Universidade de São Paulo
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de pós-graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Investigação dos efeitos de novos derivados tiazolidínicos
em modelo animal de síndrome metabólica**

Jacqueline Cavalcante Silva

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientador:
Prof^a Dr^a Dulcineia Saes Parra Abdalla

São Paulo
2015

Universidade de São Paulo
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de pós-graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Investigação dos efeitos de novos derivados tiazolidínicos
em modelo animal de síndrome metabólica**

Jacqueline Cavalcante Silva

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientador:
Prof^a Dr^a Dulcineia Saes Parra Abdalla

São Paulo
2015

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

S586i Silva, Jacqueline Cavalcante
Investigação dos efeitos de novos derivados tiazolidínicos em
modelo animal e síndrome metabólica / Jacqueline Cavalcante
Silva. -- São Paulo, 2015.
129p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Abdalla, Dulcineia Saes Parra

1. Diabetes mellitus : Tratamento 2. Inflamação I. T. II. Abdalla,
Dulcineia Saes Parra, orientador.

CDD 616.462061

Jacqueline Cavalcante Silva

Investigação dos efeitos de novos derivados tiazolidínicos em modelo animal de
síndrome metabólica

Versão original

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla
Orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2015

Dedico este trabalho

À minha mãe, Tania Aparecida Cavalcante, pelo apoio contínuo, compreensão e amor incondicional.

À minha segunda mãe, minha avó Thereza Lopes Cavalcante, pelo zelo diário, amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos céus por me darem equilíbrio, força e coragem para encarar e lutar pelos meus sonhos e objetivos, sem deixar jamais de sorrir.

Aos meus pais, Tania Aparecida Cavalcante e José Luiz da Silva, minha avó Thereza Lopes Cavalcante e minha tia-madrinha Joelma Albuquerque Cavalcante pela confiança e apoio em todas as decisões que precisei tomar em minha vida.

À prof. Dulcineia Saes Parra Abdalla, pela confiança em me receber sem experiência alguma em seu laboratório e com formação em outra área, sempre me deixando com os pés no chão, orientando de forma apoiadora e nos incentivando a buscar o conhecimento ilimitado, além de nunca nos deixar esquecer a importância da nossa família e das nossas raízes.

A todos que passaram pelo laboratório de Bioquímica Clínica da FCF-USP, onde pude encontrar apoio e orientação desde o meu primeiro dia de estágio:

A amiga e colega de trabalho Marcela Frota Cavalcante, por estar sempre e eu digo, SEMPRE, disponível para discutir dúvidas de protocolos, de verbas e problemas e alegrias pessoais também. Ao companheirismo nos dias de ficar até tarde no laboratório, seja estudando, fazendo experimentos ou simplesmente para não voltarmos sozinhos pra casa. E principalmente por me fazer buscar ser alguém melhor a cada dia, em enxergar o que há de melhor nas pessoas e a olhar pra dentro de mim.

Aos amigos e também colegas de trabalho Nicolas Saavedra Cuevas e Alejandro Cuevas Villegas por todos os ensinamentos científicos e pessoais, por acompanhar de perto detalhes de cada protocolo, por me fazer ser mais crítica e avaliadora, em ter um ombro amigo e uma mão amiga também, na hora de cuidar dos animais, de extrair própolis, fazer PCR, discutir resultados e pedir a melhor pizza do universo no laboratório, tarde da noite. Agradeço por serem para mim o simples de uma forma pura e especial.

Aos técnicos e também amigos Walter Turato e Elaine Moura Augusto, pela ajuda diária com os equipamentos, todo o investimento na captação e análise das imagens no MSFX, ao senso crítico com todos os membros do laboratório e discussões saudáveis de uso de verba e convivência em grupo, afinal somos uma bela equipe!

Aos atuais companheiros de trabalho Soraya Kazuma - a mente brilhante que faz a gente se inspirar -, Gustavo Luis Tripodi – irreverência para quebrar a rotina - e Luciane Marzullo – divertida e confusa de um jeito único -. E aos colegas que nos deixaram recentemente para voar cada vez mais alto, Camila Cayota, divertida e sempre compartilhando boas palavras e boas energias, e Felipe Wakasuqui, aquele amigo que irá ganhar o Nobel, brilhante e único.

À Tanize Faulin, Alda Silva e Martina Rudnicki por toda a orientação no início do meu estágio e no meu projeto, grandes pesquisadoras que contribuíram diretamente para a minha formação acadêmica, profissional e também pessoal.

Aos alunos que passaram pelo laboratório durante minha estadia: Cris, Fernanda e Daniel, muito importantes desde o meu início no laboratório, incentivando e auxiliando o

meu preparo para o exame de ingresso e durante todo o desenvolvimento do meu projeto de mestrado.

À doce Renila Ferrer, mostrando o quanto é possível um ser humano ser bom, sempre me dando palavras de conforto, motivação e apoio.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica Clínica, coordenado pela prof. Ana Campa, pelo compartilhamento de equipamentos e utensílios, em especial Edson Mendes, colega e colaborador direto não só deste projeto mas dos dias mais divertidos de trabalho, a todo o ensinamento nos protocolos com os animais e ajuda nos períodos de tratamento e eutanásia, além da ajuda na burocracia de vistos, na ansiedade pré-qualificação e pré-viagem.

Aos colegas do laboratório de Hematologia Clínica, coordenado pelos profs. Primavera Borelli e Ricardo Fock, por compartilhar não somente parte do espaço físico, mas também o conhecimento, os equipamentos, os reagentes e seja lá o que for necessário de urgente para salvar a nossa pele e em especial a Ed Santos pela troca de conhecimento no início do projeto para a formulação da dieta dos animais e no comportamento dos mesmos.

Aos colegas do laboratório de Patologia Clínica, coordenado pelas profs. Silvia Stucki e Silvia Berlanga, por compartilhar os equipamentos e a máquina de café expresso. Em especial ao amigo Renato Massaro, pelos almoços, pelas palavras amigas, pelos conselhos de viagem, pela ajuda e apoio pré-estágio internacional. Sem dúvida nenhuma, sem sua ajuda minha vida teria sido bem difícil!!!

À Amanda Rabello Crisma, pela ajuda nos protocolos de TTG e TTI, dando dicas de manuseio de animais, diluição das soluções e principalmente na análise dos dados, sempre muito didática e prestativa.

Aos colegas de departamento: Renata Albuquerque, auxiliando nos experimentos de citometria de fluxo, sempre esclarecedora e amiga; Maurício dos Santos, pela ajuda com os experimentos de quantificação lipídica, Claudinha Reis pelas palavras sábias e amigas logo pela manhã, às secretárias Ana, Edna, Sueli e Dora, por serem sempre prestativas e por esclarecer nossas dúvidas burocráticas.

Aos profs. Ivan da Rocha Pitta, Sueli Galdino e Maria do Carmo Lima pela colaboração na síntese das TZDs.

Ao prof. Marcelo Bonini, por me receber de braços abertos na *University of Illinois at Chicago*, possibilitando esse imenso crescimento profissional, científico e pessoal. Pela orientação amiga e acolhedora, sempre disponível para esclarecer dúvidas, traçar caminhos investigativos, pelo apoio, nos momentos em que o Brasil, o brigadeiro, a paçoca, o pastel, o guaraná fizeram falta, na comemoração dos gols durante a copa, na terrível goleada contra a Alemanha e também a ensinarmos juntos aos americanos a nossa linda e única palavra “saudades”.

Ao amigo e companheiro de laboratório André Luelsdorf, pela ajuda não só no primeiro mês, mas em toda a minha estadia nos Estados Unidos, desde a companhia no aeroporto da minha chegada à minha despedida. Pelos conselhos profissionais, ajuda com a cultura de células e *western blot*, pelo preparo conjunto dos almoços e dos jantares, milk shake da madrugada, donuts e frapuccinos quinhentas vezes na semana,

coleção de cartões e cupons de desconto, companheiro de compras, de festivais, de fireball, “*cards against the humanity*”, “*never have I ever*”, churrasco e *fish bowl*. Irmão mais velho. À Peter Hart e Alyssa Master, por me passarem com toda a paciência do mundo seus conhecimentos em cultura de células e *western blot*, apoio nos *lab meetings*, pelo “desaprendizado” no inglês e dos momentos “*hangry*”, que acabavam em algum Giordano’s, Lou Malnati’s ou Portillo’s.

Ao amigo e mentor Mao Mao, que me fez admirar a disciplina e cultura chinesa, por me acompanhar exaustivamente nos protocolos de isolamento de macrófagos de medula óssea e companhia nos dias de *after hours*. Pela companhia nos shows e pelos momentos de partilha musical.

À Sofia Zaichik, pelas discussões de protocolos e resultados de PCR, sempre indicando bons papers e pelo compartilhamento de materiais e equipamentos.

À Bianca Altrão Ratti, pela companhia não só no laboratório e nas viagens de volta pra casa, mas também pelas palavras amigas.

Aos colaboradores Richard Minshall, Maricela Castello, Timothy Koh e Rita Mirza, pela ajuda nos protocolos de cultura de células e principalmente no modelo de cicatrização de lesões cutâneas em camundongos diabéticos, pelo compartilhamento do espaço físico e de equipamentos e por todo o tempo investido nas discussões e análises dos dados.

Aos funcionários do *Histology Core* e do *DNA Center* da *University of Illinois at Chicago*, Andy Hall e Vaiva Liakaite pela instrução e ajuda nos cortes histológicos e nos experimentos de PCR.

Às funcionárias do biotério do Conjunto das Químicas da USP, Lívia, Fátima e Flávia, pelos treinamentos de gavagem e ajuda nas coletas sanguíneas periódicas dos animais.

À CAPES, CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

Aos meus amigos da vida toda: Caroline, Rodolfo, Iris, Diego e Nayara... sempre me apoiando e dando seus pontos de vista, ajudando nas dúvidas de nomenclaturas químicas, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida, desde a pré-adolescência e me viram sonhar e lutar por este tão desejado momento desde o ingresso na graduação.

Ao meu amigo e companheiro Ikaro pelo apoio e incentivo nas difíceis fases da pós-graduação, sempre me passando boas energias, calma e equilíbrio. Por estar presente até em outro continente, apesar das dificuldades, pelo abraço acolhedor e por sempre me fazer sorrir. Obrigada por “dividir comigo a sua história e me ajudar a construir a minha”.

*"No longer to be poisoned by civilization he
flees, and walks alone upon the land to
become lost in the wild"*

Christopher McCandless

RESUMO

SILVA, J.C. **Investigação dos efeitos de novos derivados tiazolidínicos em modelo animal de síndrome metabólica**. 2014. **129p.** (Dissertação de Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A síndrome metabólica (SM) é definida como um grupo de condições que aumentam o risco para doenças cardiovasculares e diabetes, com quadro clínico reconhecido por componentes como obesidade abdominal, dislipidemia, hipertensão arterial e resistência à insulina ou intolerância à glicose. Na população de 20 a 70 anos, apresenta prevalência de 24% no Brasil e no mundo.

A resistência à insulina e a inflamação são demonstradas como características de grande importância na síndrome metabólica, que constituem alvos interessantes para novas abordagens terapêuticas. Nesse sentido, a classe de fármacos anti-diabéticos orais das tiazolidinadionas (TZDs), que são agonistas do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR γ), cujo efeito hipoglicemiante é mediado pela redução da resistência à insulina sistêmica pelos tecidos periféricos, pode ser apontada como alternativa no tratamento de síndrome metabólica.

No entanto, os fármacos dessa classe disponíveis comercialmente apresentam efeitos adversos importantes, o que incentivou a descoberta de novos derivados tiazolidínicos, almejando a identificação de fármacos mais eficazes e com menos efeitos adversos. Considerando que os efeitos desses novos derivados tiazolidínicos ainda não haviam sido investigados em modelos de síndrome metabólica, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos biológicos de quatro novos derivados tiazolidínicos, a saber, GQ-02, GQ-11, GQ-177 e Lyso-7 em modelo animal utilizando as linhagens de camundongo C57BL/6J e C57BL/6J LDLr $-/-$. O tratamento com os novos derivados tiazolidínicos mostrou efeito hipoglicemiante, com melhora na sensibilidade à insulina, no estado hiperinsulinêmico e hiperleptinêmico, além da modulação do perfil inflamatório e lipídico.

Palavras-Chave: Diabetes mellitus - Tratamento, Inflamação, síndrome metabólica.

ABSTRACT

SILVA, J.C. **Investigation of new thiazolidine compounds effects in animal model of metabolic syndrome**. 2014. **129p.** (Dissertação de Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Metabolic syndrome (MetS) can be defined as a group of conditions that increases cardiovascular diseases and diabetes risk, with obesity, dyslipidemia, arterial hypertension and insulin resistance or glucose intolerance as clinical features. The 20-70 years olds population have a prevalence of 24% in Brazil and world.

An inflammatory reaction series and insulin resistance, also triggered by obesity, are demonstrated in metabolic syndrome what composes interesting targets to new therapeutic approaches. The anti-diabetic oral drugs class of thiazolidinediones (TZDs), that are peroxisome proliferator-activated receptor agonists, whose hypoglycemic effect is mediated by insulin resistance reduction in peripheral tissues, can be appointed how an alternative treatment of MetS. However, this class of drugs commercially available shows important adverse effects, such as weight increase and cardiovascular events risk. Thus, new thiazolidine compounds have been developed, craving identify more effective drugs and fewer adverse effects.

Considering that these new thiazolidinediones effects aren't investigated in MetS models, the present study objects evaluated the action of four new thiazolidine compounds, denominated GQ-11, GQ-02, GQ-177 and Lyso-7 in animal model of MetS, using C57BL/6J and C57BL/6J LDLr $-/-$ mice. The treatment with new thiazolidine compounds showed hypoglycemic effect, improving insulin resistance, hyperinsulinemia and hyperleptinemia, with peculiar characteristics on inflammatory and lipid profile modulation.

Keywords: Diabetes mellitus – Treatment, Inflammation, Metabolic Syndrome

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Prevalência de síndrome metabólica no Brasil.....	23
Figura 2: Produção de adipocinas e correlação com resistência a insulina, função endotelial, hipertensão e ação no sistema nervoso simpático	25
Figura 3: Ativação de PPARs e vias de sinalização envolvidas na sensibilização à insulina.....	26
Figura 4. Estrutura das TZDs já comercializadas: Rosiglitazona, Pioglitazona e Troglitazona.....	27
Figura 5: Vias de sinalização ativadas pela ligação de insulina e/ou IGF-1 em seus respectivos receptores para a indução de captação de glicose pela célula.....	31
Figura 6: Células envolvidas no processo de cicatrização regular e deficiente, seus respectivos marcadores e estruturas formadas.....	33
Figura 7: Consumo semanal de ração por grupo, individual, em 20 semanas de dieta, e ingestão de energia em quilojoules, nos grupos de linhagem C57BL/6J e 57BL/6J LDLr -/-, submetidos a dieta controle e hiperlipídica.....	46
Figura 8: Peso inicial e final dos camundongos de linhagem C57BL/6J e 57BL/6J LDLr -/-, submetidos a dieta controle e hiperlipídica e ganho de peso ao longo das 20 semanas de dieta.....	47
Figura 9: Alterações na glicemia de jejum dos camundongos de linhagem C57BL/6J e 57BL/6J LDLr -/-, nos períodos inicial e final e glicemia de jejum temporal.....	48
Figura 10: Curva glicêmica dos camundongos de linhagem C57BL/6J e 57BL/6J LDLr -/-, no T.T.G. e área sob a curva (AUC).....	49
Figura 11: Curva glicêmica dos camundongos de linhagem C57BL/6J e 57BL/6J LDLr -/-, no T.T.I. e K_{ITT} (constante da taxa de decaimento de glicose).....	50
Figura 12: Níveis séricos temporais, iniciais e finais de adiponectina, insulina e leptina dos camundongos de linhagem C57BL/6J e 57BL/6J LDLr -/-.....	51
Figura 13: Consumo semanal de ração por grupo, individual, dos camundongos de linhagem C57BL/6J e 57BL/6J LDLr -/-, submetidos à dieta controle e hiperlipídica, nos períodos inicial e final, tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos.....	52

Figura 14: Peso dos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr -/-, submetidos a dieta controle e hiperlipídica, nos períodos inicial e final, tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos.....	53
Figura 15: Percentual de tecido adiposo (área periférica) por MSFX, dos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr -/-, submetidos a dieta controle e hiperlipídica, tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos.....	54
Figura 16: Imagem representativa de raio-x gerado por equipamento MSFX, dos grupos de linhagens C57BL/6J, e C57BL/6J LDLr -/-, submetidos a dieta controle e hiperlipídica, para quantificação de percentual de tecido adiposo (área periférica).....	55
FIGURA 17. Glicose de jejum dos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr -/-, submetidos a dieta controle e hiperlipídica, nos períodos pré-tratamento e pós-tratamento.....	56
FIGURA 18. Área sob a curva no teste de tolerância à glicose (T.T.G.), dos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr -/-, submetidos a dieta controle e hiperlipídica, nos períodos pré-tratamento e pós-tratamento.....	57
FIGURA 19. Percentual de decaimento plasmático de glicose por minuto (K_{ITT}), no teste de tolerância a insulina (T.T.I.), dos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr -/-, submetidos a dieta controle e hiperlipídica, nos períodos pré-tratamento e pós-tratamento.....	58
FIGURA 20. Níveis séricos de insulina nos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr -/-, submetidos a dieta controle e hiperlipídica, nos períodos pré-tratamento e pós-tratamento.....	59
FIGURA 21. Níveis séricos de adiponectina nos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr -/-, submetidos a dieta controle e hiperlipídica, nos períodos pré-tratamento e pós-tratamento.....	60
FIGURA 22. Níveis séricos de leptina nos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr -/-, submetidos a dieta controle e hiperlipídica, nos períodos pré-tratamento e pós-tratamento.....	61
FIGURA 23. Níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos nos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr -/- submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos e grupos controle (submetidos a dieta controle e tratados com água).....	62
FIGURA 24. Níveis séricos das frações de colesterol: LDL, HDL e VLDL nos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr -/-, submetidos a dieta	

hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos e grupos controle (submetidos a dieta controle e tratados com água).....63

FIGURA 25. Níveis séricos de interleucinas (il-6, il-10 e il-12), nos camundongos de linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) e C57BL/6J LDLr *-/-* (B, D e F), submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos e grupos controle (submetidos a dieta controle e tratados com água).....64

FIGURA 26. Níveis séricos de citocinas inflamatórias (ifn- γ , tnf- α e mcp-1), nos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr *-/-* , submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos e grupos controle (submetidos a dieta controle e tratados com água).....66

FIGURA 27. Expressão gênica relativa de glut-4, ppar- α e ppar- γ no tecido adiposo epididimal, nos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr *-/-*, submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos.....67

FIGURA 28. Expressão gênica relativa de adipocinas no tecido adiposo epididimal, nos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr *-/-*, submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos.....69

FIGURA 29. Expressão gênica relativa de interleucinas 10 e 17 no tecido adiposo epididimal, nos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr *-/-*, submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos.....70

FIGURA 30. Expressão gênica relativa de icam, vcam e vegf no tecido adiposo epididimal, nos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr *-/-*, submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos.....71

FIGURA 31. Expressão gênica relativa de fgf-21, mcp-1 e nfkb no tecido adiposo epididimal, nos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr *-/-*, submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos.....72

FIGURA 32. Expressão gênica relativa de β -catenina no tecido adiposo epididimal, nos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr *-/-*, submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos.....73

FIGURA 33. Expressão gênica relativa de glut-2, ppar- α e pgc1- α no tecido hepático, nos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr -/-, submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos.....	74
FIGURA 34. Expressão gênica relativa de srebp e lxr- β no tecido hepático, nos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr -/-, submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos.....	75
FIGURA 35. Expressão gênica relativa de srebp e lxr- β no tecido hepático, nos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr -/-, submetidos a dieta controle e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos.....	76
FIGURA 36. Imagem representativa de raio-x, obtidas a partir do equipamento MSFX, com especificação das regiões R1, R2, R3 e R4, utilizadas nas análises de densidade óssea.....	77
FIGURA 37. Imagem representativa de raio-x, obtidas a partir do equipamento MSFX, utilizadas nas análises de densidade óssea, nos camundongos C57BL/6J e C57BL/6J LDLr -/- submetidos a dieta controle e hiperlipídica.....	78
FIGURA 38. Densidade óssea (g/cm ³), nas regiões R1 e R2, dos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr -/- submetidos a dieta controle e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos. n = 6 por grupo. *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001 (comparado ao grupo tratado com veículo correspondente).....	79
FIGURA 39. Densidade óssea (g/cm ³), nas regiões R3 e R4, dos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr -/- submetidos a dieta controle e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos.....	80
FIGURA 40. Densidade óssea (g/cm ³), nas regiões R1 e R2, dos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr -/- submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos.....	81
FIGURA 41. Densidade óssea (g/cm ³), nas regiões R3 e R4, dos camundongos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr -/- submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos.....	82
FIGURA 42. Imagem representativa do modelo de cicatrização de feridas diabéticas, pós-cirúrgico e terceiro dia pós-cirúrgico dos camundongos FVB e MKR.....	83
FIGURA 43. Imagem representativa do modelo de cicatrização de feridas diabéticas em camundongos FVB (controle), tratados com veículo e GQ-11.....	83

FIGURA 44. Imagem representativa do modelo de cicatrização de feridas diabéticas em camundongos MKR, tratados com veículo e GQ-11.....	84
FIGURA 45. Expressão gênica relativa de citocinas pró-inflamatórias $\text{tnf-}\alpha$, $\text{il-1}\beta$ e $\text{ifn-}\gamma$, em feridas de camundongos FVB e MKR, tratadas com veículo e GQ-11.....	85
FIGURA 46. Expressão gênica relativa de citocinas anti-inflamatórias $\text{tgf-}\beta$, ym1 , arg-1 e il-10 , em feridas de camundongos FVB e MKR, tratadas com veículo e GQ-11.....	86
FIGURA 47. Expressão gênica relativa de vegf e tsg-6 , em feridas de camundongos FVB e MKR, tratadas com veículo e GQ-11.....	87
FIGURA 48. Imagem representativa das lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina (HE), de tecido saudável utilizado como controle e feridas diabéticas tratadas com veículo e GQ-11, de camundongos FVB.....	88
FIGURA 49. Imagem representativa das lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina (HE), de tecido saudável utilizado como controle e feridas diabéticas tratadas com veículo e GQ-11, de camundongos MKR.....	89
FIGURA 50. Expressão gênica relativa de $\text{tnf-}\alpha$ e $\text{il-1}\beta$, de macrófagos murinos primários de medula óssea não tratados (controle) e previamente tratados por 24 horas com pioglitazona, GQ-11 e DMSO (veículo), após 2 e 6 horas de estímulo com LPS.....	90
FIGURA 51. Expressão gênica relativa de $\text{tgf-}\beta$ e il-10 , de macrófagos murinos primários de medula óssea não tratados (controle) e previamente tratados por 24 horas com pioglitazona, GQ-11 e DMSO (veículo), após 2 e 6 horas de estímulo com LPS.....	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Parâmetros de captação de imagem no Bruke Molecular Imaging Software, para análises de percentual de gordura corporal periférica de camundongos.....	41
TABELA 2. Parâmetros de captação de imagem no Bruke Molecular Imaging Software, para análises de densidade óssea dos camundongos.....	42
TABELA 3. Relação de variáveis entre consumo e ganho de peso nos grupos de linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr -/-, submetidos à dieta controle e hiperlipídica.....	47

LISTA DE SIGLAS

Ap2: proteína 2 de adipócitos, uma proteína citosólica conhecida também como proteína 4 de ligação a ácidos graxos (FABP4), frequentemente utilizado como marcador de fenótipo adipogênico

ARG-1: Arginase 1

CD36: receptor scavenger presente na membrana, responsável pelo influxo de lipídios, também denominado translocase de ácidos graxos ou proteína transportadora de ácidos graxos, frequentemente utilizado como marcador de fenótipo adipogênico

FGF-21: Fator de crescimento de fibroblastos

GLUT-2: Transportador de glicose tipo 2

GLUT-4: Transportador de glicose tipo 4

ICAM: Molécula de adesão intracelular

IFN- γ : Interferon γ

IGF-1: Fator de crescimento 1 insulina-símile

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

IL-17: Interleucina 17

INCT_if: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica

LPSF: Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos

LXR- β : Receptor X do fígado

MCP-1: Proteína 1 quimiotática de monócitos

mRNA: RNA mensageiro

NEFA: Ácidos graxos não estereificados

NF κ B: Fator nuclear κ B

NUPIT: Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica

PAI-1: Inibidor 1 do ativador de plasminogênio

PECAM: Molécula de adesão celular endotelial plaquetária

PPAR: Receptor ativado por proliferador de peroxissoma

SREBP: Proteína ligante ao elemento regulador de esterol

VCAM: Molécula de adesão celular vascular

TGF- β : Fator de crescimento de transformador β

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TSG-6: Proteína estimulada pelo gene 6 de TNF.

