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

Propriedades antiaterogênicas de novas tiazolidino-2,4-dionas

Fernanda Andrade de César

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Dulcineia Saes Parra Abdala

São Paulo
2013

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

César, Fernanda Andrade de
C421p Propriedades antiaterogênicas de novas tiazolidino-2,4-dionas / Fernanda Andrade de César. -- São Paulo, 2013.
162p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Abdala, Dulcinéia Saes Parra

1. Bioquímica clínica 2. Aterosclerose I. T. III. Abdala, Dulcinéia Saes Parra, orientador.

616.0756 CDD

Fernanda Andrade de César

Propriedades antiaterogênicas de novas tiazolidino-2,4-dionas

Comissão Julgadora
da
Tese para obtensão do grau de DOUTOR

Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla
Orientador/Presidente

_____

1º Examinador

_____

2º Examinador

_____

3º Examinador

_____

4º Examinador

São Paulo, _____ de _____.

Ao meu companheiro,
Janiel Freitas

Aos meus pais
Fernando e Maria do Céu

Aos meus avós
Cezar e Eliete (*in memorian*)
Valdir e Gilda (*in memorian*)

E, à minha Bisa,
Francisca Ferrreira (*in memorian*)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade de realizar o sonho de estudar em uma das principais universidades do país, e a partir deste, poder empreender tantos outros sonhos. Também, agradeço à força de vontade que me destes para suportar a saudade da família, dos amigos, do meu povo, da minha terra, que tentou muitas vezes levar-me a desistir.

A meu parceiro, amigo e amor, Janiel Freitas, que participou de todas as etapas desta tese, aguentou fins de semana de ausência e estudo, e me deu todo o suporte emocional necessário para que eu realizasse este trabalho.

A meus pais, razão da minha existência, que suportaram meses de ausência e datas especiais sem a minha presença, sem queixas. Eu vivo para lhes fazer felizes, e amo muito vocês.

A Profa. Sueli Lins Galdino, por acreditar mais em mim do que eu mesma. A realização deste trabalho só foi possível por sua causa, por sua confiança em colocar projetos sob minha responsabilidade. Sempre admirei como a pesquisa era um sonho em sua vida, e como você perseverava por este sonho, nunca desistindo. Muito obrigada por sempre lutar por mim, e a meu lado... Eternas saudades...

A Profa. Dulcineia, minha orientadora, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de trabalho, pela confiança de entregar um projeto a mim, depois de breves encontros, e pela convivência e aprendizagem ao seu lado. Muito obrigada...

Ao grupo de pesquisa da Profa. Dulcineia, pelo trabalho conjunto e amizade. Este trabalho não teria saído do papel sem vocês, e eu tenho orgulho em dizer que não somos colegas de trabalho, mas sim amigos. A Martina, que foi a pedra fundamental na minha adaptação e no início do projeto. Nunca esquecerei como você ajuda e orienta a

todos nós, e sempre serei grata por tudo. A Luciane e Julio, com quem aprendi a trabalhar com as células e animais, e a rir muito. Hoje, vocês estão seguindo novos rumos, mas sempre terão uma amiga para lhes ouvir em mim. A Cris, que chegou depois de mim para trabalhar com as TZDs, e com seu jeitinho tímido conquistou a todos nós, e acrescentou muito aos meus resultados. A Marcela, sempre disposta a ajudar, a ouvir, a aconselhar, sem restrições e com muita generosidade. Você tem um futuro brilhante pela frente, e eu estarei ao seu lado para comemorar. A Tanize, Alda, Elaine e Soraya, que apesar de não trabalharmos juntas, estavam sempre dispostas a ajudar e a discutir, muito obrigada pela amizade. A Jacqueline e Renila, os mais novos membros do grupo das TZDs, torço muito por vocês e sei que terão muito êxito em tudo que fizerem. A Alejandro e Nicolas, pela disponibilidade de tempo para discussão dos projetos, pela amizade oferecida, e por terem me ensinado o pouco de espanhol que vocês falam, e não o chileno.

Ao Prof. Ivan Pitta e Profa. Maria do Carmo Lima (Nena), pela colaboração com a síntese das TZDs, pela disponibilidade para discussão e pela convivência nos últimos 7 anos. Muito do que sei aprendi com vocês, espero continuar a fazê-lo.

Ao Prof. Lisardo Boscá e Profa. Beatriz de Las Heras, pela oportunidade de realizar o doutorado sanduíche na Espanha, e principalmente, fazer parte do seu grupo de pesquisa. Ás suas alunas Irene Cuadrado e Izaskun Rodal, por toda a solicitude em receber-me, senti-me em casa com elas.

A Profa. Marisa passareli e sua aluna Gabriela Castilho, pela colaboração com o estudo em efluxo de colesterol, realizado no último ano. Esses resultados foram muito importantes para este estudo, e a contribuição de vocês foi enorme, principalmente para o meu conhecimento pessoal. Aprendi muito e sempre serei grata.

Ao Laboratório de Hematologia, do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, pela disponibilidade de equipamentos e conhecimento. Às alunas Amanda e Karina, cuja contribuição técnica e teórica foi essencial durante toda a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Patologia, do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, pela disponibilidade de equipamentos, como o criostato.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, pela ajuda no manejo e manutenção dos camudongos, durante os ensaios experimentais. Sem a sua colaboração, o trabalho seria muito maior e mais difícil.

Às secretarias do Departamento de Análises Clínicas, Ana, Dora, Suely e Edna, e aos secretários da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, Jorge e Elaine, por toda a disponibilidade em ajudar e facilitar a nossa vida, principalmente nas questões burocráticas.

Aos meus grandes amigos, que sempre estiveram presentes, em cada passo desta longa caminhada.

A todos que não foram citados, mas foram essenciais à realização desta tese de doutorado.

E, novamente, a todos, que continuarão participando de todos os projetos da minha vida...

Onde você vê um obstáculo,
alguém vê o término da viagem
e o outro vê uma chance de crescer.

Onde você vê um motivo pra se irritar,
Alguém vê a tragédia total
E o outro vê uma prova para sua paciência.

Onde você vê a morte,
Alguém vê o fim
E o outro vê o começo de uma nova etapa...

Onde você vê a fortuna,
Alguém vê a riqueza material
E o outro pode encontrar por trás de tudo, a dor e a miséria total.

Onde você vê a teimosia,
Alguém vê a ignorância,
Um outro compreende as limitações do companheiro,
percebendo que cada qual caminha em seu próprio passo.

E que é inútil querer apressar o passo do outro,
a não ser que ele deseje isso.
Cada qual vê o que quer, pode ou consegue enxergar.

"Porque eu sou do tamanho do que vejo.
E não do tamanho da minha altura."

Fernando Pessoa

RESUMO

CÉSAR, F. A. **Propriedades antiaterogênicas de novas tiazolidino-2,4-dionas**. 2012. 142 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Tiazolidinadionas (TZDs) são agentes sensibilizadores de insulina que agem por ligação ao receptor gama ativado por proliferador de peroxissomos (PPARγ). Elas têm apresentado efeitos cardioprotetores em humanos e propriedades anti-aterogênicas em modelos animais. Estudos *in vitro* têm sugerido que esses efeitos anti-aterogênicos da ativação de PPARγ ocorrem por inibição da expressão de genes pro-inflamatórios e por aumentar o efluxo de colesterol via ativação dos receptores LXR-ABCA1. Entretanto, vários efeitos colaterais são associados ao tratamento com as TZDs, tornando necessária a pesquisa por novos compostos desta classe. Neste estudo, 14 novas tiazolidina-2,4-dionas, que são TZDs modificadas por bioisosterismo, foram avaliadas quanto à expressão de fatores aterogênicos e inflamatórios em linhagens de macrófagos J774 e RAW 264.7 e em camundongos com deleção genética para o receptor de LDL ($LDLr^{-/-}$). Após a avaliação da citotoxicidade em macrófagos, foram eleitas cinco TZDs, denominadas de GQ-11, GQ-97, GQ-177, GQ-145 e LYSO-7. Três destas TZDs (GQ-145, GQ-177 e LYSO-7) aumentaram significativamente a expressão de RNAm dos fatores de transcrição PPARγ1, PPARγ2 e do receptor CD36, assim como também aumentaram a expressão gênica de ABCA1 em 2.9, 3.5 e 6.7 vezes, respectivamente. Em adição, estas TZDs diminuíram a expressão gênica de iNOS, COX2, VCAM e IL-6 associado a redução na produção de nitritos, mas apenas a LYSO-7 reduziu significativamente a expressão desses genes quando comparada à rosiglitazona (RSG), além de diminuir a expressão da proteína-1 quimiotática para monócitos (MCP-1). No estudo experimental, os camundongos $LDLr^{-/-}$ machos foram alimentados com dieta hipercolesterolêmica por 16 semanas e quatro semanas antes da eutanásia receberam os derivados tiazolidínicos (20 mg/kg/dia) por gavagem. GQ-177 inibiu a progressão da placa aterosclerótica associada à aumento nas concentrações plasmáticas de HDL-C, com elevação na expressão de ABCA1, e redução da via inflamatória CD40-CD40L. LYSO-7 também mostrou inibição da aterogênese associada à redução das concentrações plasmáticas de colesterol total e triacilgliceróis, com diminuição na interação entre CD40-CD40L e expressão de citocinas inflamatórias. A GQ-145 não

alterou os níveis plasmáticos dos lipídeos, mas aumentou a expressão de todos os genes pró-aterogênicos e pró-inflamatórios. Adicionalmente, as vias de ativação destas novas TZDs também foram estudadas por ensaio de luciferase, como gene repórter. A GQ-177 induziu ativação de PPARγ e ligação ao seu domínio, enquanto a LYSO-7 estimulou ativação de PPARα e PPARδ. Portanto, conclui-se que as novas TZDs, especialmente a GQ-177 e a LYSO-7, podem apresentar propriedades ateroprotetoras associadas ao transporte reverso de colesterol e aos efeitos antiinflamatórios, e poderiam ser uma alternativa promissora para o tratamento da aterosclerose. Porém, estudos complementares são requeridos para caracterizar as vias de sinalização intracelular, visto que as duas demonstraram ativar diferentes isotipos do fator de transcrição PPAR.

ABSTRACT

CÉSAR, F. A. **Antiatherogenic properties of new thiazolidin-2,4-diones**. 2012. 142 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Thiazolidinediones (TZDs) are insulin-sensitizing agents that act by binding to peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPARγ). They have been demonstrated to possess cardioprotective effects in humans and antiatherogenic properties in animal models. In vitro studies have also suggested that these antiatherogenic effects of PPARγ activation occur by inhibiting the inflammatory gene expression and by increasing cholesterol efflux via LXR-ABCA1 activation. However, several side effects are associated with TZDs treatment making necessary the search for new compounds. In this study, 14 new thiazolidine-2,4-diones, modified TZDs by bioisosterism, were tested for aterogenic and inflammtary factors in RAW 264.7 macrophages and in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. After the citotoxicity evaluation in RAW 264.7 macrophages the TZDs named GQ-11, GQ-97, GQ-177, GQ-145 e LYSO-7 were selected for this study. Three of these TZDs (GQ-177, GQ-145 and LYSO-7) significantly increased the expression of PPARγ1, PPARγ2 and CD36 mRNA, and enhanced the expression of ABCA1 mRNA in 2.9, 3.5 and 6.7 fold, respectively. Moreover, they also significantly decreased the expression of iNOS, COX2, VCAM and IL-6 mRNA in relation to control, and these results are associated to reduction on nitrits concentration. In addition, LYSO-7 significantly reduced the expression of these genes when compared to rosiglitazone, and decreased expression of MCP1 mRNA. In the experimental study, male $LDLr^{-/-}$ mice were fed an atherogenic diet containing 0.5% cholesterol for 16 weeks, and 4 weeks before euthanasia they received TZDs (20mg/kg/ per day) by gavage. GQ-177 treatment inhibited progression of atherosclerotic plaque associated to increased plasma concentrations of HDL-C, with enhance of ABCA1 expression and reduction on CD40-CD40L interaction. LYSO-7 treatment also showed inhibition of the atherogenesis associated to decreased plasma concentrations of total cholesterol and TAG, with reduction on CD40-CD40L pathway and inflammatory cytokines expression.GQ-145 did not alter the lipid plasma levels and increased the expression of all pro-atherogenic and pro-inflammatory genes. Furthermore, the activation of PPARs has also been studied, by luciferase assay as reporter gene. GQ-177

induced activation of PPARγ, whereas LYSO-7 stimulated activation of PPARα and PPARβ/δ. Altogether, our data suggest that the new TZDs derivatives, specially GQ-177 and LYSO-7, may have atheroprotective properties associated with the reverse cholesterol transport and anti-inflammatory effects, and could be a promising alternative for the treatment of atherosclerosis. However, further studies are warranted in order to characterize the pathways of intracellular signaling since both have demonstrated to activate different isotypes of PPAR.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Representação das principais causas mundiais de mortalidade	29
FIGURA 2:	Principais causas de morte no Brasil	30
FIGURA 3:	Arquitetura de uma artéria saudável	32
FIGURA 4:	Primeiros estágios na formação do ateroma	33
FIGURA 5:	Migração das células musculares lisas e formação da capa fibrosa	34
FIGURA 6:	Trombose e complicações da aterosclerose	35
FIGURA 7:	Organização estrutural dos receptores nucleares	45
FIGURA 8:	Mecanismos de ação das tiazolidinadionas	47
FIGURA 9:	Efeitos das TZDs sobre a expressão gênica de PPARα e PPARγ1 em macrófagos J774	81
FIGURA 10:	Efeitos das TZDs sobre a expressão gênica de PPARα e PPARγ1 em macrófagos RAW 264.7	82
FIGURA 11:	Efeito das TZDs sobre a ativação de PPAR	83
FIGURA 12:	Efeito das TZDs sobre a ativação de LXRα	84
FIGURA 13:	Efeito das TZDs sobre a indução de morte celular em macrófagos J774	85
FIGURA 14:	Efeito das TZDs sobre a indução de morte celular em macrófagos RAW 264.7	86
FIGURA 15:	Efeito das TZDs sobre a expressão gênica de ABCA1, ABCG1 e CD36 em macrófagos J774	87
FIGURA 16:	Efeito das TZDs sobre a expressão gênica de ABCA1, ABCG1 e CD36 em macrófagos RAW 264.7	88

FIGURA 17: Efeito das TZDs sobre a expressão de CD36 na superfície de macrófagos RAW 264.7 89

FUGURA 18: Efeito das TZDs sobre a expressão de genes pró-inflamatórios (iNOS e COX2) em macrófagos RAW 264.7 90

FIGURA 19: Efeito das TZDs sobre a expressão de genes pró-inflamatórios (VCAM, IL-6 e MCP-1) em macrófagos RAW 264.7 91

FIGURA 20: Efeito das TZDs sobre a concentração de nitritos mensurada no meio de cultivo de macrófagos RAW 264.7 92

FIGURA 21: Efeito do tratamento de camundongos $LDLr^{-/-}$ com novos derivados tiazolidínicos sobre o peso corporal 93

FIGURA 22: Redução das áreas da lesão aterosclerótica em animais hipercolesterolêmicos tratados com as TZDs e IND 95

FIGURA 23: Análise morfométrica da área das lesões ateroscleróticas da aorta ascendente de camundongos $LDLr^{-/-}$ alimentados com dieta hipercolesterolêmica 96

FIGURA 24: Expressão gênica de (PPARγ, CD36 e ABCA1) nas lesões ateroscleróticas de camundongos $LDLr^{-/-}$ alimentados com dieta hipercolesterolêmica 98

FIGURA 25: Expressão gênica de (VCAM, PECAM e MCP-1) nas lesões ateroscleróticas de camundongos $LDLr^{-/-}$ alimentados com dieta hipercolesterolêmica 99

FIGURA 26: Expressão gênica de (IL-6, IL-1α e IL-1β) nas lesões ateroscleróticas de camundongos $LDLr^{-/-}$ alimentados com dieta hipercolesterolêmica 100

FIGURA 27: Análise quantitativa da expressão de ABCA1 em lesões

aterosclerótica da aorta ascendente de camundongos LDLr$^{-/-}$ alimentados com dieta hipercolesterolêmica 101

FIGURA 28 Análise quantitativa da expressão de CD36 em lesões aterosclerótica da aorta ascendente de camundongos LDLr$^{-/-}$ alimentados com dieta hipercolesterolêmica 102

FIGURA 29: Análise quantitativa da expressão de CD40 em lesões aterosclerótica da aorta ascendente de camundongos LDLr$^{-/-}$ alimentados com dieta hipercolesterolêmica 103

FIGURA 30: Análise quantitativa da expressão de CD40L em lesões aterosclerótica da aorta ascendente de camundongos LDLr$^{-/-}$ alimentados com dieta hipercolesterolêmica 104

FIGURA 31: Análise quantitativa da expressão de VCAM em lesões aterosclerótica da aorta ascendente de camundongos LDLr$^{-/-}$ alimentados com dieta hipercolesterolêmica 105

FIGURA 32: Efeito das TZDs sobre o efluxo de colesterol, mediado pela apo A-1 em macrófagos J774 106

FIGURA 33: Efeito das TZDs sobre o efluxo de colesterol, mediado pela HDL_2 em macrófagos J774 107

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Sequências de primers 67

TABELA 2: Viabilidade celular dos macrófagos J774 tratados com os novos derivados tiazolidínicos 79

TABELA 3: Viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7 tratados com os novos derivados tiazolidínicos 80

TABELA 4: Concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total (CT), HDL colesterol (HDL-C), triglicerídeos (TG), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em camundongos $LDLr^{-/-}$ alimentados com dieta hipercolesterolêmica e tratados com as TZDs e IND 94

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA1	Transportador ABC de classe A1
ABCG1	Transportador ABC de classe G1
ALT	Alanina aminotransferase
AP-1	Proteína ativadora 1
Apo A I	Apolipoproteína A I
Apo A II	Apolipoproteína A II
Apo B	Apolipoproteína B
Apo C III	Apolipoproteína C III
Apo E	Apolipoproteína E
AST	Aspartato aminotransferase
ATCC	American Type Culture Collection
CD36	Receptor *scavenger* para LDL oxidade
cDNA	Ácido desoxirribonucleotídeo complementar
CETP	Proteína de transferência de éster de colesterol
CK	Creatina fosfoquinase
CLA-1/SRB	Receptor *scavenger* de classe B
CMC-NA	Carboximetilcelulose
COX2	Cicloxigenase 2
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DCV	Doença cardiovascular
DMSO	Dimetilsulfoxido
FATP	Proteína de transporte de ácido graxos
FDA	Food and Drug Administration

FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA redutase	Coenzima A 3-hidroxi-3-metilglutaril redutase
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
ICAM	Molécula de adesão celular intracelular
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
IL-1α	Interleucina 1 alfa
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
INF-γ	Interferon gama
LBD	Domínio de ligação ao ligante
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LP(a)	Lipoproteína A
LPL	Lipoproteína lipase
LPS	Lipopolissacarídeo
LXR	Receptor X hepático
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos 1
MMP9	Metaloproteinase de matriz 9
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio
NF-κB	Fator de transcrição nuclear κ B
NPC1L1	Proteína Niemann-Pick C1-Like 1
NO	Óxido Nítrico

PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia polimerase
PECAM	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária
PPARα	Receptor ativado por proliferador de peroxissomos alfa
PPARβ/δ	Receptor ativado por proliferador de peroxissomos beta/delta
PPARγ	Receptor ativado por proliferador de peroxissomos gama
RNAm	Ácido ribonucleotídeo mensageiro
RSG	Rosiglitazona
RXR	Receptor X retinóide
SRA	Receptor scavenger A
STAT	Proteína de transcrição de ativadores e transdutores de sinal
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TZD	Tiazolidinadionas
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1. Introdução 27

1.1. Aterosclerose 31

1.2. Fatores de Risco 36

1.3. Tratamento 38

1.4. Tiazolidinadionas 43

2. Objetivos 55

2.1. Objetivo Geral 57

2.2. Objetivos Específicos 57

3. Animais, materiais e métodos 59

3.1. Animais 61

3.2. Materiais 61

3.2.1. Linhagens celulares 61

3.2.2. Dieta Hipercolesterolêmica 62

3.2.3. Tiazolidina-2,4-dionas 62

3.3. Metodologias 64

3.3.1. Ensaios *in vitro* em linhagens celulares de macrófagos 64

3.3.1.1. Ensaio de viabilidade celular 64

3.3.1.2. Ensaio de morte celular 65

3.3.1.3. Expressão gênica de fatores de transcrição e fatores envolvidos no metabolismo de lipídeos 66

3.3.1.4. Expressão do receptor *scavenger* CD36 na superfície dos macrófagos 67

3.3.1.5. Expressão gênica de fatores inflamatórios 68

3.3.1.6. Determinação de nitritos 69

3.3.1.7. Efluxo de colesterol mediado por apo A-1 e HDL_2 69

3.3.2. Ensaios *in vitro* utilizando células embrionárias humanas (HEK 93) 70

3.3.2.1. Ensaios de ativação das isoformas α, β/δ e γ de PPAR, e de LXRα, utilizando luciferase como gene repórter 70

3.3.3. Ensaios *in vivo* utilizando camundongos com deleção genética para o receptor de LDL ($LDLr^{-/-}$) em modelo de aterosclerose avançada 71

3.3.3.1. Protocolo experimental 71

3.3.3.2. Determinação do ganho de peso, do perfil lipídico e das aminotransferases 72

3.3.3.3. Avaliação morfométrica das lesões ateroscleróticas 73

3.3.3.4. Análise imunohistoquímica 74

3.3.3.5. Expressão de genes aterogênicos e inflamatórios 74

3.3.3. Análise estatística 75

4. Resultados 77

5. Discussão 109

6. Conclusões 121

7. Referências bibliográficas 125

Anexo A 149

Anexo B 153

Anexo C 157

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) representam a principal causa de morbidade e morte prematura em todo o mundo e contribuem substancialmente para o alto gasto com assistência médica e cuidados com a saúde. Das cerca de 58 milhões de mortes a nível mundial em 2005, 30% foram causadas por DCVs (FIGURA 1), sendo importante reconhecer que uma proporção substancial destas mortes (46%) foram de pessoas com menos de 70 anos de idade, no período mais produtivo da vida. Além disso, a Organização Mundial de Saúde (WHO) estima que entre 2006 e 2015, as mortes por doenças não transmissíveis possam aumentar em 17%, enquanto as mortes por doenças infecciosas, deficiências nutricionais e condições maternas e perinatais combinadas diminuam em 3% (WHO, 2007).

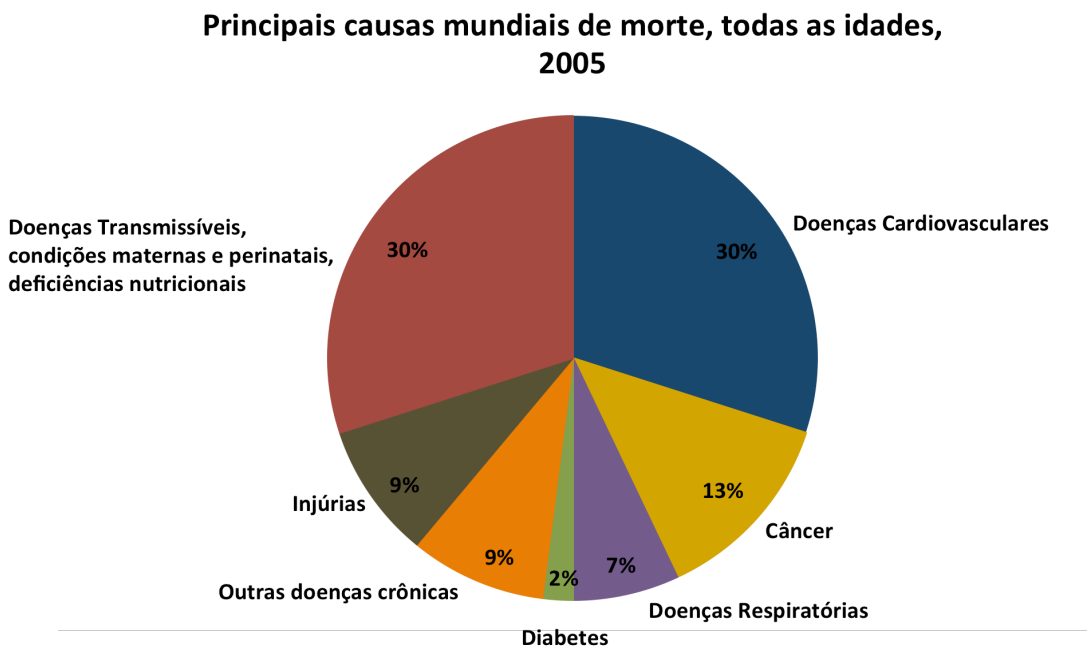

FIGURA 1: Representação das principais causas mundiais de mortalidade proporcional, em todas as idades, 2005. (Adaptado de WHO, 2005)

Anteriormente considerado um problema apenas em países desenvolvidos, o impacto das doenças crônicas está crescendo continuamente, em países de baixa e média renda, e vem gerando grandes efeitos adversos na qualidade de vida dos indivíduos afetados, além de impactos econômicos negativos para as famílias, comunidades e sociedade em geral. Cerca de 80% das mortes por doenças crônicas como DCVs, diabetes, câncer e doenças respiratórias já ocorrem nesses países (WHO, 2007). No Brasil, as doenças do sistema circulatório já respondem por 31,8% das causas de morte no país (FIGURA 2) (DATASUS, 2011).

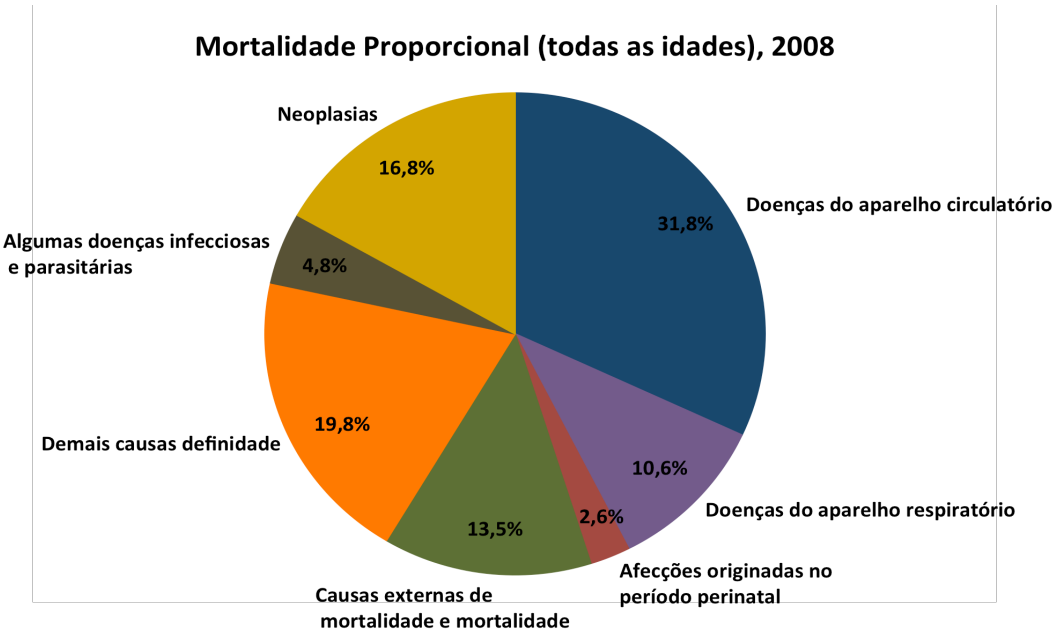

FIGURA 2: Principais causas de morte no Brasil, em todas as idades, 2008.
(Adaptado de DATASUS, 2011)

A etiologia primária das DCVs é a aterosclerose, uma doença de grandes e médias artérias caracterizada pela formação de placas ateroscleróticas compostas por um centro necrótico, regiões calcificadas, acúmulo de lipídeos modificados, células musculares lisas inflamadas, células endoteliais, leucócitos e células espumosas (ROSS,

1999). Estas características demonstram a complexidade da doença aterosclerótica, na qual componentes vasculares, metabólicos e imunológicos estão envolvidos.

1.1. Aterogênese

O termo arteriosclerose, referente ao enrijecimento das artérias, foi primeiramente introduzido por Jean Lobstein em 1829. Poucos anos depois, alterações imunológicas celulares dentro das artérias foram descritas por duas escolas de patologia: em uma delas, Rudolf Virchow postulou que a inflamação tinha um papel primário no processo aterosclerótico; em contraste, Carl Von Rokitansky sugeriu que a disfunção endotelial e inflamação seriam secundárias à injúria inicial na parede vascular, devida a processos mecânicos e toxinas (MAYERL et al., 2006). Apesar destes estudos, apenas na década de 1970, após um século, o modelo de resposta à injúria foi descrito (ROSS, GLOMSET e HARKER, 1977). Atualmente, um grande número de estudos tem enfatizado o papel chave da inflamação no início e progressão da aterosclerose, sendo esta descrita como uma doença inflamatória crônica que produz placas arteriais caracterizadas por infiltrado inflamatório, acúmulo de lipídeos, morte celular e fibrose (ANDERSSON, LIBBY e HANSSON, 2010).

A artéria saudável apresenta três camadas distintas morfologicamente. A camada mais interna, chamada de íntima, está alinhada a uma monocamada de células endoteliais em seu lado luminal, e a uma camada de fibras elásticas em seu lado mais periférico. A íntima normal é muito fina, e consiste de uma matriz extracelular, composta por proteoglicanos e colágeno, sendo a região onde as lesões ateroscleróticas se formam. A camada média, contem células musculares lisas embebidas em uma complexa matriz extracelular, rica em elastina e colágeno. E, a camada mais externa

chamada de adventícia, é composta por mastócitos, terminações nervosas e microvasos (FIGURA 3) (LIBBY, RIDKER e HANSSON, 2011).

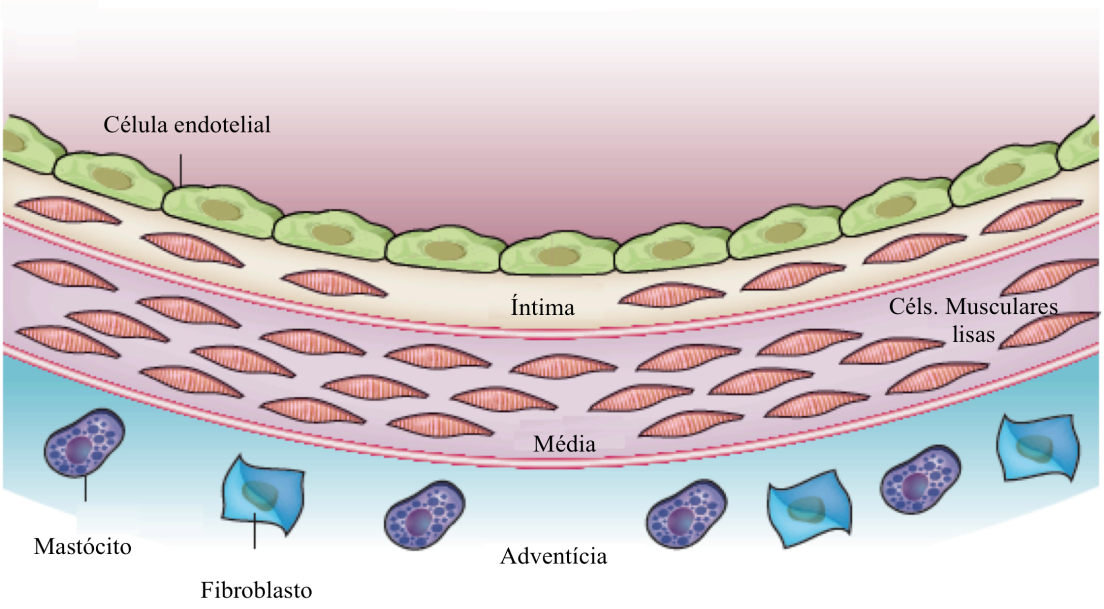

FIGURA 3: Arquitetura de uma artéria saudável (Adaptado de LIBBY, RIDKER e HANSSON, 2011).

