIC, M.; VIDAL-PUIG, A. PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. **PLoS Genet**, v.3, n.4, Apr 27, p.e64. 2007.

METZGER, D.; IMAI, T.; JIANG, M.; TAKUKAWA, R.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W.; CHAMBON, P. Functional role of RXRs and PPARgamma in mature adipocytes. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.73, n.1, Jul, p.51-8. 2005.

MIDDLETON, E., JR.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol Rev**, v.52, n.4, Dec, p.673-751. 2000.

MOORE, L. B.; GOODWIN, B.; JONES, S. A.; WISELY, G. B.; SERABJIT-SINGH, C. J.; WILLSON, T. M.; COLLINS, J. L.; KLIWER, S. A. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.13, Jun 20, p.7500-2. 2000.

MORA, A.; PAYA, M.; RIOS, J. L.; ALCARAZ, M. J. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. **Biochem Pharmacol**, v.40, n.4, Aug 15, p.793-7. 1990.

MUKHERJEE, R.; HOENER, P. A.; JOW, L.; BILAKOVICS, J.; KLAUSING, K.; MAIS, D. E.; FAULKNER, A.; CROSTON, G. E.; PATERNITI, J. R., JR. A selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) modulator blocks adipocyte differentiation but stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. **Mol Endocrinol**, v.14, n.9, Sep, p.1425-33. 2000.

NAAR, A. M.; BOUTIN, J. M.; LIPKIN, S. M.; YU, V. C.; HOLLOWAY, J. M.; GLASS, C. K.; ROSENFELD, M. G. The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. **Cell**, v.65, p.1267-1279. 1991.

NAGASAWA, T.; INADA, Y.; NAKANO, S.; TAMURA, T.; TAKAHASHI, T.; MARUYAMA, K.; YAMAZAKI, Y.; KURODA, J.; SHIBATA, N. Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPARdelta agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet. **Eur J Pharmacol**, v.536, n.1-2, Apr 24, p.182-91. 2006.

NAGY, L.; SCHWABE, J. W. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. **Trends Biochem Sci**, v.29, n.6, Jun, p.317-24. 2004.

NATALI, A.; BALDEWEG, S.; TOSCHI, E.; CAPALDO, B.; BARBARO, D.; GASTALDELLI, A.; YUDKIN, J. S.; FERRANNINI, E. Vascular effects of improving metabolic control with metformin or rosiglitazone in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.27, n.6, Jun, p.1349-57. 2004.

NEHLIN, J. O.; MOGENSEN, J. P.; PETTERSON, I.; JEPPESEN, L.; FLECKNER, J.; WULFF, E. M.; SAUERBERG, P. Selective PPAR agonists for the treatment of type 2 diabetes. **Ann N Y Acad Sci**, v.1067, May, p.448-53. 2006.

ØYVIND M. ANDERSEN, K. R. M., Ed. Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, p.1212ed. 2006.

PIKE, A. C.; BRZOZOWSKI, A. M.; HUBBARD, R. E.; BONN, T.; THORSELL, A. G.; ENGSTROM, O.; LJUNGGREN, J.; GUSTAFSSON, J. A.; CARLQUIST, M. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. **Embo J**, v.18, n.17, Sep 1, p.4608-18. 1999.

POURCET, B.; FRUCHART, J. C.; STAELS, B.; GLINEUR, C. Selective PPAR modulators, dual and pan PPAR agonists: multimodal drugs for the treatment of type 2 diabetes and atherosclerosis. **Expert Opin Emerg Drugs**, v.11, n.3, Sep, p.379-401. 2006.

RASTINEJAD, F. Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. **Curr Opin Struct Biol**, v.11, n.1, Feb, p.33-8. 2001.

RENAUD, J. P.; MORAS, D. Structural studies on nuclear receptors. **Cell Mol Life Sci**, v.57, n.12, Nov, p.1748-69. 2000.