TTG: Teste de Tolerância à Glicose

TTI: Teste de Tolerância à Insulina

TZD: Tiazolidinadiona

VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Definição e epidemiologia da síndrome metabólica	22
1.2. A obesidade na síndrome metabólica	23
1.3. Intervenções terapêuticas na síndrome metabólica: As tiazolidinonas (TZDs) e os receptores ativados por peroxisoma (PPARs)	25
1.4. Os novos derivados tiazolidínicos	27
1.5. Os novos derivados tiazolidínicos como terapêutica na síndrome metabólica	30
1.6. Os novos derivados tiazolidínicos e a cicatrização de lesões cutâneas diabéticas	30
2. OBJETIVOS GERAIS	35
2.1. ESTRATÉGIAS	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1. MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICA	36
3.1.1. Dieta	36
3.1.2. Animais	36
3.2. TRATAMENTO	36
3.3. EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	37
3.4. PARÂMETROS AVALIADOS	38
3.4.1. T.T.G. – Teste de tolerância à glicose	38
3.4.2. T.T.I. – Teste de tolerância à insulina	39
3.4.3. Determinação de níveis de adiponectina, leptina e insulina	39
3.4.4. Determinação do perfil lipídico	39
3.4.5. Análise de componentes pró-inflamatórios e anti-inflamatórios	39
3.4.5.1. Extração de RNA	39
3.4.5.2. Síntese de cDNA	40
3.4.5.3. Quantificação da expressão gênica	40

3.4.5.4. Citometria de Fluxo	40
3.4.6. Obtenção de imagens por raio-x (MSFX-Pro)	41
3.4.6.1. Detenção de percentual de gordura corporal periférica	41
3.4.6.2. Determinação de densidade óssea	42
3.5. MODELO EXPERIMENTAL DE CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS NO MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES	43
3.5.1. Animais	43
3.5.2. Tratamento	43
3.5.3. Eutanásia	43
3.5.4. Análises	44
3.5.5. Cultura celular	45
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4. RESULTADOS	46
5. DISCUSSÃO	92
5.1. O modelo animal de síndrome metabólica	92
5.2. Alterações biométricas promovidas pelo tratamento com novos derivados tiazolidínicos	97
5.3. Efeito hipoglicemiante e de sensibilização à insulina, promovidos pelo tratamento com novos derivados tiazolidínicos	98
5.4. Os efeitos promovidos pelos novos derivados tiazolidínicos no perfil inflamatório dos animais	104
5.5. O impacto do tratamento com novos derivados tiazolidínicos no perfil lipídico dos animais	106
5.6. O efeito do tratamento com novos derivados tiazolidínicos na densidade óssea dos animais	108
5.7. O uso de um novo derivado tiazolidínico, GQ-11, na cicatrização de lesões cutâneas no modelo experimental de diabetes	110
6. CONCLUSÕES	113
REFERENCIAS	115
ANEXOS	121

1. INTRODUÇÃO

1.1. Definição e epidemiologia da síndrome metabólica

A síndrome metabólica é definida como um grupo de alterações metabólicas que podem aumentar o risco para doenças cardiovasculares, bem como para o diabetes mellitus (GRUNDY *et al.*, 2004). De fato, nos EUA, 25% dos novos casos de doenças cardiovasculares são decorrentes da presença de síndrome metabólica (LUSIS *et al.*, 2008). Atualmente, os componentes identificados no quadro clínico de síndrome metabólica são: obesidade abdominal, dislipidemias, hipertensão arterial e resistência à insulina ou intolerância à glicose, além de características como estado pró-inflamatório e pró-trombótico (GRUNDY *et al.*, 2004).

Essa síndrome tem emergido como uma crise de saúde pública, uma vez que sua incidência vem atingindo proporções de epidemia, afetando 1 em cada 4 adultos no mundo. Dados epidemiológicos revelam que a prevalência da síndrome metabólica é de aproximadamente 31% da população européia, 14% na Ásia e 30% na América Latina. No Brasil, estima-se que a prevalência de síndrome metabólica em indivíduos entre 10 a 19 anos é de 6 %. Por sua vez, uma proporção variando entre 24% e 29,8% é descrita em populações entre 20 a 70 anos. Além disso, uma prevalência maior é observada em pacientes idosos, hipertensos e diabéticos, sendo de 56,9%; 81,7% e 89%, respectivamente (GRUNDY *et al.*, 2008, SALAROLI *et al.*, 2007; DA SILVA *et al.*, 2005; FRANCO *et al.*, 2009; PICON *et al.*, 2006; RIGO, 2009).

FIGURA 1. Prevalência de síndrome metabólica no Brasil nos anos de 2007 a 2009. Adaptação: SALAROLI *et al.*, 2007; FRANCO *et al.*, 2009; RIGO *et al.*, 2009).

Deve-se notar que a determinação da prevalência de síndrome metabólica nas diversas regiões do mundo depende dos diferentes critérios que a definem, limitando a comparação e análise entre os vários estudos realizados (PICON *et al.*, 2006).

Dentre os componentes identificados na síndrome metabólica, a obesidade pode ser enquadrada como uma das mais importantes, uma vez que as outras características clínicas podem surgir a partir do desenvolvimento da obesidade. A obesidade é uma doença multifatorial causada por interações genéticas e ambientais, podendo ser caracterizada pelo aumento da deposição de tecido adiposo e consequente aumento de peso (ABALLAY *et al.*, 2013). A importância da obesidade no desenvolvimento da síndrome metabólica é observado, uma vez que o aumento de tecido adiposo pode afetar ou influenciar a responsividade à insulina e o desenvolvimento de hipertensão e dislipidemias. Sendo assim, a probabilidade de um novo aumento na prevalência da síndrome metabólica pode ser antecipado devido à projeções de uma prevalência maior de obesidade no futuro.

1.2. A obesidade na síndrome metabólica

A contribuição da obesidade no desenvolvimento de hipertensão, dislipidemias e estado inflamatório, bem como alterações na resposta à insulina, tem

sido descrita, uma vez que o aumento do tecido adiposo produz atividade exacerbada de adipócitos, liberando produtos como os ácidos graxos não-esterificados (NEFA), PAI-1 e adipocinas inflamatórias. A diminuição da secreção de adiponectina, promovida pelo aumento da secreção de TNF- α pelos adipócitos, em paralelo às altas concentrações plasmáticas de NEFA, que também favorecem a deposição de lipídeos nos tecidos muscular e hepático, são correlacionados com a diminuição da sensibilidade à insulina (WILSON *et al.*, 1998, GRUNDY *et al.*, 2004).

Além disso, estudos também apontam que a composição lipídica da membrana celular também exerce uma importante influência na sensibilização à insulina e na translocação e fusão do transportador de glicose GLUT-4 (WEIJERS, 2012). Estes estudos mostram que a saturação de ácidos graxos insaturados em membranas fosfolipídicas, característica do diabetes tipo 2, que por sua vez é em grande maioria dos casos desencadeada pela obesidade, aumenta as forças de van der Waals entre as ligações de hidrocarbonetos, o que reduz a plasticidade da membrana e neutraliza a fusão dos transportadores de membrana, diminuindo a capacidade de transporte de GLUT-4 (MARRINCK & MARK, 2003).

A relação entre obesidade e resistência à insulina também pode prever o desenvolvimento futuro de hipertensão, devido à ativação do sistema nervoso simpático, bem como o sistema renina-angiotensina, devido ao receptor GPR91 succinato explicar a ligação entre a glicose elevada e a renina (LUSIS; ATTIE; REUE, 2008, WILSON *et al.*, 1998). Além disso, a obesidade ainda pode provocar a redução da lipólise das lipoproteínas ricas em triacilgliceróis, devido à diminuição da *lipase lipoproteica* e ao aumento do catabolismo de HDL, mediado pelo aumento da lipase hepática, aumentando também a produção de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) no fígado (LUSIS *et al.*, 2008). Altas concentrações de proteína C-reativa na obesidade decorre do excesso de citocinas pró-inflamatórias, enquanto o aumento de PAI-1 contribui para o estado pró-trombótico, exercendo efeitos diretos e indiretos sobre as doenças cardiovasculares (WILSON *et al.*, 1998).

FIGURA 2. Produção de adipocinas e correlação com resistência a insulina, função endotelial, hipertensão e ação no sistema nervoso simpático (KOTSIS *et al.*, 2010).

Portanto, uma série de reações inflamatórias e resistência à insulina, desencadeados também pela obesidade, são demonstradas na síndrome metabólica como características de grande importância e que podem ser vistas como um alvo interessante para novas abordagens terapêuticas.

1.3. Intervenções terapêuticas na síndrome metabólica: As tiazolidinadionas (TZDs) e os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs)

Algumas intervenções terapêuticas objetivam a melhora na sensibilidade tecidual à insulina juntamente a efeitos antiinflamatórios e hipolipemiantes. As tiazolidinadionas (TZDs) compreendem uma classe fármacos hipoglicemiantes que reduzem a resistência à insulina pelos tecidos periféricos. Evidências indicam que os efeitos hipoglicemiantes das TZDs são mediados via ativação das isoformas gama, alfa e/ou beta/delta do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR_γ, PPAR_α e PPAR_{β/δ}), os quais podem atuar como agonistas parciais, plenos ou duais de PPARs (NOLAN *et al.*, 1994; BERGER *et al.*, 1999; HAUNER, 2002).

FIGURA 3. Ativação de PPARs e vias de sinalização envolvidas na sensibilização à insulina (MORENO et. al., 2010).

Os PPARs desempenham um papel central na regulação da síntese e catabolismo de lipídeos e na resistência à insulina (YU & REDDY, 2007). Dentre as formas conhecidas de PPAR, o PPARα é predominantemente expresso no fígado, sendo também encontrado no músculo esquelético, coração e endotélio, tendo como genes alvo componentes do catabolismo lipídico como a oxidação, ligação e transporte de ácidos graxos pelas membranas, assim como o transporte de lipoproteínas e transcrição de fatores inflamatórios (KERSTEN; DESVERGNE; WAHLI, 2000). O PPARγ é predominantemente expresso em tecido adiposo, intestino, células beta e endotélio (AKBIYIK *et al.*, 2004), sendo mais relacionado com a adipogênese, a partir da diferenciação e maturação de adipócitos (WILLSON *et al.*, 2000). A isoforma β/δ é mais encontrada no fígado, músculo e intestino. Apesar das suas vias de sinalização ainda não estarem muito bem elucidadas, correlaciona-se com a regulação da expressão de acetil-CoA sintase 2 no cérebro, conferindo participação no metabolismo lipídico. As diferentes isoformas são codificadas por genes diferentes em diversos tecidos, interagindo com ligantes específicos e promovendo a regulação de genes distintos (RICOTE & GLASS, 2007; BALAKUMAR *et al.*, 2007).

Além do efeito sensibilizador à insulina, alguns estudos clínicos apontam que o uso de TZDs melhora o perfil lipídico de pacientes diabéticos. No entanto, apesar de efeitos benéficos, como o potencial anti-inflamatório (PASCERI *et al.*, 2000, RUAN; POWNALL; LODISH, 2003), o aumento de HDL e redução dos níveis de triglicérides serem relatados, o aumento de LDL também é descrito (GOLDBERG *et al.*, 2005). Apesar dos efeitos terapêuticos, o uso destes fármacos também apresenta efeitos adversos importantes, como a retenção de fluidos, o aumento de peso corporal e edema periférico (LEBOVITZ, 2002, PATEL, 2009). Nesse contexto, apesar das TZDs terem emergido como um tratamento eficaz na sensibilização à insulina, essa classe de fármacos não é atualmente recomendada no tratamento de síndrome metabólica, uma vez que seus efeitos adversos somam-se a outros fatores, como a obesidade e as dislipidemias, podendo comprometer o quadro clínico do paciente.

Inicialmente, três TZDs foram aprovadas para uso clínico: troglitazona, rosiglitazona e pioglitazona. Enquanto a troglitazona foi associada à hepatotoxicidade severa e subseqüentemente retirada do mercado, a rosiglitazona e a pioglitazona foram prescritas clinicamente para o controle glicêmico (HAUNER, 2002). Recentemente, a rosiglitazona, foi retirada do mercado devido a evidências apontarem que seu uso estaria associado com o risco aumentado de eventos cardíacos (HERNANDEZ *et al.*, 2011, LOKE; KWOK; SINGH, 2011, NISSEN; WOLSKI, 2010, GRAHAM *et al.*, 2010).

FIGURA 4. Estrutura das TZDs já comercializadas: Rosiglitazona, Pioglitazona e Troglitazona. (Adaptação PANCHAPAKESAN; CHEN & POLLOCK, 2005).

Desse modo, a busca por novos derivados tiazolidínicos, que compartilhem dos efeitos benéficos da rosiglitazona e da pioglitazona sem apresentar os mesmos efeitos deletérios, foi impulsionada. Como resultado, vários novos derivados têm sido

desenvolvidos e muitos outros se encontram em estágios pré-clínicos e clínicos de desenvolvimento. Todos eles compartilham de uma estrutura tiazolidina-2,4-diona, na qual modificações químicas seletivas nos radicais ligados a este anel tiazolidínico são realizadas no intuito da melhora da eficácia terapêutica e minimização dos efeitos colaterais desses fármacos.

1.4. Os novos derivados tiazolidínicos

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, 2001). Com a aplicação de bioisosterismo pode-se analisar a influência da modificação de um átomo ou de um grupo de átomos por seu bioisótero sobre a atividade biológica que o fármaco original apresenta, podendo ter ação idêntica ou mesmo antagônica.

Trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF), filiado ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT) (<http://www.ufpe.br/nupit>) têm explorado como *scaffold* o anel tiazolidínico para planejar novas entidades químicas com potencial atividade biológica. A base para o desenvolvimento de novas moléculas tiazolidínicas dicarboniladas e compostos análogos bioisósteros como potenciais ligantes tem sido defendida pela sua estrutura heterocíclica contendo carbonilas exocíclicas e átomos de enxofre e nitrogênio que fazem parte do seu núcleo pentagonal. As TZDs podem interagir com estruturas moleculares nucleofílicas e eletrofílicas de macromoléculas (alvo terapêutico) e, do ponto de vista reacional, apresentam grande reatividade. Também podem ser alquiladas na posição 3 com haletos de alquila ou arila tanto em solventes próticos ou apróticos. Possuem ainda, um grupamento metileno ativo que pode ser condensado com cetonas ou aldeídos aromáticos. Pela substituição dos átomos de oxigênio da tiazolidina-2,4-diona por enxofre, três tio-derivados da tiazolidina são teoricamente possíveis: 2-tioxo-tiazolidin-4-ona; 4-tioxo-tiazolidin-2-ona; e a tiazolidina-2,4-diona. Para avaliar a afinidade das TZDs por reagentes orgânicos e biomacromoléculas foram feitas modificações em sua estrutura química

visando derivatizações comportando diversos substituintes, de modo a obter espaços químicos facilitadores de interações intermoleculares com sistemas biológicos. Para tanto, o LPSF desenvolve vias de obtenção de novos derivados tiazolidínicos bioativos, o que culminou com a construção de uma importante coleção de moléculas bioativas, contando com uma quimioteca com mais de 400 novos derivados tiazolidínicos.

Estudos recentes deste grupo apontam que alguns destes novos derivados tiazolidínicos apresentam propriedades hipoglicemiantes similares à rosiglitazona, em modelo animal de diabetes (DA COSTA LEITE *et al.*, 2007, MOURÃO *et al.*, 2005). Recentemente, demonstrou-se que um destes derivados, GQ-16, promove a redução da glicemia, insulina e leptina de modo similar à rosiglitazona (AMATO *et al.*, 2012).

O laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade de São Paulo, coordenado pela Prof^a. Dulcineia Saes Parra Abdalla, tem explorado a atividade biológica desses novos derivados tiazolidínicos, em colaboração com o NUPIT/UFPE, no âmbito do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT_if). Dados desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa apontam efeitos benéficos de algumas destes novos derivados em modelo animal de aterosclerose, bem como em cultura celular de macrófagos, pré-adipócitos, pré-osteoblastos e células endoteliais (FAINE *et al.*, 2011).

Nesse sentido, estudos realizados em nosso laboratório demonstram que em contraste com a rosiglitazona, os novos derivados tiazolidínicos não alteram de modo significativo a osteogênese, a partir de pré-osteoblastos (SAITO *et al.*, 2012), o que levaria à perda óssea, um efeito adverso apontado com o tratamento de TZDs disponíveis comercialmente e atribuída ao desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea (GREY, 2008). Além desses resultados, outros estudos do grupo apontam que os novos derivados tiazolidínicos podem inibir a progressão do processo aterosclerótico de modo similar ao da rosiglitazona, em modelo animal de camundongo *knockout* para o gene do receptor de LDL e também que as modificações químicas dos novos derivados podem alterar suas propriedades angiogênicas. No entanto, o efeito anti-inflamatório de compostos dessa classe é mantido, como pode ser observado pela diminuição da expressão de marcadores

pró-inflamatórios em células endoteliais estimuladas com TNF α (CÉSAR *et al.*, 2012).

Além disso, enquanto o tratamento com rosiglitazona induz a diferenciação de pré-adipócitos a células maduras, os novos derivados tiazolidínicos não alteram de modo significativo a diferenciação de pré-adipócitos, não produzindo efeitos adipogênicos pela diminuição da expressão de β -catenin (mRNA) e não modificam a expressão proteica de CD36 e aP2 nestas células (SAITO *et al.*, 2012).

A obtenção de resultados positivos demonstrando a diminuição/alteração de efeitos adversos descritos com o uso das TZDs já comercializadas, associada à manutenção do efeito sensibilizador à insulina, sugere uma utilização futura destes novos derivados tiazolidínicos no tratamento de síndrome metabólica.

1.5. Os novos derivados tiazolidínicos como terapêutica na síndrome metabólica

O estímulo da investigação dos efeitos biológicos desses novos derivados tiazolidínicos sobre o quadro de síndrome metabólica surgiu ao considerá-los candidatos a fármacos promissores a partir dos resultados obtidos pelos estudos do nosso grupo de pesquisa, que potencialmente apresentaram propriedades terapêuticas similares e menos efeitos adversos, quando comparados à rosiglitazona. Desse modo, o presente estudo objetivou analisar os efeitos de novos compostos tiazolidínicos em modelo animal de síndrome metabólica.

Numa primeira etapa do projeto foi realizada a padronização do modelo animal de síndrome metabólica, para que fosse estabelecido um modelo fidedigno, onde pudessem ser observadas características clássicas da síndrome metabólica. Numa segunda etapa foi realizado o tratamento com novos derivados tiazolidínicos nos animais com a síndrome metabólica já desenvolvida. A partir de dados preliminares obtidos nesta segunda etapa do projeto, observou-se que um dos derivados tiazolidínicos estudados até o momento, GQ-11, apresentou efeitos hipoglicemiantes e anti-inflamatórios, além de efeitos imunomodulatórios no tecido adiposo epididimal, envolvendo citocinas como MCP-1, PECAM, VCAM, VEGF E IL-10.

Esses dados preliminares *in vivo* obtidos na presente dissertação, que envolvem modulação de citocinas que participam do processo de cicatrização, conjuntamente com dados obtidos em um projeto de pós-doutorado no grupo de pesquisa, que demonstraram ação angiogênica *in vitro*, mostraram que a GQ-11 tem efeitos que poderiam torná-la uma alternativa terapêutica promissora na cicatrização de feridas, em especial, nos casos de descompensação metabólica como ocorre no diabetes.

1.6. Os novos derivados tiazolidínicos e a cicatrização de lesões cutâneas diabéticas

Para expandir a investigação, foi firmada uma colaboração entre o laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP), supervisionado pela Prof^a. Dulcineia Saes Parra Abdalla e o laboratório de Cardiologia e Farmacologia, do Departamento de Medicina da *University of Illinois at Chicago* (UIC), supervisionado pelo Prof. Marcelo Bonini e também com colaboração do Prof. Timoty Koh, na mesma universidade, no *Center for Tissue Repair and Regeneration*, onde foi possível realizar os experimentos e utilizar camundongos de linhagens MKR e FVB, linhagens de mesmo background genético, disponibilizados pelos colaboradores.

Os camundongos da linhagem MKR superexpressam um dominante negativo do receptor IGF-1 mutado geneticamente por substituição de lisina por arginina, exclusivamente no tecido muscular esquelético (FERNÁNDEZ et al., 2001, 2002; VAITHEESVARAN et al., 2010). A proteína IGF-1 ao se ligar ao seu receptor na membrana celular, ativa as vias de sinalização clássicas RAS-ERK-MAPK e PI3K-AKT, resultando na translocação da proteína GLUT-4 para a membrana das células, responsável pela captação de glicose para o meio intracelular (BRUGTS et al., 2008). Uma vez que nessa linhagem de camundongos existe uma mutação nesses receptores de IGF-1, a translocação de GLUT-4 é prejudicada, levando ao desenvolvimento de uma resistência à insulina no músculo esquelético.

FIGURA 5. Vias de sinalização ativadas pela ligação de insulina e/ou IGF-1 em seus respectivos receptores para a indução da captação de glicose pela célula (MORENO et. al., 2010).

Nas primeiras semanas de vida, os camundongos MKR desenvolvem diabetes tipo 2 com resistência severa à insulina, demonstrando hiperinsulinemia a partir da segunda semana de vida associada ao aumento significativo de lipídeos séricos (NEFA e triglicerídeos), indicando resistência a insulina no tecido adiposo. Essa condição é seguida pelo aumento compensatório na secreção de insulina pelas células beta do pâncreas, levando a uma resistência à insulina hepática a partir da terceira semana de vida, com aumento de liberação de glicose pelo fígado e deficiência na utilização de ácidos graxos no músculo, além das células beta pancreáticas descompensadas (KIM et al., 2003; VAITHEESVARAN et al., 2010). A partir desta caracterização, os camundongos MKR vêm sendo estudados e utilizados como modelos de cicatrização de lesões cutâneas diabéticas com o objetivo de entender os diferentes estágios desse processo, assim como as vias de sinalização envolvidas no processo de cicatrização na condição do diabetes.

O processo de cicatrização de lesões ulcerosas e regeneração celular envolvem três estágios sequenciais: inflamação, proliferação e remodelação (MARTIN, 1997; SINGER; CLARK, 1999). Imediatamente após a lesão, é formado um coágulo no local da ferida por componentes sanguíneos, fornecendo matriz para o fluxo de neutrófilos, monócitos e macrófagos e representando a fase inflamatória,

que irá recrutar macrófagos de fenótipo M1 para combater possíveis infecções e remover resíduos teciduais. A fase inflamatória é sinalizada pela secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β . Num segundo estágio, após a resolução de infecções e remoção de resíduos teciduais, há uma conversão do estágio pró-inflamatório para o anti-inflamatório, onde os macrófagos de fenótipo M1 darão espaço para o recrutamento de macrófagos com fenótipo M2, a partir da secreção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, ARG-1 E TGF- β , que irão participar da resolução do estágio inflamatório e dando base para o recrutamento de fibroblastos para o início do próximo estágio, o de proliferação celular.

O estágio proliferativo é caracterizado pela regeneração celular, neovascularização e formação de matriz extracelular. Os fatores de crescimento e as citocinas envolvidas nessas fases são responsáveis pela regulação da sinalização de diversos fatores e receptores no processo de cicatrização (WERNER; GROSE, 2003). O estágio de remodelação é caracterizado por maior deposição de colágeno na matriz extracelular, onde o novo tecido irá adquirir resistência à tração.

FIGURA 6. Células envolvidas no processo de cicatrização regular e deficiente, seus respectivos marcadores e estruturas formadas (CLARK; GHOSH; TONESSEN, 2009).

