

FLORA APARECIDA MILTON

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA MODULADO
PELO GQ-16 EM ADIPÓCITOS 3T3-L1 UTILIZANDO A
TÉCNICA DE MICROARRANJO**

BRASÍLIA, 2015

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

FLORA APARECIDA MILTON

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA MODULADO
PELO GQ-16 EM ADIPÓCITOS 3T3-L1 UTILIZANDO A
TÉCNICA DE MICROARRANJO**

**Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília.**

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves

Co-orientadora: Profa. Dra. Angélica Amorin Amato

BRASÍLIA

2015

FLORA APARECIDA MILTON

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA MODULADO
PELO GQ-16 EM ADIPÓCITOS 3T3-L1 UTILIZANDO A
TÉCNICA DE MICROARRANJO

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 10 de fevereiro de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco de Assis rocha Neves (Presidente)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Paul Webb
Instituto de Pesquisa do Hospital Metodista de Houston

Profa. Dra. Aleksandra Cvorov
Instituto de Pesquisa do Hospital Metodista de Houston

Prof. Dr. Paulo Sérgio Siebra Beraldo
Rede Sarah de Hospitais de Reabilitação

Profa. Dra. Carine Royer
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Michella Soares Coelho
Universidade de Brasília

À minha mãe que sempre me apoiou na busca pelos meus sonhos.
Aos meus irmãos Flávio e Fausto que nas quedas da minha caminhada sempre me
levantaram e incentivaram a prosseguir.

Dedico esse trabalho...

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Francisco por acreditar que eu seria capaz, pela sabedoria ao me apontar os caminhos, generosidade nas mais diversas situações, apoio e incentivo que não me deixaram desanimar mesmo nos momentos mais difíceis. À você Francisco, todo meu respeito, gratidão, carinho e admiração.

À minha co-orientadora Professora Angélica, que reúne na mesma pessoa iluminada, a inteligência e a simplicidade. Obrigada pelos ensinamentos e exemplos de profissionalismo.

Ao professor Paul pela oportunidade de estagiar no seu laboratório e pelos valiosos ensinamentos. À Aleksandra, não somente pelos ensinamentos, mas também pelo carinho e preocupação que sempre demonstrou. Ao Douglas, Carly, Lou e Aijun pela colaboração no período em que estive em Houston.

À Mariella, a irmã que não é de sangue, mas é de alma. Obrigada por compartilhar conhecimentos e experiências e principalmente pela amizade, que foi fundamental para que eu pudesse enfrentar e superar os obstáculos não somente acadêmicos, mas também pessoais.

Aos meus colegas de laboratório e também amigos, Alexandre, Pedro, Caroline, Yasmim, Isabel e Simone, pela colaboração e momentos de descontração.

Aos professores Marie, Luiz, Guilherme, Fátima, Adriana e Djane, pelos ensinamentos e colaboração.

À Rilva, pela paciência e disposição em orientar e colaborar que vão além das suas atribuições profissionais.

Ao Luiz Casseiro, minha ex-liderança no Hospital Sarah pelo incentivo, apoio e exemplos de profissionalismo e dedicação.

"Se enxerguei mais longe, foi porque estava sobre os ombros de gigantes."

(Isaac Newton)

PREFÁCIO

A obesidade é atualmente um dos maiores problemas de saúde pública mundial, não apenas por sua elevada prevalência, mas também pela morbimortalidade das doenças a ela associadas. O *diabetes mellitus* tipo 2 (DM 2) é a principal doença associada à obesidade, sendo caracterizado basicamente pela redução da secreção pancreática de insulina, associada à resistência à ação desse hormônio em vários tecidos.

As terapias atuais para o tratamento da resistência insulínica associada ao DM 2 incluem a biguanida metformina e as tiazolidinonas (TZDs). Estas últimas são agonistas totais do receptor ativado por proliferadores peroxissomais gama (PPAR γ), um receptor nuclear ativado por ligantes, envolvido em diversos processos fisiológicos, incluindo o metabolismo lipídico, homeostase da glicose e resposta inflamatória.

O envolvimento do PPAR γ em vias metabólicas cruciais tornou-o alvo atrativo para o desenvolvimento de agentes para o tratamento de doenças metabólicas humanas. Contudo, seu amplo padrão de expressão e suas variadas ações metabólicas também constituem desvantagens. A ativação supra-fisiológica das vias de sinalização reguladas pelo PPAR γ parece estar relacionada aos efeitos adversos de alguns compostos que ativam esse receptor.