RIBEIRO, R. C.; APRILETTI, J. W.; WAGNER, R. L.; WEST, B. L.; FENG, W.; HUBER, R.; KUSHNER, P. J.; NILSSON, S.; SCANLAN, T.; FLETTERICK, R. J.; SCHAUFELE, F.; BAXTER, J. D. Mechanisms of thyroid hormone action: insights from X-ray crystallographic and functional studies. **Recent Prog Horm Res**, v.53, p.351-92; discussion 392-4. 1998.

RIBEIRO, R. C.; APRILETTI, J. W.; WEST, B. L.; WAGNER, R. L.; FLETTERICK, R. J.; SCHAUFELE, F.; BAXTER, J. D. The molecular biology of thyroid hormone action. **Ann N Y Acad Sci**, v.758, Jun 30, p.366-89. 1995.

RIBEIRO, R. C.; KUSHNER, P. J.; APRILETTI, J. W.; WEST, B. L.; BAXTER, J. D. Thyroid hormone alters in vitro DNA binding of monomers and dimers of thyroid hormone receptors. **Mol.Endocrinol.**, v.6, p.1142-1152. 1992.

RIBEIRO, R. C. J.; KUSHNER, P. J.; BAXTER, J. D. The nuclear hormone receptor gene superfamily. **Annu. Rev. Med.**, v.46, p.443-453. 1995.

RICOTE, M.; GLASS, C. K. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. **Biochim Biophys Acta**, Mar 12. 2007.

RICOTE, M.; LI, A. C.; WILLSON, T. M.; KELLY, C. J.; GLASS, C. K. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. **Nature**, v.391, n.6662, Jan 1, p.79-82. 1998.

ROBINSON-RECHAVI, M.; ESCRIVA GARCIA, H.; LAUDET, V. The nuclear receptor superfamily. **J Cell Sci**, v.116, n.Pt 4, Feb 15, p.585-6. 2003.

SAKAKURA, Y.; SHIMANO, H.; SONE, H.; TAKAHASHI, A.; INOUE, N.; TOYOSHIMA, H.; SUZUKI, S.; YAMADA, N. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. **Biochem Biophys Res Commun**, v.286, n.1, Aug 10, p.176-83. 2001.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, n.6865, Dec 13, p.799-806. 2001.

SALTIEL, A. R.; PESSIN, J. E. Insulin signaling pathways in time and space. **Trends Cell Biol**, v.12, n.2, Feb, p.65-71. 2002.

SATO, M.; TAI, T.; NUNOURA, Y.; YAJIMA, Y.; KAWASHIMA, S.; TANAKA, K. Dehydrotrametenolic acid induces preadipocyte differentiation and sensitizes animal models of noninsulin-dependent diabetes mellitus to insulin. **Biol Pharm Bull**, v.25, n.1, Jan, p.81-6. 2002.

SHIBATA, S. Anti-tumorigenic chalcones. **Stem Cells**, v.12, n.1, Jan, p.44-52. 1994.

SHIMOMURA, I.; BASHMAKOV, Y.; IKEMOTO, S.; HORTON, J. D.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, n.24, Nov 23, p.13656-61. 1999.

STAELS, B.; DALLONGEVILLE, J.; AUWERX, J.; SCHOONJANS, K.; LEITERSDORF, E.; FRUCHART, J. C. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. **Circulation**, v.98, n.19, Nov 10, p.2088-93. 1998.

STEVENS, J. F.; TAYLOR, A. W.; NICKERSON, G. B.; IVANCIC, M.; HENNING, J.; HAUNOLD, A.; DEINZER, M. L. Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol. **Phytochemistry**, v.53, n.7, Apr, p.759-75. 2000.

SYNOLD, T. W.; DUSSAULT, I.; FORMAN, B. M. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. **Nat Med**, v.7, n.5, May, p.584-90. 2001.

TANEJA, R. Teaching resources. Nuclear receptors. **Sci STKE**, v.2005, n.286, May 31, p.tr17. 2005.

TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. [Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): molecular study in glucose homeostasis, lipid metabolism and therapeutic approach]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.51, n.4, Jun, p.526-33. 2007.

TENENBAUM, A.; MOTRO, M.; FISMAN, E. Z. Dual and pan-peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) co-agonism: the bezafibrate lessons. **Cardiovasc Diabetol**, v.4, p.14. 2005a.

TENENBAUM, A.; MOTRO, M.; FISMAN, E. Z.; TANNE, D.; BOYKO, V.; BEHAR, S. Bezafibrate for the secondary prevention of myocardial infarction in patients with metabolic syndrome. **Arch Intern Med**, v.165, n.10, May 23, p.1154-60. 2005b.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **Br J Nutr**, v.92, n.3, Sep, p.347-55. 2004.

UMESONO, K.; EVANS, R. M. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. **Cell**, v.57, n.7, Jun 30, p.1139-46. 1989.

UMESONO, K.; MURAKAMI, K. K.; THOMPSON, C. C.; EVANS, R. M. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. **Cell**, v.65, p.1255-1266. 1991.

USUI, S.; FUJIEDA, H.; SUZUKI, T.; YOSHIDA, N.; NAKAGAWA, H.; OGURA, M.; MAKISHIMA, M.; MIYATA, N. Synthesis and evaluation of 2-Nonylaminopyridine derivatives as PPAR ligands. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v.55, n.7, Jul, p.1053-9. 2007.

WALTER, M. E.; CORREA, R.; MONTANI, C. A.; NUNES, R. J. Estudo QSAR/QSPR de chalconas antinoceptivas 2007.

WANG, M. Y.; LEE, Y.; UNGER, R. H. Novel form of lipolysis induced by leptin. **J Biol Chem**, v.274, n.25, Jun 18, p.17541-4. 1999.

WARINMARK, A.; TREUTER, E.; WRIGHT, A. P.; GUSTAFSSON, J. A. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. **Mol Endocrinol**, v.17, n.10, Oct, p.1901-9. 2003.

WILLSON, T. M.; BROWN, P. J.; STERNBACH, D. D.; HENKE, B. R. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. **J Med Chem**, v.43, n.4, Feb 24, p.527-50. 2000.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiol**, v.126, n.2, Jun, p.485-93. 2001.

WU, Y.; XU, B.; KOENIG, R. J. Thyroid hormone response element sequence and the recruitment of retinoid X receptors for thyroid hormone responsiveness. **J Biol Chem**, v.276, n.6, p.3929-36. 2001a.

_____. Thyroid hormone response element sequence and the recruitment of retinoid X receptors for thyroid hormone responsiveness. **J Biol Chem**, v.276, n.6, Feb 9, p.3929-36. 2001b.

YEN, P. M.; SUGAWARA, A.; LIU, Y.; WHANG, J.; CHIN, W. W. Factors that enhance Escherichia coli-expressed TR beta binding to T3 and DNA. **Thyroid**, v.5, n.4, Aug, p.309-13. 1995.

YU, S.; REDDY, J. K. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. **Biochim Biophys Acta**, Jan 20. 2007.

ZHU, X. F.; XIE, B. F.; ZHOU, J. M.; FENG, G. K.; LIU, Z. C.; WEI, X. Y.; ZHANG, F. X.; LIU, M. F.; ZENG, Y. X. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor signal pathway and antitumor activity of ON-III (2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone), a component from Chinese herbal medicine. **Mol Pharmacol**, v.67, n.5, May, p.1444-50. 2005.

ZILLIACUS, J.; CARLSTEDT-DUKE, J.; GUSTAFSSON, J. A.; WRIGHT, A. P. Evolution of distinct DNA-binding specificities within the nuclear receptor family of transcription factors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91, n.10, May 10, p.4175-9. 1994.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v.414, n.6865, Dec 13, p.782-7. 2001.