No quadro clínico do diabetes, as lesões cutâneas se mantêm numa condição inflamatória crônica e não podem seguir para os próximos estágios da cicatrização, uma vez que o fluxo de células inflamatórias e a produção de seus mediadores causam desequilíbrio nos fatores ativadores e inibitórios, impedindo a síntese de matriz extracelular e remodelação. Nestes casos, o diabetes prejudica a função de neutrófilos e macrófagos, adesão celular, quimiotaxia, fagocitose e a produção e secreção de citocinas, conjuntamente com a disfunção angiogênica (MARHOFFER et al., 1992), explicando a dificuldade de cicatrização nos camundongos MKR.

Para esses estudos foram selecionadas citocinas que desempenham papéis chave nas vias de sinalização do processo de cicatrização como TNF- α e TSG-6, TGF- β , e VEGF, além de marcadores de macrófagos, como YM1, e marcadores específicos de macrófagos com o fenótipo M2, como IL-10 e ARG-1.

A partir destas informações, investigamos os efeitos biológicos dos novos derivados tiazolidínicos nos modelos animais de síndrome metabólica e cicatrização de lesões cutâneas no modelo experimental de diabetes, utilizando camundongos MKR, uma vez que o uso destes potenciais fármacos podem modular vias de sinalização envolvidas no processo inflamatório, que permeia ambos os modelos e também vias de sensibilização à insulina, podendo configurar novas estratégias terapêuticas.

2. OBJETIVOS GERAIS

O presente projeto visou investigar os efeitos de novos compostos tiazolidínicos em modelo animal de síndrome metabólica em camundongos C57BL/6J e C57BL/6J com deficiência para o gene do receptor de LDL (LDLr^{-/-}) e os efeitos de um dos novos derivados tiazolidínicos, GQ-11, sobre a cicatrização de lesões ulcerosas no modelo experimental de diabetes.

2.1. ESTRATÉGIAS

2.1.1. Validar o modelo animal de síndrome metabólica, a partir de parâmetros bioquímicos e antropométricos;

2.1.2. Investigar os efeitos dos novos derivados tiazolidínicos sobre o peso corporal e o percentual de gordura corporal periférica, a resistência à insulina e as concentrações plasmáticas de glicose, insulina, leptina e adiponectina;

2.1.3. Avaliar os efeitos dos novos derivados tiazolidínicos sobre a expressão de genes pró- e anti-inflamatórios no tecido adiposo de camundongos com síndrome metabólica;

2.1.4. Investigar os efeitos dos novos derivados tiazolidínicos sobre a expressão de adipocinas e genes envolvidos na sinalização de insulina em camundongos com síndrome metabólica;

2.1.5. Analisar os efeitos dos novos derivados tiazolidínicos sobre a densidade óssea em camundongos com síndrome metabólica;

2.1.6. Investigar os efeitos da GQ-11 sobre a expressão de genes pró- e anti-inflamatórios em modelo animal de cicatrização de lesões cutâneas no modelo experimental de diabetes;

2.1.7. Observar os efeitos da GQ-11 na estruturação e organização celular e tecidual a partir de cortes histológicos de lesões cutâneas no modelo experimental de diabetes;

2.1.8. Avaliar os efeitos da GQ-11 na expressão de genes pró- e anti-inflamatórios em cultura celular de macrófagos primários.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICA

3.1.1. Dieta

A dieta para desenvolvimento do modelo animal de síndrome metabólica foi adaptada e administrada conforme descrito por Ding *et al.* (2012) e Subramanian *et al.* (2012). A composição das rações para as dietas controle e hiperlipídica são apresentadas em anexo. A adaptação da dieta incluiu modificações embasadas na *American Institute of Nutrition* (AIN – 93M) (REEVES *et al.*, 1993).

3.1.2. Animais

Camundongos C57BL/6J (*Wild Type*) e C57BL/6J deficientes em receptor de LDL (LDLr^{-/-}), machos, jovens, de aproximadamente 60 dias, provenientes do Biotério do Conjunto das Químicas da USP foram submetidos à adaptação durante 1 semana. Após esse período, os animais foram divididos em dois grupos e submetidos à dieta controle ou hiperlipídica por 20 semanas para o desenvolvimento de síndrome metabólica.

Durante todo o protocolo experimental, os animais foram mantidos em gaiolas com ambiente controlado, sendo a temperatura igual a $20 \pm 2^\circ \text{C}$ em ciclo de 12 horas claro/escuro e umidade relativa de 55 a 65%, onde os animais tiveram livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos desse estudo seguiram os princípios éticos de experimentação animal. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (em anexo), em 03/12/12 (CEUA/FCF/377) e pelo Comitê Interno de Biossegurança (em anexo), em 03/07/12.

3.2. TRATAMENTO

Os camundongos C57BL/6J (*Wild Type*) e C57BL/6J deficientes em receptor de LDL, submetidos a 20 semanas de dieta controle e hiperlipídica foram divididos em grupos de tratamento com água, veículo, pioglitazona, GQ-02, GQ-11, GQ-177 e

Lyso-7. Esses animais foram tratados durante 28 dias seguidos, com os novos derivados tiazolidínicos e com a pioglitazona (controle), em doses de 20 mg/ kg em volumes de, no máximo, 500µL, por gavagem, de acordo com o protocolo pré-estabelecido no nosso grupo de pesquisa. Durante todo o período de tratamento os animais foram mantidos em gaiolas com ambiente controlado, com temperatura de $20 \pm 2^{\circ}$ C, em ciclo de 12 horas claro/escuro e umidade relativa de 55 a 65%. Os animais tiveram livre acesso à água e ração. Durante o tratamento, os animais continuaram a receber a mesma dieta recebida durante as 20 primeiras semanas de protocolo.

Os derivados tiazolidínicos avaliados, GQ-02, GQ-11, GQ-177 e Lyso-7 foram fornecidos pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (NUPIT), na Universidade Federal de Pernambuco, na forma sólida, e foram diluídos em veículo (solução salínica (NaCl 0,9%) a 0,25% Tween 20), em soluções a 2 mg/ mL. Para os grupos tratados com pioglitazona (grupo controle), foi utilizada a forma comercial de cloridrato de pioglitazona (Actos®), onde cada comprimido (16,53 mg de cloridrato de pioglitazona, equivalente a 15 mg de pioglitazona total), também foi diluído em veículo em soluções a 2 mg/ mL. Os tratamentos foram preparados semanalmente e mantidos a -20°C, em microtubos, até o momento de serem administrados.

3.3. EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Os animais foram eutanasiados na 20ª semana de dieta no período de análise do modelo de síndrome metabólica, e na 24ª semana quando submetidos ao tratamento com novos derivados tiazolidínicos, por excesso de anestésicos, aplicando-se a dose de 150 mg/kg de cloridrato de cetamina e 50 mg/kg xilazina. Na eutanásia, realizada com jejum prévio de 4 horas, foram retirados o coração para análises morfológica e patológicas, o fígado para análises de expressão gênica e o tecido adiposo epididimal para análises de expressão gênica e de imunohistoquímica. Também foram retirados e armazenados o pâncreas, a aorta, o tecido adiposo subcutâneo, mesentérico e retroperitoneal para futuros interesses de análise.

3.4. PARÂMETROS AVALIADOS

O quadro de síndrome metabólica nos animais foi caracterizado pela pesagem dos animais e avaliação do consumo de ração, realizados semanalmente, bem como pela avaliação de parâmetros bioquímicos realizados no início do experimento e nos intervalos de 7, 14 e 20 semanas de dieta. Foram avaliadas as concentrações plasmáticas de glicose, insulina, adiponectina, leptina, perfil lipídico e a responsividade à insulina, a partir de testes de tolerância à glicose (T.T.G.) e insulina (T.T.I.). A ingestão energética dos animais foi calculada de acordo com o consumo médio de ração semanal do grupo, em quilocalorias (kcal), a partir da composição de lipídeos (9 kcal/g), proteínas e carboidratos (4 kcal/g) da dieta referida, e transformados na unidade de quilojoules (kJ), de acordo com o Sistema Internacional de Unidades, onde 1 quilocaloria corresponde a 4,184 quilojoules.

Durante o período de tratamento, foi aferido semanalmente o peso dos animais e as concentrações plasmáticas de glicose de jejum. Após os 28 dias de tratamento foram realizados novos T.T.G. e T.T.I., para avaliar as alterações promovidas pelos novos derivados tiazolidínicos e foram coletadas imagens de raio-x a partir do equipamento MSFX, para que fosse possível analisar o percentual de tecido adiposo periférico e a densidade óssea dos grupos tratados. As análises sorológicas pós-tratamento foram realizadas utilizando sangue coletado no momento da eutanásia.

3.4.1. T.T.G. – Teste de tolerância à glicose

Os animais foram submetidos a jejum prévio de 4 horas e receberam uma dose de 2 g/ kg de peso de uma solução de dextrose anidra em água Milli-Q (50%), via injeção intraperitoneal. A glicemia capilar caudal foi determinada através de glicosímetro (Contour TS Bayer®), em diferentes momentos: 0 (pré-injeção), 5, 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração de glicose, para a construção da curva glicêmica e análises de área sob a curva. O peso dos animais foi aferido no dia anterior ao experimento e foi utilizado o peso médio dos grupos de animais de cada gaiola para a determinação da quantidade de glicose a ser injetada.

3.4.2. T.T.I. – Teste de tolerância à insulina

Os animais foram submetidos a jejum prévio de 4 horas e receberam uma dose de 0,75 mU/ kg de peso de uma solução de insulina regular humana em NaCl (200 mU/ mL), via intraperitoneal. A glicemia capilar caudal foi determinada através de glicosímetro (Contour TS Bayer®), nos momentos: 0, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos após a administração de insulina. A partir destes dados foi construída a curva glicêmica e calculada a regressão linear por logaritmo neperiano (de base 1/e), sendo possível obter o percentual de decaimento plasmático de glicose (K_{ITT} – constante de decaimento plasmático de glicose) para avaliação da responsividade à insulina.

3.4.3. Determinação dos níveis de adiponectina, leptina e insulina

As amostras de sangue foram coletadas via submandibular nos períodos inicial, 7, 14 e 20 semanas; e por punção cardíaca após o período de tratamento, no momento da eutanásia. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm, 4°C, para obtenção do soro e armazenados a -80°C até o momento de análise. As análises foram realizadas pelo método ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay), utilizando kits comerciais, seguindo as instruções do fabricante (EMD Millipore Mouse ELISA Kit).

3.4.4. Determinação do perfil lipídico

As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca após o período de tratamento, no momento da eutanásia. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm, 4°C, para obtenção do soro e armazenados a -80°C. A determinação de colesterol total, frações e triglicerídeos foi realizada através de método enzimático/colorimétrico utilizando o kit comercial Labtest® seguindo as instruções do fabricante (Diagnóstica S/A).

3.4.5. Análise de componentes pró-inflamatórios e anti-inflamatórios

3.4.5.1. Extração de RNA

Uma parte do tecido adiposo e do fígado, removidos após a eutanásia dos animais, foram acondicionados em criotubos e rapidamente congelados em nitrogênio líquido até análise. Em seguida, o tecido foi homogeneizado, com uso de

homogeneizador com pistilo de teflon, para extração de RNA utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, Life Technologies) e o kit de extração de RNA RNeasy® (Qiagen), seguindo instruções fornecidas pelo fabricante.

3.4.5.2. Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit SuperScript® VILO™ (Invitrogen, Life Technologies), com capacidade de síntese de 2 mcg de cDNA por reação, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. Os tubos foram incubados em termociclador por 5 min a 65°C, 120 min a 50°C e 5 min a 95°C. Após a reação, os tubos foram armazenados a -20°C.

3.4.5.3. Quantificação da expressão gênica

Para as reações de *real time PCR* (qRT-PCR) foram utilizados 0.1 µL de cDNA (200 ng/ µL), 0.2 µL do primer *forward* e 0.2 µL do primer *reverse*, 5 µL de Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies) e 3.6 µL de água milliQ estéril e livre de *nases*. Os ensaios qRT-PCR foram realizados nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60°C por 60 segundos. Cada amostra foi feita em duplicata e a análise dos dados resultantes das reações de *real-time PCR* foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Foram avaliados os genes: il-6, il-10, il-17, ifn- γ , tnf- α , glut-2, glut-4, nf- κ -b, fgf-21, icam, vcam, vegf, leptina, resistina, adiponectina, mcp-1, ppar α , ppar γ , pgc1- α , srebp, lxr- β e β -catenina, com os *house keeping* GAPDH e S18. utilizando primers específicos (em anexo) sintetizados pela empresa Exxtend Oligos.

3.4.5.4. Citometria de fluxo

As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca após o período de tratamento, no momento da eutanásia. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm, 4°C, para obtenção do soro e armazenados a -80°C. A determinação do perfil inflamatório do soro dos animais foi realizada através da citometria de fluxo,

utilizando o kit Mouse Inflammation Citometric Beads Array (CBA)[®] (BD, Biosciences), onde foram analisadas as interleucinas 6, 10 e 12, $\text{tnf-}\alpha$, $\text{ifn-}\gamma$ e mcp-1 .

3.4.6. Obtenção de imagens por raio-x (MSFX-Pro)

3.4.6.1. Determinação de percentual de gordura corporal periférica

O percentual de gordura periférica dos animais foi determinado por imagens captadas pelo equipamento MSFX-Pro (Bruker BioSpin Corporation, Billerica, MA, USA), a partir da absorção de raios-x de dupla energia (Dual-energy X-ray absorptiometry - DXA). Animais previamente anestesiados em isoflurano 3% foram colocados em posição de decúbito ventral no interior do equipamento e mantidos sob anestesia durante todo o processo. Duas imagens de raios -x foram adquiridas, utilizando os parâmetros descritos na tabela a seguir.

TABELA 1. Parâmetros de captação de imagem no Bruke Molecular Imaging Software, para análises de percentual de gordura corporal periférica de camundongos.

Variável	Imagem 01	Imagem 02
Corrente elétrica	35 KVP	35 KVP
Campo de visão	140mm	140mm
Abertura do diafragma	2,8	2,8
Plano focal	12mm	12mm
x-binning	0	0
y-binning	0	0
Filtro de raio-x	0	8mm

As imagens foram analisadas com o Bruker Molecular Imaging Software (Bruker BioSpin Corporation, Billerica, MA, USA), onde foi calculada a razão entre a Imagem 01 e a Imagem 02. A imagem 03, resultante dessa razão, foi formatada de acordo com instruções do fabricante, com parâmetro de cores mínimo de 1.5 e máximo de 2.0, para a determinação da região de interesse (ROI) relacionada ao

tecido magro e aos ossos (R1). Uma segunda formatação foi feita, com mínimo de 2.0 e máximo de 3.0, para determinação de ROI relativa ao tecido adiposo periférico e ossos (R2). Com os dados das áreas das duas ROIs foi feita a razão entre as mesmas, onde $[(R2-R1)/R2] \times 100 = \% \text{ tecido adiposo periférico}$.

3.4.6.2. Determinação de densidade óssea

A Densidade óssea foi determinada por análise de imagens de raios-x. Animais previamente anestesiados em isoflurano 3% em oxigênio medicinal, foram colocados em posição de decúbito ventral no interior do equipamento MSFX-Pro (Bruker BioSpin Corporation, Billerica, MA, USA) e mantidos sob anestesia durante todo o processo. A imagem foi adquirida de acordo com os parâmetros da tabela abaixo:

TABELA 2. Parâmetros de captação de imagem no Bruke Molecular Imaging Software, para análises de percentual de gordura corporal periférica de camundongos.

Variável	Imagem
Corrente elétrica	35 KVP
Campo de visão (field of view)	90mm
Abertura diafragma	2,5
Plano focal	12mm
x-binning	0
y-binning	0
Filtro de raios-x	0,4mm

Posteriormente, as análises foram analisadas com Bruker Molecular Imaging Software (Bruker BioSpin Corporation, Billerica, MA, USA), onde foram construídas quatro regiões de interesse retangulares e perpendiculares ao fêmur esquerdo do animal. A densidade óssea foi calculada nessas quatro regiões, de forma independente, utilizando algoritmo fornecido pelo software supracitado.

3.5. MODELO EXPERIMENTAL DE CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS NO MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES

3.5.1. Animais

Camundongos MKR e FVB (linhagem controle), machos, com 60 dias, providos do Laboratório Jackson, foram mantidos no biotério da *University of Illinois at Chicago*, em gaiolas individuais com água e ração regulares. Após um período de 3 dias de adaptação nas gaiolas individuais, os camundongos foram anestesiados com isoflurano 3%, via inalatória, e submetidos a 4 incisões na região lombar, utilizando um instrumento de biópsia de 8 mm, de acordo com o protocolo previamente estabelecido no grupo (MIRZA et al, 2014). Após a biópsia, os tecidos saudáveis foram coletados e armazenados para utilização como controle e as incisões foram cobertas com uma membrana plástica estéril para evitar contaminação.

3.5.2. Tratamento

Após serem feitas as incisões foi necessário aguardar 3 dias para o início do tratamento, para melhor observação da resposta inflamatória. Após os 3 dias as incisões foram tratadas com veículo (F-127® *pluronic gel*, Sigma-Aldrich, 25% em PBS) ou o novo derivado tiazolidínico (GQ-11, diluída em veículo), sendo aplicado topicamente 50 µL de uma solução a 2 mM de GQ-11 em cada incisão pelos 4 dias seguintes.

3.5.3. Eutanásia

Após os 4 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e as incisões foram extraídas. De cada animal, duas incisões foram extraídas para análises histológicas, sendo coletadas em formaldeído 4% para fixação durante 24h e posteriormente transferidas para soluções de sacarose 15% por 24h, sacarose 30%, por 24h e etanol 70% até serem enviadas ao centro de histologia para serem parafinizadas e coradas com Hematoxilina-Eosina. As outras duas incisões de cada animal foram extraídas para análises de expressão gênica; portanto, foram coletadas

em criotubos e rapidamente congeladas em gelo seco até serem levadas ao nitrogênio líquido.

3.5.4. Análises

As amostras coletadas para as análises histológicas foram enviadas para o centro de histologia do Departamento de Medicina da *University of Illinois at Chicago*, onde foram parafinizadas e coradas com Hematoxilina-Eosina.

As amostras coletadas para análises de expressão gênica foram homogeneizadas, com uso de homogeneizador com pistilo de teflon, para extração de RNA utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, Life Technologies), seguindo instruções do fabricante. Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription® Kit (Applied Biosystems, Life Technologies), com capacidade de síntese de 1 mcg de cDNA por reação, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. Os tubos foram incubados em termociclador por 5 min a 65°C, 120 min a 50°C e 5 min a 95°C. Após a reação, os tubos foram armazenados a -20°C.

Para as reações de *real time PCR* (qRT-PCR) foram utilizados 0.1 µL de cDNA (200 ng/ µL), 0.2 µL do *primer forward* e 0.2 µL do *primer reverse*, 5 µL de Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies) e 3.6 µL de água miliQ estéril e livre de RNases. Os ensaios qRT-PCR foram realizados nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos *primers* e extensão a 60°C por 60 segundos. Cada amostra foi feita em duplicata e a análise dos dados resultantes das reações de *real-time PCR* foi realizada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Foram avaliados os genes: *tnf-α*, *ifn-γ*, *il-1β*, *il-10*, *tgf-β*, *ym1*, *arg-1*, *vegf* e *tsg-6*, com o *house keeping* GAPDH, utilizando-se *primers* específicos (anexo 4), sintetizados pela empresa IDT Technologies.

3.5.5. Cultura celular

Para complementar os estudos do efeito da GQ-11 sobre a resposta de macrófagos a estímulos pró-inflamatórios, foram extraídos macrófagos primários de medula óssea de camundongos FVB. Para a extração utilizou-se o protocolo *Cold Spring Harbor* (WEISCHENFELDT and PORSE, 2008), onde a medula óssea dos fêmures foi lavada em placas de 15 cm e as células diferenciadas com meio condicionado L929 por 7 dias. Após a diferenciação, utilizou-se EDTA (Life Technologies) para desaderir os macrófagos, os quais foram plaqueados na densidade de 1×10^6 células em placas de 12 poços. Após adesão nas placas, as células foram tratadas com GQ-11, Pioglitazona ou veículo (DMSO) a 2 mM por 24h e, em seguida, foram estimuladas com LPS a 250 ng/ml.

Após os períodos de 2 e 6 horas de estímulo com LPS, o meio de cultura foi coletado e armazenado a -80°C e as células aderidas foram processadas com o reagente TRIzol (Invitrogen, Life Technologies) e armazenadas a -80°C até o momento da extração do RNA. A extração de RNA e a análise por *real time* PCR (q RT-PCR) foram feitos utilizando os mesmos protocolos descritos para as amostras das lesões ulcerosas diabéticas. Foram avaliados os genes: $\text{tnf-}\alpha$, $\text{il-1}\beta$, il-10 e $\text{tgf-}\beta$, com o *house keeping* GAPDH, utilizando-se *primers* específicos (anexo 4), sintetizados pela empresa IDT Technologies.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância estatística de todos os experimentos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) para um fator, seguido do teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações e teste t, quando necessário. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SPSS 8.0 (Chicago – Il), e GraphPad Prism® 5.03.

4. RESULTADOS

Na primeira etapa do projeto, foram obtidos resultados que representam a validação do modelo animal de síndrome metabólica, onde os animais foram separados em grupos submetidos à dieta controle e hiperlipídica. Avaliou-se o consumo de ração e a ingestão de energia (em quilojoules), dos camundongos que receberam as dietas controle e hiperlipídica.

Embora o consumo de ração não tenha diferido de modo significativo entre os grupos, a ingestão de energia nos grupos com dieta hiperlipídica de ambas as linhagens foi maior quando comparados aos grupos controle correspondentes ($p < 0,05$ na linhagem C57BL/6J LDLr $-/-$ e $p < 0,001$ na linhagem C57BL/6J).

FIGURA 7. Consumo semanal de ração por grupo, individual, em 20 semanas de dieta (A), e ingestão de energia, em quilojoules (B), nos grupos das linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) e 57BL/6J LDLr $-/-$, submetidos à dieta controle e hiperlipídica. $n = 5$ por grupo. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

O peso médio final dos camundongos nos grupos que receberam dieta hiperlipídica, de ambas as linhagens, foi maior que o peso inicial dos mesmos grupos e que o peso final dos grupos controles correspondentes ($p < 0,0001$). Não foi observado ganho de peso significativo nos grupos controles de ambas as linhagens ao longo das 20 semanas de dieta (Figura 6).

FIGURA 8. Peso inicial dos camundongos, aferido antes da submissão à dieta (A) e peso final aferido após 20 semanas de dieta (B), dos grupos das linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) e C57BL/6J LDLr *-/-*, submetidos à dieta controle e hiperlipídica e ganho de peso ao longo das 20 semanas de dieta dos grupos, em gramas (C e D). *** $p < 0,0001$. $n = 5$ por grupo. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

O gráfico temporal (Figura 7D) mostra o ganho de peso dos camundongos ao longo das 20 semanas de dieta, indicando que a dieta hiperlipídica promoveu maior ganho de peso em ambas linhagens ao longo do período de 20 dias de dieta.

TABELA 3. Relação de variáveis entre consumo e ganho de peso nos grupos de linhagens C57BL/6J (WT) e C57BL/6J LDLr *-/-* (LDLr *-/-*), submetidos à dieta controle e hiperlipídica. $n = 5$ por grupo. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Variável	Controle WT	Hiperlipídico WT	Controle LDLr <i>-/-</i>	Hiperlip. LDLr <i>-/-</i>
Peso inicial (g)	26,05 $\pm$ 1,18	26,59 $\pm$ 2,56	23,80 $\pm$ 1,05	20,69 $\pm$ 2,17
Peso final (g)	24,83 $\pm$ 1,56	39,29 $\pm$ 1,26	24,03 $\pm$ 1,97	40,28 $\pm$ 6,39
Ganho de peso (g)	2,93 $\pm$ 0,44	17,28 $\pm$ 2,18	4,04 $\pm$ 1,08	21,87 $\pm$ 4,11
Ganho de peso (%)	11,25 $\pm$ 5,60	64,99 $\pm$ 35,16	17,00 $\pm$ 9,05	105,70 $\pm$ 56,52
Consumo semanal (g)	20,94 $\pm$ 2,25	18,41 $\pm$ 2,96	23,04 $\pm$ 1,92	20,97 $\pm$ 3,60
Energia (kJ)	354,05 $\pm$ 38,08	452,66 $\pm$ 73,01	389,47 $\pm$ 32,53	515,56 $\pm$ 88,59

Enquanto foi observado um aumento de peso de 105,70% nos camundongos C57BL/6J LDLr $-/-$ e de 64,99% nos camundongos C57BL/6J em dieta hiperlipídica, um ganho de peso de 17 e 11,25% foi observado nos grupos controle, respectivamente (Tabela 3).