As células endoteliais arteriais normalmente resistem à fixação dos glóbulos brancos do sangue, porém quando sujeitas a estímulos irritantes como dislipidemias, hipertensão e mediadores pró-inflamatórios, elas expressam moléculas de adesão que captam os leucócitos em sua superfície. Paralelamente, mudanças na permeabilidade endotelial e na composição da matriz extracelular promovem a entrada e retenção de lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) ricas em colesterol na parede arterial (TABAS, WILLIAMS e BOREN, 2007). Mediadores químicos, como as partículas quimiotáticas de monócitos (MCP-1), também são estimulados, direcionando a migração dos leucócitos ligados ao endotélio para a íntima arterial. Uma vez residente neste sítio, os monócitos se diferenciam em macrófagos teciduais, internalizam as partículas de LDL

modificadas, acumulando o colesterol como gotículas citoplasmáticas e se tornam células espumosas, termo que reflete a aparência microscópica destes macrófagos repletos de lipídeos (FIGURA 4) (LIBBY, RIDKER e HANSSON, 2011).

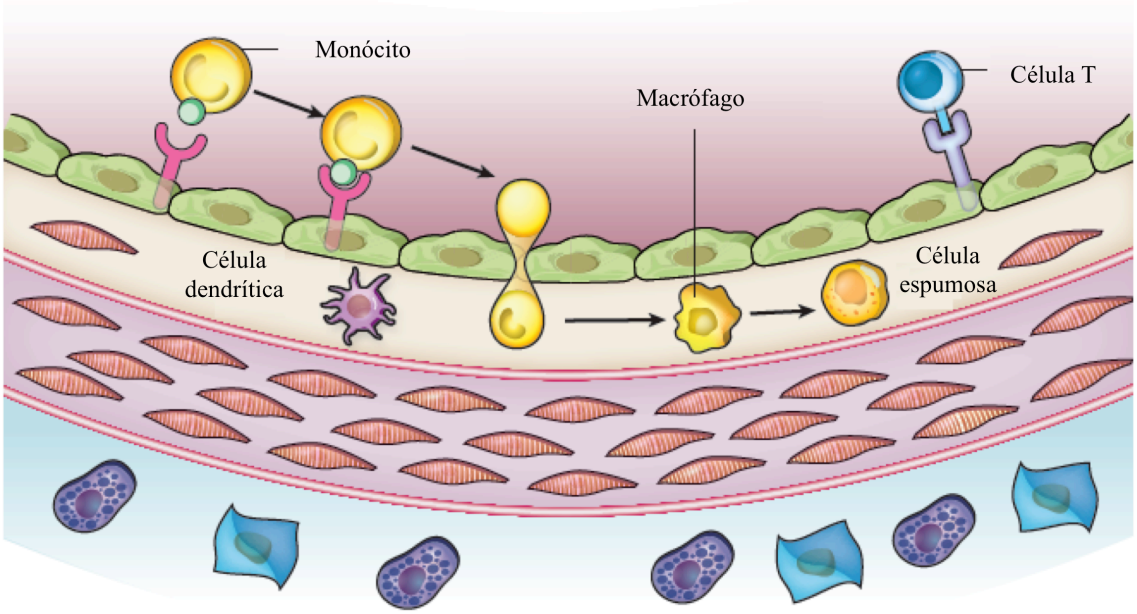

FIGURA 4: Primeiros estágios na formação dO ateroma, a partir da entrada de leucócitos para a íntima arterial, captação de partículas de LDL modificadas e formação da célula espumosa (Adaptado de LIBBY, RIDKER e HANSSON, 2011)

Estas células espumosas apresentam um perfil pró-inflamatório, com produção de fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-6, IL-12, TNFα, INFγ) e espécies reativas de oxigênio. Alguns fagócitos mononucleares também têm as características, e provavelmente a função apresentadora de antígenos, das células dendríticas. Outras classes de leucócitos, como linfócitos e mastócitos, embora em menor número do que os macrófagos, também se acumulam no ateroma nascente e possuem importantes funções reguladoras nas placas (GALKINA e LEY, 2009).

Durante esse processo, células musculares lisas migram da camada média para a íntima e proliferam em resposta a mediadores como os fatores de crescimento derivados das plaquetas. Na íntima essas células produzem moléculas de matriz extracelular,

incluindo colágeno intersticial e elastina, e formam uma capa fibrosa que cobre a placa (FIGURA 5). Esta capa recobre uma coleção de células espumosas, algumas das quais morrem e liberam seu conteúdo lipídico, que se acumula extracelularmente. A remoção ineficaz das células mortas, um processo conhecido como eferocitose, pode promover o acúmulo de restos celulares e lipídeos extracelulares, formando um centro rico em lipídeos chamado core necrótico da placa (FIGURA 6) (TABAS, 2010).

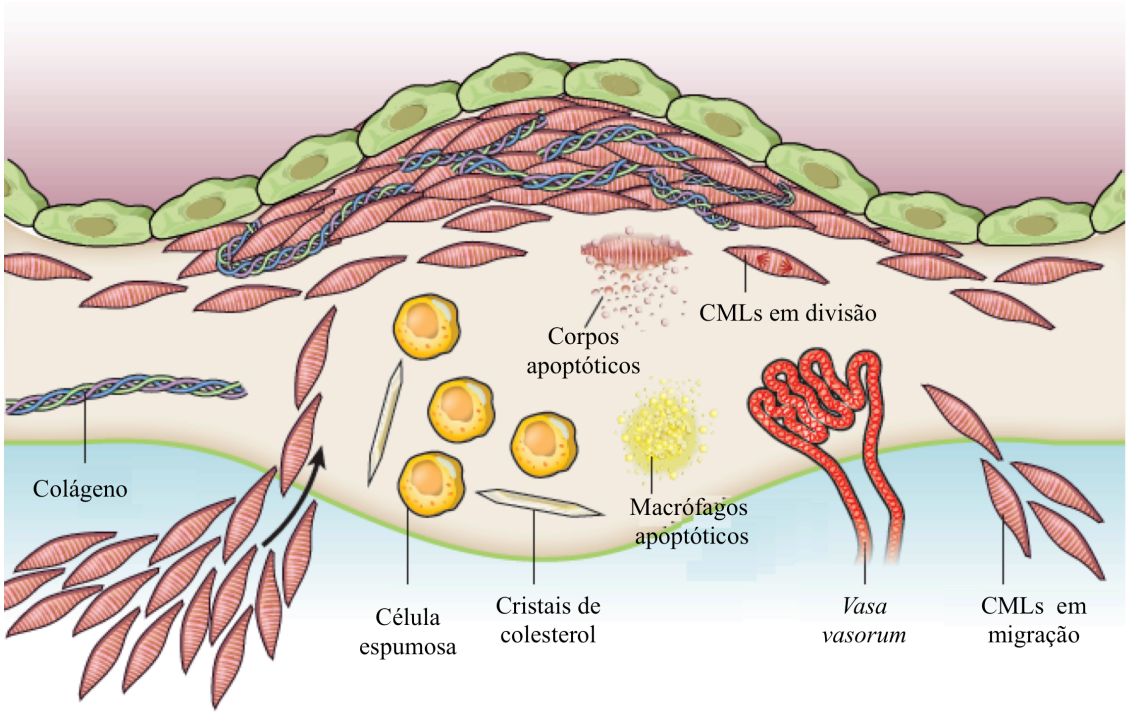

FIGURA 5: Migração das células musculares lisas e formação da capa fibrosa (Adaptado de LIBBY, RIDKER e HANSSON, 2011).

Este cenário inflamatório estimula a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), enzimas que degradam colágeno, e também gera mediadores que promovem a morte das células musculares lisas, as quais são a fonte de colágeno. Isto torna a capa fibrosa mais fina, pobre em colágeno, composta por poucas células musculares lisas e

abundantes macrófagos, e dessa forma, mais suscetível à ruptura. Consequentemente, quando há uma fratura da capa fibrosa, o material pro-coagulante no centro da placa é exposto às proteínas de coagulação no sangue, resultando em trombose (FIGURA 6). Portanto, as placas ateromatosas causam manifestações clínicas quando esses trombos interrompem o fluxo localizado, ou embolizam e alojam-se nas artérias distais, e também quando produzem estenoses que limitam o fluxo sanguíneo levando a uma isquemia tecidual (LIBBY, 2009).

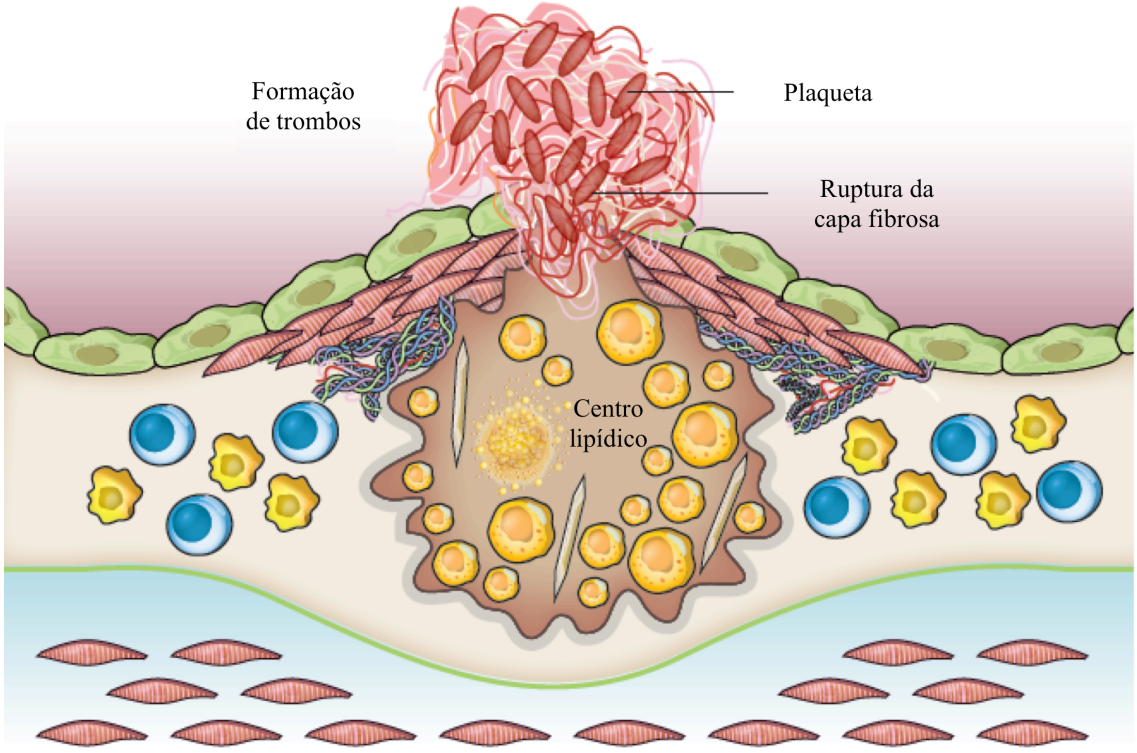

FIGURA 6: Trombose e complicações da aterosclerose (Adaptado de LIBBY, RIDKER e HANSSON, 2011).

A hipótese de resposta à injúria proposta por Russel Ross (1977) introduziu o conceito de que o gatilho para a formação da lesão aterosclerótica seria a origem das

células espumosas através das interações entre células endoteliais e monócitos, e a proliferação das células musculares lisas induzidas por fatores de crescimento. Esse conceito foi aperfeiçoado pela descoberta do papel dos macrófagos, neutrófilos, células T e células dendríticas, assim como a identificação de moléculas sinalizadoras como as citocinas quimiotáticas, reguladoras do recrutamento e homeostasia das células inflamatórias. Juntos esses achados oferecem um número abundante de alvos específicos que são de grande valor para o aperfeiçoamento das técnicas diagnósticas e desenvolvimento de novos fármacos (WEBER e NOELS, 2011).

1.2. Fatores de risco

A prevenção e o tratamento da doença aterosclerótica consistem em reduzir a incidência dos fatores de risco, os quais são comumente classificados em função de sua natureza. Os biológicos são aqueles referentes às características próprias de cada indivíduo como, por exemplo, idade, sexo, história familiar, concentrações plasmáticas das lipoproteínas, diabetes e pressão arterial. E, os de natureza comportamental são aqueles relacionados ao estilo de vida, como sedentarismo, dieta alimentar, tabagismo e consumo de álcool. Alguns destes fatores são inevitáveis e imutáveis, porém outros podem ser controlados e modificados, em especial os comportamentais (GUERRA et al., 2003).

Apesar de um único fator de risco ser capaz de contribuir para o desenvolvimento das DCVs, eles tendem a agregar-se, multiplicando o risco de desenvolvimento de doenças. Um exemplo é a síndrome metabólica, que segundo a I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento para Síndrome Metabólica (2005), é uma designação atribuída a associação de fatores de risco para doenças

cardiovasculares, vasculares periféricas e diabetes mellitus tipo 2, e se caracteriza pela combinação de obesidade abdominal, hipertrigliceridemia, dislipidemia, hipertensão arterial e hiperinsulinemia.

O próprio diabetes mellitus tipo 2 representa um preditor independente de alto risco para doença aterosclerótica e suas consequências clínicas. Ele caracteriza-se por altas concentrações plasmáticas de triglicerídeos, baixas de HDL colesterol, e elevações moderadas de colesterol total e LDL colesterol. Em pacientes diabéticos, o controle da glicemia tem uma importante influência sobre a prevenção das DCVs, apesar de em muitos casos o tratamento para dislipidemias ainda se fazer necessário (MANOMI, GENOVESE e MANNUCCI, 2013).

Portanto, a obesidade e as dislipidemias, com elevadas concentrações plasmáticas de colesterol total e concentrações reduzidas de HDL colesterol, ainda são os principais fatores de risco para as condições associadas à aterosclerose (ARSENAULT, BOEKHOLDT e KASTELEIN, 2011). Os investigadores do Estudo Framingham foram os primeiros a mostrar que o risco de DCVs aumenta em função da quantidade de colesterol transportado pelas frações de lipoproteínas como a LDL, sendo inversamente associado com a concentração de colesterol transportada pela HDL, que é a fração de lipoproteína anti-aterogênica (CASTELLI, 1988). Este achado é similar em ambos os sexos, grupos etários e etnias. Por isso, a maioria dos algoritmos que avaliam o risco cardiovascular na prática clínica utiliza as concentrações de colesterol total, LDL colesterol e HDL colesterol como parâmetros bioquímicos (CONROY et al., 2003).

1.3. TRATAMENTO

As estratégias para tratamento da doença aterosclerótica envolvem duas abordagens distintas. A primeira é feita através de medidas não-farmacológicas que consistem em mudanças comportamentais como aumento da atividade física e modificações alimentares. Essa terapia nutricional deve contemplar questões culturais, regionais, sociais e econômicas, devendo ser agradável ao paladar e visivelmente atraente. E, o paciente também deve receber orientações relacionadas à seleção, quantidade, técnicas de preparo e substituição dos alimentos (KRIS-ETHERTON et al., 2002).

De acordo com a IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2007), as recomendações nutricionais sugerem um consumo diário de 50-60% de carboidratos, 25-35% de gordura total e, aproximadamente, 15% de proteínas. Do consumo diário de gordura, deve-se ingerir até 7% de ácidos graxos saturados, até 10% de ácidos graxos poliinsaturados e até 20% de ácidos graxos monoinsaturados. Além disso, é recomendado consumir diariamente menos de 200 mg de colesterol e 20-30 g de fibras.

A segunda abordagem é feita através da intervenção terapêutica, a qual deve sempre acontecer com base em uma avaliação de risco para DCVs, sendo necessário realizar um histórico detalhado, exame clínico e testes laboratoriais para descobrir o tipo de dislipidemia presente (BHATNAGAR, SORAN e DURRINGTON, 2008). Pacientes que apresentam um risco cardiovascular baixo a intermediário são primeiramente encaminhados para o tratamento não-farmacológico, e caso não alcancem as metas, são direcionados à intervenção terapêutica. Por outro lado, os indivíduos que apresentam

um alto risco devem iniciar as medidas não-farmacológicas e a terapia com hipolipemiantes simultaneamente.

Os sequestrantes de ácidos biliares ou resinas estão em uso clínico a mais de três décadas, e são os mais seguros por não serem absorvidos pelo intestino, sendo por isso os únicos permitidos na infância e durante a gravidez. Estes fármacos são moléculas carregadas positivamente que se ligam aos ácidos biliares carregados negativamente e, devido a formação de um complexo de tamanho grande, não são absorvidos no intestino, sendo excretados nas fezes ligados aos ácidos biliares. Desde que 95% dos ácidos biliares são normalmente reabsorvidos, a interrupção deste processo depleta o pool de ácidos biliares, e aumenta a síntese hepática de ácidos biliares através de colesterol. Como resultado, o conteúdo de colesterol hepático diminui, estimulando a produção de receptores de LDL, o que eleva a remoção das partículas de LDL colesterol da circulação e diminui suas concentrações plasmáticas. Mas este efeito é parcialmente compensado pelo aumento da síntese hepática de colesterol causado pelo estímulo da coenzima A 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG-CoA) redutase, portanto a inibição da atividade desta coenzima por um fármaco específico aumenta substancialmente a eficácia das resinas. Adicionalmente, a produção elevada de ácidos biliares é acompanhada por um aumento na síntese hepática de triglicerídeos, aumentando as concentrações plasmáticas deste lipídeo. Consequentemente, a hipertrigliceridemia severa é uma contra-indicação ao uso desses fármacos (INSULL, 2006).

As estatinas, comercializadas a partir da década de 1980, são os agentes mais efetivos e melhor tolerados para o tratamento das dislipidemias. Múltiplas triagens clínicas têm documentado a eficácia e segurança das estatinas em reduzir eventos cardiovasculares fatais e não fatais, acidente vascular cerebral e a mortalidade total (RIDKER, 2009). Estes fármacos são inibidores competitivos da HMG-CoA redutase,

que cataliza um passo limitante na biossíntese de colesterol, resultando na inibição da síntese hepática de colesterol e redução do seu conteúde intracelular. Como consequência, há aumento do número de receptores de LDL na superfície do hepatócito resultando em maior remoção das partículas de VLDL, IDL e LDL colesterol da circulação para repor o colesterol intracelular. Além da maior expressão dos receptores de LDL, também há menor degradação dos receptores já existentes (ENDO, 2010). Em adição, as estatinas também apresentam efeitos pleitrópicos sobre a funçao vascular como a melhora da função endotelial, redução da ativação e proliferação de macrófagos, ação antioxidante, antiinflamatória e antiangiogênica (RIDKER, 2009). Apesar de serem muito raros, os efeitos adversos mais observados são hepatite, miosite e rabdomiólise. Por isso, recomenda-se a dosagem das concentraçõse basais de creatinofosfoquinase (CK) e das transaminases hepáticas (AST e ALT) para a identificação de possíveis efeitos adversos, devendo ser repetida a cada reavaliação ou a cada aumento de dose (BHATNAGAR, SORAN e DURRINGTON, 2008).

A ezetemiba foi o primeiro fármaco a inibir a absorção de colesterol pelos enterócitos no intestino delgado, sem afetar a absorção de outros nutrientes. Ela diminui as concentrações plasmáticas de colesterol total e LDL colesterol, por inibir a NPC1L1, proteína que faz o transporte facilitado de colesterol da luz intestinal para o enterócito, como consequência há redução da incorporação de colesterol dentro dos quilimícrons, diminuindo a disponibilização de colesterol ao fígado pelos remanescentes de quilomícrons. Essa disponibilidade reduzida estimula a expressão de genes hepáticos reguladores da expressão dos receptores de LDL e da biossíntese de colesterol. A maior expressão de receptor de LDL eleva a remoção de colesterol do plasma, reduzindo as concentrações plasmáticas de LDL colesterol. Tem sido mais frequentemente empregada em associação com as estatinas, em função da potenciação da redução do

colesterol intracelular (redução da síntese hepática pela estatina e da absorção intestinal pela ezetimiba). Raros efeitos adversos têm sido apontados, porém por precaução recomenda-se que ela não seja utilizada em casos de doença hepática aguda (DAVIS JR, LOWE e NEFF, 2011).

A niacina, um dos fármacos mais antigos para tratar as dislipidemias, em especial hipertrigliceridemia, afeta favoravelmente todos os parâmetros lipídicos. É uma vitamina do complexo B hidrossolúvel que aumenta as concentrações de HDL colesterol, diminui as concentrações de triglicerídeos e LDL colesterol, sendo também o único fármaco hipolipemiante que diminui significantemente as concentrações de Lp(a). No fígado, niacina diminui a síntese de triglicerídeos por inibir a síntese e esterificação de ácidos graxos, efeito que aumenta a degradação de apo B. A redução da síntese de triglicerídeos reduz a produção de VLDL hepática, diminuindo as concentrações plasmáticas de LDL. Como as concentrações de VLDL e LDL estão reduzidas, há uma diminuição na troca de triglicerídeos destas partículas pelos ésteres de colesterol das partículas de HDL colesterol, elevando as concentrações plasmáticas destas últimas (RUBIC et al., 2004). Efeitos cutâneos como rubor e prurido na face e tronco limitam a adesão dos pacientes. Hepatotoxidade, manifestada pela elevação da atividade das aminotransferases hepáticas, assim como hiperglicemia, também são efeitos adversos observados e, devido a isso, seu uso em pacientes diabéticos deve ser cauteloso com o monitoramento semanal das concentrações plasmáticas de glicose (LUKASOVA et al., 2011).

Os fibratos são agonistas de receptor alfa ativado de proliferação de peroxissomos (PPARα), o qual é expresso primariamente no fígado e tecido adiposo, e em menor proporção no rim, coração e músculo esquelético. Estes fármacos reduzem os triglicerídeos por estímulo da oxidação dos ácidos graxos, aumentam a síntese de LPL,

e reduzem expressão de ApoC III. Os fibratos também aumentam as concentrações de HDL por estimular expressão de ApoA I e ApoA II (RADER, 2003). Eles são compostos usualmente bem tolerados, porém efeitos adversos gastrintestinais, erupções cutâneas, perda de cabelo, mialgias, fadiga, dor de cabeça, impotência, anemia, e pequenas elevações nas aminotransferases hepáticas e fosfatase alcalina ocorrem em aproximadamente 5% dos pacientes (PRUEKSARITANONT et al., 2002). Os fibratos são os fármacos de escolha para o tratamento de indivíduos dislipidêmicos com hiperlipoproteinemia tipo III, incluindo aqueles com severa hipertrigliceridemia que estão sob risco de pancreatite, além de serem usados em pacientes com níveis altos de triglicerídeos e baixos de HDL colesterol portadores de síndrome metabólica ou diabetes tipo 2 (ROBINS, 2001).

Os inibidores da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP) agem por ligação a esta glicoproteína plasmática sintetizada pelo fígado, bloqueando a troca de éster de colesterol das partículas de HDL por triglicerídeos de lipoproteínas ricas nestas partículas. Dessa forma, há a formação de uma HDL rica em ésteres de colesterol, que os transferirá para o fígado onde serão excretados junto à bile e fezes. Em modelos animais, a inibição da CETP resulta em maiores concentrações de HDL, menores concentrações de LDL e resistência ao desenvolvimento de aterosclerose. O torcetrapib foi o primeiro inibidor de CETP avaliado em triagens clínicas com pacientes cujas concentrações plasmáticas de HDL eram menores que 40mg/dL, e em todos os grupos avaliados houve aumento das concentrações de HDL. Porém os estudos com torcetrapib foram interrompidos devido ao aumento na mortalidade e elevação da pressão sistólica (BARTER e KASTELEIN, 2006). Atualmente, estudos clínicos estão sendo realizados com o dalcetrapib, um outro inibidor de CETP, que tem elevado as concentrações plasmáticas de HDL colesterol quando administrado sozinho ou em

combinação com uma estatina, sem apresentar efeito sobre a pressão sanguínea ou expressão de genes envolvidos no sistema renina-angiotensina-aldosterona. Porém, a triagem clínica OUTCOMES não tem demonstrado benefícios clínicos significativos (HOOPER e BURNETT, 2012).

Portanto, como muitos marcadores de risco para DCVs como dislipidemias, hipertensão, obesidade central e fatores inflamatórios, coexistem com a resistência a insulina e subsequente hiperglicemia, tem havido uma maior atenção e interesse por terapias antidiabéticas, que além de suas propriedades sensibilizadoras de insulina, também apresentem efeitos cardiovasculares benéficos (CERIELLO, 2008). Neste contexto, fármacos antidiabéticos como as tiazolidinadionas (TZDs) representam uma promessa, pois reduzem as concentrações plasmáticas de glicose e apresentam efeitos sobre a aterosclerose e a inflamação em modelos experimentais e em humanos (BROWN e PLUTZKY, 2007).

1.4. Tiazolidinadionas

As TZDs, também chamadas de glitazonas, constituem uma classe de fármacos amplamente utilizada no tratamento do diabetes mellitus tipo 2, em monoterapia ou em combinação com outras medicações hipoglicemiantes como sulfonilureias, metformina e insulina (LALLOYER e STAELS, 2010). Em modelos experimentais e triagens clínicas, elas diminuem as concentrações plasmáticas de glicose tão bem quanto as de insulina, além de aumentarem a responsividade à ação da insulina no músculo esquelético e no fígado (WANG, 2010).

No início dos anos 80, as TZDs foram desenvolvidas a partir de análogos do ácido clofíbrico como antioxidantes no Japão, sem haver conhecimentos prévios de

quais seriam os seus alvos terapêuticos (KAWAMATSU et al., 1980). Inicialmente, Sohda e colaboradores (1982) observaram propriedades hipoglicemiantes, sendo ciglitazona a mais ativa da série, abandonada posteriormente devido à hepatoxicidade (GALE, 2001). Em 1997, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou a troglitazona (Rezulin®) como a primeira TZD em uso clínico nos Estados Unidos e Japão. No entanto, este medicamento foi retirado do mercado devido à ocorrência de necrose hepática maciça seguida de morte em alguns pacientes, o que motivou os pesquisadores a desenvolverem novas glitazonas. Dessa forma, em 1999 a FDA aprovou dois novos fármacos desta classe: o maleato de rosiglitazona (Avandia®) e o hidrocloreto de pioglitazona (Actos®) (LALLOYER e STAELS, 2010). Em 2010, a rosiglitazona também foi retirada do mercado devido à alta probabilidade de ocorrência de doenças isquêmicas (NISSEN e WOLSKI, 2007; 2010; GRAHAN et al., 2010), e em 2011, a pioglitazona teve sua comercialização descontinuada na França devido ao aumento no risco de câncer de bexiga (LEWIS et al., 2011).

As TZDs são agonistas sintéticos do receptor gama ativado de proliferação de peroxissomos (PPARγ). Os PPARs constituem uma superfamília de receptores nucleares composta ainda pelos PPARα e PPARβ/δ, e são fatores de transcrição ativados por agonistas. Estes receptores formam heterodímeros com os receptores X retinóides (RXR), os quais se ligam a sítios específicos localizados na região promotora do gene alvo, compostos por repetidas sequências hexaméricas separadas por um par de bases. Essa ligação desencadeia uma mudança conformacional que resulta em liberação de co-repressores, recrutamento de co-ativadores e subsequente expressão do gene alvo (BESINGER e TONTONOZ, 2008). Como receptores nucleares, os PPARs apresentam um domínio organizacional típico, contendo um domínio amino terminal, um domínio de ligação ao DNA (DBD), um domínio carboxi terminal de ligação ao ligante (LBD)

que abriga a função de ativação dependente de agonista, e uma pequena região em dobradiça que liga os domínios DBD e LBD, chamada de região hinge (FIGURA 7). Diferentes de outros receptores nucleares, a região de ligação ao ligante do PPAR é grande e pode acomodar uma variedade de lipídeos endógenos, incluindo eicosanóides, derivados do ácido linoleico, ácidos graxos oxidados e nitrados, os quais precisam estar presentes em altas concentrações para ativar os PPARs (WANG, 2010).

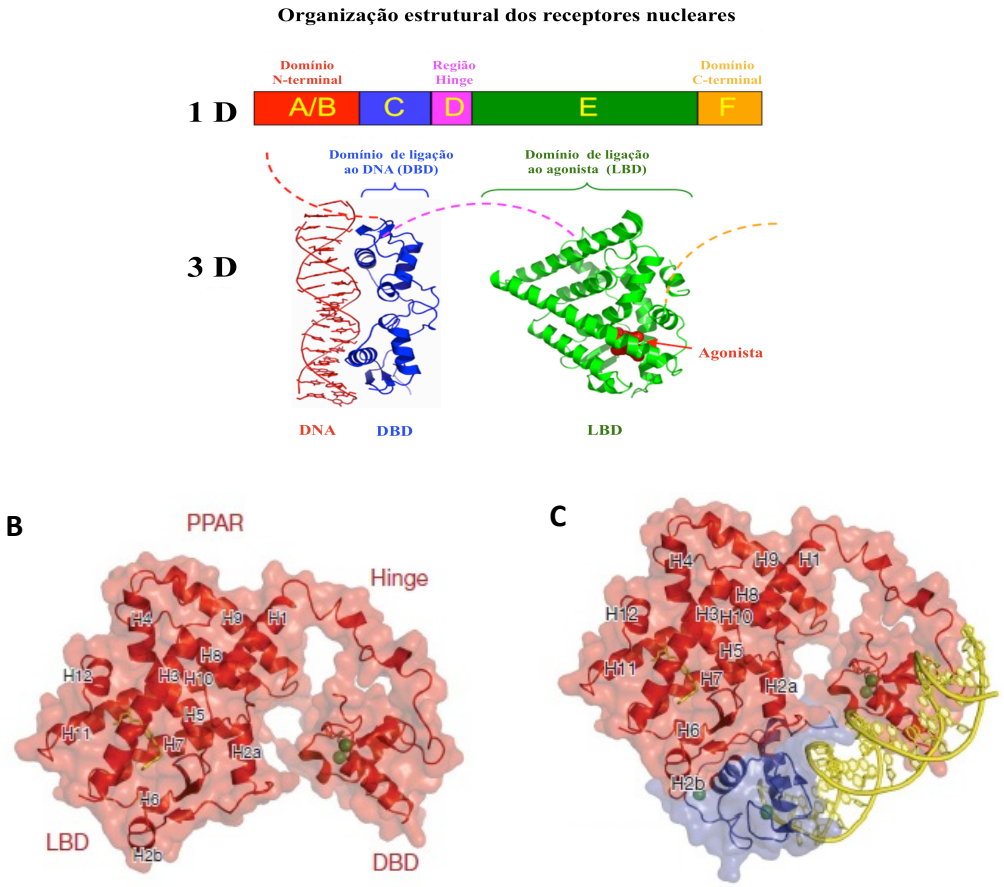

FIGURA 7: Organização estrutural dos receptores nucleares. A: Esquema em 1D da sequência de aminoácidos de um receptor nuclear (no topo). Abaixo, o esquema em 3D das regiões DBD e LBD dos receptores nucleares. B: A região LBD do PPARγ está intimamente voltada para a região DBD. C. A região LBD do PPARγ direciona-se para ambas as regiões PPARγ e RXR, visando melhorar a associação dos dois com o DNA. A região DBD do RXR está em azul. (Adaptado de CHANDRA et al., 2008)

O PPARγ apresenta quatro isoformas distintas: PPARγ1, γ2, γ3 e γ4. Em camundongos, as isoformas 1 e 2 tem sido identificadas, enquanto em humanos e outras espécies, todas as isoformas são detectadas (ZOETE, GROSDIDIER e MICHIELIN, 2007). PPARγ3 e γ4 codificam a mesma proteína que PPARγ1, a qual é expressa em células endoteliais, células musculares lisas vasculares, macrófagos e cardiomiócitos. Por outro lado, PPARγ2 é expresso predominantemente em adipócitos (RANGWALA e LASAR, 2004).