De fato, as TZDs constituem uma classe de medicamentos bastante eficazes no aumento da sensibilidade insulínica, mas estão associadas a efeitos adversos bem estabelecidos como ganho de peso, retenção hídrica, edema e insuficiência cardíaca, aumento do risco de infarto do miocárdio, perda óssea e aumento do risco de fraturas, além de aumento do risco de câncer de bexiga.

Esses efeitos adversos levaram a restrições e até mesmo suspensão do uso das TZDs em alguns países, inclusive no Brasil, onde o registro dos medicamentos contendo o princípio ativo rosiglitazona foi cancelado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2010. Dessa forma, a única alternativa às TZDs para melhorar a resistência à insulina em pacientes com DM 2 é a metformina.

Contudo, em monoterapia, a metformina é menos eficiente na redução da glicose sanguínea. Além disso, os efeitos anti-inflamatórios das TZDs mediados pela ativação do PPAR γ são importantes aspectos do mecanismo de ação dessas drogas, não compartilhados pela metformina.

Nesse cenário, esforços têm se concentrado na identificação e desenvolvimento de agonistas específicos de PPAR γ que mantenham os efeitos benéficos da ativação desse receptor, sem produzir efeitos adversos consideráveis. Com esse intuito, o GQ-16, um agonista específico e parcial do PPAR γ , foi desenvolvido na Universidade Federal de Pernambuco.

Um estudo realizado no Laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade de Brasília em colaboração com o Instituto de Pesquisa do Hospital Metodista de Houston, e publicado em 2012 no *The Journal of Biological Chemistry*, mostrou que o GQ-16 melhorou a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina em um modelo murino de obesidade e diabetes, de forma similar à rosiglitazona, mas sem indução do ganho de peso observado em resposta ao tratamento com esta TZD.

Até o momento, os mecanismos pelos quais o GQ-16 exerce ação sensibilizadora da insulina sem indução do ganho de peso não foram completamente elucidados. Buscando contribuir para o preenchimento dessa lacuna, estudamos, em adipócitos maduros, o efeito do GQ-16 sobre a atividade do PPAR γ em um nível transcricional amplo, utilizando a técnica de microarranjo.

Os resultados mostraram que o GQ-16 regula, em adipócitos maduros, poucos genes quando comparado com o agonista total rosiglitazona. Contudo, o reduzido efeito sobre genes relacionados ao metabolismo lipídico e da glicose e o efetivo efeito repressor sobre alguns genes positivamente relacionados com a resposta inflamatória podem contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares pelos quais o PPAR γ exerce seus efeitos *in vivo*.

Além do trabalho com o GQ-16, foco principal do meu doutorado, também tive a oportunidade de colaborar com outro projetos, o que proporcionou novos

aprendizados e o contato com pesquisadores que contribuíram para meu crescimento profissional e também pessoal.

Um dos trabalhos com o qual colaborei foi o *Chemical synthesis, docking studies and biological effects of a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist and cyclooxygenase inhibitor*, publicado no *European Journal of Pharmaceutical Sciences* em 2012. Esse trabalho descreve a síntese e os efeitos *in vitro* e *in vivo* do Lyso-7, um composto com atividade pan-agonista em PPAR e com atividade inibitória sobre a ciclooxigenase. O Lyso-7 reduziu a secreção neutrofílica de interleucina 1 beta (IL-1 β) e óxido nítrico (NO) induzidas por lipopolissacarídeo (LPS), efeito bloqueado pelo GW9962, um antagonista específico de PPAR γ . *In vivo*, o tratamento com o Lyso-7 reduziu o influxo de neutrófilos no tecido adiposo subcutâneo de camundongos induzido pela injeção de carragenina.

No terceiro ano de doutorado, fui contemplada com uma bolsa para realização do doutorado sanduíche, quando estagiei no Instituto de Pesquisa do Hospital Metodista de Houston, sob orientação do Professor Dr. Paul Webb. No Laboratório do Professor Paul realizei o microarranjo com o GQ-16 e também colaborei com mais dois trabalhos.

O trabalho no qual colaborei com professora Dra. Aleksandra Cvoro, intitulado *A Thyroid Hormone Receptor/KLF9 Axis in Human Hepatocytes and Pluripotent Stem Cells*, foi publicado na revista *Stem Cells* em 2014. Neste trabalho, é demonstrada a cooperação entre os Receptores do Hormônio Tiroideano (TRs) e o fator transcricional KLF9 (*Kruppel Like Factor 9*) na regulação da proliferação e diferenciação dos hepatócitos.