Ao analisar os dados de glicemia de jejum foi possível observar alterações significativas na 20ª semana de dieta, sendo que os grupos das linhagens C57BL/6J LDLr $-/-$ e C57BL/6J em dieta hiperlipídica apresentaram glicose plasmática de jejum maior que a dos respectivos grupos controle e que a glicose plasmática de jejum no período inicial do experimento, em ambas as linhagens (Figura 8).

FIGURA 9. Alterações na glicemia de jejum dos grupos de linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) e C57BL/6J LDLr $-/-$, submetidos à dieta controle e hiperlipídica, nos períodos inicial (I - tempo 0 de experimentação) e final (F - 20 semanas de dieta) (A) e glicemia de jejum temporal dos grupos (B). ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ (comparado ao grupo controle correspondente à linhagem). $n = 5$ por grupo. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

O TTG (Teste de Tolerância à Glicose) apontou decaimento mais lento da glicose basal nos grupos em dieta hiperlipídica, ao longo do período de 90 minutos após injeção de glicose (Figura 9). A área sob a curva glicêmica representa a

significância entre os comportamentos dos grupos analisados, em ambas as linhagens.

FIGURA 10. Curva glicêmica dos grupos de linhagem C57BL/6J (*Wild Type*) (A) e C57BL/6J LDLr -/- (B), submetidos a dieta controle e hiperlipídica no T.T.G.; e área sob a curva (AUC), dos grupos de linhagem C57BL/6J (*Wild Type*) (C) e C57BL/6J LDLr -/- (D), submetidos a dieta controle e hiperlipídica. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ (comparado ao grupo controle correspondente à linhagem). $n = 5$ por grupo. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

O TTI (Teste de Tolerância à Insulina) mostrou que os grupos em dieta hiperlipídica apresentaram uma tendência a maior área sob a curva, em ambas as linhagens. Quando o K_{ITT} (constante de taxa de decaimento de glicose) foi calculado, o grupo hiperlipídico dos camundongos C57BL/6J demonstrou uma taxa de decaimento significativamente menor, quando comparado ao grupo controle, assim como os camundongos C57BL/6J LDLr -/-. O K_{ITT} representa a significância entre os comportamentos dos grupos analisados, em ambas as linhagens (Figura 10).

FIGURA 11. Curva glicêmica dos grupos de linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) (A) e C57BL/6J LDLr -/- (B), submetidos a dieta controle e hiperlipídica; e K_{ITT} (constante da taxa de decaimento de glicose) no teste de tolerância à insulina, dos grupos de linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) (C) e C57BL/6J LDLr -/- (D), submetidos a dieta controle e hiperlipídica. *** $p < 0,0001$ (comparado ao grupo controle correspondente à linhagem). $n = 5$ por grupo. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Quando analisados os valores de adiponectina, insulina e leptina, observou-se uma diminuição acentuada nas concentrações de adiponectina nos grupos tratados com dieta hiperlipídica, bem como aumento nos níveis de insulina e de leptina nos mesmos grupos, em ambas as linhagens (Figura 11).

FIGURA 12. Níveis séricos temporais de adiponectina (A), insulina (C) e leptina (F) dos grupos de linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) e C57BL/6J LDLr^{-/-}, submetidos a dieta controle e hiperlipídica; e níveis séricos de adiponectina (B), insulina (D) e leptina (G) nos períodos inicial (I - tempo 0 de experimentação) e final (F - 20 semanas de dieta) dos grupos de linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) e C57BL/6J LDLr^{-/-}, submetidos a dieta controle e hiperlipídica. *** $p < 0,0001$ (comparado ao grupo controle correspondente à linhagem). $n = 5$ por grupo. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Após a realização e análise dos experimentos de validação do modelo animal de síndrome metabólica, foi iniciada a segunda etapa do projeto, onde novos camundongos foram submetidos ao protocolo e após as 20 semanas de dieta para desenvolvimento da síndrome metabólica, os mesmos foram agrupados e submetidos ao tratamento com água, veículo e os novos derivados tiazolidínicos (GQ-02, GQ-11, GQ-177 e Lyso-7).

Os resultados a seguir referem-se à segunda etapa do projeto, onde foi possível investigar os efeitos dos novos derivados tiazolidínicos em relação ao consumo, peso, resistência à insulina, perfil lipídico e modulação da expressão de genes pró-inflamatórios e pró-trombóticos nos tecidos adiposo e hepático e a densidade óssea.

FIGURA 13. Consumo semanal de ração por grupo, individual, dos camundongos de linhagens C57BL/6J (*Wild Type*), submetidos a dieta controle (A) e hiperlipídica (B); e C57BL/6J LDLr -/-, submetidos a dieta controle (C) e hiperlipídica (D), nos períodos inicial (I – antes do início do tratamento) e final (F – durante 28 dias de tratamento), tratados com água, veículo, pioglitazona (controle) e novos derivados tiazolidínicos. n = 6 por grupo. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

O consumo de ração dos camundongos em ambas as linhagens, saudáveis e com síndrome metabólica, não foi alterado significativamente com os tratamentos (Figura 12).

FIGURA 14. Peso dos camundongos de linhagens C57BL/6J (Wild Type), submetidos a dieta controle (A) e hiperlipídica (B); e C57BL/6J LDLr -/-, submetidos a dieta controle (C) e hiperlipídica (D), nos períodos inicial (I – antes do tratamento) e final (F – 28 dias de tratamento), tratados com água, veículo, pioglitazone (controle) e novos derivados tiazolidínicos. n = 6 por grupo. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

O peso dos animais foi aferido semanalmente, observando-se que não houve diferença da média de peso dos camundongos de ambas as linhagens com síndrome metabólica pelo tratamento com pioglitazone ou com os novos derivados tiazolidínicos (Figura 13).

FIGURA 15. Percentual de tecido adiposo (área periférica) por MSFX, dos grupos de linhagens C57BL/6J (*Wild Type*), submetidos a dieta controle (A) e hiperlipídica (B); e C57BL/6J LDLr *-/-*, submetidos a dieta controle (C) e hiperlipídica (D), nos períodos inicial (I – antes do tratamento) e final (F – 28 dias de tratamento). n=6 por grupo. *p<0,05, **p<0,001, ***p<0,0001 (comparado ao grupo controle correspondente à linhagem). n = 5 por grupo. Dados expressos como média ± desvio padrão.

Nos camundongos da linhagem C57BL/6J foi possível observar um aumento significativo no percentual de gordura corporal periférica nos animais saudáveis tratados com pioglitazona, GQ-02, GQ-177 e Lyso-7, quando comparados aos camundongos saudáveis tratados com veículo (Figura 14A). Os camundongos com síndrome metabólica, da mesma linhagem, tratados com GQ-02 e Lyso-7 também apresentaram aumento significativo no percentual de gordura corporal periférica (Figura 14B).

Os camundongos da linhagem C57BL/6J LDLr *-/-* saudáveis apresentaram aumento significativo no percentual de gordura corporal ao serem tratados com GQ-02, GQ-177 e Lyso-7 (Figura 14C), enquanto os camundongos de mesma linhagem, com síndrome metabólica, apresentaram aumento no percentual de gordura em todos os grupos tratados com os fármacos controle e novos derivados, com exceção de GQ-11 (Figura 14D).

Os camundongos tratados com GQ-11, de ambas as linhagens, saudáveis e com síndrome metabólica, não apresentaram aumento significativo no percentual de gordura corporal periférica.

FIGURA 16. Imagem representativa de raio-x gerado por equipamento MSFX, dos grupos de linhagens C57BL/6J, submetidos a dieta controle (A) e hiperlipídica (B); e C57BL/6J LDLr $-/-$, submetidos a dieta controle (C) e hiperlipídica (D), para quantificação do percentual de tecido adiposo (área periférica).

FIGURA 17. Glicose de jejum dos camundongos das linhagens C57BL/6J (*Wild Type*), submetidos à dieta controle (A) e hiperlipídica (B); e C57BL/6J LDLr $-/-$, submetidos a dieta controle (C) e hiperlipídica (D), nos períodos pré-tratamento e pós-tratamento (28 dias). $n = 6$ por grupo. * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$ (comparado ao grupo tratado com veículo correspondente) # $p < 0,05$ (quando comparado ao período pré-tratamento). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Os camundongos saudáveis, de ambas as linhagens, não apresentaram alterações na glicose plasmática de jejum com os tratamentos, com exceção dos camundongos C57BL/6J LDLr $-/-$ tratados com GQ-11 (Figura 16A/C). Em contraste, os camundongos com síndrome metabólica, de ambas as linhagens, apresentaram diminuição significativa na glicose plasmática de jejum, nos grupos tratados com pioglitazona e GQ-11, quando comparados à glicose plasmática de jejum aferida antes do início do período de tratamentos. (Figura 16B/D). O tratamento com Lyso-7 promoveu diminuição significativa da glicose plasmática de jejum apenas nos camundongos com síndrome metabólica da linhagem C57BL/6J LDLr $-/-$ (Figura 16D).

FIGURA 18. Área sob a curva no teste de tolerância à glicose (T.T.G.), dos camundongos de linhagens C57BL/6J (*Wild Type*), submetidos a dieta controle (A) e hiperlipídica (B); e C57BL/6J LDLr $-/-$, submetidos à dieta controle (C) e hiperlipídica (D), nos períodos pré-tratamento e pós-tratamento (28 dias). $n = 6$ por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ (comparado ao grupo tratado com veículo correspondente). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Os camundongos saudáveis de ambas as linhagens não apresentaram alteração no teste de tolerância à glicose (área sob a curva) em decorrência dos tratamentos utilizados (Figura 17A/C). Os camundongos com síndrome metabólica de ambas as linhagens apresentaram diminuição significativa na área sob a curva após o tratamento com pioglitazona, GQ-02, GQ-11 ou GQ-177, quando comparados aos camundongos tratados com veículo e no início do período de tratamento (Figura 17B/D). A Lyso-7 diminuiu a área sob a curva apenas nos camundongos com síndrome metabólica da linhagem C57BL/6J LDLr $-/-$ (Figura 17D). Estes dados demonstram o potencial hipoglicemiante dos novos derivados tiazolidínicos, uma vez que a glicose plasmática dos camundongos tratados diminuiu significativamente após o período de tratamento, em comparação com os animais tratados com água, veículo e no período anterior ao início do tratamento.

FIGURA 19. Percentual de decaimento plasmático de glicose por minuto (K_{ITT}), no teste de tolerância à insulina (T.T.I.), dos camundongos das linhagens C57BL/6J (*Wild Type*), submetidos à dieta controle (A) e hiperlipídica (B); e C57BL/6J LDLr $-/-$, submetidos à dieta controle (C) e hiperlipídica (D), nos períodos pré-tratamento e pós-tratamento (28 dias). $n = 6$ por grupo. $*p < 0,05$, $**p < 0,001$, $***p < 0,0001$ (comparado ao grupo tratado com veículo correspondente). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Os camundongos saudáveis da linhagem C57BL/6J não mostraram alterações no decaimento plasmático de glicose (T.T.I.) devido aos tratamentos utilizados (Figura 18A). Os camundongos com síndrome metabólica de ambas as linhagens foram responsivos apenas à pioglitazona (Figura 18B), não demonstrando efeito hipoglicemiante dos novos derivados tiazolidínicos à administração intraperitoneal de insulina no quadro de síndrome metabólica.

Em contrapartida, os tratamentos com GQ-02, GQ-177 e Lyso-7 demonstraram maior resistência à administração de insulina nos camundongos saudáveis de linhagem C57BL/6J LDLr $-/-$, quando comparados aos grupos tratados com veículo e água (Figura 18C).

FIGURA 20. Concentrações séricas de insulina nos camundongos das linhagens C57BL/6J (*Wild Type*), submetidos à dieta controle (A) e hiperlipídica (B); e C57BL/6J LDLr^{-/-}, submetidos à dieta controle (C) e hiperlipídica (D), nos períodos pré-tratamento e pós-tratamento (28 dias). n = 6 por grupo. *p<0,05, ***p<0,0001 (comparado ao grupo tratado com veículo correspondente). Dados expressos como média ± desvio padrão.

Os animais com síndrome metabólica de ambas as linhagens, tratados com pioglitazona e derivados tiazolidínicos apresentaram diminuição nos níveis séricos de insulina após o período de tratamento, em comparação aos grupos tratados com veículo, água e ao período anterior ao início do tratamento (Figura 19B/D), indicando melhora no estado hiperinsulinêmico demonstrado no quadro de síndrome metabólica, promovido pelos tratamentos.

Nos animais saudáveis da linhagem C57BL/6J, tanto a GQ-02 como a Lyso-7 diminuíram as concentrações de insulina (Figura 19A/B).

FIGURA 21. Concentrações séricas de adiponectina nos camundongos de linhagens C57BL/6J (*Wild Type*), submetidos a dieta controle (A) e hiperlipídica (B); e C57BL/6J LDLr $-/-$, submetidos a dieta controle (C) e hiperlipídica (D), nos períodos pré-tratamento e pós-tratamento (28 dias). $n = 6$ por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ (comparado ao grupo tratado com veículo correspondente). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Ao avaliar as concentrações séricas de adiponectina dos camundongos saudáveis e com síndrome metabólica da linhagem C57BL/6J observou-se aumento significativo nos camundongos tratados com GQ-177 e Lyso-7 enquanto que a pioglitazona aumentou a adiponectina apenas nos animais com síndrome metabólica (Figura 20A/B).

Nos animais da linhagem C57BL/6J LDLr $-/-$ saudáveis houve aumento de adiponectina nos camundongos tratados com pioglitazona, GQ-02, GQ-177 e Lyso-7 (Figura 20C). Nos animais dessa linhagem com síndrome metabólica os tratamentos com pioglitazona e os derivados tiazolidínicos aumentaram as concentrações de adiponectina, em comparação aos controles (tratados com veículo ou água) e ao período anterior ao início de tratamento (Figura 20D).

FIGURA 22. Concentrações séricas de leptina nos camundongos das linhagens C57BL/6J (*Wild Type*), submetidos à dieta controle (A) e hiperlipídica (B); e C57BL/6J LDLr $-/-$, submetidos à dieta controle (C) e hiperlipídica (D), nos períodos pré-tratamento e pós-tratamento (28 dias) com novos derivados tiazolidínicos. $n=6$ por grupo. *** $p<0,0001$ (comparado ao grupo tratado com veículo correspondente). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Somente apresentaram diminuição significativa nos níveis de leptina, em comparação aos grupos tratados com veículo e água, os camundongos com síndrome metabólica da linhagem C57BL/6J tratados com pioglitazona e derivados tiazolidínicos (Figura 21 B). Os animais saudáveis de ambas as linhagens não apresentaram alterações significativas após os tratamentos, em comparação aos controles (tratados com veículo ou água) e ao período anterior ao início do tratamento (Figura 21A/C).

Os camundongos com síndrome metabólica da linhagem C57BL/6J LDLr $-/-$, apresentaram diminuição nos níveis de leptina quando tratados com pioglitazona e derivados tiazolidínicos, em comparação ao período anterior ao início do tratamento, porém não diferiram significativamente dos animais tratados com veículo e água (Figura 21D).

FIGURA 23. Concentrações séricas de colesterol total nos camundongos de linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) (A) e C57BL/6J LDLr $-/-$ (B), e de triglicerídeos nos camundongos de linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) (C) e C57BL/6J LDLr $-/-$ (D) submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos e grupos controle (submetidos a dieta controle e tratados com água). n = 6 por grupo. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

O tratamento com pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos não promoveu mudanças significativas nos níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos (Figura 22). É possível visualizar a diferença nos perfis lipídicos entre as linhagens, onde os animais de linhagem C57BL/6J LDLr $-/-$ apresentam colesterol total e triglicerídeos mais elevados que os camundongos C57BL/6J, em todos os grupos.

A GQ-02 diminuiu as concentrações de triglicerídeos séricos nos camundongos de linhagem C57BL/6J LDLr $-/-$, em comparação ao tratamento com pioglitazona (Figura 22D).

FIGURA 24. Concentrações séricas das frações de colesterol: LDL nos camundongos de linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) (A) e C57BL/6J LDLr $-/-$ (B), HDL nos camundongos de linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) (C) e C57BL/6J LDLr $-/-$ (D) e VLDL nos camundongos de linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) (E) e C57BL/6J LDLr $-/-$ (F) submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos e grupos controle (mesma linhagem, submetidos a dieta controle e tratados com água). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ (comparado ao veículo). $n = 6$ por grupo. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Quando foram analisadas as frações de colesterol nos camundongos da linhagem C57BL/6J, foi possível observar diminuição do LDL-colesterol promovida pelo tratamento com GQ-177 (Figura 23A), aumento do HDL-colesterol promovido pelos tratamentos com GQ-177 e Lyso-7 (Figura 17C) e nenhuma alteração em VLDL-colesterol (Figura 23E).

Nos camundongos C57BL/6J LDLr ^{-/-} constatou-se diminuição do LDL-colesterol, após o tratamento com GQ-177 (Figura 23B), aumento de HDL-colesterol induzido pela GQ-11 e diminuição da mesma fração pelo tratamento com pioglitazona (Figura 23D). Houve diminuição do VLDL-colesterol após os tratamentos com pioglitazona, GQ-02, GQ-11 e GQ-177 (Figura 23F).

FIGURA 25. Concentrações séricas de interleucinas (IL-6, IL-10 e IL-12), nos camundongos de linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) (A, C e E) e C57BL/6J LDLr ^{-/-} (B, D e F), submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos e grupos controle (submetidos à dieta controle e tratados com água). n = 6 por grupo. *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001 (comparado ao grupo tratado com veículo correspondente). #p<0,05; ###p<0,001; ####p<0,0001 (comparado ao grupo controle). \$p<0,05; \$\$\$p<0,0001 (comparado aos grupos tratados com GQ-11). Dados expressos como média ± desvio padrão.

Quanto às concentrações séricas das interleucinas dos camundongos da linhagem C57BL/6J, não se observou alterações para a IL-6 tanto entre os tratamentos, como entre os camundongos do grupo controle (saudáveis) e com síndrome metabólica (Figura 24A). Houve diminuição da IL-10 nos animais tratados com pioglitazona, GQ-02, GQ-177 e Lyso-7, quando comparados àqueles tratados com GQ-11 (Figura 24C). A IL-12 diminuiu após os tratamentos com GQ-02, GQ-177 e Lyso-7, quando comparados aos animais controle (saudáveis) (Figura 24E).

Nos camundongos da linhagem C57BL/6J LDLr ^{-/-}, houve aumento da IL-6 após o tratamento com pioglitazona em comparação aos grupos tratados com veículo e água e também com os camundongos controle (saudáveis) (Figura 24B). Em contraste, os tratamentos com GQ-02, GQ-177 e Lyso-7 promoveram diminuição da IL-6 em comparação aos grupos controle (Figura 24B). Apenas a GQ-11 aumentou as concentrações de IL-10, observando-se diminuição dessa citocina após o tratamento com GQ-02, GQ-177 e Lyso-7 (Figura 24D). O tratamento com GQ-177 aumentou a IL-12, quando comparado aos controles (veículo, água e animais saudáveis) (Figura 24F).

FIGURA 26. Concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias (IFN-γ, TNF-α e MCP-1), nos camundongos das linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) (A, C e E) e C57BL/6J LDLr -/- (B, D e F), submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com novos derivados tiazolidínicos e grupos controle (submetidos à dieta controle e tratados com água). ###p<0,001; ####p<0,0001 (comparado ao grupo controle). \$p<0,05; \$\$p<0,001; \$\$\$p<0,0001 (comparado aos grupos tratados com GQ-11). n = 6 por grupo. Dados expressos como média ± desvio padrão.

Observou-se alterações decorrentes dos diferentes tratamentos sobre as citocinas inflamatórias IFN-γ, TNF-α e MCP-1 apenas nos camundongos da linhagem C57BL/6J LDLr -/- (Figura 25). Não houve alterações para o IFN-γ entre os grupos estudados (Figura 25 B). Os tratamentos com GQ-02 e Lyso-7 diminuíram as concentrações de TNF-α (Figura 25 D), quando comparados aos controles (veículo e água).

Todos os animais desta linhagem com síndrome metabólica apresentaram concentrações séricas mais baixas de MCP-1, quando comparados aos animais saudáveis, com exceção dos grupos tratados com GQ-11 (Figura 25F).

Após as análises das citocinas do soro analisou-se a expressão gênica de marcadores envolvidos no metabolismo da glicose e no processo inflamatório no tecido adiposo. Além dos marcadores mostrados nos resultados a seguir, foram também analisados IL-6 e TNF- α , que não apresentaram amplificação satisfatória para os cálculos de $\Delta\Delta ct$.

FIGURA 27. Expressão gênica relativa de glut-4, ppar- α e ppar- γ no tecido adiposo epididimal, respectivamente, nos camundongos de linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) (A, C e E) e C57BL/6J LDLr -/- (B, D e F), submetidos a dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos. n = 6 por grupo. *p<0,05; **p<0,001 e ***p<0,0001 (comparado ao grupo tratado com veículo correspondente). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Os tratamentos com pioglitazona e os novos derivados tiazolidínicos, em ambas as linhagens, induziram aumento da expressão gênica de glut-4 no tecido adiposo epididimal, em comparação aos grupos tratados com veículo e água (Figura 26A/B), sendo mais um indicador de melhora na captação de glicose e do estado hiperglicêmico dos camundongos.

A expressão gênica de ppar- α e ppar- γ foi claramente diferente entre as linhagens e os tratamentos estudados. O tratamento com pioglitazona induziu aumento na expressão de ppar- α nos camundongos C57BL/6J (Figura 26C) e de ppar- γ nos camundongos C57BL/6J LDLr -/- (Figura 26F). A GQ-02, GQ-177 e Lyso-7 induziram aumento da expressão de ppar- γ nos camundongos C57BL/6J (Figura 26E). A GQ-177 também induziu aumento de ppar- γ na linhagem C57BL/6J LDLr -/- (Figura 26F).

O tratamento com GQ-11 aumentou na expressão de ppar- α no tecido adiposo epididimal, em ambas as linhagens (Figura 26C/D), sem promover alterações na expressão de ppar- γ (Figura 26E/F). A Lyso-7 também promoveu aumento de ppar- α na linhagem C57BL/6J LDLr -/- (Figura 26D).

FIGURA 28. Expressão gênica relativa de adipocinas no tecido adiposo epididimal nos camundongos das linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) (A, C e E) e C57BL/6J LDLr -/- (B, D e F), submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos. n = 6 por grupo. *p<0,05; **p<0,001 e ***p<0,0001 (comparado ao grupo tratado com veículo correspondente). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Os tratamentos com pioglitazona e os novos derivados tiazolidínicos induziram diminuição na expressão de resistina na linhagem C57BL/6J (Figura 27E). Em contraste, a GQ-02, GQ-177 e Lyso-7 aumentaram a expressão de resistina nos camundongos C57BL/6J LDLr -/- (Figura 27F).

A pioglitazona mostrou diferentes efeitos nas linhagens estudadas, mostrando aumento na expressão gênica de adiponectina e leptina na linhagem C57BL/6J

(Figura 27A/C) e diminuição das mesmas na linhagem C57BL/6J LDLr ^{-/-} (Figura 27B/D).

O tratamento com a GQ-11 aumentou a expressão de leptina nos camundongos C57BL/6J (Figura 27C), mas diminuiu-a na linhagem C57BL/6J LDLr ^{-/-} (Figura 27D). Na linhagem C57BL/6J, os tratamentos com GQ-177 e Lyso-7 promoveu diminuição da expressão de leptina (Figura 27C).

FIGURA 29. Expressão gênica relativa de interleucinas 10 e 17 no tecido adiposo epididimal nos camundongos das linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) (A, C e E) e C57BL/6J LDLr ^{-/-} (B, D e F) submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos. n = 6 por grupo. ***p<0,0001 (comparado ao grupo tratado com veículo correspondente). Dados expressos como média ± desvio padrão.

Somente os tratamentos com pioglitazona e GQ-11 modularam a expressão das interleucinas avaliadas. O tratamento com pioglitazona induziu o aumento na expressão de il-17 em ambas as linhagens (Figura 28C/D), a diminuição da il-10 na linhagem C57BL/6J (Figura 28A), além do aumento da il-10 e il-17 na linhagem C57BL/6J LDLr ^{-/-} (Figura 28B e 28D). No tratamento com GQ-11 houve diminuição da il-10 (Figura 28A) e aumento da il-17 (Figura 28C) na linhagem C57BL/6J.