No tecido adiposo, PPARγ possui um papel chave na adipogênese, promovendo a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros, e consequentemente, estimulando o estoque de ácidos graxos através da expressão de genes como lipoproteína lípase (LPL), proteína de transporte de ácidos graxos (FATP), receptor *scavenger* para LDL oxidada (CD36) e acil-coA sintetase, e assim diminuindo a secreção de ácidos graxos livres. Isso melhora a lipotoxidade e a sensibilidade à insulina, pois desloca o estoque celular de lipídeos do fígado e músculo, onde seu acúmulo prejudicaria a sinalização à insulina (FIGURA 8) (SAMUEL et al., 2010). Além disso, PPARγ também modula a produção e secreção de adipocinas que incluem adiponectina, resistina, TNFα, IL-6 e MCP-1, as quais diminuem a inflamação induzida pela obesidade (FIGURA 8) (TONTONOZ e SPIEGELMAN, 2008).

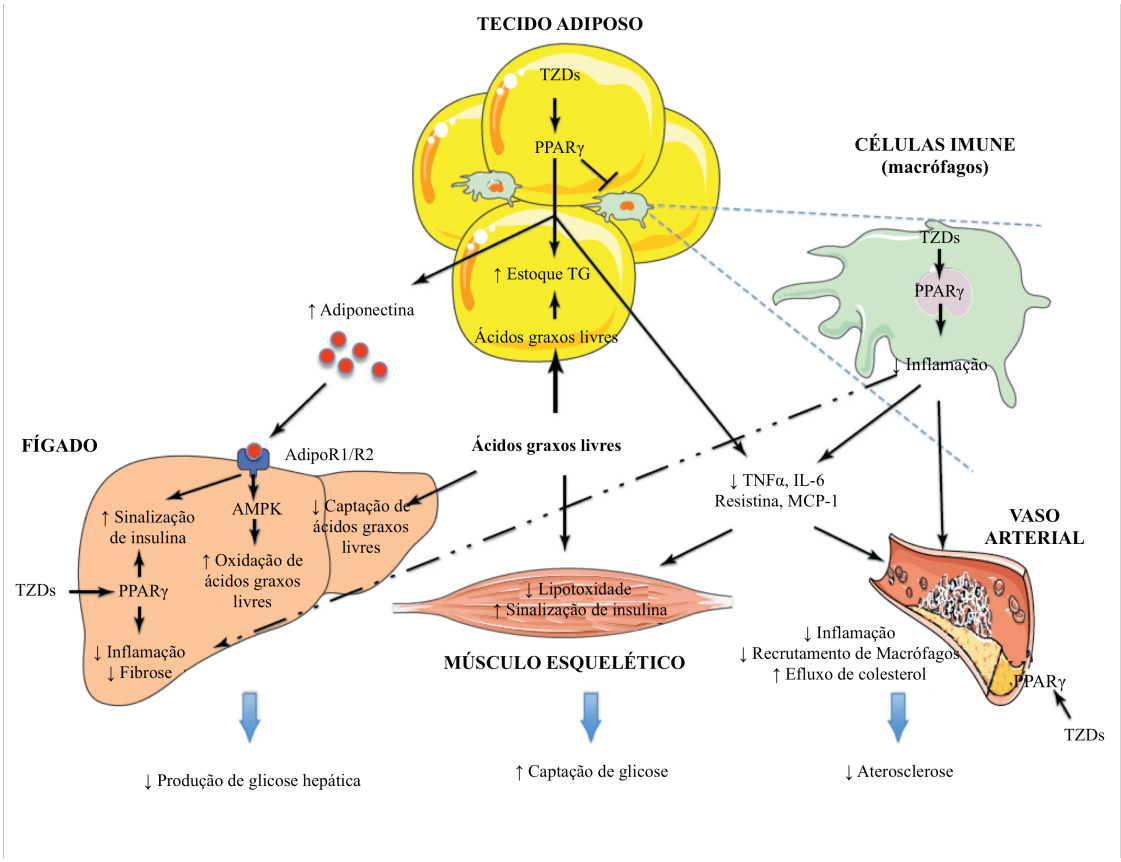

FIGURA 8: Mecanismos de ação das Tiazolidinadionas (TZDs)
(Adaptado de CARIOU, CHARBONNEL e STAELS, 2012)

Apesar da expressão hepática de PPARγ ser pequena, aproximadamente 10 a 30% dos níveis expressos no tecido adiposo, ela pode ter um impacto significante na homeostasia metabólica e na função tecidual. No fígado, as TZDs podem diretamente ativar PPARγ nas células do parênquima hepático e/ou nas células de kupfer, reduzindo a fibrose e a inflamação (FIGURA 8) (CARIOU, CHARBONNEL e STAELS, 2012). Além do fígado, PPARγ também pode ser expresso em vários tipos celulares presentes na parede vascular, exercendo funções cruciais na modulação da inflamação vascular e aterosclerose (GLASS e SAIJO, 2010).

Em células endoteliais tem sido relatado que a ativação de PPARγ inibe a expressão de moléculas de adesão celular, como VCAM-1, ICAM-1, PECAM e a E-selectina (NAWA et al., 2000; JACKSON et al., 1999). Esse efeito ocorre devido à

transrepressão dos fatores de transcrição NF-κB e AP-1, considerados os mais importantes nas vias de sinalização endotelial, promovida pelo PPARγ (WANG et al., 2002). As TZDs também possuem efeitos vasculoprotetores, atenuando o estresse oxidativo e elevando os níveis de óxido nítrico endotelial (·NO) (TAO et al., 2003).

Em células musculares lisas vasculares, a ativação de PPARγ inibe a migração e a proliferação dessas células (LITTLE et al., 2007; DE DIOS et al., 2003), assim como diminuem a expressão gênica de algumas proteínas como a MMP-9, envolvidas na estabilidade da placa aterosclerótica (MARX et al., 1998). Além disto, PPARγ inibe a expressão de VCAM, MCP-1 e fractalcina (CX3CL1) induzida por TNFα, através da inibição de NF-κB (PARK et al., 2006). Estes efeitos podem modular a formação da estria gordurosa e potencialmente atenuar a resposta arterial e a injúria que ocorre após intervenção coronariana (HAMBLIN et al., 2009).

De forma similar às células endoteliais e musculares lisas, a ativação de PPARγ nos macrófagos inibe a expressão dos fatores de transcrição AP-1, STAT e NF-κB (RICOTE et al., 1998), com atenuação da expressão de iNOS e consequente inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1β, TNF-α) (JIANG et al., 1998). Além disso, rosiglitazona mostrou reduzir a migração de monócitos direcionada pela MCP-1 por modulação da expressão de MMP-9 (KINTSCHER et al., 2000). Por outro lado, PPARγ também pode ter efeitos deletérios por aumentar a expressão do receptor *scavenger* CD36, o que promove a formação de células espumosas (NAGY et al., 1998; TONTONOZ et al., 1998). Porém, outros investigadores sugerem que este aumento na expressão de CD36, pode não estar acompanhado pela formação de células espumosas, demonstrando que PPARγ ativaria outras vias que contrabalanceariam este efeito (CHAWNLA et al., 2001; CHINETTI et al., 2001). Algumas hipóteses indicam que os agonistas de PPARγ promovem a regressão das estrias gordurosas por aumentar a

remoção de colesterol dos macrófagos via indução da expressão do receptor de HDL CLA-1/SRB-I (CHINETTI et al., 2000), e dos transportadores ABCA1 e ABCG1 (ARGMANN et al., 2003; AKIYAMA et al., 2002; CHINETTI et al., 2001). Em adição, a ativação de PPARγ leva à diminuição da atividade do receptor *scavenger* de classe A I e II (SRA I/II) o que resulta em redução do acúmulo de ésteres de colesterol intracelular (ARGMANN et al., 2003). Em conjunto, esses dados sugerem efeitos benéficos dos agonistas de PPARγ na formação da estria gordurosa e no desenvolvimento de aterosclerose.

Estudos clínicos têm sido realizados para avaliar os efeitos das TZDs sobre a espessura das placas nas artérias coronárias e demonstram que estes fármacos reduzem a progressão da espessura medial-intimal da artéria carótida após alguns meses de tratamento, em pacientes diabéticos (KOSHIYAMA et al., 2001; CHOI et al., 2004; LANGENFELD et al, 2005; MAZZONE et al., 2006; NISSEN et al., 2008; GERSTEIN et al., 2010). Além disso, outras investigações indicam redução do risco de morte e da incidência de infarto agudo do miocárdio e de acidentes vascular cerebral, após tratamento com este fármaco (LINCOFF et al., 2007; DORMANDY et al., 2005). Em contraste, algumas meta-análises mostraram que a rosiglitazona pode estar associada ao aumento na incidência de infarto agudo do miocárdio (NISSEN e WOLSKI, 2010; 2007).

Esses estudos clínicos também demonstram que as TZDs apresentam efeitos benéficos sobre o controle glicêmico, porém efeitos distintos sobre os parâmetros lipídicos. A rosiglitazona aumenta significativamente os níveis plasmáticos de colesterol total e LDL colesterol, enquanto a pioglitazona tem pouco ou nenhum efeito sobre o perfil lipídico de pacientes diabéticos e não diabéticos (DEEG et al., 2007; GOLDBREG et al., 2005; CHIQUETTE, RAMIREZ e DEFRONZO, 2004). Entretanto,

as duas glitazonas aumentam os níveis plasmáticos de HDL colesterol (SZAPARY et al., 2008; FULLERT et al., 2002).

O efeito dos agonistas de PPARγ na doença vascular também tem sido examinado em modelos experimentais de aterogênese, utilizando camundongos com deleção genética para os genes do receptor de LDL ($LDLr^{-/-}$) e Apolipoproteína E ($ApoE^{-/-}$), os quais caracterizam-se por uma severa elevação dos níveis plasmáticos de LDL colesterol associado ao rápido desenvolvimento de aterosclerose, quando alimentados com uma dieta rica em lipídeos (ZADELAAR et al., 2007). A troglitazona inibiu a progressão da aterosclerose em camundongos $LDLr^{-/-}$ diabéticos e não diabéticos (COLLINS et al., 2001) e também em camundongos $ApoE^{-/-}$ (CHEN et al., 2001). A pioglitazona preveniu o desenvolvimento da aterosclerose em seus estágios intermediários (NAKAYA et al., 2009) e em placas ateroscleróticas avançadas, com redução na expressão de MMPs (HE et al., 2006). E, a rosiglitazona atenuou a aterogênese em modelo experimental que associa diabetes e aterosclerose (LEVI et al., 2003). Em camundongos $LDLr^{-/-}$, a rosiglitazona também inibiu a formação de células espumosas *in vivo* na cavidade peritoneal, reduziu a esterificação de colesterol e induziu a expressão de ABCG1, o que estimulou o efluxo de colesterol dependente de HDL colesterol (LI et al., 2000; 2004). Adicionalmente, Claudel e colaboradores (2001) relataram que a rosiglitazona reduziu a aterosclerose por ativação de LXR em camundongos $ApoE^{-/-}$.

Entretanto, seu uso na prática clínica tem sido desafiado devido ao aparecimento de diversos efeitos colaterais. A primeira adversidade observada com o uso das glitazonas foi a incidência de hepatite fulminante induzida por troglitazona, o que culminou com a sua retirada do mercado farmacêutico (SHIBUYA et al., 1998). Hoje, a rosiglitazona e a pioglitazona apresentam uma menor incidência de hepatoxidade,

porém ainda são necessários cuidados relacionados a sua indução por estes fármacos (PAN et al., 2005).

O efeito colateral mais comumente observado em pacientes diabéticos tratados com as glitazonas é a retenção de fluidos com formação de edema e ganho de peso, resultando em falha cardíaca. Pesquisas indicam que isso pode acontece porque as TZDs induzem expressão de canais de sódio epiteliais, via estímulo da proteína quinase induzível por glicocorticoides, nas células do ducto coletor renal, resultando em reabsorção de sódio com aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação e retenção de fluidos pelo rim (ZHANG et al., 2005; GUAN et al., 2005).

Um aumento no risco de incidência de infarto do miocárdio e mortalidade por DCVs associado ao tratamento com rosiglitazona, observado em uma meta-análise de 56 triagens clínicas padronizadas, contribuiu para a decisão das agências regulatórias em retirá-la do mercado na Europa e em limitar o seu uso nos Estados Unidos (NISSEN e WOLSKI, 2010; 2007). Em contraste, a pioglitazona não tem apresentado estes mesmos efeitos, parecendo reduzir significativamente os eventos cardiovasculares e os óbitos. Os mecanismos responsáveis por essa diferença de ação entre estas duas TZDs podem estar relacionados a uma menor afinidade da pioglitazona pelo PPARγ, ou, a uma afinidade parcial desse fármaco por outras isoformas de receptores PPAR (YKI-JARVINEM, 2004).

Além destes, rosiglitazona e pioglitazona também provocam perda óssea com aumento no risco de fraturas, especialmente em mulheres diabéticas. Essas fraturas estão localizadas nos membros superiores e inferiores, incluindo os pés, e acontecem preferencialmente nas pernas, pés e braços (BETTERIDGE, 2011). A razão pela qual as TZDs produzem este efeito não está clara, mas alguns estudos relatam que PPARγ possui um papel dual no metabolismo ósseo, suprimindo a osteoblastogênese e

promovendo a osteoclastogênese, havendo, portanto, um remodelamento ósseo em favor da perda óssea (WAN, 2010).

Apesar dos dados acumulados sugerirem que os agonistas de PPARγ apresentam um efeito antiproliferativo em uma ampla variedade de cânceres como, por exemplo, cólon, pulmão, ovário, mama, tireoide e próstata, um risco elevado de câncer de bexiga levou à descontinuação da comercialização da pioglitazona na França, baseado em um estudo de vigilância de fármacos (LEWIS et al., 2011). Dados da literatura sugerem que as TZDs podem alterar o crescimento tumoral de maneira dependente e independente de PPARγ por alterar o ciclo celular, provocar apoptose e rediferenciação celular. Porém, até o momento, uma explicação clara para este efeito ainda não existe (HAN e ROMAN, 2007).

Neste cenário, várias TZDs têm sido desenvolvidas e muitas outras se encontram em estágios pré-clínicos e clínicos de desenvolvimento. Todas elas compartilham uma estrutura tiazolidino-2,4-diona substituída, na qual se têm realizado modificações químicas seletivas, na tentativa de melhorar a eficácia farmacológica e minimizar os efeitos colaterais desses fármacos. Dentre os métodos de obtenção de novos fármacos, a modificação ou variação molecular, utilizando principalmente o conceito de bioisosterismo, é um dos mais utilizados (BARREIRO & FRAGA, 2008). Com a aplicação de bioisosterismo pode-se analisar a influência da modificação de um átomo ou de um grupo de átomos por seu bioisóstero sobre a atividade biológica que o fármaco original apresenta, podendo ser de ação idêntica ou mesmo antagônica. Langmuir (1919 *apud* KOROLKOVAS, 1974) definiu os isósteros como sendo átomos ou grupos de átomos que apresentam a mesma valência ou o mesmo número de elétrons na última camada, por exemplo, SH, NH_2 e CH_3, são isósteros de OH, enquanto que S, NH e CH_2 são isósteros do O. Eles são utilizados para desenhar inibidores ou para aumentar a

estabilidade dos metabólitos formados (Pró-fármacos), uma vez que a alteração do caráter químico da molécula constitui sutilmente uma provável forma de modificação molecular (PATRICK et al., 1995).

Em virtude desses fatos e da necessidade de novas intervenções terapêuticas que visem não apenas o tratamento da hiperglicemia como também os eventos cardiovasculares, este estudo tem como objetivo avaliar novas tiazolidino-2,4-dionas, modificadas por bioisosterismo, como possíveis alvos anti-aterogênicos. Para isso, foram realizadas avaliações *in vitro* utilizando-se as linhagens monocíticas de murino RAW 264.7 e J774, além de avaliações *in vivo* com o modelo animal de aterosclerose em camundongos com deleção genética para o receptor de LDL (LDLr-/-), nos quais ocorre uma severa elevação nos níveis de LDL colesterol associado à lesão aterosclerótica aórtica, quando alimentados com dieta rica em colesterol.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar o potencial antiaterogênico de novas tiazolidino-2,4-dionas.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar ensaios *in vitro* utilizando linhagens de macrófagos murinos J774 e RAW 264.7 tratados com as novas tiazolidino-2,4-dionas, para:
  - avaliar a viabilidade celular e a morte celular;
  - investigar a expressão gênica dos fatores de transcrição PPARα, PPARγ1 e PPARγ2, assim como de fatores envolvidos no metabolismo de lipídeos e na inflamação vascular;
  - avaliar a expressão do receptor *scavenger* de LDL oxidada (CD36), e dos transportadores ABCA1 e ABCG1;
  - determinar a concentração de nitritos induzida por LPS e INFγ.

- Realizar ensaios *in vitro* com células embrionárias humanas de rim (HEK 293), para:
  - investigar a ativação de PPARα, PPARβ/δ e PPARγ pelas novas tiazolidino-2,4-dionas, assim como a ligação específica dessas novas moléculas ao domínio de ligação ao agonista (LBD) do PPARγ;

- pesquisar a ativação de LXRα e a ligação específicas ao LBD de LXRα, promovidas pelas novas tiazolidino-2,4-dionas.

- Realizar ensaios *in vivo* utilizando camundongos com deleção genética para o receptor de LDL tratados com as novas tiazolidino-2,4-dionas em modelo de aterosclerose avançada, para:
  - determinar o perfil lipídico, o ganho de peso e as aminotransferases hepáticas;
  - avaliar o desenvolvimento da lesão aterosclerótica;
  - investigar a expressão de RNAm de fatores aterogênicos e inflamatórios nas lesões ateroscleróticas;
  - determinar a expressão de moléculas de adesão e fatores aterogênicos.

Animais, Material e Metodologia

3. ANIMAIS, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Camundongos C57BL/6 *knockout* para o gene do receptor de LDL ($LDL^{-/-}$), machos adultos, com 3-4 meses de idade, foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e mantidos em salas estéreis e termostatizadas em condições apropriadas, com livre acesso à ração e água e com ciclos alternados de luz/escuro (12/12hs). A linhagem utilizada de camundongos $C57BL/6J/LDLr^{-/-}$ é proveniente do Laboratório Jackson (Bar Harbor, ME).

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, protocolo CEEA nº 248 e aprovado em 10/08/2009 por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (ANEXO 1).

3.2. MATERIAIS

3.2.1. Linhagens celulares

Células RAW 264.7 (linhagem de macrófagos de murino - ATCC, Manassas, VA, USA) foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 contendo 10% soro bovino fetal, e suplementado com (50µg/mL), estreptomicina (50µg/mL) e glutamina (2mmol/L).

Células J774 (linhagem de macrófagos de murino, ATCC) foram mantidas em

meio de cultura RPMI 1640 contendo 10% de soro bovino fetal, suplementado com penicilina (50µg/mL), estreptomicina (50µg/mL) e glutamina (2mmol/L).

Células HEK 293 (células embrionárias humanas de rim – ATCC) foram cultivadas em meio de cultura DMEM contendo 10% de soro bovino fetal, suplementado com penicilina (50µg/mL), estreptomicina (50µg/mL) e glutamina (2mmol/L).

3.2.2. Dieta

A dieta aterogênica foi formulada conforme as recomendações da AIN – 93 (REEVES et al., 1993), com seguinte composição: 52,95% de carboidratos, 16,5% de proteínas, 20% de lipídios (70% de óleo de coco, 29,4% de óleo de soja e 0,5% de colesterol), 5% de celulose, 3,5 de mistura mineral, 1% de mistura vitamínica, 0,3% de L-cistina, 0,25% de bitartarato e 0,5% de ácido cólico.

3.2.3. Tiazolidina-2,4-dionas

Os novos derivados tiazolidínicos foram sintetizados pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (GPIT) do Departamento de Antibióticos/UFPE e cedidos para avaliação, em colaboração com o laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas/FCF/USP. Todos eles já tiveram suas patentes depositadas no Instituto Nacional de Propriedade Industrial, sob os números de processo PI0300997-1 A2 e PI0601826-2 A, nos dias 10 de abril de 2003 e 24 de abril de 2006, respectivamente.

Para este estudo foram avaliados 12 novos derivados tiazolidínicos, cuja síntese foi realizada de acordo com a via plena convergente aplicando o conceito de biososterismo, onde se realizou separadamente a obtenção de todos os intermediários (Ésteres de Cope), e paralelamente foram obtidos os núcleos pentagonais tiazolidínicos substituídos na posição três.

Para os ensaios *in vitro*, as TZDs foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO - Merck, Darmstadt, GER), o fenofibrato (Sigma, Saint Louis, MA, USA) foi utilizado como controle positivo para demonstrar o agonismo pelo PPARα, o T1317 (Sigma) como agonista de LXRα e a rosiglitazona (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) como agonista de PPARγ. Por outro lado, os estudos *in vivo* utilizaram a Carboximetilcelulose Sódica (CMC-Na, Sigma Aldrich) como veículo, o maleato de rosiglitazona (Avandia®) comercializado pela Glaxo Smith Kline (Philadelphia, PA, USA) como agonista de PPARγ, e a indometacina produzida pela Sigma Aldrich como agente antiinflamatório.

3.3. Metodologias

3.3.1. Ensaios *in vitro* utilizando linhagens de macrófagos

3.3.1.1. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada através do método de MTT conforme o descrito previamente por Denizot e Lang (1986). Esse método é baseado na conversão celular do composto tetrazólico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio), pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial, em um produto insolúvel

denominado formazana, refletindo assim o funcionamento normal da mitocôndria e, conseqüentemente, a viabilidade celular.

Para o ensaio, as duas linhagens monocíticas foram cultivadas em placas de 96 poços a um volume inicial de 200µL, na densidade celular de $1x10^4$ células/poço. Após 3h de incubação a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO_2, com o objetivo de permitir aderência celular, o meio de cultura foi substituído por meio RPMI 1640 sem soro, e as células foram incubadas *overnight*. Após esse período, foi adicionado 100µL de meio RPMI sem soro em um gradiente de concentração que variou de 0,5 a 10µM dos derivados tiazolidínicos. Concentrações equivalentes ao veículo DMSO presente nos poços tratados também foram testadas, cuja maior dose foi de 0,1% v/v. Após 24hs de incubação, o meio de cultura foi removido por inversão da placa, e 50µL de uma solução de MTT (1mg/mL) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MA, USA) em meio RPMI livre de vermelho de fenol foi adicionada, sofrendo agitação por 3hs a temperatura ambiente. Em seguida, o MTT não reduzido foi removido por inversão da placa, e 100µL de DMSO foi adicionado em cada poço. As placas foram vigorosamente agitadas, para completa solubilização do produto formazana, e a densidade óptica de cada poço foi determinada em leitor de placas (BioTek, Winooski, VT, USA) a 580nm.

3.3.1.2. Ensaio de morte celular

O ensaio de morte celular foi feito de acordo com as instruções do fabricante, onde macrófagos J774 e RAW 264.7 foram cultivados em uma densidade de $1,5 \times 10^5$ células/mL, em placas de 48 poços. Após 3h de incubação a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO_2, com o objetivo de permitir aderência celular, o meio de cultura foi substituído por meio RPMI 1640 sem soro, e as células foram incubadas *overnight*.

Posteriormente, elas foram tratadas com os derivados tiazolidínicos, em um gradiente de concentração de 0,5 a 10,0 μM, durante 24h. Como controle positivo foi utilizado DMSO em uma concentração de 25% v/v. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, incubadas em seguida por 10 minutos com anexina V conjugada a FITC e solução de iodedo de propídio (PI) (Sigma Aldrich) e analisadas em citômetro BDFACS Canto II (Becton Dickinson Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

3.3.1.3. Expressão gênica de fatores de transcrição e fatores envolvidos no metabolismo de lipídeos

Para isso, as duas linhagens de macrófagos foram plaqueadas em uma densidade de $1x10^6$ células/mL. Quando atingiram um estágio de 80% de confluência, meio de cultura contendo os derivados tiazolidínicos, na concentração de 2μM, foi adicionado à cultura celular. Após 16hs de exposição ao tratamento, o mesmo foi retirado e o RNAm das células foi isolado utilizando-se reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Após retirada do clorofórmio, o RNA foi precipitado em isopropanol e o pellet de RNA foi lavado com etanol 75%, dissolvido em água destilada e quantificado. Os cDNAs foram sintetizados através de transcrição reversa utilizando-se 1,0 μg de RNA de boa qualidade e o reagente High Capacity (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A reação de polimerase em cadeia (PCR) quantitativa foi realizada utilizando-se 1μg de cDNA, reagente Power SYBR Green mix (Applied Biosystems) e sequências de primers para camundongos (sense e antisense) de PPARα, PPARγ1, PPARγ2, CD36, ABCA1 e ABCG1 (TABELA 1), em equipamento Real Time PCR 7500 Fast (Applied Biosystems). Os resultados foram normalizados para o rRNA do gene 18S .

As sequências dos primers foram desenhadas usando o programa Primer Express version 2.0 (Applied Biosystems). A eficiência e especificidade da amplificação foram verificadas para cada reação. As condições das reações foram as seguintes: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C , 1 minuto a 60°C e 1 ciclo para o estágio de dissociação. Os resultados foram calculados de acordo com o método de comparação relativa 2(-Delta Delta c(t)) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

TABELA 1: Sequências de Primers

Gene	ID. NCBI	Sequência de primer (Sense)	Sequência de Primer (Antisense)
PPARα	NM001113418.1	5'-TCAGGGTACCACTACGGA-3'	5'-CTTGGCATTCTTCCAAAGCG-3'
PPARγ1	NM 001127330.1	5'-TTCTGACAGGACTGTGTGACAG-3'	5'-ATAAGGTGGAGATGCAGGTTC-3'
PPARγ2	NM 011146.3	5'-CACAGAGATGCCATTCTGGC-3'	5'-GGCCTGTTGTAGAGCTGGGT-3'
CD36	NM 001159558.1	5´-TTTCCTCTGACATTTGCAGGTCTA-3'	5´-AAAGGCATTGGCTGGAAGAA-3'
ABCA1	NM 013454.3	5´-GGTTTGGAGATGGTTATACAATAGTTGT-3'	5´-TTCCCGGAAACGCAAGTC-3'
ABCG1	NM009593.2	5'-CCTTCCTCAGCATCATGC-3'	5'-CCGATCCCAATGTGCGA-3'
iNOS	NM 010927.3	5'-GGCAGCCTGTGAGACCTTTG-3'	5'-GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC-3'
COX2	NM 011198.3	5'- TGGTGCCTGGTCTGATGATG-3'	5'-GTGGTAACCGCTCAGGTGTTG-3'
VCAM	NM 011693.3	5´- TGATTGGGAGAGACAAAGCA – 3´	5´- GCAGCACACGTCAGAACAA – 3´
PECAM	NM 001032378.1	5´-AAGTTTTACAAAGAAAAGGAGGAC-3	5´-ATCCAGGAATCGGCTGCTCTTC-3
MCP1	NM 011333.3	5'-TGAGTAGGCTGGAGAGCTACAA-3'	5'-ATGTCTGGACCCATTCCTTC-3'
IL-6	NM 031168.1	5´-TGTGCAATGGCAATTCTGAT- 3'	5´-ACCAGAGGAAATTTTCAATAGGC- 3'
IL-1α	NM 010554.4	5´-CTGCAGTCCATAACCCATGAT- 3'	5´-TGACAAACTTCTGCCTGACG- 3'
IL-1β	NM 008361.3	5´- TTCCCATTAGACAACTGCACTAC – 3´	5´- GTCGTTGCTTGGTTCTCCTT –3´
18SrRNA	NR 003278.1	5'-GTAACCCGTTGAACCCCATT-3'	5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'

3.3.1.4. Expressão do receptor *scavenger* CD36 na superfície dos macrófagos

Macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados em uma densidade de 1,5 x 10^5 células/mL. Após 3h de incubação a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO_2, com o objetivo de permitir aderência celular, o meio de cultura foi substituído por meio RPMI 1640 sem soro, e as células foram incubadas *overnight*. Posteriormente, as células foram tratadas com os derivados tiazolidínicos, na concentração de 2μM, durante 48 hs. A RSG foi utilizada como controle positivo para verificar o agonismo pelo PPARγ. Após esse período, as células foram incubadas por 30 minutos com anticorpo monoclonal anti-CD36 de camundongo (Santa Cruz Biotecnology, Santa Cruz, CA, USA), lavadas com PBS, incubadas com anticorpo secundário anti-IgG2 ligado a FITC (Sigma) por 30 minutos, novamente lavadas com PBS e analisadas em citômetro BDFACS Canto II (Bencton Dickinson Company).

3.3.1.5. Expressão gênica de fatores inflamatórios

Para avaliar a expressão de fatores inflamatórios, apenas foi utilizada a linhagem monocítica RAW 264.7. Primeiramente, as células foram plaqueadas em uma densidade de 1x10^6 células/mL. Após 3h de incubação a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO_2 para aderência celular, o meio de cultura foi substituído por meio RPMI 1640 sem soro contendo os derivados tiazolidínicos solubilizados, na concentração de 2μM, com adição após 30 minutos de LPS (1μg/mL) (Sigma) e INFγ (0,5 UI) (Sigma) como estímulos inflamatórios. Depois de 5 hs de incubação, a extração de RNA, a construção do cDNA e as reações de q-RT-PCR, foram feitas conforme anteriormente citadas no item 3.3.1.3., e de acordo com as indicações do fabricante. Para este fim foram

utilizadas as sequências de primers para camundongos (sense e antisense) de iNOS, COX2, VCAM, MCP-1 e IL-6, listadas na TABELA 1, e os resultados foram normalizados para o rRNA do gene 18S

3.3.1.6. Determinação de nitritos

Para este ensaio, macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em uma densidade de $4x10^4$ células/poço, em uma placa de 96 poços, e incubadas *overnight* a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO_2, para aderência celular. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por meio RPMI sem soro por 3 hs para adaptação, sendo em seguida trocado por 100µL de meio RPMI sem soro contendo concentrações crescentes (0,625-5µM) dos derivados tiazolidínicos, com adição após 30 minutos de LPS (1 µg/mL) (Sigma) e INFγ (0,5 UI) (Sigma), como estímulo inflamatório. Depois de 20 hs de incubação, o sobrenadante da cultura celular foi misturado a um volume igual de Reagente de Griess, e a densidade óptica de cada poço determinada por leitor de placas (BioTek) a 550nm. A leitura das amostras experimentais foi comparada a uma curva padrão gerada por diluições de $NaNO_2$.

3.3.1.7. Efluxo de colesterol mediado por apo A-1 e HDL_2

Macrófagos J774 foram cultivados em placas de 48 poços, a uma densidade de 0,5 x 10^6 células/poço. Após confluência, as células foram incubadas em DMEM (Gibco, Grand Island, NY, USA) contendo albumina livre de ácidos graxos (FAFA) (1 mg/mL) (Sigma Aldrich) acrescido de LDL acetilada (50 µg/mL) e ^{14}C-Colesterol (0,3 µCi/mL), durante 48 hs. Após lavagem com PBS/FAFA, as células foram tratadas com

meio de equilíbrio o qual compreende DMEM, FAFA e AMPc (0,5mM), para estimular a expressão basal de ABCA1 e ABCG1. Posteriormente, elas foram novamente lavadas com PBS/FAFA, e subsequentemente, incubadas com os novos derivados tiazolidínicos por 8 e 24 hs, na concentração de 2 μM. Após novas lavagens, as células foram incubadas com apo-A1 (30 μg/mL) e HDL_2 (50 μg/mL), durante 8 hs. Subsequentemente, o meio de cultura foi centrifugado em 1500 rpm por 10 minutos, para remover o *debris* celular, e transferido para frascos de cintilação (Perkin Elmer, Turko, FIN), seguindo-se a adição da solução contadora para determinação da radioatividade no meio. Os poços das placas foram lavados com solução fisiológica gelada (4ºC) por 2 vezes. Os lípides celulares foram extraídos com solução de hexana:isopropanol (3:2) e a radioatividade determinada, após evaporação do solvente. NaOH 0,2 N foi adicionado aos poços da placa para extração do conteúdo protéico (3 h, sob agitação, à temperatura ambiente), e a determinação da concentração de proteína foi feita pelo método do BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). A porcentagem de efluxo de colesterol radioativo foi calculada como (^{14}C-Colesterol no meio/ ^{14}C-Colesterol no meio + ^{14}C-Colesterol nas células) × 100.

3.3.2. Ensaios *in vitro* utilizando células embrionárias humanas (HEK 293)

3.3.2.1. Ensaios de ativação das isoformas α, β/δ e γ de PPAR, e LXRα, utilizando a luciferase como gene repórter

Para a transfecção, células HEK 293 foram cultivadas em placas de 24 poços, em uma densidade celular de $1x10^6$ células/poço, e mantidas a 37ºC em atmosfera úmida a 5% de CO_2 *overnight*. Posteriormente, elas foram incubadas por 10 horas com

plasmídeo repórter (100ng/poço), plasmídeos receptores (10-50ng/pocinho) e lucifectamina (Invitrogen) (50ng/pocinho). Os plasmídeos repórters compreendem os genes do elemento de resposta ao PPAR (PPRE) ou o elemento de resposta ao LXR (LXRE), conjugados ao gene da luciferase, e os plasmídeos receptores compreendem os genes do PPARα, PPARβ/δ, PPARγ, LBD-PPARγ, LXRα e LBD-LXRα. Após transfecção, as células foram incubadas em meio Opti-MEM (GIBCO) contendo as TZDs, na concentração de 2,0 uM, os controles positivos rosiglitazona e fenofibrato na mesma concentração, e o veículo (DMSO) por 16 horas. As atividades foram medidas usando kit para ensaio de luciferase (Promega, Madison, WI, USA) em um leitor de luminescência (BioTek), de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.3. Ensaios *in vivo* utilizando camundongos com deleção genética para o receptor de LDL (LDLr$^{-/-}$) em modelo de aterosclerose avançada

3.3.3.1. Protocolo experimental

Camundongos LDLr$^{-/-}$, com 3-4 meses de idades, foram divididos em grupos: 1) tratados com carboximetilcelulose 0,25% (Sigma) (Controle); 2) tratados com rosiglitazona – controle positivo (15 mg/kg/dia) (RSG); 3) tratados com indometacina – – controle positivo (1 mg/kg/dia) (IND); 4) tratados com GQ-177 (20mg/kg/dia); 5) tratados com GQ-145 (20 mg/kg/dia); e 6) tratados com LYSO-7 (20 mg/kg/dia). O tratamento foi feito de acordo com o protocolo para lesão avançada, onde os camundongos receberam dieta hipercolesterolêmica, contendo 0,5% de colesterol, por 16 semanas e administração dos derivados tiazolidínicos, por gavage, durante as últimas 4 semanas. A dieta hipercolesterolêmica foi mantida durante o tratamento. Após esse

período, os animais foram eutanasiados e as amostras de sangue e órgãos retiradas para análise.

3.3.3.2. Determinação do ganho de peso, do perfil lipídico e das aminotransferases

A variação de peso dos camundongos tratados com os derivados tiazolidínicos foi acompanhada desde o primeiro até o último dia de tratamento. A cada início de semana, todos os animais eram pesados, sempre pela manhã e em balança digital de precisão (Mettler Toledo).

Ao final do experimento, os animais foram previamente anestesiados com xilasina (2,0g / 100mL; Bayer do Brasil, Leverkusen, GER) e cloridrato de cetamina (1,0g / 10,0mL; Vetaset, Fort. Dodge Saúde Animal Ltda, Iowa, USA) para a coleta de amostras de sangue por punção pelo plexo branquial. Após 2 hs, para retração do coágulo, as amostras foram centrifugadas a 2000 X g a 4º C durante 15 minutos para obtenção do plasma, o qual foi armazenado em microtubos e estocado a -80°C até análise.

As concentrações plasmáticas de glicose foram determinadas usando Accu-Chek Performa (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA). A determinação de colesterol total e triglicerídeos foi realizada por método enzimático, segundo metodologia desenvolvida por Trinder (1969), e para avaliar as concentrações de HDL colesterol foi utilizada uma técnica de precipitação de VLDL e LDL por ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio, feita de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, BRA). A determinação da aspartato transferase (AST) e da alanina transferase (ALT) foi realizada segundo as instruções do fabricante

(Labtest Diagnóstica), baseada nas metodologias desenvolvidas por Karmen (1955) e Reitman (1957).

3.3.3.3. Avaliação morfométrica das lesões ateroscleróticas

Após eutanásia, os corações dos animais foram expostos e perfundidos com salina 0,9%, e o órgão contendo a porção superior da aorta foi removido e deixado em solução salina por uma hora para relaxamento da musculatura, com posterior armazenamento em formalina 10% tamponada, por pelo menos 48h, para fixação do tecido. A inclusão dos tecidos para corte em criostato foi feita em três soluções de diferentes concentrações de gelatina (Synth, Diadema, SP, BRA): 1) solução a 5% de gelatina por três horas; 2) solução a 10% de gelatina por mais três horas; e, 3) solução a 25% de gelatina *overnight*. Todas as etapas ocorreram em banho-maria (temperatura entre 40-50° C). Após inclusão, os ventrículos foram seccionados entre o ápice e a base, num plano paralelo a uma linha definida pelas pontas laterais dos átrios. A porção superior dos corações foi então embebida em meio de inclusão para criostato (OCT) (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), dentro da câmara de congelamento do criostato (Leica, Weszlar, GER) e foram feitos cortes consecutivos de 10 μm, coletados em lâminas de microscópio cobertas com uma fina camada de gelatina. Os cortes coletados compreenderam a região entre o sinus aórtico e o início da aorta, amostrando uma extensão média de 250-400 μm, conforme Paigen et al (1987). Foram coletadas 5 lâminas, cada uma contendo 8 cortes, para cada animal. Posteriormente, as lâminas foram coradas com Oil red-O (Sigma) e contra-coradas com hematoxilina (MBF, São Paulo, SP, BRA) e light Green (Sigma). Após a coloração, os cortes foram analisados

por microscópio óptico (Zeiss, Jena, GER), acoplado a uma câmera fotográfica, e a captura da imagem foi feita utilizando-se um computador. As imagens foram analisadas pelo programa Axio Vision versão 4.8.1.0 (Zeiss), e as medidas obtidas em $(pixels)^2$, sendo posteriormente transformadas em $(\mu m)^2$. Todas as análises foram feitas por observadores independentes em um estudo cego.

3.3.3.4. Análise imunohistoquímica

Após fixação, as lesões ateroscleróticas foram embebidas em parafina. Secções de 5 μM de espessura foram cortadas e aderidas a lâminas silanizadas. Posteriormente, estas secções foram deparafinizadas com xylol e rehidratadas em um gradiente de etanol (100 – 70%). Para aumentar a exposição ao epítopo, as secções foram aquecidas por 30 minutos em uma solução de tampão de citrato de sódio (0.01M, pH 6.0), sendo posteriormente tratadas com água oxigenada em uma concentração de 0,3% (v/v) durante 6 minutos, para minimizar a atividade da peroxidase endógena. Em seguida, elas foram incubadas por 18 hs a 4°C com os seguintes anticorpos anti-*mouse* e diluições: ABCA1 (1:300, ABCAM, Cambridge, MA, USA), CD36 (1:300, ABCAM), CD40 (1:100, ABCAM), CD40L (1:100, ABCAM), and VCAM (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). A reação antigen-anticorpo foi visualizada com kit Vectastain Elite ABC (Vector, Burlingame, CA, USA) usando 3,3-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina, e a coloração positiva resultou em um produto de reação marrom. Imagens de mesma magnitude foram quantitativamente analisadas usando Software Image-Pro Plus (version 3.0, Media Cybernetics, USA).

3.3.3.5. Expressão de genes aterogênicos e inflamatórios

Outro grupo de animais foi exposto ao protocolo experimental, e ao término do mesmo os animais foram anestesiados para coleta das amostras de sangue visando análise do perfil lipídico e a porção superior do coração foi coletada e embebida em RNA Later (Qiagen, Hilden, GER), reagente que estabiliza o RNA em amostras teciduais preservando o perfil de expressão gênica. Após 16hs, as amostras foram rapidamente acondicionadas em criotubos e congeladas em nitrogênio líquido até análise. Em seguida, o tecido cardíaco foi homogeneizado para extração de RNAm e proteínas utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), segundo instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado através de transcrição reversa pelo uso do kit High Capacity, utilizando 1µg de RNA total. Similarmente aos ensaios *in vitro*, a reação de polimerase em cadeia (PCR) quantitativa foi feita utilizando 1µg de cDNA, reagente Power SYBR Green mix e sequências de primers para camundongos (sense e antisense) de PPARγ2, CD36, ABCA1, VCAM, PECAM, MCP-1, IL-6, IL-1α e IL-1β (TABELA 1). Os resultados foram normalizados para o rRNA do gene 18S. As condições das reações foram semelhantes ao anteriormente descrito, e os resultados foram calculados de acordo com o método de comparação relativa 2(-Delta Delta c(t)) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

3.3.4. Análises estatísticas

Os dados analisados foram apresentados sob a forma de média ± desvio padrão (S.D.). A significância estatística será avaliada através da análise de variância (ANOVA) para um fator, seguido do Teste de Tukey-Kramer para múltiplas

comparações. Os dados foram analisados pelo programa estatístico Graphpad, com nível α de significância de 5% (bicaudal).

Resultados

4. RESULTADOS

Inicialmente, com o objetivo de fazer uma triagem dos 12 novos derivados tiazolidínicos, o ensaio de MTT foi utilizado para avaliar a viabilidade celular das linhagens de macrófagos J774 e RAW 264.7 após exposição aos mesmos por 24 h, em um gradiente de concentração de 0,5 a 10 µM. Os resultados demonstraram que cinco TZDs (GQ-97, GQ-177, GQ-11, GQ-145 e LYSO-7) apresentaram menor toxidade nos dois tipos celulares, com mais de 90% das células viáveis entre as concentrações 0,5 - 2,5 µM (TABELA 2 e 3), e por isso, eles foram eleitos para dar seguimento ao projeto.

TABELA 2: Viabilidade celular de macrófagos J774 tratados com os novos derivados tiazolidínicos, nas concentrações 0,5 a 10,0 µM. Os resultados estão apresentados na forma de média ± DP (n=32).

TZD	% redução de MTT				
	0,5µM	**1µM**	**2,5 µM**	**5µM**	**10µM**
GQ-97	114,4 ± 7,4	111,2 ± 7,2	116,8 ± 5,5	112,6 ± 8,5	89,9 ± 12,3
GQ-177	110,9 ± 1,9	102,8 ± 5,2	92,1 ± 1,8	88,2 ± 2,2	81,9 ± 1,7
GQ-11	95,7 ± 1,4	94,0 ± 5,7	100,7 ± 4,9	79,6 ± 9,6	67,4 ± 9,7
GQ-145	108,1 ± 4,9	99,4 ± 3,7	97,1 ± 5,0	94,1 ± 3,6	81,5 ± 2,5
GQ-89	68,1 ± 11,7	73,0 ± 11,9	71,7 ± 10,8	71,1 ± 5,2	57,9 ± 3,7
GQ-169	73,2 ± 8,2	71,7 ± 7,3	70,7 ± 8,7	65,5 ± 7,9	64,3 ± 8,3
GQ-150	70,4 ± 6,6	71,4 ± 3,8	69,3 ± 3,3	78,2 ± 5,6	73,0 ± 13,6
SF-3	72,2 ± 14,2	72,0 ± 14,4	66,6 ± 6,7	62,7 ± 8,4	60,4 ± 4,9
SF-5	59,5 ± 6,5	60,8 ± 4,4	66,2 ± 6,3	65,1 ± 13,7	62,4 ± 6,7
SF-20	99,2 ± 4,7	89,2 ± 16,1	92,9 ± 6,0	83,6 ± 5,7	78,2 ± 11,9
SF-23	50,8 ± 1,6	62,6 ± 3,4	68,2 ± 6,2	64,9 ± 1,1	61,0 ± 0,6
LYSO-7	95,0 ± 3,7	96,4 ± 3,1	97,6 ± 1,4	96,7 ± 3,7	89,0 ± 5,1

TABELA 3: Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 tratados com os novos derivados tiazolidínicos, nas concentrações 0,5 a 10,0 µM. Os resultados estão apresentados na forma de média ± DP (n=32).

TZD	**% redução de MTT**				
	0,5µM	**1µM**	**2,5 µM**	**5µM**	**10µM**
GQ-97	92,8 ± 4,0	93,7 ± 3,0	92,6 ± 3,5	93,3 ± 3,2	88,4 ± 4,1
GQ-177	97,2 ± 5,3	93,7 ± 3,4	92,7 ± 2,2	72,5 ± 1,2	69,1 ± 2,8
GQ-11	92,3 ± 1,1	90,3 ± 1,3	91,8 ± 1,7	89,7 ± 2,2	70,6 ± 2,4
GQ-145	96,6 ± 4,4	92,4 ± 1,8	90,4 ± 1,9	83,6 ± 2,3	81,4 ± 3,8
GQ-89	92,3 ± 3,1	89,4 ± 2,6	88,6 ± 3,4	89,5 ± 3,0	87,0 ± 3,4
GQ-169	96,0 ± 2,5	89,1 ± 3,0	85,8 ± 2,3	84,2 ± 3,2	80,5 ± 3,1
GQ-150	94,2 ± 3,8	87,2 ± 1,4	87,5 ± 3,5	90,8 ± 2,4	86,6 ± 2,3
SF-3	81,0 ± 3,0	76,0 ± 3,0	69,8 ± 3,7	64,2 ± 2,2	55,5 ± 1,2
SF-5	78,6 ± 2,5	79,4 ± 1,7	82,0 ± 2,2	83,5 ± 2,4	84,9 ± 2,7
SF-20	87,5 ± 2,8	85,7 ± 5,3	78,9 ± 3,7	73,4 ± 1,9	65,0 ± 1,8
SF-23	94,8 ± 5,0	90,8 ± 5,9	93,0 ± 3,0	87,5 ± 3,4	84,6 ± 5,1
LYSO-7	100,2 ± 1,7	96,2 ± 2,3	102,6 ± 3,1	101,0 ± 2,1	97,8 ± 2,4

O próximo passo foi investigar a expressão gênica dos fatores de transcrição PPARα e PPARγ1 nas duas linhagens monocíticas expostas aos cinco derivados, na concentração de 2μM, durante 16 h. Neste ensaio, as GQ-177, GQ-145 e LYSO-7 elevaram significativamente a expressão de RNAm de PPARγ1 nos dois tipos celulares, quando comparado ao grupo controle (FIGURAS 9 e 10). Além disso, as GQ-177 e LYSO-7 também aumentaram significativamente a expressão gênica de PPARα, em mais de 2.5 vezes em relação ao controle (FIGURAS 9 e 10).

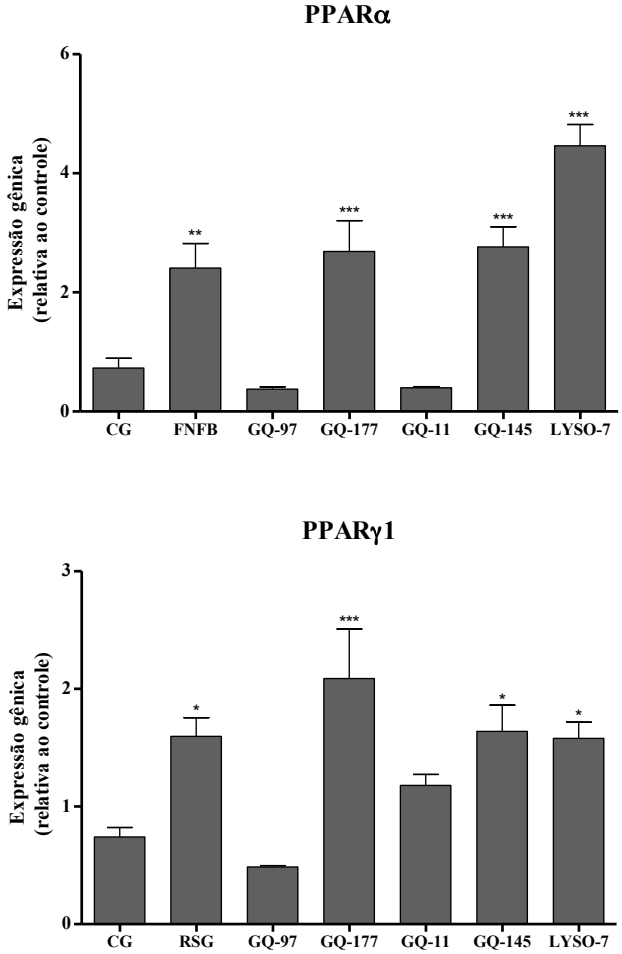

FIGURA 9: Efeito das TZDs sobre a expressão gênica de PPARα e PPARγ1 em macrófagos J774. As células foram incubadas com as TZDs (RSG, GQ-97, GQ-177, GQ-11, GQ-145, LYSO-7), na concentração 2μM, e em seguida, o RNAm de PPARα e PPARγ1 foi extraído para construção do cDNA e posterior determinação por Real Time PCR quantitativo. Os resultados foram normalisados com RNAm de 18S. Dados estão em triplicata, e expressos como média ± SD. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 (comparado ao grupo controle). CG, grupo controle; FNFB, fenofibrato; RSG, rosiglitazona.

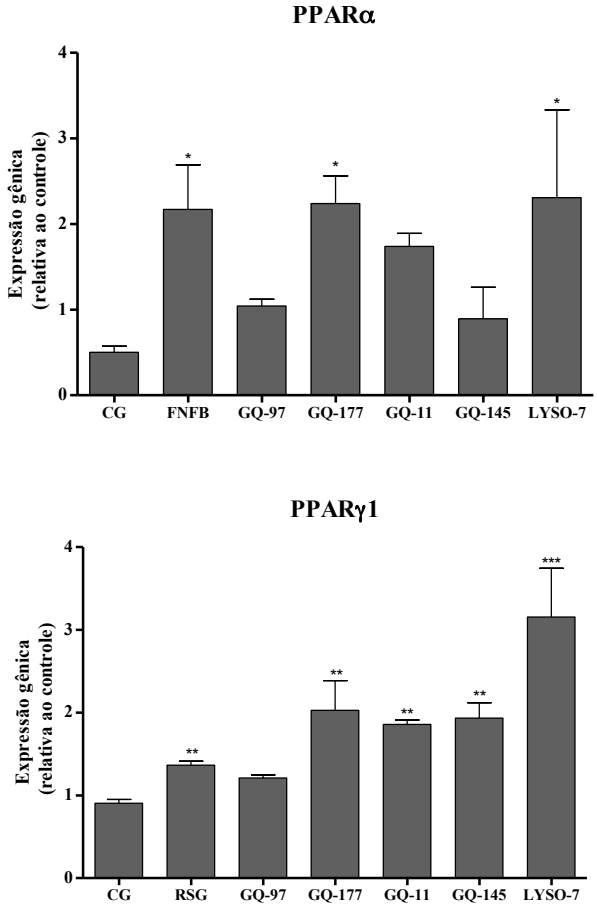

FIGURA 10: Efeito das TZDs sobre a expressão gênica de PPARα e PPARγ1 em macrófagos RAW 264.7. As células foram incubadas com as TZDs (RSG, GQ-97, GQ-177, GQ-11, GQ-145, LYSO-7), na concentração 2μM, e em seguida, o RNAm de PPARα e PPARγ1 foi extraído para construção do cDNA e posterior determinação por Real Time PCR quantitativo. Os resultados foram normalisados com RNAm de 18S. Dados estão em triplicata, e expressos como média ± SD. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 (comparado ao grupo controle). CG, grupo controle; FNFB, fenofibrato; RSG, rosiglitazona.

Para confirmar o agonismo pelos PPARs, os três derivados GQ-177, GQ-145 e LYSO-7 foram avaliados quanto à ativação das três isoformas de PPAR, utilizando o ensaio de luciferase como gene repórter. A GQ-177 induziu significativamente a ativação de PPARγ e de seu respectivo domínio de ligação, quando comparado ao controle, porém em uma menor magnitude que a rosiglitazona (RSG) (FIGURA 11). A LYSO-7 estimulou a ativação de PPARα, na mesma magnitude do fenofibrato, e também ativou PPARδ (FIGURAS 11). Por outro lado, a GQ-145 não induziu ativação de nenhuma das isoformas de PPAR (FIGURA 11).

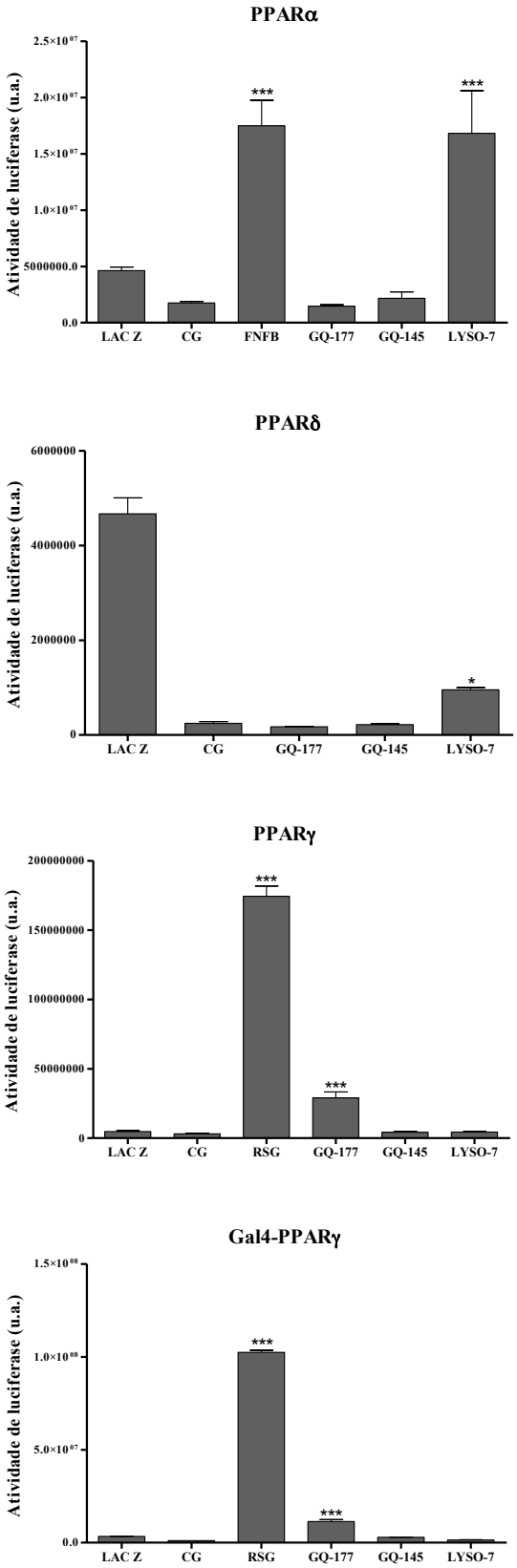

FIGURA 11: Efeito das TZDs sobre a ativação de PPAR. Células HEK 293 foram transfectadas com plasmídeos repórteres, plasmídeos receptores e lucifectamina por 10hs. Após esse período, elas foram incubadas com as novas TZDs (GQ-177, GQ-145, LYSO-7) e os controles positivos (RSG e FNFB), na concentração 2,5 µM, por 16hs. Ensaio de luciferase como gene repórter foi utilizado como metodologia, e os dados são resultado de dois experimentos em triplicata, e estão expressos como média e desvio padrão. *P<0.05, ***P<0.001 (comparado ao controle). CG, grupo controle; FNFB, fenofibrato; RSG, rosiglitazona.

Como PPARα e PPARγ estimulam o efluxo de colesterol por induzir expressão de LXRα, o ensaio de ativação de LXRα e de seu domínio de ligação também foi realizado, utilizando a mesma técnica. E, neste experimento, nenhum dos três derivados estimulou a ativação de LXRα e seu domínio de ligação (FIGURA 12).

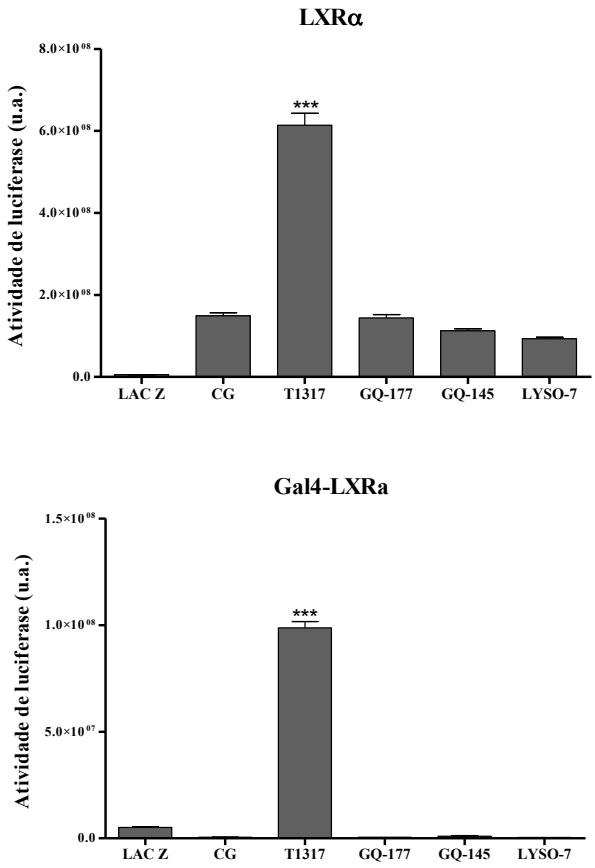

FIGURA 12: Efeito das TZDs sobre a ativação de LXR. Células HEK 293 foram transfectadas com plasmídeos repórteres, plasmídeos receptores e lucifectamina por 10hs. Após esse período, elas foram incubadas com as novas TZDs (GQ-177, GQ-145, LYSO-7) e o controle positivo (T1317), na concentração 2,5 μM, por 16hs. Ensaio de luciferase como gene repórter foi utilizado como metodologia, e os dados são resultado de dois experimentos em triplicata, e estão expressos como média e desvio padrão. ***P<0.001 (comparado ao controle). CG, grupo controle.

Para confirmar a toxicidade dos novos derivados tiazolidínicos, a indução de morte celular foi avaliada nas duas linhagens de macrófagos, sob as mesmas condições do ensaio de MTT, através de marcação com anexina e iodedo de propídio (PI). Corroborando com os resultados obtidos no ensaio de MTT, os macrófagos apresentaram menos de 10% de morte celular após 24 hs de tratamento com os três novos derivados tiazolidínicos, entre as concentrações 0.625 e 5.0 µM (FIGURA 13 e 14).

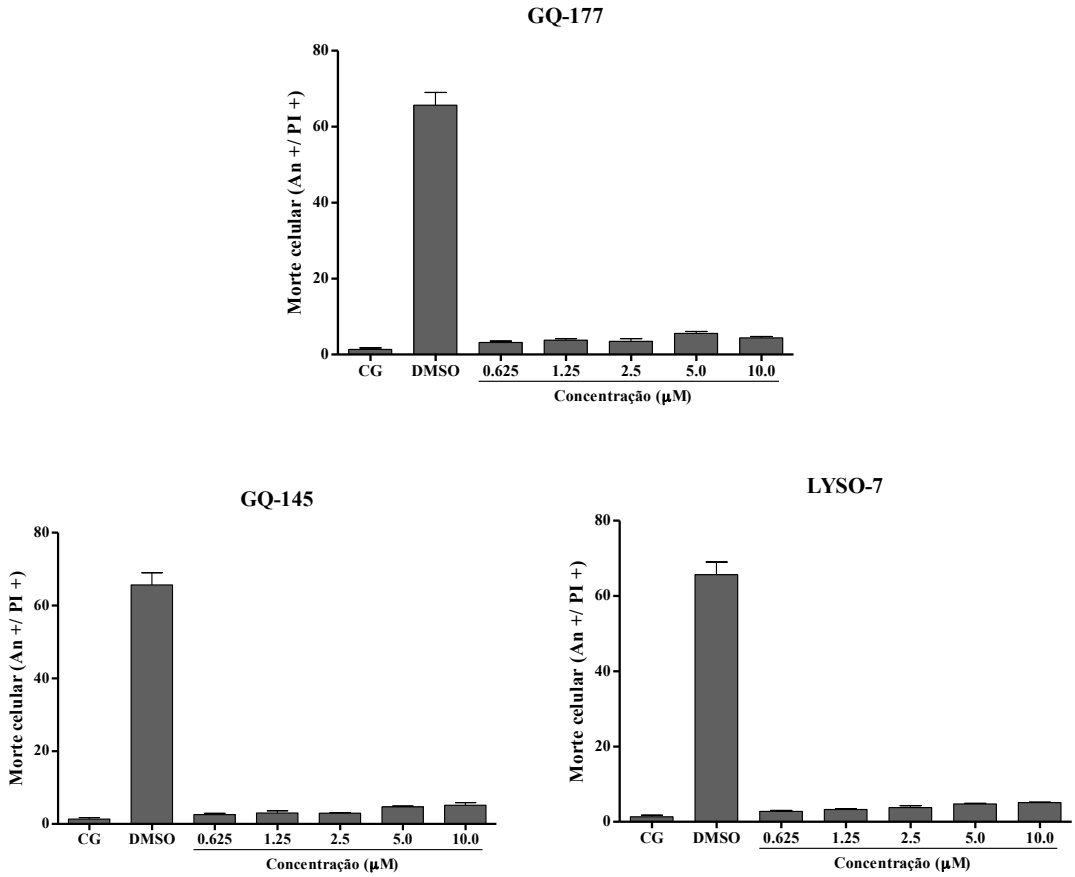

FIGURA 13: Efeito das TZDs sobre a indução de morte celular em macrófagos J774. As células foram incubados com as TZDs (RSG, GQ-177, GQ-145, LYSO-7) nas concentrações 0,5-10,0µM, por 48 hs, sendo em seguida, marcadas com PI e anexina V ligada a FITC e analisada por citometria de fluxo. Dados estão em triplicata, e expressos como média ± SD. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. CG, grupo controle; DMSO, dimetilsufóxido.

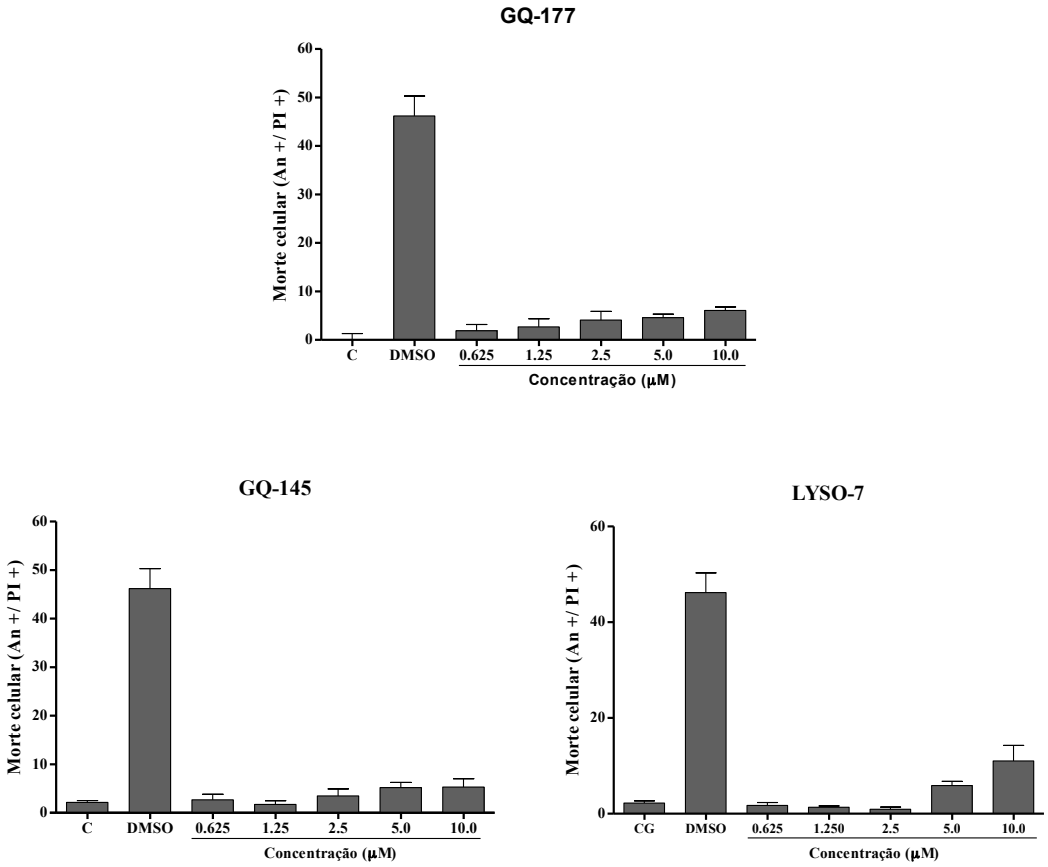

FIGURA 14: Efeito das TZDs sobre a indução de morte celular em macrófagos RAW 264.7. As células foram incubados com as TZDs (RSG, GQ-177, GQ-145, LYSO-7) nas concentrações 0,5-10,0µM, por 48 hs, sendo em seguida, marcadas com PI e anexina V ligada a FITC e analisada por citometria de fluxo. Dados estão em triplicata, e expressos como média ± SD. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. CG, grupo controle; DMSO, dimetilsufóxido.