FIGURA 30. Expressão gênica relativa de *icam*, *vcam* e *vegf* no tecido adiposo epididimal nos camundongos das linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) (A, C e E) e C57BL/6J LDLr $-/-$ (B, D e F), submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos. n = 6 por grupo. *p<0,05 (comparado ao grupo tratado com veículo correspondente). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

A maior parte das tiazolidinas estudadas não afetou a expressão das moléculas de adesão *icam* e *vcam* e o fator de crescimento *vegf*. No entanto, a GQ-11 aumentou a expressão de *vcam* em ambas as linhagens (Figura 29C/D) e a GQ-177 diminuiu a expressão de *vegf* na linhagem C57BL/6J (Figura 29E).

FIGURA 31. Expressão gênica relativa de *fgf-21*, *mcp-1* e *nfkb* no tecido adiposo epididimal nos camundongos das linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) (A, C e E) e C57BL/6J LDLr -/- (B, D e F), submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ (comparado ao grupo tratado com veículo correspondente). $n = 6$ por grupo. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Ao analisar o *fgf-21* constatou-se que pioglitazona e a GQ-11 aumentaram sua expressão na linhagem C57BL/6J (Figura 30A). Nessa linhagem, houve forte indução de *mcp-1* induzido pela pioglitazona e indução mais moderada pelos novos derivados tiazolidínicos (Figura 30C). Na linhagem C57BL/6J LDLr -/-, a pioglitazona e a GQ-11 inibiram a expressão de *mcp-1*, enquanto o oposto foi observado para a GQ-02 (Figura 30D).

A expressão de *nfkb* não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos e linhagens estudadas (Figura 30E/F).

FIGURA 32. Expressão gênica relativa de β -catenina no tecido adiposo epididimal nos camundongos das linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) (A) e C57BL/6J LDLr $-/-$ (B), submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos. n = 6 por grupo. *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001 (comparado ao grupo tratado com veículo correspondente). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

A expressão da β -catenina foi inibida pela pioglitazona e os novos derivados tiazolidínicos, com exceção de GQ-11, em ambas as linhagens em relação aos grupos tratados com veículo e água (Figura 31). Em contraste, a GQ-11 promoveu o aumento significativo de β -catenina no tecido adiposo epididimal.

Além de se analisar a expressão gênica no tecido adiposo, avaliou-se também a expressão de marcadores de interesse no tecido hepático. Dentre os marcadores hepáticos, foram selecionados marcadores envolvidos no metabolismo de glicose e lipídeos.

FIGURA 33. Expressão gênica relativa de glut-2, ppar-α e pgc1-α no tecido hepático, nos camundongos das linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) (A, C e E) e C57BL/6J LDLr -/- (B, D e F), submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos. n = 6 por grupo. *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001 (comparado ao grupo tratado com veículo correspondente). Dados expressos como média ± desvio padrão.

O tratamento com pioglitazona induziu o aumento na expressão gênica de glut-2 na linhagem C57BL/6J LDLr -/- (Figura 32B), também induzindo o aumento de ppar-α (Figura 32C) e a diminuição de pgc1-α na linhagem C57BL/6J (Figura 32E).

O tratamento com GQ-02 promoveu diminuição de glut-2 (Figura 32A/B) e pgc1-α em ambas as linhagens (Figura 32E/F), além de diminuir ppar-α na linhagem C57BL/6J LDLr -/- (Figura 32D).

A GQ-11 aumentou a expressão de glut-2 (Figura 31A) e ppar- α (Figura 32C) e diminuiu a expressão de pgc1- α (Figura 32E) na linhagem C57BL/6J. Na linhagem C57BL/6J LDLr $-/-$, a GQ-11 promoveu aumento apenas de ppar- α (Figura 32D).

O tratamento com GQ-177 diminuiu a expressão dos três marcadores analisados em ambas as linhagens, com exceção do ppar- α na linhagem C57BL/6J, onde não mostrou modulação significativa (Figura 32C).

O tratamento com Lyso-7 diminuiu pgc1- α em ambas as linhagens (Figura 32E/F), além de aumentar a expressão de ppar- α na linhagem C57BL/6J (Figura 32C) e diminuir a de glut-2 nos animais C57BL/6J (Figura 32B).

FIGURA 34. Expressão gênica relativa de srebp e lxr- β no tecido hepático dos camundongos de linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) (A, e C) e C57BL/6J LDLr $-/-$ (B e D), submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos. n = 6 por grupo. *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001 (comparado ao grupo tratado com veículo correspondente). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

No estudo dos marcadores envolvidos no metabolismo lipídico analisou-se amostras de tecido hepático dos camundongos saudáveis e com síndrome metabólica. A figura 33 mostra as análises das amostras dos camundongos com síndrome metabólica.

Ao comparar os animais tratados com fármacos e animais tratados com veículo, foi observado que tanto a pioglitazona como os novos derivados tiazolidínicos diminuíram significativamente a expressão de *srebp*, em ambas as linhagens (Figura 33A/B).

Quanto ao *lxr-β*, a pioglitazona promoveu diminuição desse marcador apenas na linhagem C57BL/6J LDLr ^{-/-}, enquanto a GQ-177 aumentou sua expressão em ambas as linhagens (Figura 33C/D), quando comparados aos grupos tratados com veículo e água.

FIGURA 35. Expressão gênica relativa de *srebp* e *lxr-β* no tecido hepático dos camundongos de linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) (A, e C) e C57BL/6J LDLr ^{-/-} (B e D), submetidos à dieta controle e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos. n = 6 por grupo. Dados expressos como média ± desvio padrão.

Para complementar os dados de comparação entre a condição normal e a síndrome metabólica, investigou-se se os novos derivados seriam capazes de modular os mesmos marcadores em animais saudáveis. A figura 34 mostra que os níveis de expressão gênica dos marcadores não diferiram significativamente entre os grupos tratados e os controles.

Com o objetivo de verificar se as novos derivados apresentavam efeitos sobre a estrutura óssea, que é um efeito colateral descrito para algumas tiazolidinas, foram obtidas imagens de raio-x no equipamento MSFX, as quais possibilitaram analisar os efeitos dos tratamentos sobre a densidade óssea dos animais estudados.

FIGURA 36. Imagem representativa do raio-x do fêmur dos animais, obtida no equipamento MSFX, com especificação das regiões R1, R2, R3 e R4, utilizadas nas análises de densidade óssea.

Foram coletadas imagens dos camundongos com síndrome metabólica e também dos camundongos saudáveis, para que fosse possível observar as alterações promovidas pelos tratamentos em ambas as condições metabólicas. Para cada animal, foram demarcadas as áreas R1, R2, R3 e R4 do fêmur, separadamente, para que houvesse maior acurácia dos dados, onde a região R1 se encontra mais próxima da junção com a tíbia e a região R4 se encontra mais próxima da junção com o quadril.

FIGURA 37. Imagens representativa de raio-x, obtidas no equipamento MSFX, utilizadas nas análises de densidade óssea, nos camundongos C57BL/6J submetidos à dieta controle (A) e hiperlipídica (B) e nos camundongos C57BL/6J LDLr -/- submetidos à dieta controle (C) e hiperlipídica (D).

FIGURA 38. Densidade óssea (g/cm³), nas regiões R1 (A) e R2 (C), dos camundongos das linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) e regiões R1 (B) e R2 (D) dos camundongos da linhagem C57BL/6J LDLr -/- submetidos à dieta controle e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos. n = 6 por grupo. *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001 (comparado ao grupo tratado com veículo correspondente). Dados expressos como média ± desvio padrão.

A densidade óssea das regiões R1 e R2 dos animais saudáveis tratados com GQ-02, GQ-177 e Lyso-7 foi mais elevada em ambas as linhagens (Figura 37). Os tratamentos com pioglitazona e GQ-11 não promoveram alterações significativas na linhagem C57BL/6J LDLr -/- .

FIGURA 39. Densidade óssea (g/cm^3), nas regiões R3 (A) e R4 (C) dos camundongos das linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) e regiões R3 (B) e R4 (D) dos camundongos de linhagem C57BL/6J LDLr $^{-/-}$ submetidos à dieta controle e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos. n = 6 por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ (comparado ao grupo tratado com veículo correspondente). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Ao analisar as regiões R3 e R4 dos animais saudáveis observou-se maior densidade óssea nos camundongos C57BL/6J LDLr $^{-/-}$ tratados com GQ-177 e Lyso-7, enquanto os outros tratamentos não mostraram alterações significativas em ambas as linhagens.

Sendo assim, o tratamento com os novos derivados tiazolidínicos não mostrou perda de densidade óssea como descrito nos estudos clínicos para algumas tiazolidinadionas. De qualquer maneira, a pioglitazona, utilizada como controle, também não mostrou densidade óssea menor que os grupos tratados com água e veículo nos camundongos saudáveis.

FIGURA 40. Densidade óssea (g/cm^3), nas regiões R1 (A) e R2 (C), dos camundongos das linhagens C57BL/6J (*Wild Type*) e regiões R1 (B) e R2 (D) dos camundongos de linhagem C57BL/6J LDLr $-/-$ submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos. $n = 6$ por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ (comparado ao grupo tratado com veículo correspondente). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Em contraste aos camundongos saudáveis, quando a densidade óssea foi avaliada nos animais com síndrome metabólica observou-se significativa diminuição na densidade óssea dos camundongos C57BL/6J tratados com pioglitazona, nas regiões R1 (Figura 39A) e R2 (Figura 39C).

Os tratamentos com novos derivados tiazolidínicos também não demonstraram aumento de densidade óssea como nos resultados dos estudos com camundongos saudáveis nas regiões R1 e R2, com exceção do grupo tratado com GQ-02 na linhagem C57BL/6J LDLr $-/-$, nas regiões R2 (Figura 39D) e R3 (Figura 39B). As regiões ósseas R3 e R4 dos camundongos com síndrome metabólica não foram alteradas por nenhum outro tratamento (Figura 39).

FIGURA 41. Densidade óssea (g/cm³), nas regiões R3 (A) e R4 (C), dos camundongos da linhagem C57BL/6J (*Wild Type*) e regiões R3 (B) e R4 (D) dos camundongos da linhagem C57BL/6J LDLr -/- submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos. n = 6 por grupo. *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001 (comparado ao grupo tratado com veículo correspondente). Dados expressos como média ± desvio padrão.

As atividades antiinflamatória e angiogênica observadas no tratamento com o derivado tiazolidínico GQ-11 levaram-nos a expandir a investigação, firmando-se uma colaboração entre os laboratórios de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e de Cardiologia e Farmacologia, da *University of Illinois at Chicago* (UIC). Como comentado anteriormente, essa colaboração permitiu a realização de estudos complementares em torno do novo composto tiazolidínico GQ-11 em um modelo animal de cicatrização de lesões cutâneas no modelo experimental de diabetes em camundongos MKR, os quais deram origem aos resultados a seguir.

FIGURA 42. Imagem representativa do modelo de cicatrização de lesões cutâneas pós-cirurgia (A) e no terceiro dia pós-cirúrgico dos camundongos FVB (B) e MKR (C).

As imagens da FIGURA 41 mostram os momentos pós-cirúrgico imediato e o terceiro dia pós-cirúrgico nas linhagens FVB (41B) e MKR (41C). A FIGURA 42 mostra a evolução da lesão cutânea após 4 dias de tratamento com o veículo (42A) ou GQ-11 (42B).

FIGURA 43. Imagem representativa do modelo de cicatrização das lesões cutâneas em camundongos FVB (controle), tratados com veículo (A) e GQ-11 (B). Tratamento tópico realizado no período de 4 dias consecutivos.

FIGURA 44. Imagem representativa do modelo de cicatrização de lesões cutâneas em camundongos MKR, tratados com veículo (A) e GQ-11 (B). Tratamento tópico realizado no período de 4 dias consecutivos.

Primeiramente, foram realizadas incisões na região lombar de camundongos saudáveis e diabéticos, para serem tratadas com a GQ-11 e com o veículo. Ao terceiro dia de pós-cirúrgico, após ascensão da resposta inflamatória inicial, é possível observar que as lesões dos camundongos da linhagem FVB (Figura 42), aparentavam estar em um estágio mais avançado de cicatrização que os camundongos de linhagem MKR (Figura 43).

Após 4 dias de tratamento tópico, iniciado no terceiro dia pós-cirúrgico, foi possível observar que as feridas dos camundongos MKR tratadas com GQ-11 aparentavam estar num estágio mais avançado que os camundongos MKR e FVB tratados com veículo (Figura 43).

Após o tratamento, as lesões foram coletadas e processadas para que fossem feitas análises de expressão gênica e cortes histológicos, com o objetivo de explorar de uma forma mais aprofundada os efeitos promovidos pelo tratamento com o novo derivado tiazolidínico.

FIGURA 45. Expressão gênica relativa de citocinas pró-inflamatórias *tnf-α* (A), *il-1β* (B) e *ifn-γ* (C), em lesões cutâneas de camundongos FVB e MKR tratadas com veículo e GQ-11 durante 4 dias. * $p < 0,05$. $n = 6$. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

O tratamento tópico com GQ-11 mostrou uma tendência à diminuição na expressão de *tnf-α* (Figura 44A). Mesmo sem significância estatística, é possível observar acentuada tendência no decaimento desta citocina em ambas as linhagens tratadas com GQ-11, indicando modulação na expressão e indicando uma provável diminuição da atividade de macrófagos do fenótipo M1.

O tratamento não demonstrou efeitos na modulação da expressão de *il-1β* (Figura 44B) nos camundongos MKR, apesar da expressão dessa citocina estar significativamente diminuída na linhagem FVB. Também não foram observados efeitos sobre a expressão de *ifn-γ* (Figura 44C), em ambas as linhagens. As diferenças de expressão das citocinas citadas entre os animais das linhagens FVB e MKR tratados com veículo, confirmam dados publicados da caracterização do modelo, mostrando o envolvimento de *ifn-γ* e *il-1β* no desequilíbrio do perfil inflamatório nas lesões dos animais diabéticos.

FIGURA 46. Expressão gênica relativa de citocinas anti-inflamatórias $\text{tgf-}\beta$ (A), ym1 (B), arg-1 (C) e il-10 (D), em lesões cutâneas de camundongos FVB e MKR, tratadas com veículo e novo derivado tiazolidínico (GQ-11), durante 4 dias. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$. $n = 6$. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

O aumento da expressão de arg-1 em ambas as linhagens tratadas com GQ-11 (Figura 44C) e o aumento na expressão de il-10 na linhagem MKR (Figura 44D) sugere aumento na atividade de macrófagos de fenótipo M2 e estímulo a vias de sinalização anti-inflamatórias, contribuindo para a resolução do estágio inflamatório no processo de cicatrização.

A expressão de ym1 não foi modulada pelos tratamentos em ambas as linhagens (Figura 44B) e a expressão de $\text{tgf-}\beta$ se mostrou diminuída com o tratamento de GQ-11 (Figura 44A). A diminuição de $\text{tgf-}\beta$ pode estar associada com o estágio de cicatrização onde o recrutamento de fibroblastos já está sendo concluído.

FIGURA 47. Expressão gênica relativa de vegf (A) e tsg-6 (B), em feridas de camundongos FVB e MKR, tratadas com veículo e novo derivado tiazolidínico (GQ-11), durante 4 dias. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$. $n = 6$. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Houve uma tendência à diminuição da expressão de vegf pelo tratamento com a GQ-11 somente na linhagem FVB, sem alteração para a linhagem MKR (Figura 45A).

Em complementação aos resultados obtidos sobre a expressão de $\text{tnf-}\alpha$, foi possível observar aumento na expressão de tsg-6 nos grupos tratados com GQ-11 (Figura 45B), confirmando predominância de atividade anti-inflamatória e diminuição na atividade pró-inflamatória também promovida por macrófagos de fenótipo M1.

A análise dos cortes histológicos das lesões cutâneas, corados com HE revelam as camadas que compõem as lesões provindas das incisões na região lombar dos camundongos. Neste corte transversal é possível visualizar as camadas teciduais, possibilitando ver as estruturas celulares e sua organização, formação de abscessos e folículos capilares. O tratamento com GQ-11, nos camundongos FVB, parece contribuir para a organização celular dos tecidos epitelial e conectivo, além de prevenir a formação de abscessos e o excesso de granulação (Figura 47C), quando comparado ao grupo tratado com veículo (Figura 47B).

FIGURA 48. Imagem representativa das lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina (HE), de tecido saudável utilizado como controle (A) e feridas diabéticas tratadas com veículo (B) e GQ-11 (C), de camundongos FVB, após 4 dias de tratamento tópico. As flechas indicam as estruturas de tecido epitelial, folículos capilares, tecido conectivo, abscesso e tecido muscular. Todas as imagens foram captadas com zoom 4x.

Nos cortes histológicos das lesões ulcerosas dos camundongos MKR foi possível observar maior organização celular e completa formação de tecido epitelial e folículos capilares, além de diminuição na espessura no tecido conectivo, indicando menor granulação no estágio de proliferação do processo de cicatrização e prevenção na formação de abscessos (Figura 48C), quando comparado ao grupo tratado com veículo (Figura 48B).

FIGURA 49. Imagem representativa das lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina (HE), de tecido saudável utilizado como controle (A) e lesões tratadas com veículo (B) e GQ-11 (C) de camundongos MKR, após 4 dias de tratamento tópico. As flechas indicam as estruturas de tecido epitelial, folículos capilares, tecido conectivo, abscesso e tecido muscular. Todas as imagens foram captadas com zoom 4x.

Com o objetivo de avaliar o efeito das tiazolidinas estudadas sobre o comportamento dos macrófagos, uma vez que estas células regem o estágio inflamatório do processo de cicatrização, foram realizados estudos com cultura celular de macrófagos murinos primários isolados de medula óssea. Nestes ensaios, os macrófagos foram tratados previamente com veículo (DMSO), pioglitazone ou GQ-11 por 24 horas e, então, estimulados com LPS para indução de atividade pró-inflamatória.

FIGURA 50. Expressão gênica relativa de $tnfr-\alpha$ e $il-1\beta$, de macrófagos murinos primários de medula óssea não tratados (controle) e previamente tratados por 24 horas com pioglitazona, GQ-11 e DMSO (veículo), após 2 horas (A e C) e após 6 horas (B e D) de estímulo com LPS. ** $p < 0,01$. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

A Figura 49 mostra a diferença entre os tratamentos com pioglitazona, GQ-11 e veículo (DMSO), indicando diminuição significativa $il-1\beta$ e tendência à menor intensidade na expressão de $tnfr-\alpha$ em macrófagos tratados com pioglitazona e GQ-11 após 6 horas de estímulo (Figura 49C/D), indicando diminuição de resposta inflamatória promovida pelos tratamentos com pioglitazona e GQ-11.

FIGURA 51. Expressão gênica relativa de tgf- β e il-10, de macrófagos murinos primários de medula óssea não tratados (controle) e previamente tratados por 24 horas com pioglitazona, GQ-11 e DMSO (veículo), após 2 horas (A e C) e após 6 horas (B e D) de estímulo com LPS. *** $p < 0,001$. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Os ensaios com macrófagos também mostraram estímulo anti-inflamatório promovido pelos tratamentos com pioglitazona e GQ-11, uma vez que estes induziram o aumento da expressão de il-10 (Figura 49A/B) e tgf- β (Figura 50C/D), quando comparados ao grupo tratado com veículo (DMSO), após 2 ou 6 horas de estímulo com LPS.

5. DISCUSSÃO

5.1. O modelo animal de síndrome metabólica

Na primeira etapa do projeto, foi realizada a padronização e validação do modelo animal de síndrome metabólica nas linhagens de camundongos C57BL/6J e C57BL/6J LDLr ^{-/-}. Em 1976, Wessler reportou no *Workshop on Animal Models of Thrombosis and Hemorrhagic Diseases*, em Washington D.C., que um modelo animal é um organismo com um processo patológico desenvolvido, herdado ou naturalmente adquirido que se assemelha em um ou mais aspectos ao mesmo fenômeno ocorrido em humanos. Nos últimos anos, uma das maiores dificuldades encontradas nos estudos de síndrome metabólica é a identificação de modelos animais que a caracterizem de maneira fiel. Assim como, também é um desafio constante a padronização dos sintomas e parâmetros de diagnóstico da síndrome em humanos, devido à sua caracterização por um aglomerado de manifestações complexas, é de extrema importância demonstrar pelo menos parte dos sintomas observados nos seres humanos nestes modelos animais. Sendo assim, o desenvolvimento de modelos animais de síndrome metabólica é necessário para o desenvolvimento dos estudos, não somente com o objetivo de permitir elucidação na etiologia da doença, mas também para embasar e complementar os estudos de intervenções terapêuticas (MORI *et al.*, 2010).

Estudos de modelos animais descrevem que o ganho de peso, hiperglicemia, hiperinsulinemia, dislipidemias e resistência à insulina é observada em camundongos C57BL/6J submetidos a dietas hiperlipídicas (ALMIND; KAHN, 2004, WOUTERS *et al.*, 2008, SHIH; LIN; LIN, 2008). Por sua vez, a linhagem deficiente em receptor para lipoproteína de baixa densidade (LDLr^{-/-}) é a mais suscetível à dieta hipercolesterolêmica, desenvolvendo também hipercolesterolemia devido ao *clearance* reduzido de LDL e, como consequência, a formação de placa aterosclerótica (WU *et al.*, 2006; RUSSELL; PROCTOR, 2006).

Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa em modelos animais de aterosclerose na linhagem C57BL/6J LDLr ^{-/-} têm mostrado efeitos benéficos dos novos compostos tiazolidínicos, dentre eles, compostos também utilizados nesta

dissertação. De fato, observou-se que alguns desses compostos inibem a progressão do processo aterosclerótico, induzindo aumento de HDL-colesterol e diminuição de triglicerídeos e colesterol total, bem como o aumento na expressão gênica de PPAR γ e ABCA1 e diminuição na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (César *et al.* 2012). A fim de dar continuidade aos estudos dos efeitos biológicos destes novos compostos tiazolidínicos, desenvolveu-se um modelo animal de síndrome metabólica na mesma linhagem utilizada em estudos anteriores do grupo. Desse modo, inicialmente objetivou-se determinar a linhagem mais adequada para o desenvolvimento do modelo experimental, uma vez que estas linhagens apresentam respostas características da síndrome metabólica como o ganho de peso, a resistência à insulina, hiperinsulinemia, hiperglicemia e dislipidemia, porém de formas diferentes devido à deleção genética na linhagem C57BL/6J LDLr -/-.

Os primeiros parâmetros observados neste modelo de síndrome metabólica foram o consumo das rações hiperlipídica e controle, além do aumento gradativo no peso dos animais. Como esperado, apesar de o consumo de ração hiperlipídica ser menor que o consumo da ração controle, em ambas as linhagens, não foi observada diferença estatística na ingestão de ração (Figura 6).

As dietas ricas em lipídeos vêm sendo amplamente associadas a problemas metabólicos e cardiovasculares, desde obesidade a resistência à insulina em diversos tecidos (KHAN *et al.*, 2005; URANGA *et al.*, 2010). Apesar da ingestão de ração não diferir de modo significativo entre os grupos, a ingestão energética dos grupos submetidos à dieta hiperlipídica foi significativamente maior em comparação aos grupos submetidos à dieta controle, em ambas as linhagens (Figura 6), promovendo um ganho de peso de 105% nos camundongos deficientes em receptor de lipoproteína de baixa densidade, e de 65% nos camundongos selvagens (Figura 2), caracterizando-os como obesos. O maior ganho de peso constatado nos camundongos C57BL/6J LDLr -/- pode ser apontado pela maior ingestão energética semanal no grupo (Tabela 1), quando comparado à linhagem C57BL/6J.

Com o objetivo de avaliar as alterações glicêmicas e a resistência à insulina promovidos pela dieta hiperlipídica e pela obesidade dos animais, foi medida a glicose plasmática de jejum e foram feitos os testes de tolerância à glicose e à insulina.

A primeira evidência para a sugestão do desenvolvimento de hiperglicemia nos animais é encontrada ao observar-se que na 20ª semana de dieta, a glicemia de jejum dos animais dos grupos hiperlipídicos, de ambas as linhagens, eram mais elevadas quando comparadas aos grupos controle e à glicemia de jejum anterior à introdução da dieta hiperlipídica. Sendo assim, foi possível observar um aumento gradativo da glicemia ao longo do período de 20 semanas de administração de dieta (Figura 8).