Como os receptores nucleares PPARs possuem importantes funções no metabolismo de lipídeos e efluxo de colesterol, a expressão gênica de CD36, ABCA1 e ABCG1 foi avaliada por PCR em tempo real. As três novas TZDs (GQ-177, GQ-145 e LYSO-7) aumentaram significativamente a expressão de RNAm destes três marcadores, porém a GQ-145 não estimulou a expressão de ABCG1 em macrófagos RAW 264.7 (FIGURA 16), assim como a GQ-177 e a LYSO-7 não elevaram a expressão de ABCA1 e CD36 em macrófagos J774, respectivamente (FIGURA 15).

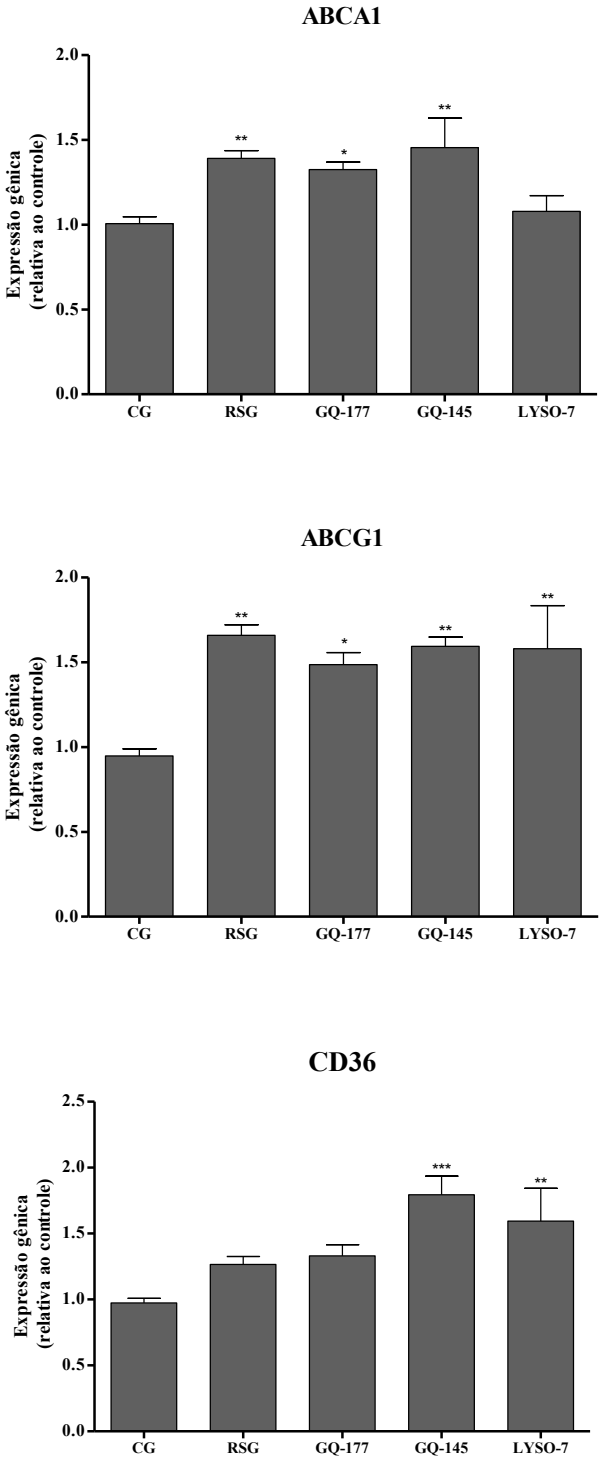

FIGURA 15: Efeito das TZDs sobre a expressão gênica de ABCA1, ABCG1 e CD36 em macrófagos J774. As células foram incubadas com as TZDs (RSG, GQ-177, GQ-145, LYSO-7), na concentração 2µM, e em seguida, o RNAm de ABCA1, ABCG1e CD36 foi extraído para a construção do cDNA e posterior determinação por Real Time PCR quantitativo. Os resultados foram normalisados com RNAm de 18S. Dados estão em triplicata, e expressos como média ± SD. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 (comparado ao grupo controle). CG, grupo controle; RSG, rosiglitazona.

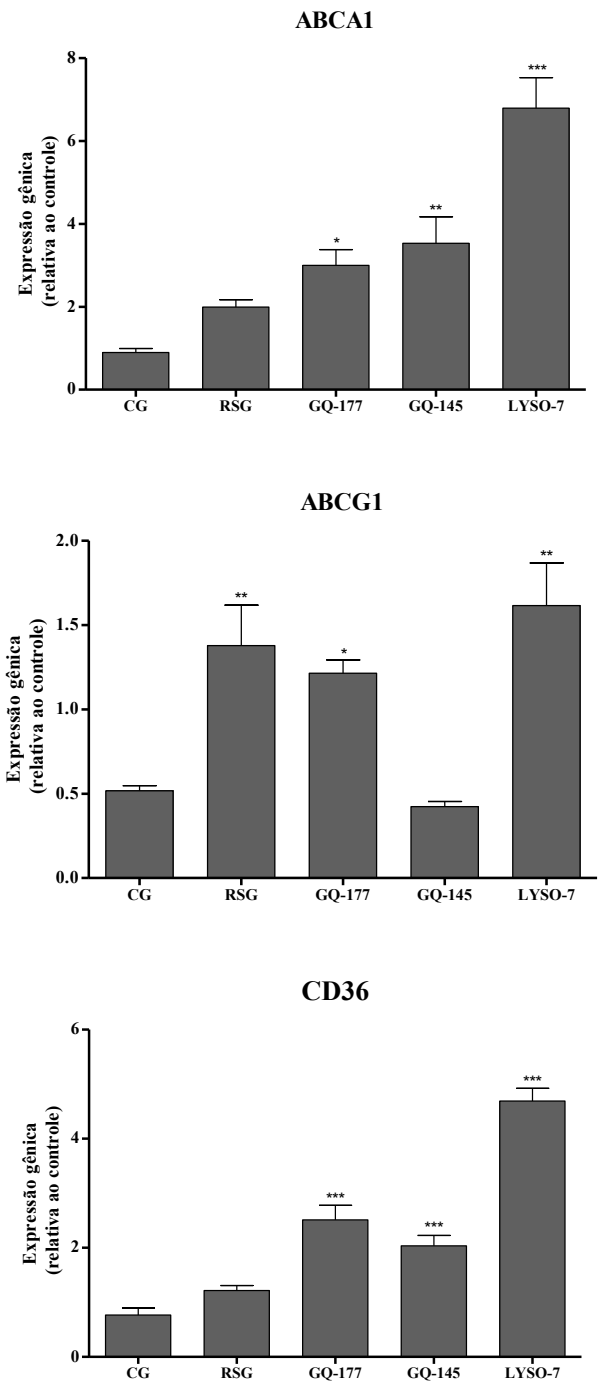

FIGURA 16: Efeito das TZDs sobre a expressão gênica de ABCA1, ABCG1 e CD36 em macrófagos RAW 264.7. As células foram incubadas com as TZDs (RSG, GQ-177, GQ-145, LYSO-7), na concentração 2µM, e em seguida, o RNAm de ABCA1, ABCG1 e CD36 foi extraído para a construção do cDNA e posterior determinação por Real Time PCR quantitativo. Os resultados foram normalisados com RNAm de 18S. Dados estão em triplicata, e expressos como média ± SD. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 (comparado ao grupo controle). CG, grupo controle; RSG, rosiglitazona.

Visto que os três novos derivados tiazolidínicos elevaram RNAm do receptor *scavenger* CD36 em macrófagos RAW 264.7, sua expressão na superfície destes também foi avaliada. Neste ensaio, apenas a RSG aumentou significativamente a expressão deste receptor, enquanto todos os novos derivados apresentaram um perfil de expressão semelhante ao controle (FIGURA 17).

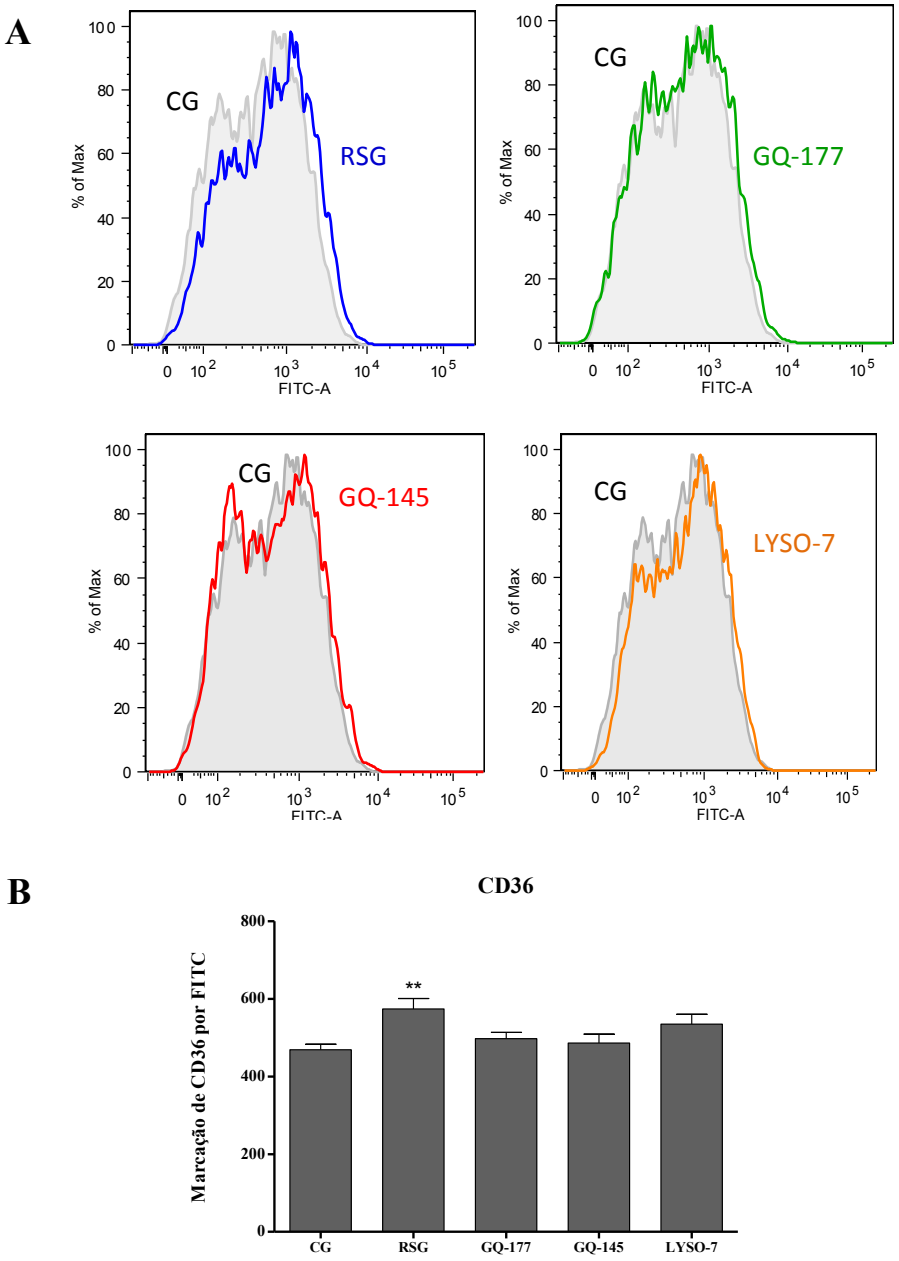

FIGURA 17: Efeito das TZDs sobre a expressão de CD36 na superfície de macrófagos. Macrófagos RAW 264.7 foram incubados com as TZDs (RSG, GQ-177, GQ-145, LYSO-7) na concentração 2µM, por 48 hs. Em seguida, o receptor scavenger CD36 expresso foi marcado com anticorpo ligado a FITC e analisado por citometria de fluxo. Representação como histogramas (A) e como gráfico de barras (B) Dados estão em triplicata, e expressos como média ± SD. **P<0.01 (comparado ao controle). CG, grupo controle; RSG, rosiglitazona.

Como os agonistas de PPARα e PPARγ possuem a habilidade de inibir a expressão de genes inflamatórios, neste estudo o RNAm de iNOS, COX2, IL-6, MCP-1 e VCAM foram investigados por PCR em tempo real, utilizando apenas a linhagem de macrófagos RAW 264.7, pois a J774 tem seu crescimento celular inibido após exposição ao LPS, que foi utilizado como estímulo inflamatório. Os resultados demonstraram que os três novos derivados (GQ-177, GQ-145 e LYSO-7) diminuíram significativamente a expressão de mRNA de iNOS e COX2, comparado ao controle. Em adição, eles também reduziram significativamente a expressão de iNOS quando comparado à RSG, assim como LYSO-7 diminuiu a expressão de COX2 (FIGURA 18).

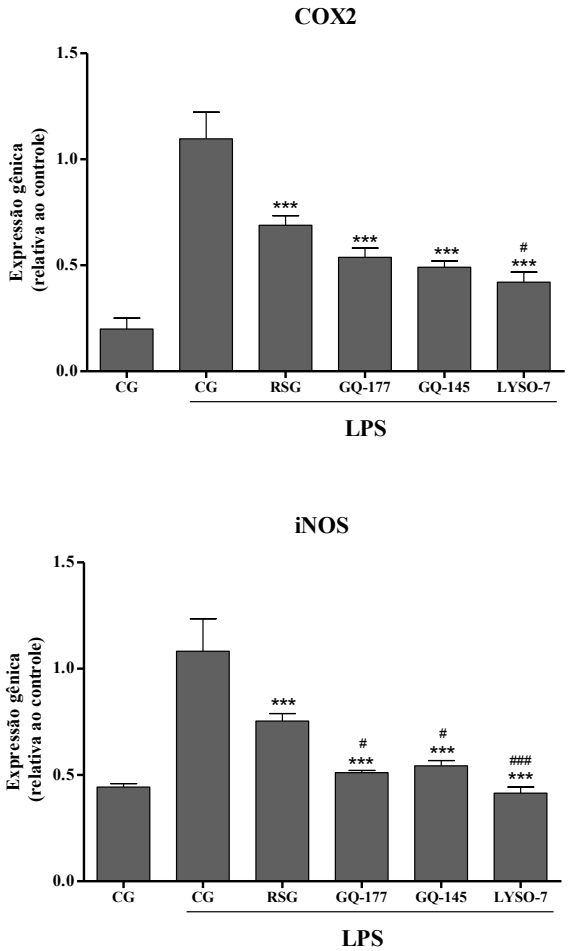

FIGURA 18: Efeito das TZDs sobre a expressão de genes pró-inflamatórios. Macrófagos RAW 264.7 foram estimulados com LPS (1 μg/ml) por 5h na ausência ou presence das TZDs (RSG, GQ-177, GQ-145, LYSO-7) na concentração 2μM. Em seguida, mRNA de iNOS e COX2 foi determinado por Real Time PCR quantitativo e normalizados com RNAm de 18S. Dados representam Média ± DP de dois experimentos independentes. **P<0.01, ***P<0.001 (comparado ao controle); # P<0.05 (comparado ao RSG). CG, grupo controle; LPS, lipopolissacarídeo, RSG, rosiglitazona.

Todas as TZDs reduziram significativamente a expressão de RNAm de VCAM, quando comparados ao controle, porém apenas a LYSO-7 diminuiu significativamente a expressão de MCP-1 (FIGURA 19). Nenhum deles promoveu redução na expressão gênica de IL-6, conforme observado com a RSG como controle positivo (FIGURA 19).

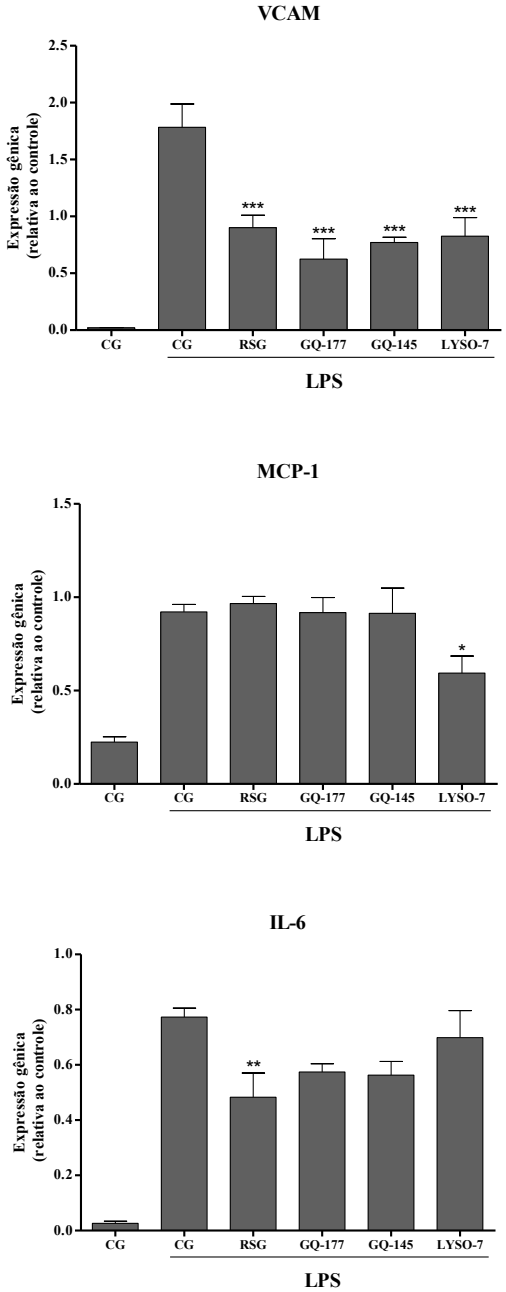

FIGURA 19: Efeito das TZDs sobre a expressão de genes pró-inflamatórios. Macrófagos RAW 264.7 foram estimulados com LPS (1 µg/ml) por 5h na ausência ou presence das TZDs (RSG, GQ-177, GQ-145, LYSO-7) na concentração 2µM. Em seguida, mRNA de VCAM, IL-6 e MCP1 foi determinado por Real Time PCR quantitativo e normalizados com RNAm de 18S. Dados representam Média ± DP de dois experimentos independentes. * P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (comparado ao controle). CG, grupo controle; LPS, lipopolissacarídeo, RSG, rosiglitazona.

Devido aos resultados acima descritos, a concentração de nitritos mensurada no sobrenadante celular, induzida por LPS e INFγ, também foi determinada. A GQ-177 e a GQ-145 induziram uma redução significante deste parâmetro, ente as concentrações 1,25 e 2,5 μM, quando comparadas ao grupo controle exposto ao estímulo inflamatório. A LYSO-7 também apresentou uma tendência em diminuir esse mesmo índice, na concentração de 5,0 μM, em relação ao mesmo grupo (FIGURA 20).

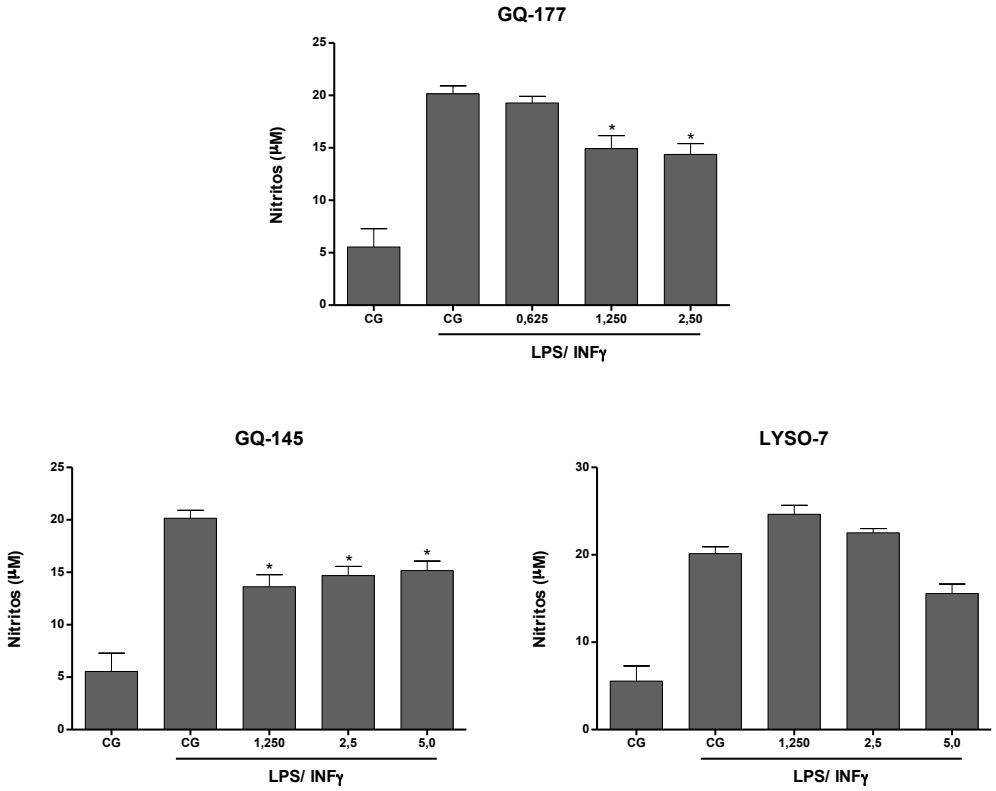

FIGURA 20: Efeito das TZDs sobre a concentração de nitritos mensurada no sobrenadante celular. Macrófagos RAW 264.7 foram incubados com as TZDs (GQ-177, GQ-145, LYSO-7), entre as concentrações 0,625 e 5μM, por 20 hs, com posterior exposição aos estímulos inflamatórios LPS (1μg/mL) e INF γ (0,5 UI), por 24 hs adicionais. Os níveis de nitritos foram determinados por Reação de Griess. Dados estão expressos como média ± SD. *P<0.05 (comparado ao CG estimulado com LPS/INFγ). CG, grupo controle; INFγ, interferon γ; LPS, lipopolissacarídeo.

Em virtude dos resultados *in vitro*, os novos derivados tiazolidínicos GQ-177, GQ-145 e LYSO-7 foram eleitos para avaliação *in vivo*. Para isso, os animais foram divididos em 6 grupos: **Controle** - tratados com veículo CMC-NA 0.25%; **RSG** (15mg/kg/dia); **IND** (1 mg/kg/dia); **GQ-177** (20mg/kg/dia); **GQ-145** (20mg/kg/dia); e **LYSO-7** (20mg/kg/dia). Eles foram alimentados com dieta hipercolesterolêmica por 16 semanas e tratados com os compostos por gavagem durante as últimas 4 semanas, sem interrupção da dieta.

Para investigar possíveis mecanismos que expliquem os efeitos antiaterogênicos dos novos derivados em camundongos LDLr$^{-/-}$, o peso corporal, o perfil lipídico e as aminotransferases hepáticas foram avaliadas nos grupos controle e tratados. Quanto ao peso corporal nenhuma diferença significante foi encontrada (FIGURA 21).

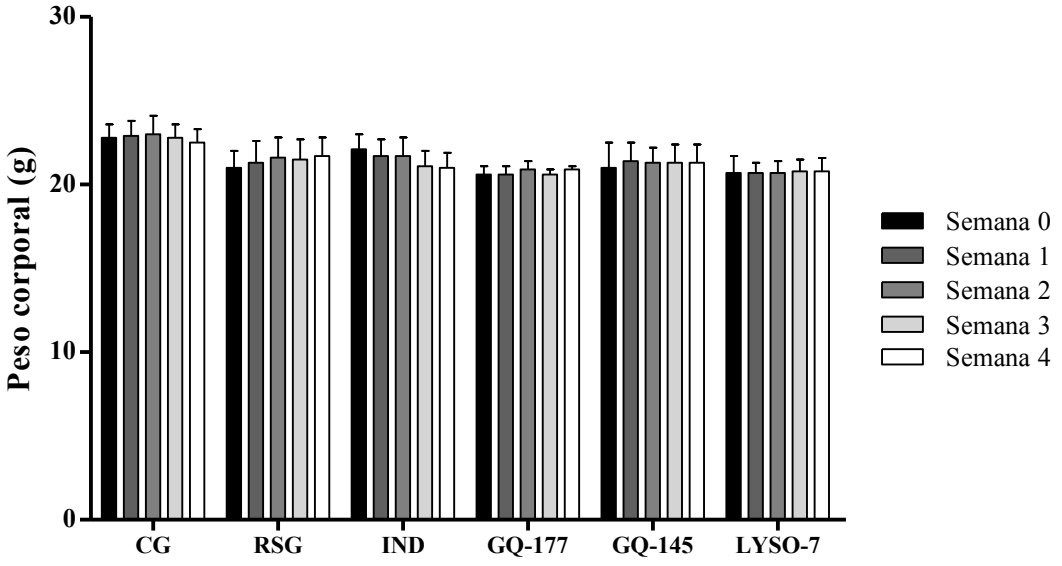

FIGURA 21: Efeito do tratamento de camundongos LDLr$^{-/-}$ com novos derivados tiazolidínicos (GQ-177, GQ-145, LYSO-7) sobre o peso corporal. Todos os grupos apresentavam um número de 7 animais.Valores expressos como média. CG, grupo controle; IND, indometacina; RSG rosiglitazona.

Comparado ao grupo controle, o tratamento com GQ-177 significativamente reduziu as concentrações plasmáticas de glicose assim como aumentou as concentrações de HDL-C. Por outro lado, o tratamento com LYSO-7 significativamente diminuiu as concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total e triglicerídeos. A GQ-145 não modificou o perfil lipídico, porém foi o único derivado a reduzir significativamente as concentrações plasmáticas de ALT e AST, semelhante à RSG (TABELA 4).

TABELA 4: Concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total (CT), HDL colesterol (HDL-C), triglicerídeos (TG), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em camundongos $LDLr^{-/-}$ alimentados com dieta hipercolesterolêmica e tratados com TZDs (RSG, GQ-177, GQ-145 e LYSO-7) e IND (antiinflamatório). CG, grupo controle; IND, indometacina; RSG rosiglitazona.

	CG (N=7)	**RSG (N=7)**	**IND (N=7)**	**GQ-177 (N=7)**	**GQ-145 (N=7)**	**LYSO-7 (N=7)**
Glicose (mg/dL)	104,2 ± 15,6	92,0 ± 9,1	85,5 ± 7,2	83,2 ± 4,5*	89,3 ± 6,4	80,4 ± 8,0**
CT (mg/dL)	1367,5 ± 181,6	1350,0 ± 148,7	712,8 ± 87,5***	1258,3 ± 76,2	1272,2 ± 98,9	1012,8 ± 236,2***
HDL-C (mg/dL)	19,6 ± 1,5	24,3 ± 2,8	27,3 ± 5,7	31,6 ± 2,3*	24,2 ± 3,8	19,7 ± 6,2
TG (mg/dL)	223,7 ± 40,3	221,0 ± 31,4	185,0 ± 18,5*	220 ± 24,4	242,5 ± 31,5	176,2 ± 33,7*
AST (U/L)	415,7 ± 95,0	247,1 ± 40,2**	325,0 ± 98,3	343,3 ± 58,1	195,7 ± 25,0**	331,2 ± 151,0
ALT (U/L)	227,8 ± 82,0	121,4 ± 24,1**	151,6 ± 47,5*	183,3 ± 43,6	104,2 ± 11,3**	196,2 ± 85,6

Dados são expressos como Média ± Desvio Padrão.

*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; em relação ao controle.

A avaliação histológica das lesões revelou que a GQ-177, GQ-145 e LYSO-7 diminuiu significativamente o desenvolvimento de lesão aterosclerótica em 29.29%, 20.35% e 18.82%, respectivamente, em relação ao controle. A rosiglitazona (RSG) reduziu em 19.30%, enquanto a indometacina (IND) em 32.68% (FIGURA 22 e 23).

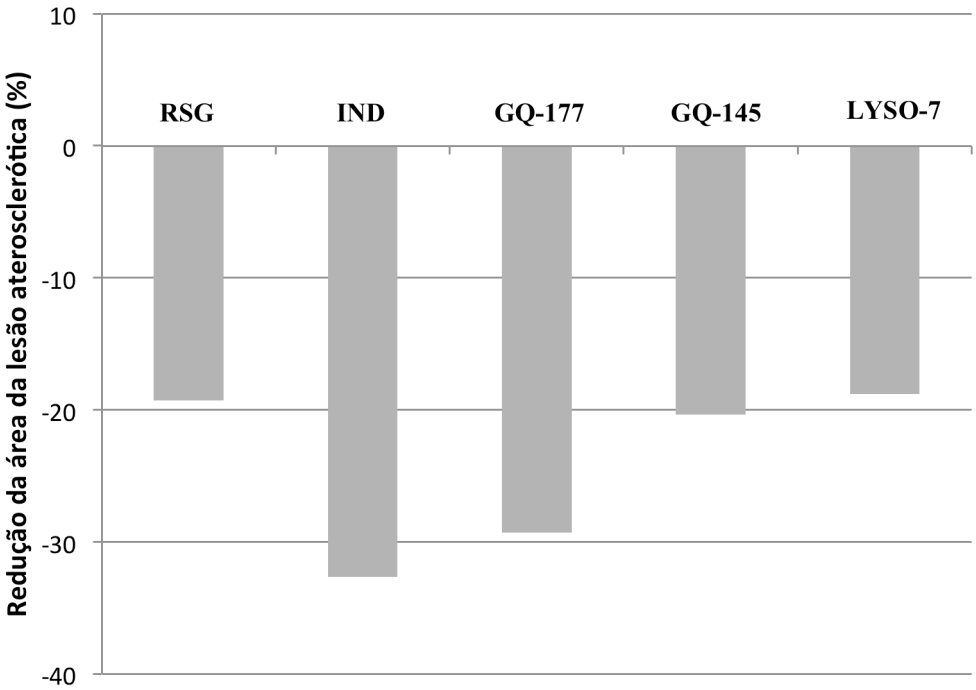

FIGURA 22: Redução das áreas da lesão aterosclerótica em animais hipercolesterolêmicos tratados com as TZDs (RSG, GQ-177, GQ-145, LYSO-7) e IND. Todos os grupos apresentavam um número de 7 animais. Os valores estão apresentados em porcentagem e foram estabelecidos em relação ao grupo controle. IND, indometacina; RSG

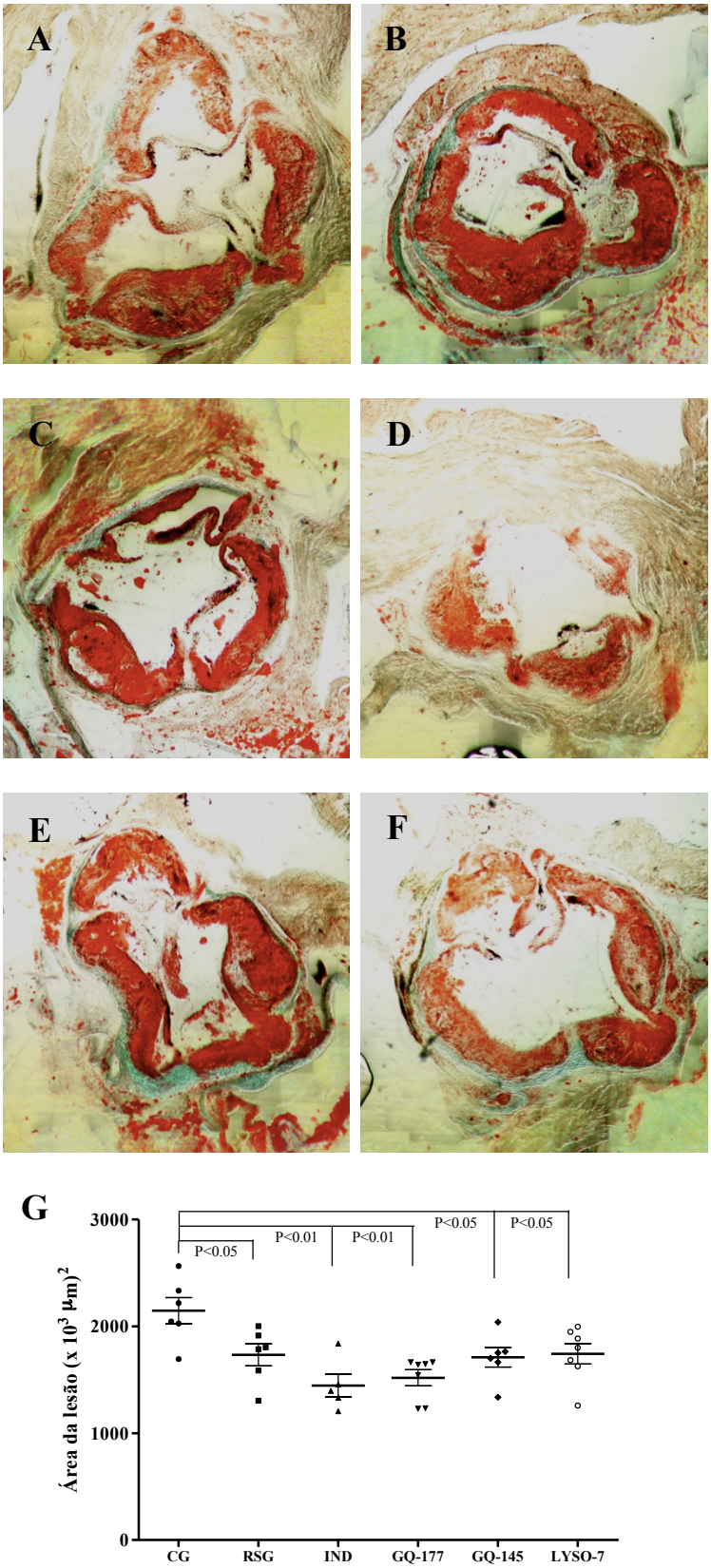

FIGURA 23: Análise morfométrica da área das lesões ateroscleróticas da aorta ascendente de camundongos LDLr$^{-/-}$ alimentados com dieta hipercolesterolêmica. Todos os animais foram submetidos à dieta por 4 meses, recebendo durante as últimas 4 semanas o tratamento com a RSG(B), IND (C), GQ-177 (D), GQ-145 (E) e LYSO-7 (F) por via oral. Imagens representativas dos cortes histológicos, aumento de 10X. Gráfico (G) representativo das áreas de lesão. Todos os grupos possuíam um número de 7 animais. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. CG, grupo controle; IND, indometacina; RSG rosiglitazona.

Para investigar como os novos derivados tiazolidínicos atenuam a progressão da lesão aterosclerótica, o padrão de expressão gênica na parede arterial foi avaliado. A GQ-177 e a GQ-145 significativamente elevaram a expressão de RNAm de PPARγ, (FIGURA 24). Além disso, a GQ-177 aumentou significativamente a expressão gênica de CD36, ABCA1, VCAM e IL-1α, enquanto que a GQ-145 elevou significativamente o RNAm de todos os genes avaliados (FIGURAS 24-26). Por outro lado, a LYSO-7 apresentou um perfil semelhante ao controle ou uma tendência em diminuir a expressão gênica de PECAM, MCP-1, IL-6, IL-1α e IL-1β (FIGURAS 25 e 26).

Alguns dos genes investigados anteriormente também foram avaliados quanto a sua expressão no *sinus* aórtico da lesão aterosclerótica. Nestes estudos, os animais tratados com GQ-177 demonstraram uma significante redução na expressão de CD36, CD40 e CD40L, assim como apresentaram uma tendência em diminuir VCAM e em aumentar ABCA1 (FIGURAS 27-31). A GQ-145 apenas atenuou significativamente a expressão de CD40, mas, por outro lado, elevou a expressão de VCAM (FIGURAS 29 e 31). E, o tratamento com LYSO-7 reduziu significativamente a expressão de CD40 e seu ligante, porém também promoveu um aumento em VCAM (FIGURAS 29-31).

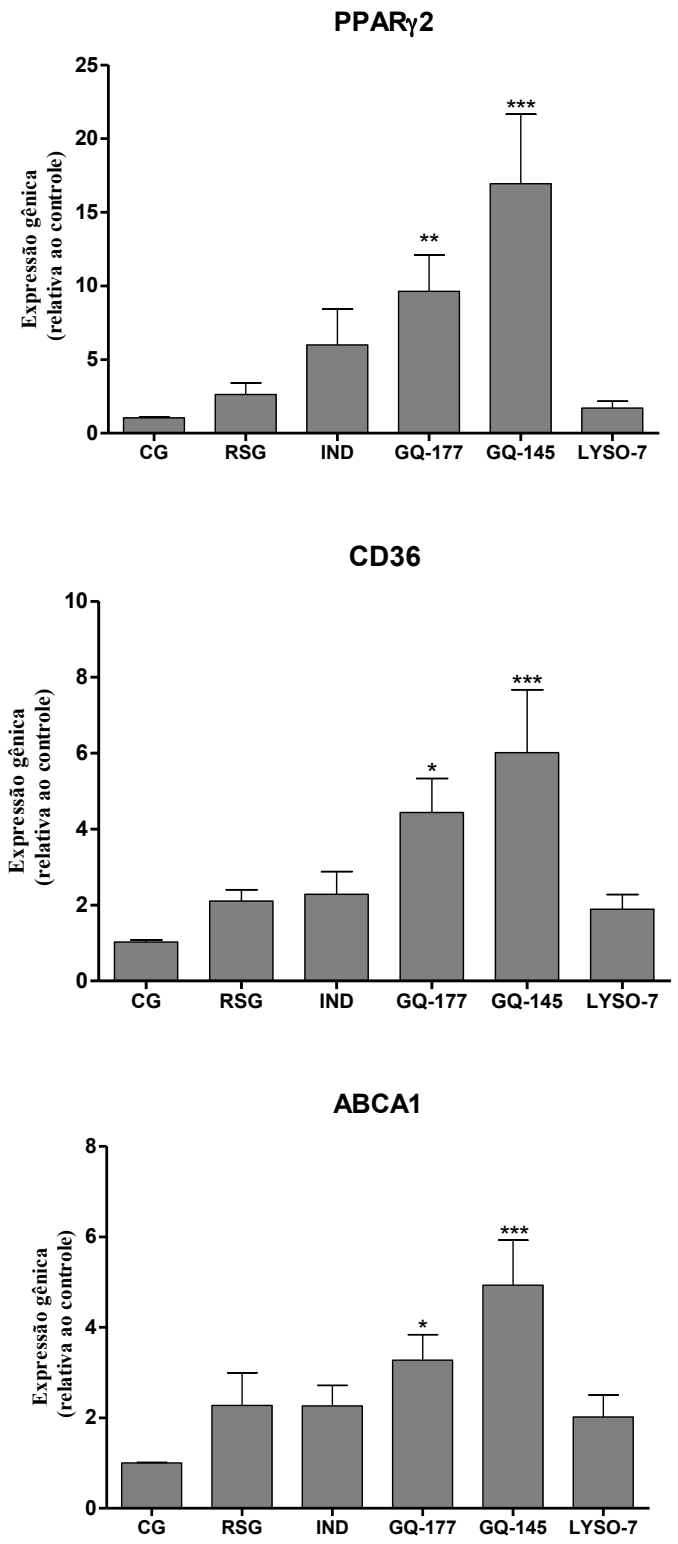

FIGURA 24: Expressão gênica nas lesões ateroscleróticas de camundongos LDLr$^{-/-}$ alimentados com dieta hipercolesterolêmica. Todos os animais foram submetidos a dieta por 4 meses, recebendo durante os últimos 28 dias tratamento com as TZDs (RSG, GQ-177, GQ-145, LYSO-7) e IND (indometacina) por via oral. Após eutanásia, as porções superiores dos corações foram removidas para extração do mRNA e quantificação por Real Time PCR dos genes PPARγ, CD36 e ABCA1. Os resultados foram normalizados com RNAm de 18S. Todos os grupos possuiam um número de 7 animais. Dados representam Média ± DP. *P<0.05, ***P<0.001 (comparado ao controle). CG, grupo controle; IND, indometacina; RSG rosiglitazona.

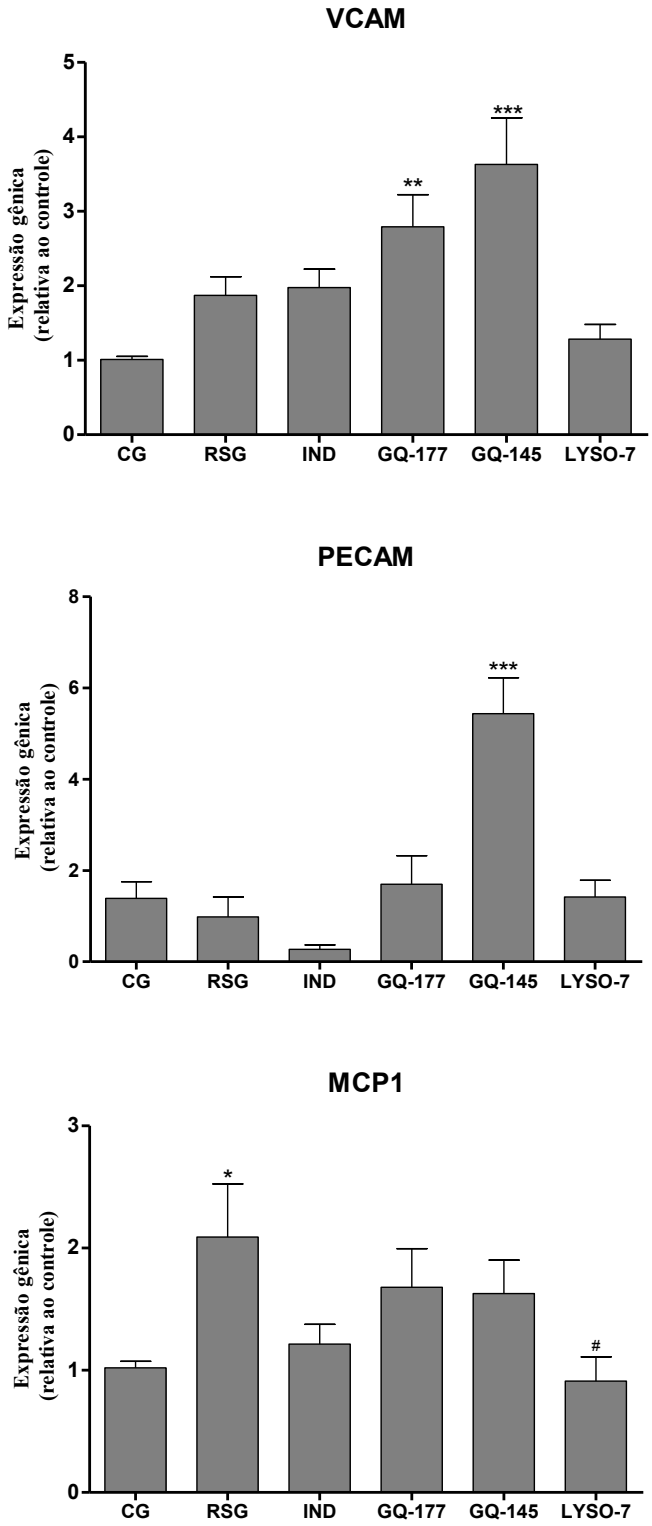

FIGURA 25: Expressão gênica nas lesões ateroscleróticas de camundongos LDLr$^{-/-}$ alimentados com dieta hipercolesterolêmica. Todos os animais foram submetidos a dieta por 4 meses, recebendo durante os últimos 28 dias tratamento com as TZDs (RSG, GQ-177, GQ-145, LYSO-7) e IND (indometacina) por via oral. Após eutanásia, as porções superiores dos corações foram removidas para extração do mRNA e quantificação por Real Time PCR dos genes VCAM, PECAM e MCP1. Os resultados foram normalizados com RNAm de 18S. Todos os grupos possuíam um número de 7 animais. Dados representam Média ± DP. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (comparado ao controle); $^{\#}$P<0.05 (comparado a RSG). CG, grupo controle; IND, indometacina; RSG rosiglitazona.

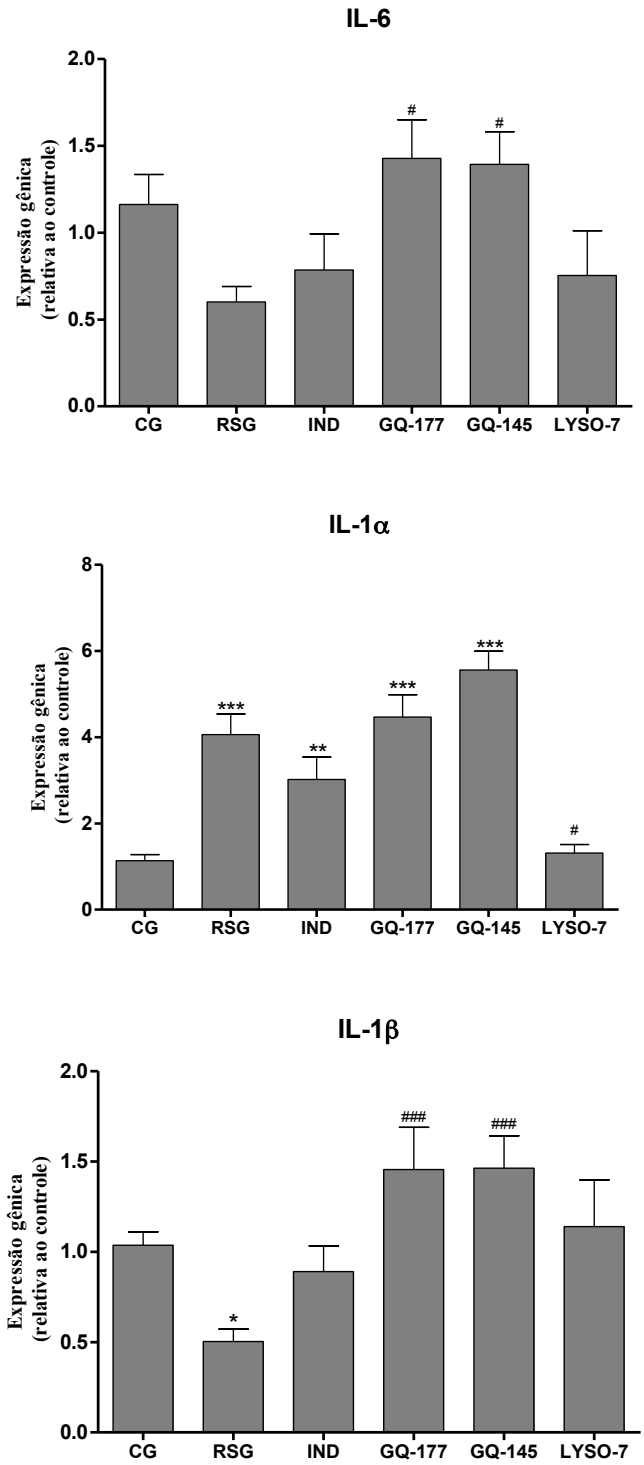

FIGURA 26: Expressão gênica nas lesões ateroscleróticas de camundongos LDLr$^{-/-}$ alimentados com dieta hipercolesterolêmica. Todos os animais foram submetidos a dieta por 4 meses, recebendo durante os últimos 28 dias tratamento com as TZDs (RSG, GQ-177, GQ-145, LYSO-7) e IND (indometacina) por via oral. Após eutanásia, as porções superiores dos corações foram removidas para extração do mRNA e quantificação por Real Time PCR dos genes IL-6, IL-1α E IL-1β. Os resultados foram normalizados com RNAm de 18S. Todos os grupos possuíam um número de 7 animais. Dados representam Média ± DP. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (comparado ao controle); $^{\#}$P<0.05, $^{\#\#}$P<0.001 (comparado a RSG). CG, grupo controle; IND, indometacina; RSG rosiglitazona.

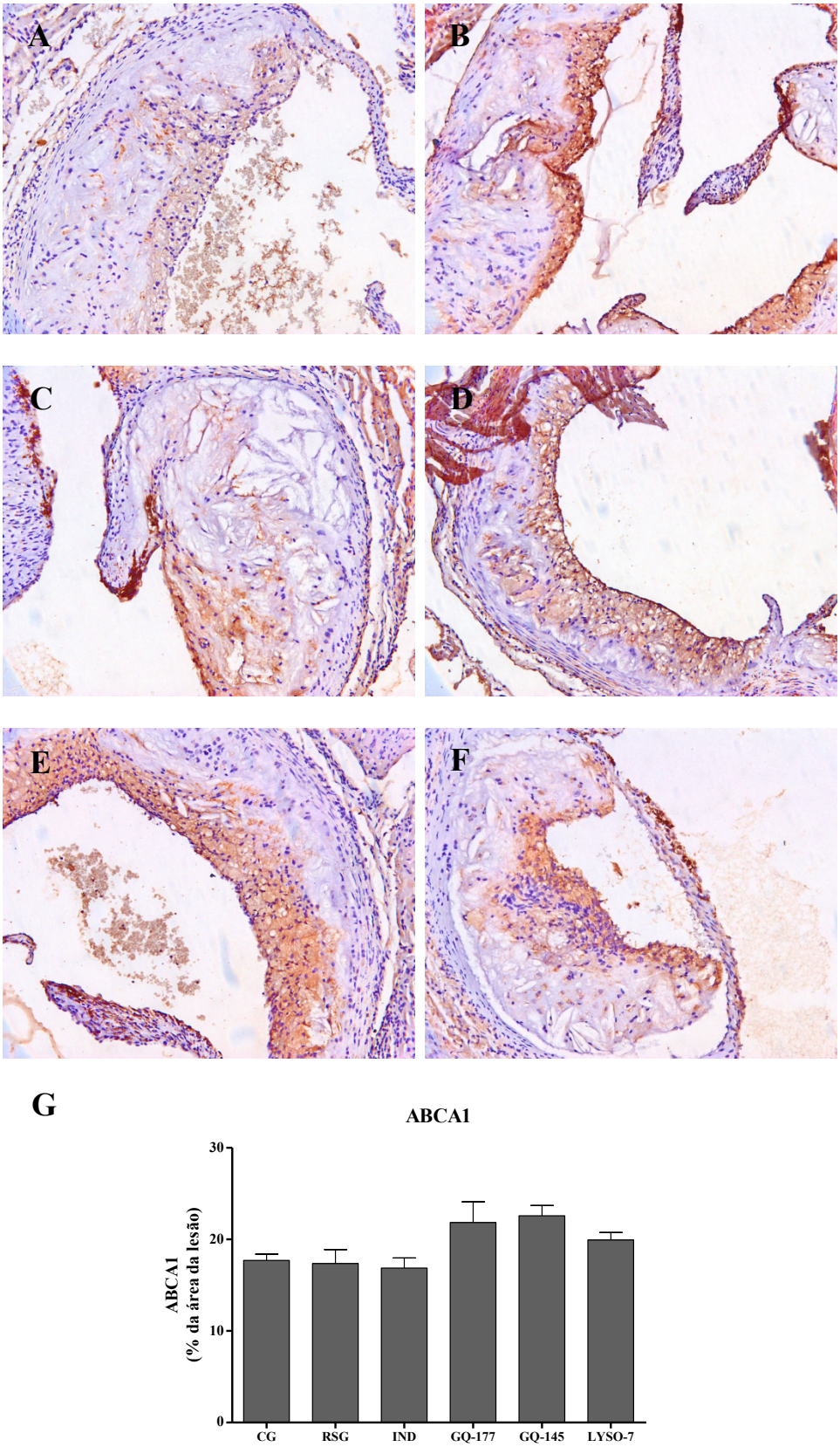

FIGURA 27: Análise quantitativa da expressão de ABCA1 em lesões ateroscleróticas da aorta ascendente de camundongos LDLr$^{-/-}$ alimentados com dieta hipercolesterolêmica. Todos os animais foram submetidos à dieta por 4 meses, recebendo durante as últimas 4 semanas o tratamento com RSG(B), IND (C), GQ-177 (D), GQ-145 (E) e LYSO-7 (F) por via oral. Imagens representativas dos cortes histológicos, aumento de 20X. Gráfico (G) representativo das áreas de lesão. Todos os grupos possuíam um número de 7 animais. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. CG, grupo controle; IND, indometacina; RSG rosiglitazona.

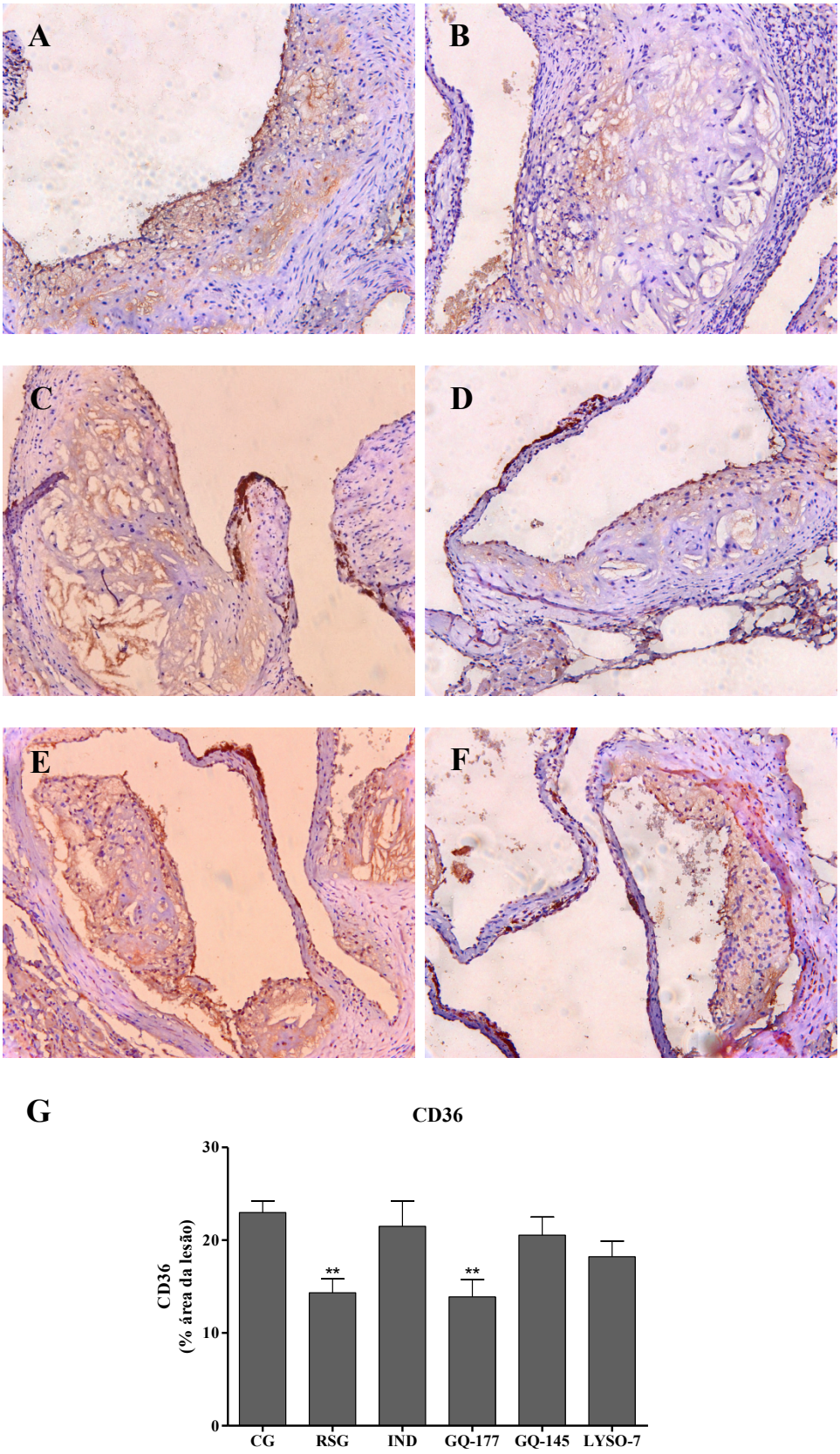

FIGURA 28: Análise quantitativa da expressão de CD36 em lesões ateroscleróticas da aorta ascendente de camundongos LDLr$^{-/-}$ alimentados com dieta hipercolesterolêmica. Todos os animais foram submetidos à dieta por 4 meses, recebendo durante as últimas 4 semanas o tratamento com RSG(B), IND (C), GQ-177 (D), GQ-145 (E) e LYSO-7 (F) por via oral. Imagens representativas dos cortes histológicos, aumento de 20X. Gráfico (G) representativo das áreas de lesão. Todos os grupos possuíam um número de 7 animais. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. $^{**}P<0.01$ (em relação ao controle). CG, grupo controle; IND, indometacina; RSG rosiglitazona.

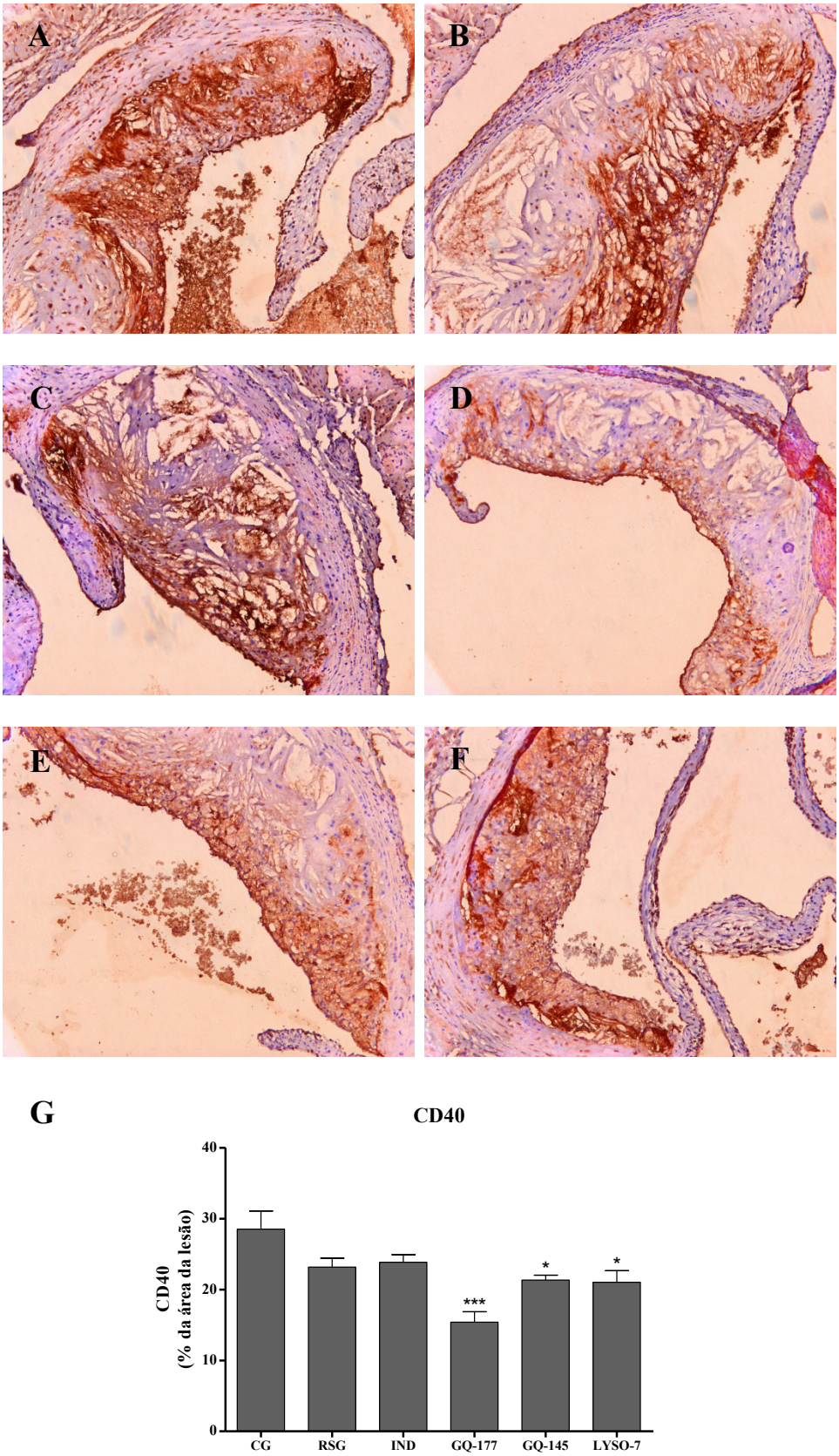

FIGURA 29: Análise quantitativa da expressão de CD40 em lesões ateroscleróticas da aorta ascendente de camundongos LDLr$^{-/-}$ alimentados com dieta hipercolesterolêmica. Todos os animais foram submetidos à dieta por 4 meses, recebendo durante as últimas 4 semanas o tratamento com RSG(B), IND (C), GQ-177 (D), GQ-145 (E) e LYSO-7 (F) por via oral. Imagens representativas dos cortes histológicos, aumento de 20X. Gráfico (G) representativo das áreas de lesão. Todos os grupos possuíam um número de 7 animais. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. $^{*}P<0.05$, $^{***}P<0.001$ (em relação ao controle). CG, grupo controle; IND, indometacina; RSG, rosiglitazona.