Ao comparar o grau de tolerância à glicose nos camundongos com dieta controle e hiperlipídica, foi observado que os animais tratados com a dieta hiperlipídica mostraram curvas glicêmicas, no teste de tolerância à glicose, com uma área sob a curva significativamente maior que os camundongos com a dieta controle (Figura 9). Essa maior área sob a curva corresponde à manutenção do estado hiperglicêmico em resposta à sobrecarga de glicose, devido à redução na ação, quantidade ou responsividade à insulina ou de seus receptores (FONSECA, 2007).

Também foi observado um aumento significativo nos níveis séricos da insulina de jejum desses camundongos ao longo do período de 20 semanas, nos grupos submetidos à dieta hiperlipídica (Figura 11). Desse modo é possível estabelecer uma correlação entre os estados de hiperinsulinemia e de resistência à insulina, obtidos com o *TTG*. Este quadro é característico no estado inicial da resistência à insulina, uma vez que devido à baixa resposta dos tecidos à insulina e consequente hiperglicemia persistente, as células beta do pâncreas respondem de forma em que há o aumento da secreção do hormônio, podendo causar, com o tempo, a exaustão das células beta pancreáticas (FONSECA, 2007). Assim, a hiperinsulinemia representa um dos primeiros sintomas ocasionados pela resistência à insulina (SHANIK *et al.*, 2008), sendo um sintoma consequente da deficiência progressiva da secreção do hormônio, não sendo a única causa para este estado, já que ela também pode surgir decorrente de tumores associados às células pancreáticas e o aumento excessivo do número destas células, mesmo que estes casos sejam poucos frequentes (NANKERVIS *et al.*, 1985), (DEL PRATO *et al.*, 1993).

Ao serem analisados os testes de tolerância à insulina, os grupos controle e hiperlipídico da linhagem C57BL/6J foram comparados, onde foi possível observar uma tendência à resistência da ação da insulina nos grupos hiperlipídicos, uma vez

que os grupos controle apresentaram uma taxa de decaimento de glicose plasmática mais alta. É possível notar também uma característica nos camundongos C57BL/6J LDLr -/- sob dieta hiperlipídica em manter a hiperglicemia 10 minutos após a injeção de insulina, decaindo mais bruscamente que os camundongos C57BL/6J na mesma dieta e apresentando uma resposta inversa, onde a taxa de decaimento de glicose é mais alta no grupo hiperlipídico ao ser comparada com o grupo controle.

A resistência à insulina tem sido sempre apontada como fator-chave na fisiopatologia da síndrome metabólica ao longo dos últimos 20 anos (REAVEN, 2006). O prejuízo na transmissão do sinal intracelular da insulina é o que caracteriza a resistência à insulina nos tecidos insulino-responsivos clássicos como o tecido adiposo, muscular esquelético e fígado, mas também no endotélio vascular e em núcleos hipotalâmicos relacionados ao controle da saciedade. Estes conhecimentos demonstram a hipótese de que alterações na transmissão do sinal da insulina estão diretamente relacionadas não somente à resistência a insulina, mas também ao desenvolvimento do diabetes tipo 2 e de outros componentes da síndrome metabólica, tais como doenças cardiovasculares e obesidade (MORI, ANHÊ, MACHADO, 2010)

Dentre estes componentes, é possível citar evidências entre resistência à insulina, estado hiperglicêmico, síndrome metabólica e disfunção de células endoteliais, identificada como contribuinte na patogênese de vários componentes da síndrome metabólica, como também nos mecanismos moleculares da insulina com outros sinalizadores importantes como leptina, ácidos graxos e citocinas inflamatórias. (MORI, ANHÊ, MACHADO, 2010)

A quantificação de adiponectina foi selecionada neste estudo em função de ser uma proteína secretada exclusivamente pelo tecido adiposo e ser considerada um marcador de resistência à insulina (ZHU *et al.*, 2008), por alterar a sensibilidade a este hormônio e a captação de glicose, além de reduzir a produção hepática de glicose (INADERA, 2008). Esta adipocina tem ainda um potente efeito anti-inflamatório via supressão da sinalização mediada pelo NF- κ B e da expressão de moléculas de adesão na parede endotelial, reduzindo os riscos aterogênicos e tendo efeito vasoprotetor. Os grupos hiperlipídicos de ambas as linhagens apresentaram diminuição significativa das concentrações de adiponectina ao longo das 20

semanas de dieta (Figura 6). Esses resultados corroboram dados da literatura que apontam que na obesidade ocorre uma redução na secreção de adiponectina e no número de seus receptores, tendo também esta relação inversa com a resistência à insulina e com a síndrome metabólica, em portadores de diabetes tipo 2 e na aterosclerose (VÁZQUEZ-VELA *et al.*, 2008; STEFFENS; MACH, 2008). Essas associações são demonstradas com os resultados dos testes de intolerância à glicose e insulina, bem como com os níveis detectados de insulina, adiponectina e glicemia de jejum, sendo possível caracterizar um perfil insulinoresistente nestes animais.

Outra importante proteína secretada pelo tecido adiposo é a leptina, hormônio responsável pela regulação do metabolismo energético e diminuição da ingestão calórica, agindo na saciedade e no controle de peso, sendo representada metabolicamente como um sinal para a suficiência em ingestão energética, insulina, imunidade, função vascular e regulação da pressão arterial (VÁZQUEZ-VELA; TORRES; TOVAR, 2008, AHIMA; LAZAR, 2008, MARTIN; QASIM; REILLY, 2008, ROBERTSON; LEINNINGER; MYERS, 2008). É produzida principalmente pelo tecido adiposo, mas também é descrita como sendo secretada pelo epitélio do fundo gástrico, mamário, intestino, fígado, placenta, músculo esquelético e cérebro, em menor quantidade. Seu metabolismo é regulado por alterações de glicose e insulina, que estimulam sua secreção pelos adipócitos, reduzindo a secreção de insulina nas células pancreáticas, aumentando a captação e oxidação de glicose pelos músculos e diminuindo a produção hepática de glicose (AHIMA, 2006).

Quando analisados os resultados de quantificação de leptina nos camundongos estudados, observou-se uma grande alteração nos níveis de leptina nos camundongos de ambas as linhagens submetidas à dieta hiperlipídica, sendo estas significativamente maiores que nos grupos submetidos à dieta controle (Figura 11). A hiperleptinemia encontrada nesses animais, associada à obesidade, hiperinsulinemia, intolerância à glicose e resistência à insulina, também encontradas nesses camundongos, pode ser caracterizada como um quadro de resistência à leptina. A resistência à leptina pode estar envolvida nos prováveis mecanismos de diminuição de expressão dos níveis de receptores hipotalâmicos, bem como na saturação do transporte de leptina para o sistema nervoso central via ObRa, na

interação entre os níveis aumentados de proteína C-reativa, caracterizado na inflamação, que se liga ao hormônio e impede sua ação, e de proteínas séricas leptino-interativas que alteram sua biodisponibilidade e bioatividade, todos associados à hiperleptinemia persistente (MARTIN *et al.*, 2008).

Este conjunto de resultados confirma o estabelecimento de um modelo animal de síndrome metabólica nas linhagens C57BL/6J e C57BL/6J LDLr ^{-/-}, com características de hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia. Essas características podem ser associadas à resistência à insulina e resistência à leptina, bem como obesidade e diminuição nos níveis de adiponectina, características também pertinentes à síndrome metabólica. Como o modelo foi validado em ambas as linhagens, o estudo da ação dos novos derivados tiazolidínicos foi realizado com camundongos das duas linhagens, caracterizados como diferentes grupos de observação.

5.2. Alterações biométricas promovidas pelo tratamento com novos derivados tiazolidínicos

Após a validação do modelo animal, novos animais foram submetidos ao protocolo de desenvolvimento de síndrome metabólica para que fossem, então, submetidos ao tratamento com água, veículo, pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos, por 28 dias consecutivos. Durante esse período, foram avaliados o consumo de ração e o peso dos animais, onde foi possível observar que nenhum dos tratamentos alterou significativamente o consumo de ração (Figura 12) e o peso dos animais (Figura 13).

Apesar de nenhum dos tratamentos ter interferido no peso dos animais também foi possível observar que os camundongos controle tratados com GQ-02, GQ-177 e Lyso-7, em ambas as linhagens, apresentaram maior percentual de gordura corporal periférica (Figura 14). Os mesmos tratamentos também influenciaram os camundongos com síndrome metabólica, com exceção de GQ-177, nos camundongos C57BL/6J.

Os animais tratados com pioglitazona também mostraram alteração do percentual de gordura corporal nos camundongos controle da linhagem C57BL/6J e

nos camundongos com síndrome metabólica da linhagem C57BL/6J LDLr $-/-$. Em contraste, os animais tratados com GQ-11 não apresentaram aumento no percentual de gordura corporal quando comparados aos animais tratados com veículo e água.

De um ponto de vista investigativo, foi possível observar que os tratamentos com pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos, com exceção de GQ-11, diminuíram de maneira significativa a expressão gênica de β -catenina no tecido adiposo (Figura 31). Alguns estudos demonstram que a ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina inibe a adipogênese, através da manutenção de pré-adipócitos em um estado não diferenciado (CHOI *et al.*, 2014). Dessa forma, a diminuição nos níveis de β -catenina nos camundongos tratados com novos derivados tiazolidínicos pode estar relacionada com o aumento do percentual de gordura corporal promovido pelos tratamentos com GQ-02, GQ-177 e Lyso-7, uma vez que pode não haver a manutenção no estado não diferenciado dos adipócitos nos animais que estejam com o metabolismo comprometido, como no caso dos animais com síndrome metabólica.

Ao mesmo tempo, é interessante notar que os níveis aumentados de β -catenina nos animais tratados com GQ-11 podem estar relacionados à manutenção do percentual de gordura corporal dos animais.

5.3. Efeito hipoglicemiante e de sensibilização à insulina, promovidos pelo tratamento com novos derivados tiazolidínicos

Investigando o possível efeito hipoglicemiante dos fármacos, verificou-se que os novos derivados tiazolidínicos apresentaram significativo efeito hipoglicemiante, a partir das análises de glicose de jejum nos períodos pré- e pós-tratamento (Figura 16), além de mostrar melhora na tolerância à glicose (Figura 17), com exceção de Lyso-7, que só mostrou efeito na linhagem C57BL/6J LDLr $-/-$. Apesar de os novos derivados não mostrarem efeitos à administração de insulina (Figura 18), pode-se afirmar sua capacidade hipoglicemiante, considerando a resposta à administração de glicose.

Os tratamentos também mostraram influência na diminuição dos níveis séricos de insulina, quando comparados ao período pré-tratamento (Figura 19),

indicando melhora no estado hiperinsulinêmico devido ao controle do estado hiperglicêmico. Pode-se dizer que os níveis de insulina estavam alterados devido à hiperglicemia persistente e o quadro pôde ser revertido, uma vez que o tratamento induziu a diminuição da glicemia plasmática.

É importante discutir também que um dos motivos pelos quais os testes de tolerância à insulina não foram afetados pelos novos derivados tiazolidínicos pode ser devido a dificuldades mecânicas de transporte de insulina dos vasos sanguíneos nos tecidos periféricos. Estudos recentes indicam que o transporte de insulina dos vasos até a membrana das células de tecidos periféricos é também mediado pela proteína caveolina-1, essencial para a formação da cavéola, vesículas endocíticas que mediam o transporte celular de macromoléculas (MINSHALL *et.al*, 2003, SCHWENCKE *et. al*, 2006) Estes estudos também mostram que a caveolina-1 é degradada com a inflamação crônica e o estresse oxidativo (BAKHSHI *et. al*, 2013), indicando que animais com diabetes tipo 2 são depletados de caveolina-1, devido à inflamação crônica, resultando na deficiência do transporte de insulina. A partir desses estudos é possível afirmar que o quadro denominado de resistência à insulina, consiste não somente no fator de sensibilidade à insulina com o receptor celular que ocorre no diabetes tipo 2, mas também pela diminuição da disponibilidade de insulina para os receptores celulares, mantendo o hormônio secretado pelo pâncreas, ou administrado, circulante nos vasos, sem interação com os receptores celulares.

Foram avaliados os níveis de expressão gênica de caveolina-1 no tecido adiposo epididimal e fígado dos camundongos estudados, mas não foi possível observar expressão, inclusive nos grupos controle. Seria necessário analisar outros tecidos, para observar a expressão da proteína.

Os mecanismos de ação dos novos derivados tiazolidínicos ainda estão sendo elucidados pelo grupo de pesquisa e colaboradores, porém, partindo do ponto de vista de que estes compostos sejam realmente agonistas de PPARs, assim como as tiazolidinadionas já estudadas, é possível entender o efeito hipoglicemiante observado.

A promoção de sensibilização à insulina promovida pela ativação de PPARs também é descrita pelo aumento da expressão de adiponectina. De fato, na

linhagem C57BL/6J LDLr ^{-/-} foi observado aumento sérico significativo de adiponectina pelos grupos tratados com pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos (Figura 20) tanto nos grupos controle como nos grupos com síndrome metabólica, além de mostrar tendência ao aumento de expressão também no tecido adiposo epididimal (Figura 27). Interessantemente, a pioglitazona mostrou comportamentos contrários entre as linhagens, mostrando aumento de adiponectina na linhagem C57BL/6J e diminuição na C57BL/6J LDLr ^{-/-}. Na linhagem C57BL/6J, somente GQ-177 e Lyso-7 mostraram aumento nos níveis séricos de adiponectina (Figura 20).

A resistina, outra adipocina que também modula a resistência à insulina pela inibição da fosforilação de Akt e GSK3, diminuindo a sensibilidade à insulina e tendo efeito contrário à adiponectina (LI *et al.*, 2013), foi avaliada no tecido adiposo dos camundongos tratados. De alguma forma, o tratamento com pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos promoveu diminuição na expressão de resistina no tecido adiposo epididimal dos camundongos C57BL/6J (Figura 27), contribuindo para a sensibilização à insulina. Em contraste, os níveis de resistina mostraram-se aumentados nos tratamentos com GQ-02, GQ-177 e Lyso-7 nos camundongos C57BL/6J LDLr ^{-/-} (Figura 27), em parte contribuindo para a compreensão dos diferentes potenciais de efeito hipoglicemiante obtidos nos resultados de tolerância à glicose.

No contexto geral, as diferenças na indução da expressão de adiponectina e resistina, entre as linhagens e os tratamentos, podem indicar as diferentes intensidades de efeito sensibilizador de acordo com o ambiente, no caso, as modificações genéticas pertinentes às linhagens, e às ações dos derivados tiazolidínicos, que podem ativar de formas diferentes e específicas os PPARs.

Experimentos realizados pelo grupo e por colaboradores, a partir de ensaios de gene reporter com luciferase, mostram evidências de que GQ-11 ativa com maior intensidade PPAR α enquanto GQ-177 e Lyso-7, PPAR γ . Ao mesmo tempo, ensaios em linhagens de adipócitos murinos e humanos realizados em uma tese de doutorado do nosso grupo, mostram que GQ-177 estimulou em menor magnitude genes-alvo de PPAR γ , enquanto Lyso-7 não ativou as vias de sinalização Wnt/ β -catenina, indicando menor ativação de PPAR γ .

Neste trabalho, foi observada maior expressão de ppar- α em tecido adiposo nos camundongos tratados com GQ-11 em ambas as linhagens, e de ppar- γ nos animais tratados com GQ-02, GQ-177 e Lyso-7, sobretudo na linhagem selvagem (Figura 26). Ao mesmo tempo, os níveis diminuídos de β -catenina encontrados no tecido adiposo, também indicam baixa atividade da via Wnt/ β -catenina, podendo indicar certa reatividade de GQ-02, GQ-177 e Lyso-7 com PPAR γ .

Apesar da heterogeneidade de resposta, tanto pioglitazona quanto os novos derivados tiazolidínicos aumentaram significativamente a expressão de glut-4 no tecido adiposo epididimal, em ambas as linhagens, o qual está diretamente envolvido nas vias de captação de glicose. Uma vez que a sinalização promovida a partir da ligação entre insulina e receptor ativa as cascatas RAS-ERK-MAPK e PI3K-AKT; que por sua vez promovem a translocação de GLUT-4 (Figura 4) possibilitando o transporte de glicose para o meio intracelular, é possível afirmar que na condição de resistência à insulina há diminuição da sensibilidade de resposta do receptor à insulina, diminuindo a ativação das cascatas de sinalização que participam do processo de translocação do transportador de glicose. Sendo assim, o aumento da expressão de glut-4 nos camundongos pode indicar maior ativação das vias de sinalização envolvidas na interação insulina e receptor, indicando aumento de sensibilização à insulina.

Além de avaliar marcadores como glut-4, adiponectina, insulina, resistina, ppar- α e ppar- γ , pertinentes ao tecido adiposo, foram avaliados genes envolvidos na sinalização e captação de glicose no fígado, como glut-2, ppar- α e pgc1- α (Figura 31). Os resultados mostraram que o tratamento com GQ-02 e GQ-177 promoveram diminuição na expressão de glut-2 em ambas as linhagens. Lyso-7 e pioglitazona somente promoveram alterações na linhagem C57BL/6J LDLr^{-/-}, diminuindo e aumentando a expressão desse transportador, respectivamente. Interessantemente, GQ-11 promoveu aumento na expressão de glut-2 nas duas linhagens estudadas; apesar de não diferir significativamente dos animais tratados com água e veículo, induziu maior expressão em comparação aos animais tratados com os outros derivados tiazolidínicos (Figura 31).

Assim como no tecido adiposo, o tratamento com GQ-11 também aumentou a expressão de ppar- α no fígado, em ambas as linhagens. Lyso-7 e pioglitazona

também aumentaram a expressão de $\text{ppar-}\alpha$, mas somente na linhagem selvagem (Figura 31). GQ-02 e GQ-177 somente alteraram a expressão nos camundongos *knock out*, diminuindo a expressão.

Nos camundongos C57BL/6J foi possível observar que todos os tratamentos promoveram diminuição na expressão de $\text{pgc1-}\alpha$, enquanto na linhagem C57BL/6J LDLr $-/-$, somente os tratamentos com pioglitazona e GQ-11 mantiveram-se equivalentes aos grupos tratados com veículo e água. A diminuição nos níveis de $\text{pgc1-}\alpha$ indica menor interação de PPARs com os múltiplos fatores co-ativadores e co-repressores envolvidos na transcrição, uma vez que PGC1- α é um importante cofator de PPARs, além de diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias. Ao mesmo tempo, $\text{pgc-1}\alpha$ tem se mostrado um importante alvo terapêutico de fármacos anti-obesidade e antidiabéticos, por controlar importantes vias de sinalização metabólicas em diversos tecidos, atuando na termogênese e gliconeogênese no fígado, a partir da resposta ao jejum (PUIGSERVER, 2005). É interessante observar que, de alguma maneira, os novos derivados tiazolidínicos conseguem modular este cofator, sendo um importante dado para futuras investigações acerca de seus mecanismos de ação.

Como discutido na validação do modelo animal de síndrome metabólica, a leptina também participa do metabolismo energético e os animais com síndrome metabólica se mostraram resistentes ao hormônio. A quantificação dos níveis séricos de leptina mostrou que os tratamentos com pioglitazona e novos derivados tiazolidínicos promoveram a diminuição significativa do hormônio nos camundongos selvagens com síndrome metabólica (Figura 21). Ao mesmo tempo, a expressão gênica desse hormônio também se mostrou significativamente diminuída na mesma linhagem nos grupos tratados com GQ-02, GQ-177 e Lyso-7 (Figura 27). Apesar de os tratamentos com pioglitazona e GQ-11 mostrarem aumento na expressão da leptina, as concentrações séricas do hormônio estavam diminuídas, indicando que esse aumento na expressão não influenciou na síntese e utilização do hormônio.

Na linhagem C57BL/6J LDLr $-/-$ observou-se resultados inversos, onde pioglitazona e GQ-11 diminuíram a expressão de leptina, enquanto os outros tratamentos não alteraram sua expressão (Figura 27). De qualquer maneira, essas diferenças de indução ou supressão de expressão não mostraram influenciar os

níveis séricos de leptina, que não foram alterados significativamente em comparação com os animais tratados com água e veículo (Figura 21), apesar de apresentarem uma forte tendência, mesmo que não significativa.

A diminuição da expressão e dos níveis séricos de leptina mostra que o tratamento com os novos derivados tiazolidínicos, na linhagem C57BL/6J reverteu o quadro de resistência à leptina. Como consequência é possível observar a melhora na resistência à insulina, uma vez que a leptina, quando ligada aos receptores específicos, ativa vias que participam na sinalização de insulina, como PI3K, MAPK e AMPK (DALAMAGA *et al*, 2013). Em parte, a modulação de citocinas inflamatórias promovida pelos tratamentos, como discutiremos a seguir, podem ter contribuído para a sensibilização à leptina.

Concluindo, com toda a heterogeneidade na expressão de adipocinas envolvidas no metabolismo de glicose e resistência à insulina, o resultado final do tratamento com os novos derivados tiazolidínicos mostrou melhora da intolerância à glicose em diferentes intensidades. Dessa maneira, é necessário intensificar os estudos em torno do mecanismo de ação dos novos derivados, para que seja possível elucidar os fenômenos descritos.

Alguns estudos já demonstraram que a fosforilação de PPAR γ na serina 273 por Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5) estimula a expressão de genes que induzem a diminuição da sensibilização à insulina em tecido adiposo. Ao mesmo tempo, as quinases do sinal extracelular regulado por quinases (ERK) também fosforilam diretamente a serina 273 de PPAR γ e Cdk5 pode suprimir as ERKs por ação direta na via de sinalização MAP kinase/ERK kinase (MEK) (BANKS *et al.*, 2014). De forma importante, a inibição farmacológica de MEK e ERK melhoram efetivamente a resistência à insulina, uma vez que a inibição dessa fosforilação pode ser demonstrada como um mecanismo de sensibilização à insulina. Sendo assim, esse mecanismo pode ser identificado como um mecanismo terapêutico chave para fármacos anti-diabéticos e pode sugerir um caminho a se seguir na investigação dos mecanismos de ação dos novos derivados tiazolidínicos,

Essas conclusões sugerem que uma potencial estratégia terapêutica para a sensibilização à insulina via PPAR γ , poderia ser um tratamento com baixas doses de

inibidores de MEK ou ligantes que possam bloquear a acessibilidade das kinases à serina 273 do PPAR γ , ou ambos agindo conjuntamente.

5.4. Os efeitos promovidos pelos novos derivados tiazolidínicos no perfil inflamatório dos animais

Outro aspecto importante não somente para o caso de resistência a insulina, mas também na homeostase metabólica no geral, é o perfil inflamatório na síndrome metabólica. Devido ao aumento de tecido adiposo na obesidade, característica da síndrome metabólica, há o desequilíbrio na expressão de citocinas pró- e anti-inflamatórias pelo tecido adiposo que contribuem para uma inflamação sistêmica crônica (WILSON *et al.*, 1998, GRUNDY *et al.*, 2004). Por isso, foram analisados os componentes inflamatórios, avaliando-se suas concentrações séricas e expressão gênica no tecido adiposo.

Ao analisar os níveis séricos, foram obtidos resultados muito heterogêneos. Na linhagem C57BL/6J verificou-se uma atividade anti-inflamatória nos animais tratados com GQ-02, GQ-177 e Lyso-7 ao diminuírem a expressão de il-12, citocina que participa na indução de expressão de ifn- γ , um dos principais mediadores da inflamação. Os mesmos tratamentos não alteraram il-6 e il-10 séricos, quando comparados aos grupos tratados com veículo e água (Figura 24)

Já na linhagem *knock out*, GQ-02, GQ-177 e Lyso-7 diminuíram il-6 ao mesmo tempo que diminuíram a expressão de il-10, tanto quando comparados aos grupos tratados com veículo e água como aos camundongos saudáveis. GQ-177 mostrou aumento significativo de il-12, como nenhum outro tratamento, indicando atividade pró-inflamatória. A GQ-11 mostrou balanceada atividade anti-inflamatória, sem mostrar modulação de il-6 e il-12, citocinas pró-inflamatórias, mas aumentando il-10, citocina anti-inflamatória (Figura 24).