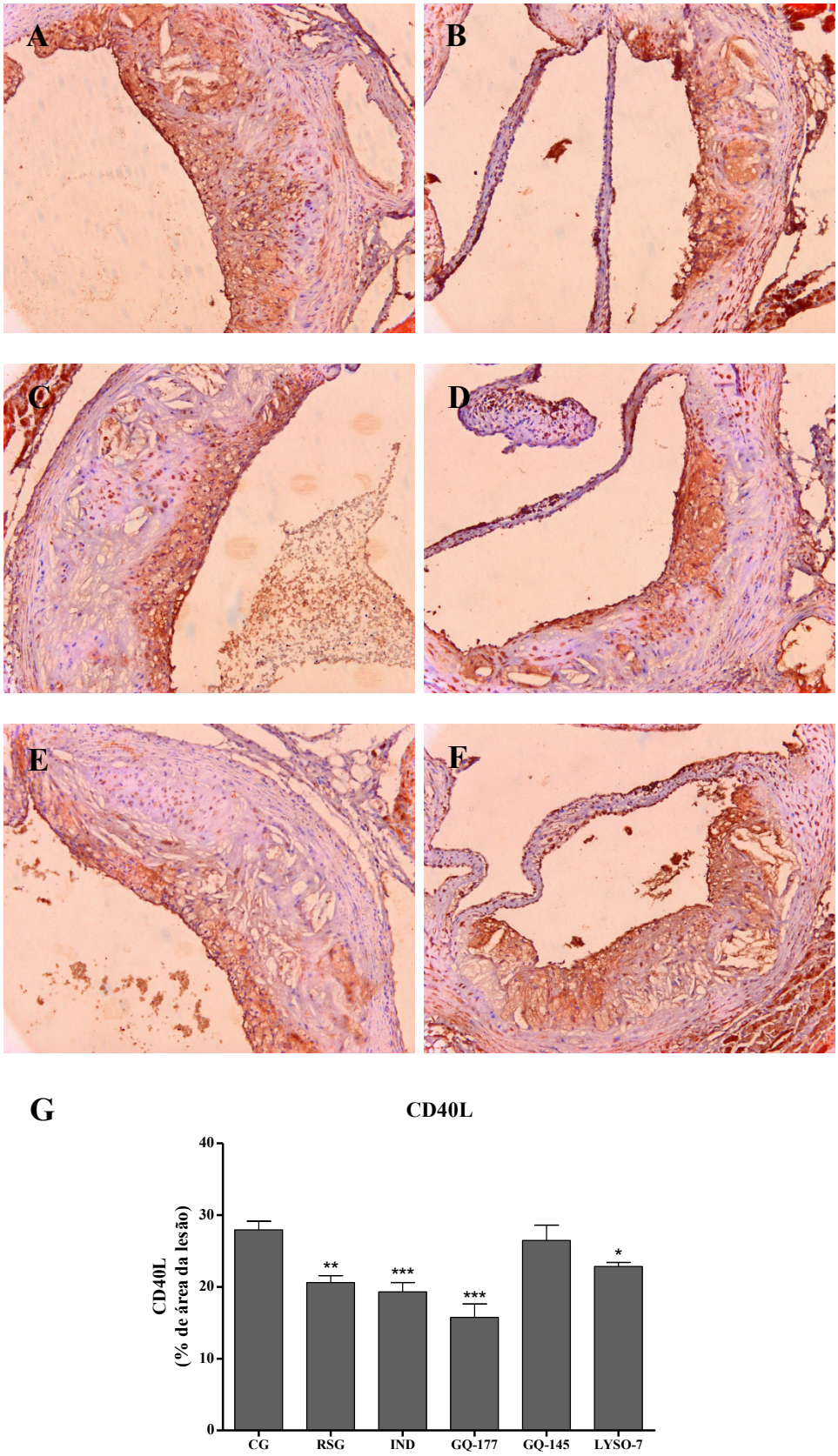

FIGURA 30: Análise quantitativa da expressão de CD40L em lesões ateroscleróticas da aorta ascendente de camundongos LDLr$^{-/-}$ alimentados com dieta hipercolesterolêmica. Todos os animais foram submetidos à dieta por 4 meses, recebendo durante as últimas 4 semanas o tratamento com RSG(B), IND (C), GQ-177 (D), GQ-145 (E) e LYSO-7 (F) por via oral. Imagens representativas dos cortes histológicos, aumento de 20X. Gráfico (G) representativo das áreas de lesão. Todos os grupos possuíam um número de 7 animais. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ (em relação ao controle). CG, grupo controle; IND,

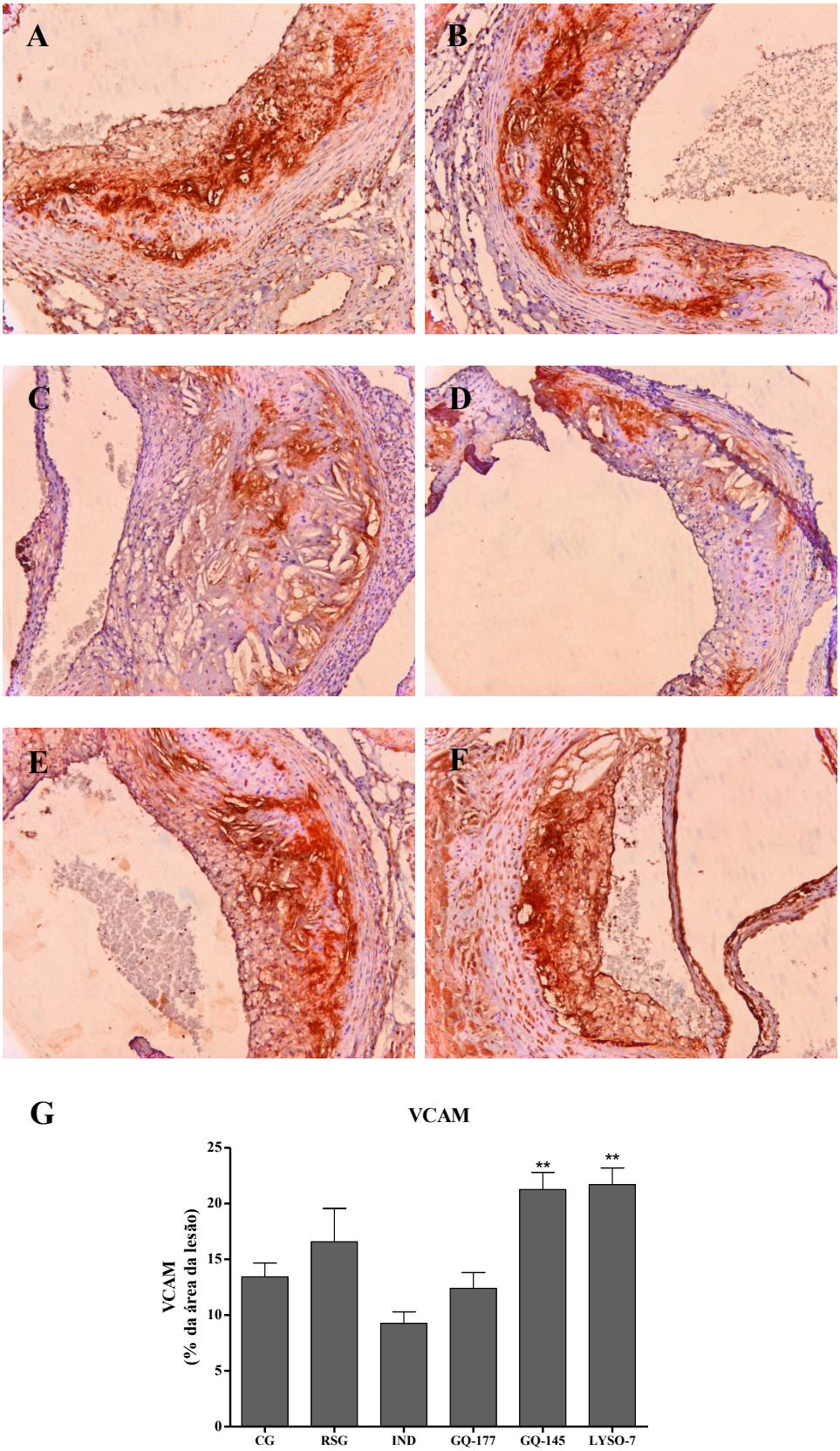

FIGURA 31: Análise quantitativa da expressão de VCAM em lesões ateroscleróticas da aorta ascendente de camundongos LDLr$^{-/-}$ alimentados com dieta hipercolesterolêmica. Todos os animais foram submetidos à dieta por 4 meses, recebendo durante as últimas 4 semanas o tratamento com RSG(B), IND (C), GQ-177 (D), GQ-145 (E) e LYSO-7 (F) por via oral. Imagens representativas dos cortes histológicos, aumento de 20X. Gráfico (G) representativo das áreas de lesão. Todos os grupos possuíam um número de 7 animais. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. $^{**}P<0.01$ (em relação ao controle). CG, grupo controle; IND, indometacina; RSG rosiglitazona

Visto que o novo derivado tiazolidínico GQ-177 elevou as concentrações plasmáticas de HDL colesterol em camundongos $LDLr^{-/-}$, assim como também aumentou a expressão gênica de ABCA1 e ABCG1 nas duas abordagens experimentais *in vitro* e *in vivo*, avaliou-se o efluxo de colesterol radioativo de macrófagos J774 para aceptores extracelulares Apo A-1 e HDL_2 após 8 e 24hs de exposição à nova TZD. Neste ensaio, a GQ-177 apenas aumentou significativamente o efluxo de colesterol mediado pela apo A-1 após 24 hs de tratamento (FIGURA 32). Por outro lado, o efluxo mediado pela HDL_2 mostrou-se significativamente elevado após 8 e 24hs de exposição ao novo derivado (FIGURA 33).

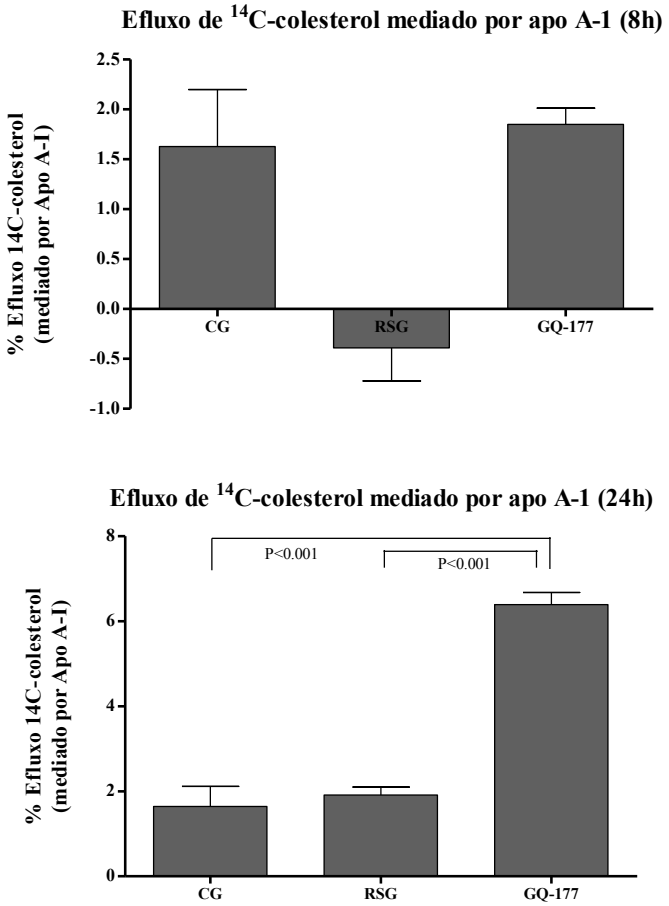

FIGURA 32: Efeito das TZDs sobre o efluxo de colesterol, mediado pela apo A-1, em macrófagos J774. As células foram primeiramente incubadas com LDL acetilada e ^{14}C-Colesterol, por 48 hs, sendo posteriormente expostas a RSG e a GQ-177, na concentração 2µM, por 8 ou 24 hs. Em seguida, elas foram incubadas com o aceptor apo A-1 por 8 hs, e então o colesterol radioativo foi mensurado no meio de cultura e nas células lisadas. Os dados são resultados de dois experimentos em triplicata, e estão expressos como média e desvio padrão. CG, grupo controle; RSG, rosiglitazona.

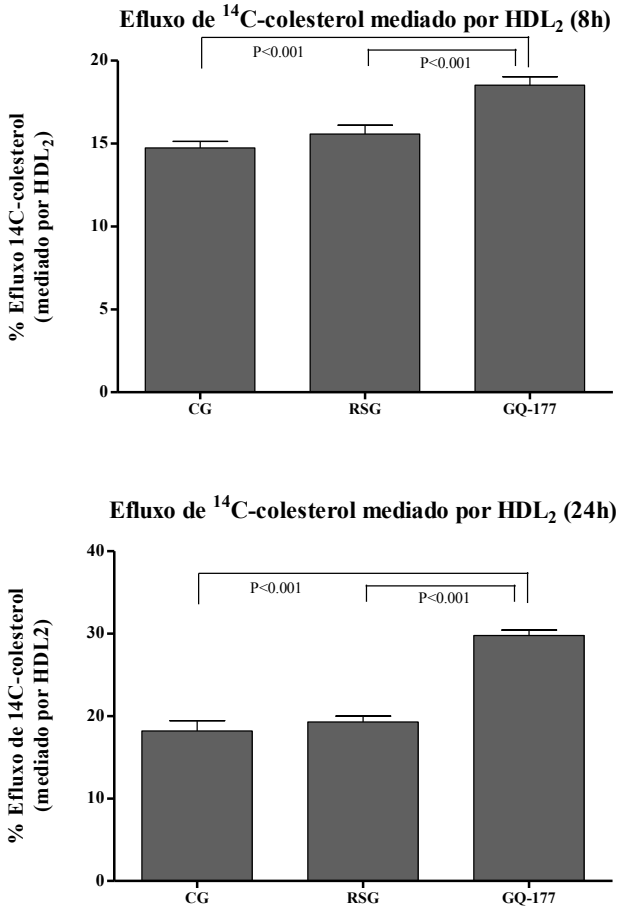

FIGURA 33: Efeito das TZDs sobre o efluxo de colesterol, mediado pela HDl_2, em macrófagos J774. As células foram primeiramente incubadas com LDL acetilada e ^{14}C-Colesterol, por 48 hs, sendo posteriormente expostas a RSG e a GQ-177, na concentração 2μM, por 8 ou 24 hs. Em seguida, elas foram incubadas com o aceptor HDL_2 por 8 hs, e então o colesterol radioativo foi mensurado no meio de cultura e nas células lisadas. Os dados são resultados de dois experimentos em triplicata, e estão expressos como média e desvio padrão. CG, grupo controle; RSG, rosiglitazona.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A relevância do PPARγ como um importante alvo terapêutico para o tratamento das DCVs cresce não apenas por seus efeitos hipoglicemiantes em pacientes diabéticos, mas também por seu papel crítico na regulação das funções cardiovasculares. Entretanto, o aparecimento de efeitos adversos, extensivamente documentados por estudos clínicos, dificulta a utilização dos agonistas completos de PPARγ e justifica a busca de outros agonistas totais ou parciais para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (VILLACORTA et al., 2010).

Neste estudo, inicialmente os novos compostos foram avaliados quanto à viabilidade em linhagens de macrófagos RAW 264.7 e J774 por ensaio de MTT, onde definiu-se a concentração de 2μM, como a mais segura, pois mais de 90% das células permaneceram viáveis após 24h de exposição aos compostos entre as concentrações 0,5 e 2,5μM. Este resultado foi confirmado pelo ensaio de anexina e iodedo de propídeo o qual demonstrou que, entre as concentrações 0.625 e 5.0μM, as células tratadas com os compostos GQ-177, GQ-145 e LYSO-7 apresentavam menos de 10% de morte celular.

Em seguida, esses três compostos foram avaliados quanto à ativação das três isoformas do receptor nuclear PPAR. Quanto à expressão gênica, todos eles aumentaram a de PPARγ, e surpreendentemente, a GQ-177 e a LYSO-7 produziram o mesmo efeito sobre o PPARα. Porém, quando foi avaliada a ativação das mesmas isoformas por ensaio de luciferase, como gene repórter, a GQ-177 confirmou-se como um agonista de PPARγ, em menor magnitude do que o agonista clássico rosiglitazona, mostrando-se um potencial agonista parcial desta isoforma, enquanto a LYSO-7 demonstrou ativar PPARα e PPARβ/δ, podendo ser um possível agonista dual.

Conforme anteriormente descrito, as TZDs são fármacos eficientes no tratamento da resistência à insulina que agem como agonistas de PPARγ. Entretanto, seus vários efeitos colaterais têm restringido o seu uso terapêutico, e atualmente acredita-se que o desenvolvimento de agonistas seletivos de PPAR possa contornar esses problemas. Entre as estratégias para o desenho de novos fármacos está a pesquisa por agonistas parciais de PPARγ, que apresentem afinidade suficiente pelo PPARγ para preservar seus efeitos sobre a sensibilização de insulina, porém incapazes de saturá-lo, diminuindo os efeitos adversos associados às TZDs (VILLACORTA et al., 2009). Eles têm sido coletivamente chamados de moduladores de PPARγ, e incluem metaglidasem, halofenato, leucina-FMOC e agonistas parciais não-TZDs (RUBENSTRUNK et al., 2007). Outra estratégia envolve o desenvolvimento de agonistas duais de PPAR, os quais induzem uma ação sinérgica e complementar sobre o metabolismo de lipídeos, sensibilidade à insulina e controle da inflamação reduzindo os efeitos adversos do PPARγ sobre a adiposidade (GROSS e STAELS, 2007). Os agonistas duais de PPARα/γ mais estudados são os glitazars, que combinam os efeitos sensibilizadores de insulina da ativação de PPARγ com os efeitos hipolipemiantes do PPARα, reduzindo as concentrações plasmáticas de triglicerídeos e aumentando as concentrações de HDL colesterol. Em modelos animais, estes compostos têm sido promissores, porém alguns estudos clínicos tiveram que ser descontinuados devido ao aparecimento de efeitos não esperados como anemia e câncer urotelial (FIEVET, FRUCHART e STAELS, 2006). Agonistas duais de PPARα/PPARδ, como o novo composto LYSO-7 avaliado neste estudo, ainda estão sob investigação (LALLOYER e STAELS, 2010).

Uma das características da ativação de PPARγ está em estimular a expressão do receptor *scavenger* CD36 em adipócitos e macrófagos (SUN et al., 2003). Este é uma glicoproteína de membrana integral com participação em diversas funções celulares

como captação de ácidos graxos de cadeia longa (LCFA) pelos adipócitos, e de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDLox) pelos macrófagos (PEDROSA et al., 2010), o que promove a formação de células espumosas e contribui para a aterogênese (NICHOLSON, 2004). Os três novos derivados tiazolidínicos aumentaram a expressão gênica de CD36, porém não alteraram a sua expressão na superfície dos macrófagos. Em um estudo anterior, Moore e colaboradores (2001) mostraram que os agonistas de PPARγ, troglitazona e LG268, podem aumentar expressão gênica CD36 de maneira dependente de PPARγ, sem induzir o acúmulo de colesterol celular, indicando que as TZDs podem não exacerbar a formação de células espumosas.

Em adição, os três derivados também aumentaram significativamente os níveis de RNAm de ABCA1 e ABCG1, quando comparadas ao controle. Esses transportadores fazem parte de uma grande família de proteínas envolvidas na exportação ou importação celular de uma ampla quantidade de substratos incluindo íons, nucleotídeos cíclicos, peptídeos, proteínas e lipídeos. ABCA1 e ABCG1 têm um papel crucial na mediação do efluxo celular de fosfolipídeos e colesterol para a apo A-I livre de lipídeos e lipoproteínas contendo apo A-I (CAVELIER et al., 2006). Estudos prévios têm relatado que ativação de PPARα ou PPARγ em macrófagos pode induzir a expressão de ABCA1, o que promoveria a saída de colesterol dos macrófagos arteriais para a HDL (CHINETTI et al., 2001; CHAWNLA et al., 2001).

Desde que o ABCA1 é regulado pelo receptor hepático X (LXR), alguns investigadores também demonstraram que a indução de expressão de LXRα por agonistas de PPARγ pode representar um mecanismo indireto de estímulo de ABCA1 (OGATA etal., 2009; CHAWNLA et al., 2001; CHINETTI et al., 1998). Entretanto, nenhum dos novos derivados ativou LXRα ou o seu domínio de ligação, demonstrando

que o aumento na expressão gênica de ABCA1 e ABCG1 pelos novos derivados é um efeito independente da ativação de LXR.

Os PPARs também reprimem a expressão de genes de resposta inflamatória por um mecanismo denominado transrepressão dependente de agonista. Este processo não envolve a ligação do receptor nuclear a região promotora do gene, mas aqui PPARγ opera por antagonizar a ativação dependente de sinal de seus genes alvo por outras classes de fatores de transcrição, os quais incluem as proteínas NF-κB e AP-1, reduzindo assim as vias de sinalização inflamatórias (STRAUSS e GLASS, 2007). Dessa forma os agonistas de PPARα e PPARγ inibem a expressão de genes inflamatórios, como iNOS, INFγ, IL-1β, IL-6 e TNF-α, que promovem o recrutamento de monócitos e células T dentro das lesões, e sua subsequente diferenciação e ativação (MARX et al., 2002; PASCERI et al., 2000). Com relação aos novos derivados tiazolídinicos, todos eles reduziram a expressão gênica de iNOS, COX2 e VCAM, porém apenas a LYSO-7 diminuiu a expressão de MCP-1. A expressão dessa proteína quimiotática também já mostrou ser inibida pela pioglitazona em monócitos e outros tipos celulares, reduzindo assim a proliferação e migração dessas células (DI GREGORIO et al., 2005).

Os efeitos das TZDs sobre o desenvolvimento de aterosclerose têm sido avaliado por vários grupos de pesquisa, utilizando para isso modelos experimentais seja em camundongos com deleção genética para o receptor de LDL (NAKAYA et al., 2009; HE et al., 2006; LI et al., 2004; COLLINS et al., 2001; LI et al., 2000) ou com deleção genética para apo E (CALKIN et al., 2005; CHEN et al., 2001; CLAUDEL et al., 2001). Todos eles possuem desenhos similares nos quais os camundongos são alimentados com uma dieta hiperlipídica na presença ou ausência dos compostos. Semelhante a estes, o presente estudo utilizou camundongos $LDLr^{-/-}$ alimentados com uma dieta rica em

colesterol por 16 semanas, e submetidos ao tratamento com os novos derivados tiazolidínicos, GQ-177, GQ-145 e LYSO-7, por gavagem durante as últimas 4 semanas. Rosiglitazona e indometacina foram utilizadas como controles positivos por serem um agonista clássico de PPARγ e um agente antiinflamatório, respectivamente.

Os três compostos reduziram significativamente a progressão da lesão aterosclerótica, quando comparados ao controle. Além disso, nos animais tratados com a GQ-177 esse efeito foi acompanhado por aumento nas concentrações plasmáticas de HDL colesterol, enquanto no tratamento com a LYSO-7 houve redução das concentrações plasmáticas de colesterol total e triglicerídeos. Em estudos clínicos, a rosiglitazona e a pioglitazona apresentam efeitos distintos sobre o perfil lipídico, enquanto a primeira aumenta as concentrações plasmáticas de colesterol total e LDL colesterol com redução das concentrações de HDL colesterol, a segunda pode elevar as concentrações plasmáticas de HDL colesterol, reduzir as concentrações de triglicerídeos com pouco ou nenhum efeito sobre as concentrações de colesterol total e LDL colesterol (DEEG et al., 2007). Em modelos experimentais, a rosiglitazona também não tem demonstrado nenhum efeito sobre o perfil de lipoproteínas (HE et al., 2006; LI et al., 2000), semelhante aos resultados apresentados por este estudo. Similarmente ao derivado LYSO-7, animais tratados com BHB-TZD, um inibidor dual de COX2 e 5-LOX, apresentaram lesões ateroscleróticas menores associadas a reduções nas concentrações plasmáticas de triglicerídeos (CHOI et al., 2010). Além disso, Nakaya e colaboradores (2009) observaram que a pioglitazona aumentava as concentrações plasmáticas de HDL colesterol durante o desenvolvimento de aterosclerose em camundongos $LDLr^{-/-}$ alimentados com uma dieta hiperlipídica por 14 semanas com suplementação com o fármaco nas últimas 6 semanas, protocolo semelhante ao usado neste estudo com a GQ-177.

De forma similar aos ensaios *in vitro*, GQ-177 e GQ-145 aumentaram expressão gênica de PPARγ, CD36, ABCA1 e VCAM, porém apenas as lesões dos animais tratados com o primeiro apresentaram menor expressão proteica de CD36 e VCAM assim como demonstraram maior expressão de ABCA1. Além disso, o tratamento com GQ-177 também diminuiu significativamente a expressão proteica de CD40 e seu ligante, CD40L. Lesões ateroscleróticas humanas expressam o mediador imunológico CD40 e seu ligante, e uma interação entre ambos estes mediadores participam proeminentemente na resposta imune humoral e celular (MACH et al., 1998). A via CD40-CD40L nas células associadas ao ateroma *in vitro* ativam funções relacionadas à aterogênese, incluindo indução de citocinas pro-inflamatórias, metaloproteinases de matrix, moléculas de adesão e fatores teciduais (MACH et al., 1998; SCHONBECK et al., 1997; KARMANN et al., 1995).

Estudo prévio demonstrou que o tratamento com o anticorpo anti-CD40L para camundongos limitou a aterosclerose em animais $LDLr^{-/-}$ alimentados com uma dieta rica em lipídeos por 12 semanas, e adicionalmente, a constituição do ateroma nascente continha menos macrófagos e linfócitos T, e exibia uma expressão reduzida de VCAM (MACH et al., 1998). Um outro estudo, em que camundongos apo $E^{-/-}$ receberam um adenovírus recombinante contendo um fragmento de cDNA de PPARγ, demonstrou que a terapia gênica atenuou a aterogênese, estabilizou a placa aterosclerótica e inibiu a expressão de CD40, CD40L, TNFα, MCP-1, VCAM, SR A e MMP-9 (HU et al., 2008). No presente estudo, apenas o tratamento com a GQ-177 promoveu o aumento da expressão gênica de PPARγ acompanhado por inibição da interação entre CD40 e seu ligante, e consequente interrupção no aumento da expressão proteica de VCAM, pois os derivados GQ-145 e LYSO-7 promoveram um aumento significante na expressão gênica e proteica desta molécula de adesão.

Por outro lado, o tratamento com a LYSO-7 também interrompeu a via de sinalização CD40-CD40L, o pode ter influenciado a tendência em reduzir a expressão gênica de MCP-1, IL-6, IL-1α e IL-1β, produzida por este composto. Inclusive, o perfil de expressão gênica das lesões ateroscleróticas de animais tratados com a LYSO-7 mostrou-se similar ao perfil da indometacina em todos os genes avaliados. Este efeito pode ser explicado pela LYSO-7 promover ativação de PPARα, conforme descrito nos ensaios *in vitro*, pois esta isoforma de PPAR foi primeiramente proposta ser uma moduladora de inflamação desde que o leucotrieno B4, um potente agente inflamatório, seria um ligante e agonista para este receptor. Posteriormente, Staels e colaboradores (1998) relataram que agonistas de PPARα inibiam ativação de células musculares lisas aórticas em resposta a estímulos inflamatórios por reprimir a sinalização de NF-κB. Além disso, o tratamento com fenofibrato também diminuiu as concentrações plasmáticas de IL-6, em pacientes hiperlipidêmicos (BERGER e MOLLER, 2002). Os fibratos, como agonistas de PPARα, também possuem funções como redutores de triglicerídeos, relacionadas à síntese diminuída e catabolismo aumentado das partículas de VLDL (LALLOYER e STAELS 2010), o que também poderia justificar a redução nas concentrações plasmáticas de triglicerídeos promovida apenas pelo tratamento com a LYSO-7.

Quanto a GQ-145, esta reduziu significativamente a progressão da lesão aterosclerótica, porém não alterou o perfil lipídico e elevou a expressão gênica de todos os marcadores pró-ateroscleróticos e pró-inflamatórios analisados nas lesões ateroscleróticas. Novos alvos terapêuticos e mecanismos de ação deverão ser investigados para esta TZD.

Apesar dos estudos prévios em linhagens celulares demonstrarem que os novos compostos reduziam a expressão gênica de fatores inflamatórios, esse efeito não foi

observado na análise dos genes expressos nas lesões ateroscleróticas, como IL-6, IL-1α e IL-1β, especialmente em animais tratados com a GQ-177. Esse resultado pode refletir a heterogeneidade celular da lesão aterosclerótica analisada no *sinus* aórtico, de onde o RNA foi isolado para análise.

Uma vez que o derivado GQ-177 foi o único que promoveu aumento nas concentrações plasmáticas de HDL colesterol associado a redução da progressão da lesão aterosclerótica, aumento na expressão de ABCA1 e redução de CD36, VCAM e CD40-CD40L em modelo experimental de aterosclerose, além de também ter elevado a expressão de ABCA1 e ABCG1 em linhagens de macrófagos, o efluxo de colesterol celular dos macrófagos mediado pelas apo A-1 e HDL_2, também foi avaliado para este composto. Os resultados demonstraram que a GQ-177 realmente participa do processo de transporte reverso de colesterol, estimulando a saída de colesterol da célula para o meio de cultura pelos dois mediadores, mas em especial pela HDL_2 logo após 8h de exposição.

O efluxo de colesterol mediado pela HDL e suas apolipoproteínas é um processo crucial na regulação da homeostasia do colesterol do organismo, sendo um importante alvo terapêutico para a prevenção e reversão da aterosclerose. Diferentemente da maioria das células do organismo, as quais limitam a captação e síntese de colesterol por regular a expressão do receptor de LDL e a HMG-CoA redutase, os macrófagos podem acumular grandes quantidades de colesterol pela captação descontrolada via receptor *scavenger*. Os ésteres de colesterol são estocados, intracelularmente, como gotículas de lipídeos citosólicos, em um processo que transforma os macrófagos em células espumosas ativadas, as quais produzem fatores de crescimento, citocinas e proteases que influenciam a progressão da aterosclerose. Portanto, o efluxo é o único mecanismo pelo qual os macrófagos podem limitar ou reverter o acúmulo de colesterol

celular (VON EKCARDSTEIN, HERSBERGER e ROHRER, 2005).

Neste processo, a captação de LDL oxidada pelos macrófagos introduz colesterol na célula, gerando óxidos de colesterol os quais por serem ligantes naturais de LXR, estimulam a formação de heterodímeros LXR/RXR e a transcrição gênica de ABCA1 e ABCG1. O ABCA1 facilita o transporte de fosfolipídeos e colesterol para a apo A-1 da pré-β-HDL, pobre em lipídeos e em formato discoide. Pela ação da LCAT, este colesterol é esterificado, e essa partícula é convertida em HDL esférica (HDL_3), a qual troca colesterol esterificado por triglicerídeos de lipoproteínas contendo apo B, em uma troca mediada pela CETP, originando a HDL_2. Esta partícula também é incorporadora de mais colesterol por interações adicionais com o transportador ABCG1, nos macrófagos, e posteriormente, ela transporta os ésteres de colesterol para os receptores SR BI no fígado (QUINTÃO, NAKANDAKARE e PASSARELLI, 2011). Na ausência de transportadores ABCA1 ou ABCG1, os macrófagos acumulam ésteres de colesterol massivamente em seu citoplasma, evidenciando a importância fisiológica do efluxo de colesterol para a homeostasia do colesterol nos macrófagos (CAVELIER et al., 2006).

Entretanto, a GQ-177 não promoveu ativação de LXRα e de seu domínio de ligação, demonstrando que seus efeitos sobre o efluxo de colesterol dos macrófagos e sobre a expressão gênica de ABCA1 e ABCG1 foram independentes deste fator de transcrição. Li e colaboradores (2004) observaram que a ativação de PPARγ pela rosiglitazona, em macrófagos com deleção genética para o gene de LXR, reduzia a esterificação de colesterol, induzia expressão de ABCG1 e estimulava o efluxo de colesterol dependente de HDL. Portanto, a GQ-177, como um agonista de PPARγ, poderia aumentar o efluxo de colesterol através de ABCG1, mediado pela HDL_2, mesmo de forma independente de LXR.

Em conclusão, os novos derivados tiazolidínicos GQ-177 e LYSO-7 apresentaram diferentes efeitos sobre o desenvolvimento da aterosclerose. O derivado GQ-177 demonstrou ser um possível agonista parcial de PPARγ que aumentou a expressão gênica de CD36, ABCA1 e ABCG1, promoveu efluxo de colesterol para apo A-1 e HDL_2, e reduziu expressão de genes inflamatórios como iNOS, COX2 e VCAM em linhagens monocíticas, assim como também inibiu a progressão da placa aterosclerótica associada a elevadas concentrações plasmáticas de HDL colesterol, com aumento na expressão de ABCA1 e redução da interação CD40-CD40L, em modelo de aterosclerose experimental. Por outro lado, o derivado LYSO-7 mostrou ser um potencial agonista dual de PPARα/PPARδ que promoveu elevação na expressão gênica de CD36, ABCA1 e ABCG1 e redução da expressão de genes inflamatórios como iNOS, COX2, VCAM e MCP1 em macrófagos, assim como também apresentou uma inibição da aterogênese acompanhada por diminuição nas concentrações plasmáticas de colesterol total e triglicerídeos, com redução na via CD40-CD40L e expressão de citocinas inflamatórias. Entretanto, estudos adicionais não necessários com o objetivo de caracterizar as vias de sinalização intracelular envolvidas no transporte reverso de colesterol e atividade antiinflamatória promovida pelas GQ-177 e LYSO-7, respectivamente.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- Ensaios *in vitro* utilizando linhagens de macrófagos murinos J774 e RAW 264.7 tratados com as novas tiazolidino-2,4-dionas:
  - A concentração de 2μM foi eleita a mais segura para dar seguimento ao projeto, pois mais de 90% das células permaneceram viáveis após 24h de exposição aos compostos entre as concentrações 0,5 e 2,5μM;
  - As tiazolidino-2,4-dionas GQ-177, GQ-145 e LYSO-7 estimularam a expressão gênica de PPARγ, sendo que a GQ-177 e a LYSO-7 também estimularam expressão do RNAm de PPARα;
  - As tiazolidino-2,4-dionas GQ-177, GQ-145 e LYSO-7 aumentaram expressão gênica de CD36, porém não promoveram o mesmo efeito sobre a sua expressão na superfície do macrófago;
  - As tiazolidino-2,4-dionas GQ-177, GQ-145 e LYSO-7 reduziram expressão gênica de iNOS, COX2 e VCAM, assim como diminuíram a concentração de nitritos no meio de cultura após estímulo inflamatório com LPS, no entanto, apenas a LYSO-7 inibiu a expressão gênica de MCP-1;
  - As tiazolidino-2,4-dionas GQ-177, GQ-145 e LYSO-7 elevaram a expressão gênica de ABCA1 e ABCG1, mas apenas a GQ-177 aumentou o efluxo de colesterol em macrófagos, mediado por apo A-1 e HDL_2, especialmente pelo último.

- Ensaios *in vitro* com células embrionárias humanas de rim (HEK 293):
  - A GQ-177 promoveu ativação de PPARγ, assim como também o ativou após ligação ao seu domínio de ligação ao agonista (LBD), porém em menor magnitude que a rosiglitazona, demonstrando ser um agonista parcial deste receptor;
  - A LYSO-7 promoveu a ativação de PPARα e de PPARβ/δ, podendo ser um possível agonista dual destes dois receptores nuclerares;
  - Nenhuma das três tiazolidino-2,4-dionas ativou o receptor LXRα ou promoveu ativação deste após ligação ao seu domínio LBD.

- Ensaios *in vivo* utilizando camundongos com deleção genética para o receptor de LDL tratados com as novas tiazolidino-2,4-dionas em modelo de aterosclerose avançada:
  - A GQ-177 reduziu a progressão da lesão aterosclerótica em 29,29%, com aumento nas concentrações plasmáticas de HDL colesterol, elevação na expressão de ABCA1 e redução na interação CD40-CD40L;
  - A LYSO-7 também diminuiu o desenvolvimento da placa aterosclerótica em 19%, associado a diminuição nas concentrações plasmáticas de colesterol total e triglicerídeos, redução na expressão de CD40 e seu ligante, e inibição da expressão gênica de citocinas inflamatórias;
  - A GQ-145 inibiu a progressão da lesão aterosclerótica, em menor grau, porém não alterou a perfil lipídico e aumentou a expressão de todos os fatores aterogênicos e inflamatórios avaliados.

Referências

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIYAMA, TE; SAKAI, S; LAMBERT, G; et al. Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor γ gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, p. 2607–2619, 2002.

ARGMANN, CA; SAWYEZ, CG; MCNEIL, CJ; et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoid X receptor results in net depletion of cellular cholesteryl esters in macrophages exposed to oxidized lipoproteins. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 23, p. 475–482, 2003.

ANDERSSON, J; LIBBY, P; HANSSON, G. Adaptive immune and atherosclerosis. **Clinical immunology**, v. 134, p. 33-46, 2010.

ARSENAULT, BJ; BOEKHOLDT, SM; KASTELEIN, JJP. Lipid parameters for measuring risk of cardiovascular disease. **Nature Reviews of Cardiology**, v. 8, p. 197-206, 2011.

BARREIRO, EJ; FRAGA, CAM. Química Medicinal: as bases moleculares da ação de fármacos. 2ª Edição. **ARTMED**: Porto Alegre, 2008.

BARTER, PJ; KASTELEIN, JJ. Targeting cholesteryl ester transfer protein for the prevention and manegement of cardiovascular disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 47, n. 3, p. 492-499, 2006.

BENSINGER, SJ; TONTONOZ, P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. **Nature**, v. 454, p.470-477, 2008.

BERGER, J; MOLLER, DE. The mechanisms of action of PPARs. **Annual Review of Medicine**, v. 53, p. 409-435, 2002.

BETTERIDGE, DJ. Thiazolidinediones and fracture risk in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Medicine**, v. 28, p. 759-771, 2011.

BHATNAGAR, D; SORAN, H; DURRINGTON, PN. Hipercholesterolemia and its management. **BMJ**, v. 337, p. 503-508, 2008.

BROWN, JD; PLUTZKY, J. Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets. **Circulation**, v. 115, p. 518 –33, 2007.

CARIOU, B; CHARBONNEL, B; STAELS, B. Thiazolidinediones and PPARγ agonists: time for a reassessment. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 23, n. 5, p. 205-215, 2012.

CASTELLI, WP. Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease—the Framingham Heart Study. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 4, s. A, 5A–10ª, 1988.

CALKIN, AC; FORBES, JM; SMITH, CM; LASSILA, M; COOPER, ME; JANDELEIT-DAHM, KA; ALLEN, TJ. Rosiglitazone attenuates atherosclerosis in a model of insulin insufficiency independent of its metabolic effects. **Artheriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 25, n. 9, p. 1903-1909, 2005.

CAVELIER, C; LORENZI, I; ROHRER, R; et al. Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. **Biochimica et Biophisica Acta**, v. 1761, p. 655-666, 2006.

CERIELLO, A. Thiazolidinediones as anti-inflammatory and anti-atherogenic agents. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 24, p. 14-26, 2008.

CHANDRA, V; HUANG, P; HAMURO, Y; et al. Structure of the intact PPAR-γ–RXR-α nuclear receptor complex on DNA. **Nature**, v. 456, p. 350-357, 2008.

CHAWNLA, A; BARAK, Y; NAGY, L; et al. PPAR-γ dependent and independent effects on macrophage –gene expression in lipid metabolism and inflammation. **Nature Medicine**, v. 7, p. 48-52, 2001.

CHEN, Z; ISHIBASHI, S; PERREY, S; et al. Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. p. 372-377, 2001.

CHINETTI, G; FRUCHART, JC; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. **Inflammation Research**, v. 49, p. 497-505, 2000.

CHINETTI, G; LESTAVEL, S; BOCHER, V; REMALEY, AT; NEVE, B; TORRA, IP; TEISSIER, E; MINNICH, A; JAYE, M; DUVERGER, N; BREWER, HB; FRUCHART, JC; CLAVEY, V; STAELS, B. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. **Nature Medicine**, v. 7, p. 53-58, 2001.

CHIQUETTE, E; RAMIREZ, G; DEFRONZO, R. A meta-analysis comparing the effect of thiazolidinediones on cardiovascular risk factors. **Archives of Internal Medicine**, v. 164, p. 2097–2104, 2004.

CHOI, D; KIM, SK; CHOI, SH; et al. Preventative effects of rosiglitazone on restenosis after coronary stent implantation in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, p. 2654–60, 2004.

CHOI, JH; JEON, HJ; PARK, JG; SONN, SK; LEE, MR; LEE, MN; YOU, HJ; KIM, GY; LEE, MH; KWON, OS; NAM, KH; KIM, HC; JEONG, TS; LEE, WS; OH, GT. Anti-atherogenic effect of BHB-TZD having inhibitory activities on cyclooxygenase and 5-lipoxygenase in hyperlipidemic mice. **Atherosclerosis**, v. 212, n. 1, p. 146-152, 2010.

CLAUDEL, T; LEIBOWITZ, MD; FIÉVET, C; et al. Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation of the retinoid X receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 2610–2615, 2001.

COLLINS, AR; MEEHAN, WP; KINTSCHER, U; et al. Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic lesions in diabetic and nondiabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 21, p. 365-371, 2001.

CONROY, RM; PYORALA, K; FITZGERALD AP; et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. **European Heart Journal**, v. 24, p. 987–1003, 2003.

DATASUS, MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. **Cadernos de informações da saúde**. Disponível em: www.datasus.gov.br. Acesso em: 22/02/2011.

DAVIS JR, HR; LOWE, RS; NEFF, DR. Effect of ezetimibe on atherosclerosis in preclinical models. **Atherosclerosis**, v. 215, p. 266-278, 2011.

DE DIOS, ST; BRUEMMER, D; DILLEY, RJ; IVEY, ME; JENNINGS, GL; LAW, RE; LITTLE, PJ. Inhibitory activity of clinical thiazolidinedione peroxisome proliferator activating receptor gamma ligands toward internal mammary artery, radial artery, and saphenous vein smooth muscle cell proliferation. **Circulation**, v. 107, p. 2548-2550, 2003.

DEEG, MA; BUSE, JB, GOLDBERG, RB; et al. Pioglitazone and rosiglitazone have different effect on serum lipoprotein particle concentrations and sizes in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. **Diabetes Care**, v. 30, p. 2458-2464, 2007.

DENIZOT, F; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunology Methods**, v. 89, p. 271-77, 1986.

DI GREGORIO, GB; YAO-BORENGASSER, A; RASOULI, N; et al. Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone. **Diabetes**, v. 54, p. 2305–2313, 2005.

DORMANDY, JA; CHARBONNNEL, B; ECKLAND, DJ; et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial in macroVascular Events): a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 366, p. 1279-1289, 2005.

ENDO, A. A historical perspective on the discovery of statins. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 86, n. 5, p. 484-493, 2010.

FIEVET, C; FRUCHART, JC; STAELS, B. PPARalpha and PPARgamma dual agonists for the treatment of type 2 diabetes and metabolic syndrome. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, p. 606-614, 2006.

FULLERT, S; SCHNEIDER, F; HAAK, E; et al. Effects of pioglitazone in nondiabetic patients with arterial hypertension: a double-blind, placebo-controlled study. **Journal of Clinical Endocrinoly and Metabology**, v. 87, p. 5503–5506, 2002.

GALE, EAM. Lessons from the glitazones, a story of drug development**. Lancet**, p. 1870-1875, 2001.

GALKINA, E; LEY, K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 165-197, 2009.

GERSTEIN, HC; RATNER, RE; CANNON, CP; et al. Effect of rosiglitazone on progression of coronary atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease: the assessment on the prevention of progression by rosiglitazone on atherosclerosis in diabetes patients with cardiovascular history trial. **Circulation**, v. 121, p. 1176–87, 2010.

GLASS, CK; SAIJO, K. Nuclear transrepression pathway that regulate inflammation in macrophages and T cells. **Nature Review Immunology**, v. 10, p. 365-376, 2010.

GOLDBERG, RB; KENDALL, DM; DEEG, MA; et al. A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. **Diabetes Care**, v. 28, p. 1547–1554, 2005.

GRAHAN, DJ; QUELLET-HELLTROM, R; MACURDY, TE. Risk of Acute myocardial infarction, stroke, heart failure, and death in elderly medicare patients treated with rosiglitazone and pioglitazone. **Journal of American Medical Association**, v. 304, n. 4, p. 411-418, 2010.

GROSS, B; STAELS, B. PPAR agonists: multimodal drugs for the treatment of type-2 diabetes. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 4, p. 687-710, 2007.

GUAN, Y; HAO, C; CHA, DR; RAO, R; LU, W; KOHAN, DR; MAGNUSON, MA; REDHA, R; ZHANG, Y; BREYER, MD. Thiazolidinediones expands body fluid volume through PPARgamma stimulation of ENaC-mediated renal salt absortion. **Nature Medicine**, v. 11, p. 861-866, 2005.

GUERRA, S; OLIVEIRA, J; RIBEIRO, JC; DUARTE, JA; MOTA, J. Relação entre a atividade física regular e a agregação de fatores de risco biológico das doenças cardiovasculares em crianças e adolescentes. **Revista Brasileira de Saúde Materno-Infantil**, v. 3, p. 9-15, 2003.

HAMBLIN, M; CHANG, L; FAN, Y; et al. PPARs and the cardiovascular system. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 6, p. 1-38, 2009.

HAN, S; ROMAN, J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: a novel target for cancer therapeutics? **Anticancer Drugs**, v. 18, p. 439-445, 2007.

HE, L; GAME, BA; NAREIKA, A; et al. Administration of pioglitazone in low-density lipoprotein receptor-deficient mice inhibits lesion progression and matrix metalloproteinase expression in advanced atherosclerotic plaques. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 48, p. 212-222, 2006.

HOOPER, AJ; BERNETT, JR. Dalcetrapib, a cholesteryl ester transfer protein modulator. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 21, n. 9, p. 1427-1432, 2012.

HU, Q; ZHANG, XJ; ZHANG, C; ZHAO, YX; HE, H; LIU, CX; FENG, JB; JIANG, H; YANG, FL; ZHANG, CX; ZHANG, Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 gene therapy attenuates atherosclerosis and stabilizes plaques in apolipoprotein E-deficient mice. **Human Gene Therapy**, v. 19, n. 3, p. 287-299, 2008.

INSULL JR, W. Clinical utility of bile acid sequestrants in the treatment of dyslipidemia: a scientific review. **Southern Medical Journal**, v. 99, n. 3, p. 257-273, 2006.

JACKSON, SM; PARHAMI, F; XI, XP; et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 19, p. 2094–2104, 1999.

JIANG, C; TING, AT; SEED, B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature,** v. 391, p. 82–86, 1998.

KARMANN, K; HUGHES, CCW; SCHECHNER, J; FANSLOW, WC; POBER, JS. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 4342-4346, 1995.

KAWAMATSU, Y; SARAIE, T; IMAMIYA, E; et al. . Studies on antihyperlipidemic agents. I. Synthesis and hypolipidemic activities of phenoxyphenyl alkanoic acid derivatives. **Arzneim Forsch./Drug,** v. 30, p. 454–459, 1980.

KINTSCHER, U; GOETZE, S; WAKINO, S; et al. Peroxisome proliferator-activated receptor and retinoid X receptor ligands inhibit monocyte chemotactic protein-1-directed migration of monocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 401, p. 259–270, 2000.

KOSHIYAMA, H; SHIMONO, D; KUWAMURA, N; et al. Rapid communication: inhibitory effect of pioglitazone on carotid arterial wall thickness in type 2 diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabology**, v. 86, p. 3452–6, 2001.

KRIS-ETHERTON, PM; HARRIS, WS; APPEL, LJ. American Heart Association, Nutrition Committee. Fish consumption, fish oil, omega 3 fatty acids and cardiovascular disease. **Circulation**, v. 106, p. 2747-2757, 2002.

LALLOYER, F; STAELS, B. Fibrates, glitazones and peroxisomes proliferator-activated receptors. **Artherioclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 30, n.5, p. 894-899, 2010.

LANGENFELD, MR; FORST, T; HOHBERG, C; et al. Pioglitazone decreases carotid intima-media thickness independently of glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus : results from a controlled randomized study. **Circulation**, v. 111, p. 2525-2531, 2005.

LANGMUIR, I. Isomorphism, isosterism and covalence. J. Am. Chem. Soc., v. 41, n. 10, p. 1543-1559, 1919. In: KOROLKOVAS, A**. Fundamentos de farmacologia molecular: base para o planejamento de fármacos**. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo. 1974.

LEVI, Z; SHAISH, A; YACOV, N. Rosiglitazone (PPAR-gamma-agonist) attenuates atherogenesis with no effect on hyperglycaemia in a combined diabetes-atherosclerosis mouse model. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 5, p. 45-50, 2003.

LEWIS, JD; FERRARA, A; PENG, T; HEDDERSON, M; BILKER, WB; QUESENBERRY JR, CP; VAUGHN, DJ; NESSEL, L; SELBY, J; STROM, BL. Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: interim report of a longitudinal cohort study. **Diabetes Care**, v. 34, p. 916-922, 2011.

LI, AC; BROWN, KK; SILVESTRE, MJ; et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, p. 523-531, 2000.

LI, AC; BINDER, CJ; GUTIERREZ, A; et al. Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARα, β/δ and γ. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p. 1564-76, 2004.

LIBBY, P. Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complication of atherosclerosis. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p. S352-S357, 2009.

LIBBY, P; RIDKER, PM; HANSSON, GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, v. 473, p. 317-325, 2011.

LINCOFF, AM; WOLSKI, K; NICHOLLS, SJ; NISSEN, SE. Pioglitazone and risk of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized trials. **JAMA**, v. 298, p. 1180–1188, 2007.

LITTLE, PJ; OSMAN, N; DE DIOS, ST; CEMERLANG, N; BALLINGER, M; NIGRO, J. Anti-proliferative activity of oral anti-hyperglycemic agents on human vascular smooth muscle cells: thiazolidinediones (glitazones) have enhanced activity under high glucose condictions. **Cardiovascular Diabetology**, v. 28, n. 6, p. 33, 2007.

LIVAK, KJ; SCHMITTGEN, TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-delta delta c (t)) method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LUKASOVA, M; HANSON, J; TUNARU, S; OFFERMANNS, S. Nicotinic acid (niacin): new lipid-independent mechanisms of action and therapeutic potentials. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 12, p. 700-707, 2011.

MACH, F; SCHONBECK, U; SUKHOVA, GK; ATKINSON, E; LIBBY, P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. **Nature**, v. 394, p. 200-203, 1998.

MANOMI, M; GENOVESE, S; MANNUCCI, E. Cardiovascular safety of sulfonylureas: a meta-analysis of randomized clinical trials. **Diabetes, Obesity & Metabolism**, Abril, 2013.

MARX, N; SCHONBECK, U; LAZAR, MA; LIBBY, P; PLUTZKY, J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. **Circulation Research**, v. 83, p. 1097-1103, 1998.

MARX, N; KEHRLE, B; KOHLHAMMER, K; et al. PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. **Circulation Research**, v. 90, p. 703–710, 2002.

MAYERL, C; LUKASSER, M; SEDIVY, R; NIEDEREGGER, H; SEILER, R; WICK, G. Atherosclerosis research from past to present – on the track of two pathologists with

opposing views, Carl Von Rokitansky and Rudolph Virchow. **Virchows Archiv**, v. 449, n. 1, p. 96-103, 2006.

MAZZONE, T; MEYER, PM; FEINSTEIN, SB; et al. Effect of pioglitazone compared with glimepiride on carotid intima-media thickness in type 2 diabetes: a randomized trial. **JAMA**, v. 296, p. 2572–81, 2006.

MOORE, KJ; ROSEN, ED; FITZGERALD, ML; RANDOW, F; ANDERSSON, LP; ALTSHULER, D; MILSTONE, DS; MORTENSEN, RM; SPIEGELMEN, BM; FREEMAN, MW. The role of PPAR-γ in macrophage differentiation and cholesterol uptake. **Nature Medicine**, v. 7, n. 1, p. 41-47, 2001.

NAGY, L; TONTONOZ, P; ALVAREZ, JG; CHEN, H; EVANS, RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. **Cell**, v. 93, p. 229-240, 1998.

NAKAIA, H; SUMMERS, BD; NICHOLSON, AC; et al. Atherosclerosis in LDL-knockout mice is inhibited, but not reversed, by the PPARγ ligand pioglitazone. **American Journal of Pathology**, v. 174, p. 2007-2014, 2009.

NAWA, T; NAWA, MT; CAI, Y; ZHANG, C; UCHIMURA, I; NARUMI, S; NUMANO, F; KITAJIMA, S. Repression of TNF-alpha-induced E-selectin expression by PPAR activators: involvement of transcriptional repressor LRF-1/ATF3. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, p. 406-411, 2000.

NICHOLSON, AC. Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis. The role of lipid regulation of PPARγ signaling. **Trens in Cardiovascular Medicine,** v. 14, n. 1, p. 8-12, 2004.

NISSEN, SE; WOLSKI, K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and cardiovascular death. **New England Journal of Medicine**, v. 356, p. 2457-71, 2007.

NISSEN, SE; NICHOLLS, SJ; WOLSKI, K; et al. Comparison of pioglitazone vs glimepiride on progression of coronary atherosclerosis in patients with type 2 diabetes: the PERISCOPE randomized controlled trial. **JAMA**, v. 299, p. 1561–73, 2008.

NISSEN, SE; WOLSKI, K. Rosiglitazone revisited: an updated meta-analysis of risk for myocardial infarction and cardiovascular mortality. **Archives of Internal Medicine**, v. 170, p. 1191-1201, 2010.

OGATA, M; TSUJITA, M; HOSSAIN, MA; et al. On the mechanism for PPAR agonists to enhance ABCA1 gene expression. **Atherosclerosis**, v. 205, n. 2, p. 413-419, 2009.

PAIGEN, B; MORROW, A; HOLMES, PA; et al. Quantitative assessment of atherosclerotics lesions in mice. **Atherosclerosis**, v. 68, p. 231-280, 1987.

PAN, HJ; REIFSNYDER, P; VANCE, DE; et al. Pharmacogenetic analysis of rosiglitazone induced hepatosteatosis in new mouse models of type 2 diabetes. **Diabetes,** v. 54, p. 1854–1862, 2005.

PARK, KG; LEE, KM; CHANG, YC; et al. The ascochlorin derivative, AS-6, inhibits TNF-alpha-induced adhesion molecule and chemokine expression in rat vascular smooth muscle cells. **Life Science**, v. 80, p. 120–126, 2006.

PASCERI, V; WU, HD; WILLERSON, JT; YEH, ET. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. **Circulation**, v. 101, p. 235-238, 2000.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**, Oxford: Oxford University Press, 1995.

PEDROSA, AMC; FAINE, LA; GROSSO, DM; DE LAS HERAS, B; BOSCÁ, L; ABDALLA, DSP. Electronegative LDL induction of apoptosis in macrophages: involvement of Nrf2. **Biochim Biophis Acta**, v. 1801, p. 430-437, 2010.

PRUEKSARITANONT, T; TANG, C; QIU, Y. Effects of fibrates on metabolism of statins in human hepatocytes. **Drug Metabolism of Dyslipidemia**, v. 30, p. 1280-1287, 2002.

QUINTÃO, ECR; NAKANDAKARE, ER; PASSARELLI, M. Lípides – do metabolismo à aterosclerose. Editora Sarvier. São Paulo, 2011.

RADER, DJ. Effects of nonstatin lipid drug therapy on high-density lipoprotein metabolism. **American Journal of Cardiology**, v. 91, p. 18E-23E, 2003.

RANGWALA, SM; LASAR, MA. Peroxisome proliferator-activated receptor γ in diabetes and metabolism. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 6, p. 331-336, 2004.

REEVES, PG; NIELSEN, FH; FAHEY, GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v.123, p.1939-1951, 1993.

RICOTE, M; HUANG, J; FAJAS, L; et al. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. **Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America**, v. 95, p. 7614-7619, 1998.

RICOTE, M; LI, AC; WILLSON, TM; et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. **Nature**, v. 391, p. 79–82, 1998.

RIDKER, PM. Moving toward new statin guidelines in a post-JUPITER world: principles to consider. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 11, n. 4, p. 249-256, 2009.

ROBINS, SJ. Targeting low high-density lipoprotein cholesterol for therapy: lessons from the Veterans Affairs high-density lipoprotein intervention trial. **American Journal of Cardiology**, v. 88, p. 19N-23N, 2001.

ROSS, R; GLOMSET, J; HARKER, L. Response to injury and atherosclerosis. **American Journal of Pathology**, v. 86, n. 3, p. 675-684, 1977.

ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 2, p. 115-126, 1999.

RUBIC, T; TROTTMANN, M; LORENZ, RL. Stimulation of CD36 and the key effectors of reverse cholesterol transport ATP-binding cassette A1 in monocytoids cells, by niacin. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 411-419, 2004.

SAMUEL, VT; PETERSEN, KF; SHULMAN, GI. Lipid-induced insulin resistance: unraveling the mechanism. **Lancet**, v. 375, p. 2267-2277, 2010.

SCHONBECK, U; MACH, F; SUKHOVA, GK; MURPHY, C; BONNEFOY, GY; FABINMI, RP; LIBBY, P. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? **Circulation Research**, v. 81, p. 448-454, 1997.

SHIBUYA, A; WATANABE, M; FUJITA, Y; SAIGENJI, K; KUWAO, S; TAKAHASHI, H; TAKEUCHI, H. An autopsy case of troglitazone-induced fulminant hepatitis. **Diabetes Care**, v. 21, p. 2140-2143, 1998.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Brasileira de diagnóstico e tratamento da síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, s. 1, p. 1-28, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, s. 1, p. 1-19, 2007.

SOHDA, T; MIZUNO, K; IMAMIYA, E; et al. Studies on antidiabetic agents. II. Synthesis of 5-[4-(1- methylcyclohexylmethoxy)-benzyl]thiazolidine-2,4-dione(ADD-3878) and its derivatives**. Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 10, p. 3580-600, 1982.

STAELS, B; KOENIG, W; HABIB, A; MERVAL, R; LEBRET, M; TORRA, IP; DELERIVE, P; FADEL, A; CHINETTI, G; FRUCHART, JC; NAGIB, J; MACLOUF, J; TEDQUI, A. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. **Nature**, v. 393, p. 790-793, 1998.

STRAUSS, DS; GLASS, CK. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. **Trends in Immunology**, v. 28, p. 551-558, 2007.

SUN, L; NICHOLSON, AC; HAJJAR DP; et al. Adipogenic differentiating agents regulate expression of fatty acid binding protein and CD36 in the J774 macrophage cell line. **Journal of Lipid Research**, v.44, p.1877-1886, 2003.

SZAPARY, PO; BLOEDON, LT; SAMAHA, FF; et al. Effects of pioglitazone on lipoproteins, inflammatory markers, and adipokines in nondiabetic patients with metabolic syndrome. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 26, p. 182–188, 2006.

TABAS, I; WILLIAMS, KJ; BOREN, J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications.**Circulation**, v. 116, p. 1832-1844, 2007.

TABAS, I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 36-46, 2010.

TAO, L; LIU, HR; GAO, E; et al. Antioxidative, antinitrative, and vasculoprotective effects of a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist in hypercholesterolemia. **Circulation**, v. 108; p. 2805–2811, 2003.

TONTONOZ, P; NAGY, L; ALVAREZ, JG; THOMAZY, VA; EVANS, RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. **Cell**, v. 93, p. 241-252, 1998.

TONTONOZ, P; SPIEGELMAN, BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARγ. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, p. 289-312, 2008.

VILLACORTA, L; SCHOPFER, FJ; ZHANG, J; et al. PPARγ and its ligands: therapeutic implications in cardiovascular disease. **Clinical Science**, v. 116, n. 3, p. 205-218, 2010.

VON ECKARDSTEIN, A; HERSBERGER, M; ROHRER, L. Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Car**e, v. 8, p. 147–152, 2005.

WAN, Y; CHONG, LW; EVANS, RM. PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. **Nature Medicine**, v. 13, p. 1496–1503, 2007.

WANG, N; VERNA, L; CHEN, NG; et al. Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma suppresses proinflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 34176–34181, 2002.

WANG, YX. PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. **Cell Research**, v. 20, p. 124-137, 2010.

WEBER, C; NOELS, H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. **Nature Medicine**, v. 17, n. 11, p. 1410-1422, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Prevention of cardiovascular disease: guidelines for assessment and management of total cardiovascular risk. **WHO Press**, 2007.

YKI-JARVINEN, H. Thiazolidinediones. **New England Journal of Medicine**, v. 351, p. 1106–1118, 2004.

ZADELAAR, S; KLEEMANN, R; VERSCHUREN, L; et al. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. **Artheriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 27, p. 1706-1721, 2007.

ZHANG, H; ZHANG, A; KOHAN, ED; et al. Collecting duct-specific deletion of peroxisome proliferator-activated recepto γ blocks thiazolidinedione-induced fluid retention. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 102, p. 9406-11, 2005.

ZOETE, V; GROSDIDIER, A; MICHIELIN, O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, n. 8, p. 915-925, 2007.

Anexo A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética em Experimentação Animal

1934 | 2009 USP 75 ANOS

Cert.CEEA/FCF/87/2009

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "**Propriedades anti-aterogênicas de novas tiazolidina-2,4-dionas**" (Protocolo nº 248), de responsabilidade da pesquisadora **Fernanda Andrade de César** sob a orientação da Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA, desta Faculdade, em 10 de agosto de 2009.

São Paulo, 16 de setembro de 2009.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEEA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 / Fax: (11) 3813-5093 - e-mail: rtrigo@usp.br

Anexo B

UNVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão Interna de Biossegurança

Of.CIBio/0392010/FCF

São Paulo, 02 de setembro de 2010

Senhora Professora,

Conforme parecer favorável do relator, e de ordem do senhor Presidente da Comissão Interna de Biossegurança, informo a Vossa Senhoria que estamos aprovando "ad referendum" da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas o Projeto "Propriedades anti-aterogênicas de novas tiazolidina-2,4-DIONAS".

Em anexo envio cópia do CQB da Unidade para necessário quando da solicitação de recursos junto a agências de fomento.

Lembramos que, quando da elaboração do Relatório Anual a ser encaminhado à Comissão Interna de Biossegurança esta Comissão solicitará a V.Sa. comprovante de participação em treinamentos de Biossegurança de sua equipe para manutenção do credenciamento.

Atenciosamente,

YARA MARIA LIMA MARDEGAN
Membro da CIBio

Ilma. Sra.
Profa. Dra. **DULCINÉIA SAES PARRA ABDALLA**
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP
NESTA

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone/fax: (011) 3091-3678 - e-mail: atadfcf.usp.br

Anexo C

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 6712120/1 - Fernanda Andrade de César

Email:	fernandacesar@usp.br
Data de Nascimento:	16/07/1982
Cédula de Identidade:	RG - 6032507 - PE
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Biomedicina - Universidade Federal de Pernambuco - Pernambuco - Brasil - 2005
Mestrado:	Mestre em Ciências Biológicas (1) - Universidade Federal de Pernambuco - Pernambuco - Brasil - 2008

Curso:	Doutorado
Programa:	Farmácia (Análises Clínicas)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	03/02/2009
Início da Contagem de Prazo:	03/02/2009
Data Limite:	03/02/2013
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Dulcineia Saes Parra Abdalla - 03/02/2009 até o presente. E.Mail: dspa@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 21/10/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 01/06/2011
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Doutorado em 03/02/2009 Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2012

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2012
Impresso em: 26/11/12 11:21:11

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 6712120/1 - Fernanda Andrade de César

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
HEP5732-12/3	Bioestatística I (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	03/03/2009	07/04/2009	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5793-9/1	Tópicos em Análises Clínicas I	23/03/2009	05/07/2009	30	2	93	A	N	Concluída
FBC5757-2/1	Tópicos em Análises Clínicas II	17/08/2009	29/11/2009	30	2	100	A	N	Concluída
BMI5883-1/2	Inflamação e Apresentação de Antígenos	24/08/2009	06/09/2009	30	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBA5728-2/10	Aprimoramento Didático	21/09/2009	18/10/2009	60	4	87	A	N	Concluída
MCM5725-5/1	Aspectos Atuais do Metabolismo de Lípides (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	09/11/2009	13/12/2009	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5803-1/1	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	01/03/2010	14/03/2010	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5748-3/2	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	02/03/2010	12/04/2010	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5723-4/3	Mecanismos das Interações Patológicas entre Células Endoteliais e Elementos Circulantes e sua Importância em Processos Vaso-oclusivos	05/04/2010	26/04/2010	75	0	0	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	20	20	20
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	20	20	20

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria nº 524, de 29.04.2008.

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2012