Ainda avaliando os níveis séricos, não foi possível observar alteração em ifn- γ , onde os níveis se mantiveram equivalentes aos camundongos tratados com veículo e água, mas também aos de camundongos saudáveis, indo ao encontro aos dados de il-12, sua indutora, pelos tratamentos com GQ-02, GQ-177 e Lyso-7 (Figura 25). Foi observado pelos mesmos tratamentos, diminuição nos níveis de tnf-

α , outro mediador da inflamação, e de mcp-1 (ccl2), potencial quimioatraente de macrófagos, que caracteriza o processo inflamatório (Figura 25). Sendo assim, ao nível sistêmico, os tratamentos com GQ-02, GQ-177 e Lyso-7 mostraram potencial anti-inflamatório.

Ao analisar as citocinas inflamatórias no tecido adiposo epididimal, observou-se diminuição de il-10 e aumento de il-17 por GQ-11, na linhagem selvagem, assim como aumento de mcp-1, fgf-21 e vcam (Figuras 28, 29 e 30), indicando potencial pró-inflamatório. Na linhagem C57BL/6J LDLr $-/-$, os efeitos foram contrários, mostrando modulação por aumento de il-10, vcam e diminuição de mcp-1(ccl2) e vegf, demonstrando ação anti-inflamatória nestes animais.

GQ-177 mostrou modular vegf, diminuindo sua expressão, quando comparado aos grupos tratados com veículo e água, em ambas as linhagens (Figura 29) e também aumento mcp-1 na linhagem selvagem (Figura 30).

Os tratamentos com GQ-02 e Lyso-7 mostraram aumentar mcp-1 nos camundongos selvagens, onde GQ-02 mostrou efeito contrário na linhagem C57BL/6J LDLr $-/-$.

Nenhuma dessas alterações permitiu estabelecer um perfil anti-inflamatório ou pró-inflamatório pelos tratamentos estudados, uma vez que não foi encontrado equilíbrio num único perfil definido de citocinas.

Por sua vez, o tratamento com GQ-11 mostrou atividade anti-inflamatória na linhagem C57BL/6J LDLr $-/-$, indicada pelo aumento de citocinas anti-inflamatórias e diminuição de citocinas pró-inflamatórias. A diminuição na expressão de mcp-1 (ccl2) indica modulação no recrutamento de macrófagos, exacerbado na síndrome metabólica devido ao perfil inflamatório dessa condição. O recrutamento de macrófagos para infiltração no tecido adiposo de forma exacerbada contribui para o aumento da inflamação nesse tecido, uma vez que os macrófagos infiltrados irão secretar outras citocinas pró-inflamatórias (PANEE, 2012). Dessa forma, a regulação da super expressão de mcp-1 (ccl2) demonstra melhora no estado inflamatório (TATEYA et al., 2010). Já a diminuição da expressão de vegf, também indica diminuição do processo inflamatório, uma vez que a desregulação na sinalização promovida por VEGF resulta em diminuição nos níveis de eNOS e aumento na produção de ROS, com um consequente estímulo na expressão de mediadores pro-

coagulantes, pro-trombóticos e pro-inflamatórios (PARK et al., 2009). Ao mesmo tempo, a diminuição na expressão de vcam, uma molécula de adesão, indica regulação de um sistema que promove o acúmulo de AGEs (advanced glycation endproducts) e de seus receptores (RAGEs), em quadros de hiperglicemia, causando um aumento na expressão de NFkB. (XU et al., 2013) A regulação de vcam, neste caso, parece estar relacionada ao efeito hipoglicêmico também promovido pelo tratamento.

Ainda colaborando para o efeito anti-inflamatório, o aumento de IL-10, indica uma relação entre o recrutamento de macrófagos de fenótipo M2, com ação anti-inflamatória, podendo demonstrar equilíbrio num ambiente inflamatório descompensado (MARTINEZ et al., 2008; XU et al., 2013).

Dessa forma, somente GQ-11 demonstrou efeitos anti-inflamatórios.

5.5. O impacto do tratamento com novos derivados tiazolidínicos no perfil lipídico dos animais

Uma vez que os PPARs também estão envolvidos no metabolismo lipídico, avaliou-se o perfil lipídico dos camundongos tratados, onde não foi possível observar nenhuma alteração significativa nos níveis de colesterol total e triglicerídeos, promovidos pelos tratamentos nos camundongos com síndrome metabólica, em ambas as linhagens. É importante ressaltar que entre as linhagens selvagem e *knock out* há diferença significativa nas concentrações de colesterol total e triglicerídeos, devido ao *clearance* reduzido de LDL pela modificação genética da deficiência no receptor de LDL.

Apesar de não alterar os níveis de colesterol total, alguns novos derivados mostraram modular as frações LDL e HDL. O novo derivado GQ-177 diminuiu as concentrações de LDL-colesterol em ambas as linhagens e aumentou HDL-colesterol na linhagem selvagem, enquanto Lyso-7 também aumentou HDL-colesterol nos camundongos selvagens (Figura 23). O tratamento com GQ-11 também induziu o aumento de HDL-colesterol nos camundongos *knock out*, mas o tratamento com pioglitazona diminuiu os níveis de HDL-colesterol nessa linhagem.

Observando os níveis de VLDL-colesterol, foi possível observar diminuição promovida pelos tratamentos com pioglitazona, GQ-02, GQ-11 e GQ-177 na linhagem *knock out*. Não foi observada nenhuma alteração na linhagem selvagem.

É interessante observar a ação da GQ-177 em promover a diminuição de LDL-colesterol e aumento de HDL-colesterol, indicando melhora no perfil lipídico na condição de síndrome metabólica. Apesar de não modular os níveis de triglicerídeos, é possível observar que os mesmos se encontram equivalentes aos dos camundongos saudáveis. Agonistas de PPAR α atuam como reguladores lipídicos, por promover o catabolismo de ácidos graxos e o transporte reverso de colesterol, resultando na diminuição da LDL e triglicerídeos e aumento de HDL, assim como os fibratos (BOULANGER *et al*, 2006; STAELS *et al.*, 1998). Dessa forma, é possível levantar a hipótese de que GQ-177 possa ser agonista parcial ou dual de PPAR α e γ . Em parte, a diminuição na expressão de *srebp* também promovida por GQ-177, em ambas as linhagens (Figura 32), pode estar envolvida com os efeitos acima encontrados, uma vez que SREBP é necessário para a síntese de colesterol. Uma vez no núcleo, o SREBP pode ligar-se a sequências específicas de DNA (elementos regulatórios de esteróis), encontradas nas regiões de controle de genes que codificam enzimas necessárias para a síntese de lipídeos. Essa ligação no DNA leva ao aumento da transcrição de genes como os de receptores de LDL (YOKOYOMA *et al.*, 1993). Em conjunto com a diminuição nos níveis de *srebp*, também foi encontrado aumento na expressão de *lxr- β* promovido pelo tratamento com GQ-177, em ambas as linhagens (Figura 32). O LXR- β age como um sensor de colesterol de uma forma inversa ao SREBP, diminuindo os níveis de colesterol pelo aumento na expressão de genes alvo associados com o transporte reverso de colesterol (CALKIN & TOLTONOZ, 2010). Dessa forma, a diminuição de *srebp*, conjuntamente com o aumento de *lxr- β* , contribuíram para a melhora no perfil lipídico dos animais tratados com GQ-177, resultando em diminuição do LDL-colesterol e aumento no HDL-colesterol.

A tendência à maior expressão de *lxr- β* também foi observada nos camundongos selvagens tratados com Lyso-7 (Figura 32), podendo estar relacionado ao aumento nos níveis de HDL-colesterol desses animais (Figura 23), da mesma forma que a diminuição nos níveis de HDL-colesterol nos animais *knock out*

tratados com pioglitazona também pode estar relacionada com a diminuição na expressão de *lxr-β*.

Não houve alteração na expressão gênica de *srebp* e *lxr-β* nos camundongos saudáveis e apesar de os novos derivados tiazolidínicos mostrarem diminuição na expressão gênica de *srebp*, assim como GQ-177, a possível supressão na síntese de colesterol e ativação da transcrição do gene do receptor de LDL, não foram refletidas no perfil lipídico dos camundongos tratados com GQ-02, GQ-11 e Lyso-7, bem como a pioglitazona. A expressão de *lxr-β* nesses grupos não se mostrou alterada, mostrando que a interação entre a expressão de *lxr-β* e *srebp* possam ser importantes na regulação do perfil lipídico.

Os tratamentos com pioglitazona, GQ-02, GQ-11 e GQ-177 não mostraram alterações nos níveis de triglicerídeos, porém promoveram diminuição de VLDL-colesterol nos camundongos *knock out*, indicando ter uma baixa modulação no perfil lipídico, notável somente na linhagem que se mostra descompensada devido à sua mutação genética.

5.6. O efeito do tratamento com novos derivados tiazolidínicos na densidade óssea dos animais

Um dos efeitos adversos notificados pelo tratamento com tiazolidinadionas é a perda óssea. Basicamente, isso acontece porque a ativação de PPAR γ promove a formação de adipócitos a partir de osteoblastos (AKUNE *et al.*, 2004; WAN, 2010).

Os ossos são constantemente remodelados pela atividade de osteoclastos e osteoblastos. Os osteoclastos são derivados de progenitores hematopoiéticos da linhagem de monócitos e macrófagos, os quais adquirem fenótipo de reabsorção óssea pela influência de ligantes do receptor ativador de fator nuclear kappa b (RANKL) (TEITELBAUM, 2007), enquanto os osteoblastos são derivados de progenitores mesenquimais (PITTENGER *et al.*, 1999). A densidade ou massa óssea é estável em suas condições fisiológicas por conta da atividade balanceada dos dois tipos celulares, enquanto na osteoporose a reabsorção ultrapassa a formação óssea (NOVACK & TEITELBAUM, 2008). CD36 é uma glicoproteína de membrana presente em diversos tipos celulares, incluindo macrófagos e funciona

como um receptor *scavenger* pelo reconhecimento de lipídeos específicos e assim regulando o seu acúmulo em células fagocíticas (COLLOT *et al.*, 2007; SILVERSTEIN & FEBBRAIO, 2009). O reconhecimento de lipídios endógenos por CD36 também atua na fusão de macrófagos induzida por IL-4, mas não na formação de osteoclastos (TEITELBAUM, 2007). Nesse contexto, CD36 é um gene alvo de PPAR γ , havendo aumentando da expressão de CD36 em células mielóides (CHAWLA *et al.*, 2001). Os osteoblastos e os adipócitos são derivados de precursores mesenquimais comuns, os quais são modulados por PPAR γ , que promove a adipogênese em detrimento da osteogênese (AKUNE *et al.*, 2004; WAN, 2007).

Por sua vez, PPAR γ é também expresso em precursores de osteoclastos e sua ativação tem um efeito de estímulo na formação da célula reabsortiva óssea, um evento mediado pelo fator de transcrição AP-1 c-fos (WAN *et al.*, 2007). Dessa forma, as tiazolidinonas podem ter um impacto negativo na massa óssea tanto pela redução da formação de células ósseas, como no reforço da reabsorção. Enquanto a contribuição destes componentes ainda não é totalmente clara, essas observações estão de acordo com a perda óssea experimental induzida por esses fármacos e de forma mais impactante, como efeitos adversos demonstrados na prática clínica por pacientes tratados com as tiazolidinonas.

Neste contexto, a densidade óssea dos camundongos estudados foi avaliada a fim de observar um panorama geral do ponto de vista da perda óssea. As imagens captadas por raio-x possibilitou avaliar 4 diferentes regiões ósseas do fêmur, sendo elas as regiões R1, R2, R3 e R4 (Figura 35). De uma maneira geral, o tratamento com novos derivados tiazolidínicos pareceram aumentar a densidade óssea nas regiões R1 e R2 (Figura 37), dos camundongos saudáveis, não alterando a densidade das regiões R3 e R4 (Figura 38)

Diferentemente dos camundongos saudáveis, os camundongos selvagens com síndrome metabólica tratados com pioglitazona mostraram densidade óssea diminuída nas regiões R1 e R2. Na mesma linhagem, os camundongos tratados com GQ-11 também mostraram densidade diminuída na região R2 (Figura 39). As regiões R3 e R4 não se mostraram alteradas com os tratamentos em nenhuma das

linhagens, com exceção do tratamento com GQ-02, onde os animais apresentaram aumento de densidade óssea na região R3 dos camundongos *knock out* (Figura 40).

A perda óssea caracterizada nos animais tratados com pioglitazona pode predizer maior potencial ligante do fármaco ao PPAR γ (agonista total) em comparação com os novos derivados tiazolidínicos (agonistas parciais), que não indicaram perda óssea.

5.7. O uso de um novo derivado tiazolidínico, GQ-11, na cicatrização de lesões cutâneas no modelo experimental de diabetes

Resultados prévios que mostraram modulação nas vias de sinalização envolvidas no processo inflamatório e, ao mesmo tempo, sensibilização à insulina promovida pelo tratamento com os novos derivados tiazolidínicos tem potencial como nova abordagem terapêutica na cicatrização de lesões cutâneas diabéticas.

Os resultados obtidos neste estudo indicaram diminuição na sinalização de *tnf- α* (Figura 33), ao lado do aumento de *arg-1* e *il-10*, promovidos pelo tratamento tópico com GQ-11, nas lesões cutâneas de camundongos MKR (Figura 34). Regularmente, o estágio inflamatório do processo de cicatrização, com o objetivo de proteção e remoção de resíduos teciduais no local por macrófagos ativados é sustentado pelo aumento da secreção de *tnf- α* , o qual exerce função autócrina na ativação dos macrófagos. Na condição do diabetes, *tnf- α* e *il-1 β* são superexpressos em feridas de camundongos e humanos (GOREN et al, 2003; MIRZA et al, 2013). A inflamação persistente tem sido caracterizada pela mediação da superexpressão de *tnf- α* , promovendo desequilíbrio no recrutamento dos macrófagos de fenótipo M1. Contudo, ainda existem muitos pormenores a serem elucidados na desregulação de macrófagos em feridas diabéticas. De qualquer forma, já é conhecido que em feridas diabéticas os macrófagos de fenótipo M1 não conseguem ser substituídos pelo recrutamento de macrófagos M2, para a promoção de um ambiente anti-inflamatório, para a resolução do estágio (GOREN et al, 2003). Assim, o efeito modulatório da GQ-11 na diminuição na decodificação de *tnf- α* e aumento de *il-10* e *arg-1*, nos dá base para a hipótese de que GQ-11 pode modular o recrutamento de macrófagos de

fenótipo M1 para os de fenótipo M2, promovendo homeostase no estágio inflamatório do processo de cicatrização.

Além dos resultados de intervenção em $\text{tnf-}\alpha$, o aumento da expressão de tsg-6 , também observado nos grupos tratamentos com GQ-11, confirma a diminuição da atividade de macrófagos M1, uma vez que tsg-6 é uma proteína anti-inflamatória, induzida por $\text{tnf-}\alpha$, também agindo como um regulador de $\text{tnf-}\alpha$ a partir do mecanismo de *feedback* negativo. Alguns estudos demonstram supressão de condição pró-inflamatória em células mesenquimais a partir da secreção de tsg-6 , em resposta ao estímulo de LPS/IFN- γ e também melhora no reparo tecidual em modelos animais de infarto do miocárdio a partir da secreção da proteína (QI et al., 2013).

Como uma resposta da regulação das citocinas envolvidas, as lâminas histológicas das feridas dos camundongos MKR tratados com GQ-11 mostraram melhor organização celular e formação completa o tecido epitelial e folículos capilares, além de menor espessura no tecido conectivo, indicando menor granulação e equilíbrio na fase proliferativa da cicatrização (Imagem 5).

Para completar os estudos, macrófagos primários de medula óssea, em cultura celular, tratados com GQ-11 e estimulados com LPS, mostraram diminuição na expressão de $\text{tnf-}\alpha$ e $\text{il-1}\beta$ (Figura 36) quando comparados ao veículo. Ao mesmo tempo, foi possível observar aumento na expressão de il-10 e $\text{tgf-}\beta$ (Figura 37), indicando que o tratamento prévio com GQ-11 pode modular o estado pró-inflamatório promovido pelo estímulo a LPS, demonstrando o envolvimento do tratamento no comportamento dos macrófagos e sua expressão de citocinas.

Em suma, os estudos do efeito da GQ-11 na cicatrização de feridas diabéticas mostraram modulação no fenótipo da população de macrófagos M1 para M2, promovendo maior equilíbrio entre citocinas e nas fases pro e anti-inflamatórias no estágio de inflamação. No momento, conclui-se que essa modulação está envolvida com a diminuição na expressão de $\text{tnf-}\alpha$ e aumento de arg-1 e il-10 , levando a melhora no reparo tecidual e organização celular em camundongos diabéticos. Como um assunto de extrema importância na saúde pública, muito ainda deve ser estudado em torno da cicatrização de feridas diabéticas e suas abordagens terapêuticas, a fim de elucidar pormenores nas vias de sinalização envolvidas em

seus estágios clássicos, permitindo entender os exatos mecanismos na fisiologia do processo e nos mecanismos de ação dos tratamentos propostos em novas abordagens terapêuticas para a evolução no serviço médico.

6. CONCLUSÕES

Os novos derivados tiazolidínicos mostraram distintos comportamentos entre as linhagens, sendo necessário aprofundar os estudos acerca de cada linhagem para entender as suas peculiaridades. De maneira geral, os efeitos pareceram ser mais efetivos na linhagem selvagem, em relação à modulação de citocinas inflamatórias e adipocinas.

- GQ-02: Mostrou aumento na expressão de ppar- γ no tecido adiposo epididimal de camundongos selvagens e aumento no percentual de gordura corporal, devido à diminuição na atividade de β -catenina. Promoveu aumento da sensibilidade à insulina com aumento de adiponectina e diminuição de resistina, além de melhora no estado hiperinsulinêmico e hiperleptinêmico. Mostrou modular citocinas inflamatórias, porém, de maneira controversa. Não mostrou modulação no perfil lipídico e também não alterou a densidade óssea dos animais.
- GQ-11: Mostrou aumento na expressão de ppar- α no tecido adiposo epididimal e no tecido hepático, não promovendo aumento no percentual de gordura corporal, caracterizado pelo aumento da atividade de β -catenina. Promoveu maior aumento da sensibilidade à insulina com aumento de adiponectina, diminuição de resistina nos camundongos selvagens e diminuição da glicose plasmática de jejum, além da melhora no estado hiperinsulinêmico e hiperleptinêmico, também nos camundongos selvagens. Apresentou alta atividade anti-inflamatória, pela diminuição de citocinas pró-inflamatórias, vegf e vcam, além de aumentar il-10. Demonstrou aumento de HDL nos camundongos *knock out*, indicando baixa, porém existente, modulação no perfil lipídico.

Não alterou a densidade óssea dos animais, com exceção da região R2 dos camundongos selvagens, que apresentaram menor densidade óssea. Além dos efeitos na síndrome metabólica, mostrou potencial efeito modulatório no fenótipo da população de macrófagos M1 para macrófagos M2, promovendo maior equilíbrio entre citocinas e nas fases pro e anti-inflamatórias no estágio inflamatório da cicatrização, contribuindo para a melhora na organização celular e reparo tecidual.

- GQ-177: Mostrou aumento na expressão de ppar- γ no tecido adiposo epididimal e aumento no percentual de gordura corporal, com diminuição de β -catenina. Promoveu sensibilização a insulina com aumento de adiponectina e diminuição de resistina, além de melhorar a hiperinsulinemia e hiperleptinemia nos camundongos selvagens. Apresentou efeitos pró e anti-inflamatórios controversos, porém com interessante modulação na diminuição de citocinas pró-inflamatórias. Demonstrou interessante modulação no perfil lipídico dos animais, diminuindo LDL e aumentando HDL.
- LYSO-7: Mostrou aumento na expressão de ppar- γ no tecido adiposo epididimal dos camundongos selvagens, com aumento na expressão de ppar- α no tecido hepático e aumento no percentual de gordura corporal, com a diminuição de β -catenina. Aumentou a sensibilização a insulina de uma forma menos intensa que os outros novos derivados, com aumento de adiponectina, melhorando o estado hiperleptinêmico nos camundongos selvagens. Também apresentou atividade pró e anti-inflamatória controversa. Mostrou modular o perfil lipídico, pelo aumento de HDL nos camundongos selvagens.

REFERÊNCIAS

- ABALLAY, L. R.; EYNARD, A. R.; DÍAZ, M. DEL P.; NAVARRO, A.; MUÑOZ, S. E. Overweight and obesity: a review of their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. **Nutrition reviews**, v. 71, n. 3, p. 168–179, 2013.
- AHIMA, R. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 14 Suppl 5, p. 242S–249S, 2006.
- AHIMA, R. S.; LAZAR, M. A. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 22, n. 5, p. 1023–31, 2008.
- AKBIYIK, F.; RAY, D. M.; GETTINGS, K. F.; BLUMBERG, N.; FRANCIS, C. W.; PHIPPS, R. P. Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPARgamma, and PPARgamma agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes. **Blood**, v.104, n.5, p. 1361-8, 2004.
- AKUNE, T.; OHBA, S.; KAMEKURA, S.; YAMAGUCHI, M.; CHUNG, U. I.; KUBOTA, N. PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. **J Clin Invest**. 113(6):846-55, 2004.
- ALMIND, K.; KAHN, C. R. Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. **Diabetes**, v. 53, n. 12, p. 3274–3285, 2004.
- AMATO, A. A.; RAJAGOPALAN, S.; LIN, J. Z. GQ-16, a novel peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligand, promotes insulin sensitization without weight gain. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 33, p. 28169–28179, 2012.
- BAKHSHI, F. R.; MAO, M.; SHAJAHAN, A. N.; PIEGHELER, T.; CHEN, Z.; CHERNAYA, O.; SHARMA, T.; ELLIOTT, W. .M.; SZULCEK, R.; BOGAARD, H. J.; COMHAIR, S.; ERZURUM, S.; AMERONGEN, G. P. V. N.; BONINI, M. G.; MINSHALL, R. D. Nitrosation-dependent caveolin 1 phosphorylation, ubiquitination, and degradation and its association with idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Pulm Circ**. 3(4): 816–830, 2013.
- BALAKUMAR, P.; ROSE, M.; GANTI, S.; KRISHAN, P.; SINGH, M.; PPAR dual agonists: Are they opening Pandora's box? **Pharmacol Res**. 56 (2):91-8, 2007.
- BERGER, J.; LEIBOWITZ, M. D.; DOEBBER, T. W.; et al. Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 10, p. 6718–6725, 1999.
- BOULANGER, H.; MANSOURI, R.; GAUTIER, J. F.; GLOTZ, D. Are peroxisome proliferator-activated receptors new therapeutic targets in diabetic and non-diabetic nephropathies? **Nephrol Dial Transplant**, v.21, n.10, p-2696-702, 2006.
- BRUGTS, M. P.; RANKE, M. B.; HOFLAND, L. J.; VAN DER WANSEM, K.; WEBER, K.; FRYSTYK, J.; LAMBERTS, S. W.; JANSSEN, J. A. Normal values of circulating insulin-like growth factor-I bioactivity in the healthy population: comparison with five widely used IGF-I immunoassays. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 93, 2539–2545, 2008.
- BRUGTS, M. P. IGF-I bioactivity in aging, health and disease. *Doctoral Thesis 2009*. Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam, The Netherlands (ISBN: 978-90-8559-915-9).
- CALKIN, A.; TONTONOZ, P. LXR signaling pathways and atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 30 (8):1513-8, 2010.
- DO CARMO, J. M.; DA SILVA, A. A.; MORGAN, J. Inhibition of soluble epoxide hydrolase reduces food intake and increases metabolic rate in obese mice. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD**, v. 22, n. 7, p. 598–604, 2012.
- CHAWLA, A.; BARAK, Y.; NAGY, L.; LIAO, D.; TONTONOZ, P.; EVANS, R. M. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. **Nat Med**. 7(1):48-52, 2001.

CLARK, R. A. F.; KAUSTABH, G.; TONNESEN, M. G. Tissue Engineering for Cutaneous Wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, 1018–1029, 2007.

COLLOT-TEIXEIRA, S.; MARTIN, J.; MCDERMOTT-ROE, C.; POSTON, R.; MCGREGOR, J. L. CD36 and macrophages in atherosclerosis. **Cardiovasc Res**, 75(3):468-77, 2007.

DA COSTA LEITE, L. F. C.; VERAS MOURÃO, R. H.; DE LIMA, M. DO C. A. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of arylidene-thiazolidinediones with potential hypoglycemic and hypolipidemic activities. **European journal of medicinal chemistry**, v. 42, n. 10, p. 1263–1271, 2007.

DALAMAGA, M.; CHOU, S. H.; SHIELDS, K.; PAPAGEORGIOU, P.; POLYZOS, S. A.; MANTZOROS, C. S. Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: current evidence and therapeutic perspectives. **Cell Metab**, v. 18, p. 29–42, 2013.

FAINE, L. A.; RUDNICKI, M.; CÉSAR, F. A.; et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of a new arylidene-thiazolidinedione in macrophages. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 22, p. 3351–3360, 2011.

FERNÁNDEZ, A. M.; DUPONT, J.; FARRAR, R. P.; et al. Muscle-specific inactivation of the IGF-I receptor induces compensatory hyperplasia in skeletal muscle. **The Journal of clinical investigation**, v. 109, n. 3, p. 347–355, 2002.

FONSECA, V. A. Early identification and treatment of insulin resistance: impact on subsequent prediabetes and type 2 diabetes. **Clinical cornerstone**, v. 8 Suppl 7, p. S7–18, 2007.

FRANCO, G. P. P.; SCALA, L. C. N.; ALVES, C. J.; et al. Metabolic syndrome in patients with high blood pressure in Cuiabá-Mato Grosso State: prevalence and associated factors. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 92, n. 6, p. 437–442, 456–461, 472–478, 2009.

GOLDBERG, R. B.; KENDALL, D. M.; DEEG, M. A.; 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, n. 7, p. 1547–1554, 2005.

GOREN, I.; KÄMPFER, H.; PODDA, M.; PFEILSCHIFTER, J.; FRANK, S. Leptin and wound inflammation in diabetic ob/ob mice: differential regulation of neutrophil and macrophage influx and a potential role for the scab as a sink for inflammatory cells and mediators. **Diabetes**, v. 52, p. 2821–2832, 2003.

GRAHAM, D. J.; OUELLET-HELLSTROM, R.; MACURDY, T. E.; et al. Risk of acute myocardial infarction, stroke, heart failure, and death in elderly Medicare patients treated with rosiglitazone or pioglitazone. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 304, n. 4, p. 411–418, 2010.

GREY, A. Skeletal consequences of thiazolidinedione therapy. **Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, v. 19, n. 2, p. 129–137, 2008.

GRUNDY, S. M.; ADAMS-HUET, B.; VEGA, G. L. Variable contributions of fat content and distribution to metabolic syndrome risk factors. **Metabolic syndrome and related disorders**, v. 6, n. 4, p. 281–288, 2008.

GRUNDY, S. M.; BREWER, H. B., Jr; CLEEMAN, J. I.; et al. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 24, n. 2, p. e13–18, 2004.

HAUNER, H. The mode of action of thiazolidinediones. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 18 Suppl 2, p. S10–15, 2002.

HERNANDEZ, A. V.; USMANI, A.; RAJAMANICKAM, A.; MOHEET, A. Thiazolidinediones and risk of heart failure in patients with or at high risk of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis and meta-regression analysis of placebo-controlled randomized clinical trials. **American journal of cardiovascular drugs: drugs, devices, and other interventions**, v. 11, n. 2, p. 115–128, 2011.

INADERA, H. The usefulness of circulating adipokine levels for the assessment of obesity-related health problems. **International journal of medical sciences**, v. 5, n. 5, p. 248–262, 2008.

KERSTEN, S.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Roles of PPARs in health and disease. **Nature**, v. 405, n. 6745, May 25, p. 421–4, 2000.

KHAN, I. Y.; DEKOU, V.; DOUGLAS, G. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 288, n. 1, p. R127–133, 2005.

KOTSIS, V.; STABOULI, S.; PAPAKATSIKA, S.; RIZOS, Z.; PARATI, G. Mechanisms of obesity-induced hypertension. **Hypertension Research** 33, 386–393, 2010.

LEBOVITZ, H. E. Differentiating members of the thiazolidinedione class: a focus on safety. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 18 Suppl 2, p. S23–29, 2002.

LI, Y.; DING, L.; HASSAN, W.; ABDELKALDER, D.; SHANG, J. Adipokines and Hepatic Insulin Resistance. **J Diabetes Res**. v. 13, p. 170–82, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOKE, Y. K.; KWOK, C. S.; SINGH, S. Comparative cardiovascular effects of thiazolidinediones: systematic review and meta-analysis of observational studies. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 342, p. d1309–21, 2011.

LUSIS, A. J.; ATTIE, A. D.; REUE, K. Metabolic syndrome: from epidemiology to systems biology. **Nature reviews. Genetics**, v. 9, n. 11, p. 819–830, 2008.

MARTIN, P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. **Science (New York, N.Y.)**, v. 276, n. 5309, p. 75–81, 1997.

MARTIN, S. S.; QASIM, A.; REILLY, M. P. Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 15, p. 1201–1210, 2008.

MARTINEZ, F. O.; SICA, A.; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 13, p. 453–461, 2008.

MARHOFFER, W.; STEIN, M.; MAESER, E.; FEDERLIN, K. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. **Diabetes care**, v. 15, n. 2, p. 256–260, 1992.

Marrink SJ, Mark AL. The mechanism of vesicle fusion as revealed by molecular dynamics simulation. **J Am Chem Soc**. v.125, p.11144–56, 2003.

MINSHALL, R. D.; SESSA, W. C.; STAN, R. V.; ANDERSON, R. G.; MALIK, A. B. Caveolin regulation of endothelial function. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 285(6):L1179–83, 2003.

MIRZA, R.E.; FANG, M.M.; WEINHEIMER-HAUS, E.M.; ENNIS, W.J.; KOH, T. Sustained inflammasome activity in macrophages impairs wound healing in type 2 diabetic humans and mice. **Diabetes**, v. 63, p.1–13. 2014.

MORENO, M.; LOMBARDI, A.; SILVESTRI, E.; SENESE, R.; CIOFFI, F.; GOGLIA, F.; LANNI, A.; LANGE, P. PPARs: Nuclear Receptors Controlled by, and Controlling, Nutrient Handling through Nuclear and Cytosolic Signaling. **PPAR Res**. 2010: 435689, 2010.

MOURÃO, R. H.; SILVA, T. G.; SOARES, A. L. M.; et al. Synthesis and biological activity of novel acridinylidene and benzylidene thiazolidinediones. **European journal of medicinal chemistry**, v. 40, n. 11, p. 1129–1133, 2005.

NANKERVIS, A.; PROIETTO, J.; AITKEN, P.; ALFORD, F. Hyperinsulinaemia and insulin insensitivity: studies in subjects with insulinoma. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 427–431, 1985.

NISOLI, E.; CLEMENTI, E.; CARRUBA, M. O.; MONCADA, S. Defective mitochondrial biogenesis: a hallmark of the high cardiovascular risk in the metabolic syndrome? **Circulation research**, v. 100, n. 6, p. 795–806, 2007.

NISSEN, S. E.; WOLSKI, K. Rosiglitazone revisited: an updated meta-analysis of risk for myocardial infarction and cardiovascular mortality. **Archives of internal medicine**. v. 170, n. 14, p. 1191–1201, 2010.

NOLAN, J. J.; LUDVIK, B.; BEERDSEN, P.; JOYCE, M.; OLEFSKY, J. Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. **The New England journal of medicine**, v. 331, n. 18, p. 1188–1193, 1994.

NOVACK, D. V.; TEITELBAUM, S. L. The osteoclast: friend or foe? **Annu Rev Pathol**. v. 3, p. 457–84, 2008.

PASCHER, V.; WU, H. D.; WILLERSON, J. T.; YEH, E. T. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. **Circulation**, v. 101, n. 3, p. 235–238, 2000.

PARK, C. W.; KIM, H. W.; LIM, J. H.; et al. Vascular endothelial growth factor inhibition by dR6 causes endothelial apoptosis, fibrosis, and inflammation in the heart via the Akt/eNOS axis in db/db mice. **Diabetes**, v. 58, n. 11, p. 2666–2676, 2009.

PATEL, R. R. Thiazolidinediones and congestive heart failure: a judicious balance of risks and benefits. **Cardiology in review**, v. 17, n. 3, p. 132–135, 2009.

PICON, P. X.; ZANATTA, C. M.; GERCHMAN, F.; et al. [Analysis of the criteria used for the definition of metabolic syndrome in patients with type 2 diabetes mellitus]. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 50, n. 2, p. 264–270, 2006.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**. 284(5411):143–7, 1999.

DEL PRATO, S.; RICCIO, A.; VIGILI DE KREUTZENBERG, S.; et al. Mechanisms of fasting hypoglycemia and concomitant insulin resistance in insulinoma patients. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 42, n. 1, p. 24–29, 1993.

PANCHAPAKESAN, U.; CHEN, X.M.; POLLOCK, C. A. Drug insight: thiazolidinediones and diabetic nephropathy - relevance to renoprotection. **Nature Clinical Practice Nephrology**. 1, 33–43. 2005.

PUIGSERVER, P. Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1- α . **International Journal of Obesity**. v. 29, p.55–59, 1999.

QI, Y.; JIANG, D.; SINDRILARU, A.; STEGEMANN, A.; SCHATZ, S.; TREIBER, N.; ROJEWSKI, M.; SCHREZENMEIER, H.; VANDER BEKEN, S.; WLASCHEK, M.; BÖHM, M.; SEITZ, A.; SCHOLZ, N.; DÜRSELEN, L.; BRINCKMANN, J.; IGNATIUS, A.; SCHARFFETTER-KOCHANKE, K. TSG-6 released from intradermally injected mesenchymal stem cells accelerates wound healing and reduces tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds. **J Invest Dermatol**. v. 134, n. 2, p. 526–37, 2013.

RICOTE, M.; GLASS, C. K. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. **Biochem Biophys Acta**. 1771(8):926–35, 2007.

RIGO, J. C.; VIEIRA, J. L.; DALACORTE, R. R.; REICHERT, C. L. Prevalence of metabolic syndrome in an elderly community: comparison between three diagnostic methods. **Arq Bras Cardiol.** 93(2):85-91, 2009.

REAVEN, G. M. The metabolic syndrome: is this diagnosis necessary? **The American journal of clinical nutrition**, v. 83, n. 6, p. 1237–1247, 2006.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., Jr. 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. **The Journal of nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993.

ROBERTSON, S. A.; LEINNINGER, G. M.; MYERS, M. G., Jr. Molecular and neural mediators of leptin action. **Physiology & behavior**, v. 94, n. 5, p. 637–642, 2008.

RUAN, H.; POWNALL, H. J.; LODISH, H. F. Troglitazone antagonizes tumor necrosis factor- α -induced reprogramming of adipocyte gene expression by inhibiting the transcriptional regulatory functions of NF- κ B. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 30, p. 28181–28192, 2003.

RUSSELL, J. C.; PROCTOR, S. D. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. **Cardiovascular pathology: the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology**. v. 15, n. 6, p. 318–330, 2006.

SALAROLI, L. B.; BARBOSA, G. C.; MILL, J. G.; MOLINA, M. C. B. [Prevalence of metabolic syndrome in population-based study, Vitória, ES-Brazil]. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**. v. 51, n. 7, p. 1143–1152, 2007.

SHANIK, M. H.; XU, Y.; SKRHA, J.; et al. Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? **Diabetes care**, v. 31 Suppl 2, p. S262–268, 2008.

SHIH, C.-C.; LIN, C.-H.; LIN, W.-L. Effects of Momordica charantia on insulin resistance and visceral obesity in mice on high-fat diet. **Diabetes research and clinical practice**, v. 81, n. 2, p. 134–143, 2008.

SILVERSTEIN, R. L.; FEBBRAIO, M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. **Sci Signal**. 2(72):re3, 2009.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **The New England journal of medicine**, v. 341, n. 10, p. 738–746, 1999.

SCHWENCKE, C.; BRAUN-DULLAEUS, R. C.; WUNDERLICH, C.; STRASSER, R. H. Caveolae and caveolin in transmembrane signaling: Implications for human disease. **Cardiovasc Res**. 1;70(1):42-9, 2006.

DA SILVA, R. C. Q.; MIRANDA, W. L.; CHACRA, A. R.; DIB, S. A. Metabolic syndrome and insulin resistance in normal glucose tolerant brazilian adolescents with family history of type 2 diabetes. **Diabetes care**. v. 28, n. 3, p. 716–718, 2005.

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

STEFFENS, S.; MACH, F. Adiponectin and adaptive immunity: linking the bridge from obesity to atherogenesis. **Circulation research**, v. 102, n. 2, p. 140–142, 2008.

TATEYA, S.; TAMORI, Y.; KAWAGUCHI, T.; KANDA, H.; KASUGA, M. An increase in the circulating concentration of monocyte chemoattractant protein-1 elicits systemic insulin resistance irrespective of adipose tissue inflammation in mice. **Endocrinology**. v. 151, n. 3, p. 971–979, 2010.

Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? **Am J Pathol**. 170(2):427-35, 2007.

URANGA, R. M.; BRUCE-KELLER, A. J.; MORRISON, C. D.; et al. Intersection between metabolic dysfunction, high fat diet consumption, and brain aging. **Journal of neurochemistry**, v. 114, n. 2, p. 344–361, 2010.

VAITHEESVARAN, B.; LEROITH, D.; KURLAND, I. J. MKR mice have increased dynamic glucose disposal despite metabolic inflexibility, and hepatic and peripheral insulin insensitivity. **Diabetologia**, v. 53, n. 10, p. 2224–2232, 2010.

VÁZQUEZ-VELA, M. E. F.; TORRES, N.; TOVAR, A. R. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. **Archives of medical research**, v. 39, n. 8, p. 715–728, 2008.

Wan Y, Chong LW, Evans RM. PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. **Nat Med**. 13(12):1496-503, 2007.

WEISCHENFELDT, J.; PORSE, B. Bone marrow-derived macrophages (BMM): Isolation and applications. **Cold Spring Harbor Protocols**. pdb.prot5080, 2008.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes care**, v. 27, n. 5, p. 1047–1053, 2004.

WILSON, P. W.; D'AGOSTINO, R. B.; LEVY, D.; et al. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. **Circulation**, v. 97, n. 18, p. 1837–1847, 1998.

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

WOUTERS, K.; VAN GORP, P. J.; BIEGHS, V.; et al. Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 48, n. 2, p. 474–486, 2008.

WU, Q.; ORTEGON, A. M.; TSANG, B.; et al. FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. **Molecular and cellular biology**, v. 26, n. 9, p. 3455–3467, 2006.

XU, F.; ZHANG, C.; GRAVES, D. T. Abnormal cell responses and role of TNF- α in impaired diabetic wound healing. **BioMed research international**, v. 2013, p. 754802, 2013.

YOKOYAMA, C.; WANG, X.; BRIGGS, M. R.; ADMON, A.; WU, J.; HUA, X.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. **Cell**. 75 (1): 187–97, 1993.

YU, S; REDDY, J. K. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. **Biochim Biophys Acta**. 1771(8):936-51, 2007.

ZHU, W.; CHENG, K. K. Y.; VANHOUTTE, P. M.; LAM, K. S. L.; XU, A. Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention. **Clinical science**, v. 114, n. 5, p. 361–374, 2008.

ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

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

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

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

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

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

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

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

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

São Paulo, 23 de maio de 2014.

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

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

9136 - 7804444/1 - Jacqueline Cavalcante Silva

Email: jacque_cavalcante@yahoo.com.br (favor indicar um email usp.br o mais rápido possível)
Data de Nascimento: 20/06/1989
Cédula de Identidade: RG - 291867509 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Nutrição - Universidade Presbiteriana Mackenzie - São Paulo - Brasil - 2011

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Análises Clínicas)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 13/07/2012
Início da Contagem de Prazo: 13/07/2012
Data Limite para o Depósito: 13/01/2015
Orientador: Prof(a). Dr(a). Dulcineia Saes Parra Abdalla - 13/07/2012 até o presente. E.Mail: dspa@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 13/07/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 26/06/2013
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 Mestrado em 13/07/2012
Matrícula de Acompanhamento em 14/07/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013)
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 14/07/2014
Impresso em: 08/01/15 13:40:47

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 7804444/1 - Jacqueline Cavalcante Silva

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
HNT5736-4/1	Nutrição Humana (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	03/08/2012	25/09/2012	60	0	0	-	N	Turma cancelada
FBC5734-2/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	06/08/2012	12/08/2012	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5803-2/2	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	07/08/2012	20/08/2012	30	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5709-5/1	Biologia Molecular em Análises Clínicas	13/08/2012	16/09/2012	75	5	78	A	N	Concluída
FBC5757-4/1	Tópicos em Análises Clínicas II	14/08/2012	26/11/2012	15	1	85	A	N	Concluída
EDM5102-3/1	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	14/08/2012	24/09/2012	60	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
HNT5760-1/2	Marcadores Bioquímicos em Estudos de Nutrição e Alimentação (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	04/09/2012	08/10/2012	30	2	80	C	N	Concluída
FBA5728-3/6	Aprimoramento Didático	16/10/2012	12/11/2012	60	4	75	A	N	Concluída
MCM5725-5/4	Aspectos Atuais do Metabolismo de Lípidos (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	23/10/2012	26/11/2012	60	4	80	A	N	Concluída
FBC5705-4/2	Tópicos em Microscopia Quantitativa	03/12/2012	09/12/2012	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5803-3/1	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	04/03/2013	17/03/2013	30	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5793-11/1	Tópicos em Análises Clínicas I	05/03/2013	17/06/2013	15	1	90	A	N	Concluída
FBC5722-2/2	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	06/03/2013	26/03/2013	60	4	90	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	25
Estágios:			
Total:	0	25	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

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 14/07/2014

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 7804444/1 - Jacqueline Cavalcante Silva

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
2083139	Dulcineia Saes Parra Abdalla	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 14/07/2014

Impresso em: 08/01/15 13:40:48

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/128/2012

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **"Investigação dos efeitos de TZDs quimicamente modificadas em modelo animal de síndrome metabólica"** (Protocolo CEUA/FCF/377), de responsabilidade da pesquisadora **Jacqueline Cavalcante Silva** sob a orientação da Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 03 de dezembro de 2012.

São Paulo, 04 de dezembro de 2012.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

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

Of. CIBio/0132012/FCF

São Paulo, 03 de julho de 2012

Senhora Professora,

Conforme parecer favorável do relator, informo a Vossa Senhoria que estamos aprovando "ad referendum" da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas o Projeto "Investigação dos efeitos de TZDs quimicamente modificadas em modelo animal de síndrome metabólica".

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,

Profa. Dra. **TELMA MARY KANEKO**
Membro da CIBio

Ilma. Sra.

Profa. Dra. **DULCINEIA SAES PARRA ABDALLA**

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP

NESTA

Composição das dietas controle e hiperlipídica

Perfil (%)	Controle	Hiperlipídica
Proteína	24,0	20,5
Lipídeos	4,000	36,0
Carboidratos	68,0	36,2
Fibras	4,0	0,0
Umidade	<10,0	<10,0
Cinzas	3,5	3,5
Aminoácidos (g/kg)		
Alanina	6,2	5,3
Arginina	8,5	7,3
Ácido Aspártico	15,0	12,8
Cistina	0,7	0,6
Ácido Glutâmico	47,5	40,6
Glicina	5,7	4,9
Histidina	6,4	5,5
Isoleucina	12,9	11,0
Leucina	19,4	16,6
Lisina	17,3	14,8
Metionina	8,3	7,1
Fenilalanina	10,4	8,9
Prolina	24,0	20,5
Serina	13,3	11,4
Treonina	10,2	8,7
Triptofano	2,6	2,2
Tirosina	13,3	11,4
Valina	15,2	13,0
Carboidratos (g/kg)		
Monossacarídeos	1,9	1,0
Dissacarídeos	456,5	243,0
Polissacarídeos	212,3	113,0
Ácidos Graxos (g/kg)		
C18:2 Linoleico	4,1	36,6
C18:3 Linolênico	0,4	3,6
Total Saturado	15,7	141,0
Total Monoinsaturado	18,0	162,0
Ácidos Graxos (g/kg)	Controle	Hiperlipídica
Total Poliinsaturado	4,5	40,2
Minerais (g/kg)		

Cálcio	5,60	7,40
Cloreto	0,86	1,14
Cobre (mg/kg)	3,60	4,78
Cromo (mg/kg)	0,41	0,54
Fluoreto (mg/kg)	11,00	14,63
Iodo (mg/kg)	0,31	0,412
Ferro (mg/kg)	40,80	54,26
Magnésio	0,49	0,65
Manganês (mg/kg)	46,70	62,11
Fósforo	5,80	7,71
Potássio	5,60	7,44
Selênio (mg/kg)	0,21	0,27
Sódio (mg/kg)	571,00	759,43
Enxofre (mg/kg)	668,00	888,44
Zinco (mg/kg)	21,60	28,72
Vitaminas (mg/kg)		
Colina	1148,00	1526,84
Ácido Fólico	0,75	0,99
Niacina	15,00	19,95
Ácido Pantotênico	5,50	7,31
Piroxidina	4,10	5,45
Riboflavina	2,30	3,05
Tiamina	3,00	3,99
Vitamina A UI/kg	3162,00	4205,46
Vitamina B12	40,00	53,20
Vitamina D2 UI/kg	1000,0	1330,0
Vitamina E UI/kg	25,70	34, 181
Vitamina K3 (menadiona)	0,52	0,69

Lista do sequenciamento dos primers utilizados nos experimentos de RT-PCR

Gene	<i>Forward Primer</i>	<i>Reverse Primer</i>
IL-1 β	CAGGCAGGCAGTATCACTCA	ATGAGTCACAGAGGATGGGC
IL-6	TCCTCTCTGCAAGAGACTTCC	TTGTGAAGTAGGGAAGGCCG
IL-10	CCAAGCCTTATCGGAAATGA	TTTTCACAGGGGAGAAATCG
IL-17	TCTCTGATGCTGTTGCTGCT	CGTGGAACGGTTGAGGTAGT
Leptina	TTTCACACACGCAGTCGGTA	GGGTGAAGCCCAGGAATGAA
Resistina	CACACGCAGTCCAACGAGTCA	CATTCTGCTGTAAGCCCAGAG
Adiponectina	CACAGATAGGACGTGGGAGC	AAGGCGTGGCTTTGTTTGTC
NF κ -B	TGGGGACTTGGTGGGTCTAT	TTTCACCTCTGCTGTGCTGG
GLUT-2	AGCGAGTGACTGGAACACTG	TCAATCACCTTCTGTGGGGC
GLUT-4	AACCGGGATGATTGGCATGT	GGCGAATTTATCCAGCAGCA
TNF- α	ATGGCCTCCCTCTCATCAGT	CTTGGTGGTTTGCTACGACG
MCP-1	CACTCACCTGCTGCTACTCA	GCTTGGTGACAAAACTACAGC
PPAR α	GCAGCCTCAGCCAAGTTGAA	TGTTCCCGAACTTGACCAGC
PPAR γ	GGCCTTGTGTCAAGGTGGAT	AGGTGCTTATGCAGTTCCGT
PGC1- α	AGATAGGAGCAGTCGGTAAC	CGAGGTTTATGCGCACGATAC
IFN- γ	ACTGGCAAAAGGATGGTGAC	GACCTGTGGGTTGTTGACCT
FGF-21	CTGGGGGTCTACCAAGCATA	ATCCTCCCTGATCTCCAGGT
ICAM	CTTCCAGCTACCATCCCAA	CTTCAGAGGCAGGAAACAGG
VCAM	GCTCAAATCGGTGACTCCAT	TGAATCTCTGGATCCTTGGG
LXR- β	ATTAAGGAAGAGGGGCAGGA	GCTGAGCACGTTGTAGTGGA
β -catenina	CCTGAGACGCTAGATGAGGG	TGTCAGCTCAGGAATTGCAC
TGF- β	TGAGTGGCTGTCTTTTGACG	GTTTCATGTCATGGATGGTGC
Ym1	TGGAGGATGGAAGTTTGAC	AATGATTCCTGCTCCTGTGG
ARG-1	GTGAAGAACCCACGGTCTGT	CTGGTTGTCAGGGGAGTGTT
VEGF	CTTTCTGCTCTCTTGGGTGC	GGCAGTAGCTTCGCTGGTAG
TSG-6	CGGATACCCCATGTGAAAC	TCCTTTGCATGTGGGTTGTA
GAPDH	ACTCCACTCACGGCAAATTC	TCTCCATGGTGGTGAAGACA
S18	GAAAATAGCCTTCGCCATCA	CACCTCATCCTCCGTGAGTT