A ativação do TR levou ao aumento da expressão do KLF-9 em células HepG2, hepatócitos primários de camundongos e humanos, células tronco pluripotentes humanas (*human induced pluripotent stem cells* - hiPSC) e células tronco embrionárias humanas (*human embryonic stem cells* - hESC). O nocaute do KLF-9 alterou a expressão de centenas de genes em células HepG2, hESC e hiPSC e a avaliação por microarranjo mostrou que vários genes envolvidos na sinalização Notch, importante no desenvolvimento e regeneração do fígado, são regulados em resposta ao tratamento com T3 e também alterados pelo nocaute do KLF-9.

O segundo trabalho com o qual colaborei no período do doutorado sanduiche, de autoria da pesquisadora Ana Puhl, ainda não foi publicado, mas encontra-se pronto para ser submetido. Nesse trabalho, por meio de ensaios de gene repórter, foi mostrado que os anti-inflamatórios diclofenaco sódico, indometacina e ibuprofeno são agonistas do PPAR γ . A cristalografia do LBD do PPAR γ ligado a esses compostos mostrou modos de ligação distintos. Enquanto a indometacina e o ibuprofeno se ligam como homodímeros, o diclofenaco sódico liga-se ao LBD como um monômero. Ensaio de adipogênese com células 3T3-L1 revelaram que o diclofenaco sódico, indometacina e ibuprofeno são capazes de induzir a diferenciação dessas células em adipócitos, embora com intensidades diferentes. A análise da expressão gênica induzida pelo tratamento de adipócitos 3T3-L1 maduros com esses anti-inflamatórios revelou um padrão de regulação semelhante ao da rosiglitazona, nas vias relacionadas ao metabolismo lipídico e da glicose e resposta inflamatória.

Quando retornei dos Estados Unidos, além de concluir a análise dos dados do microarranjo, iniciei um trabalho que visa a identificação de poluentes ambientais que atuam como desreguladores endócrinos (DEs). Os DEs são substâncias exógenas com capacidade de interferir na função endócrina, alguns dos quais já foram relacionados com o desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina e diabetes. Entre os poluentes ambientais mais amplamente distribuídos no ambiente estão os organostânicos, utilizados principalmente na fabricação do PVC. Por meio de ensaios de gene repórter, foram identificados quatro compostos da classe dos organoestânicos (DBTs diclorato, diacetato, dilaurato, maleato) capazes de ativar o PPAR γ . Ensaio de diferenciação com células 3T3-L1 também mostraram que esses compostos possuem efeito adipogênico, evidenciado pelo acúmulo intracelular de lipídeos. Esses resultados preliminares serão apresentados no congresso internacional Endo 2015 (*The Endocrine Society's 97th Annual Meeting*), que será realizado em março, em San Diego, Califórnia. Nosso próximo passo é o estudo *in vivo*, buscando avaliar o efeito desses compostos sobre variáveis metabólicas, depósitos de tecido adiposo e em outros tecidos, tais como o fígado.

RESUMO

A prevalência de obesidade, associada à resistência insulínica e diabetes tipo 2 vem aumentando nas últimas décadas. As tiazolidinadonas (TZDs) são agonistas do receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR γ) com eficiente ação sensibilizadora da insulina. Contudo, o uso das TZDs está associado a efeitos adversos como o ganho de peso, retenção de líquido, edema, insuficiência cardíaca congestiva e perda óssea. GQ-16 é um agonista parcial e específico do PPAR γ que melhorou a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina de camundongos submetidos a dieta hiperlipídica de forma semelhante à rosiglitazona, mas, ao contrário dessa, não induziu ganho de peso ou edema. Considerando que um dos principais alvos farmacológicos das TZDs é o tecido adiposo, o objetivo desse estudo foi determinar o efeito de GQ-16 no transcriptoma de adipócitos 3T3-L1 maduros e comparar sua ação com a da rosiglitazona. A análise realizada pela técnica de microarranjo revelou que esses ligantes modificam a expressão gênica de forma diferenciada. Enquanto a rosiglitazona modificou a expressão de 1156 genes, GQ-16 regulou a expressão de apenas 89. Dos 544 genes regulados positivamente pela rosiglitazona (47%), somente 22 (4,2%) foram regulados pelo GQ-16. No mesmo sentido, dos 612 genes regulados negativamente pela rosiglitazona (53%), apenas 24 (4%) foram reprimidos pelo GQ-16. Assim, 46 genes foram regulados simultaneamente pela rosiglitazona e GQ-16, ou seja, uma concordância de somente 4%. Além disso, GQ-16 regulou a expressão de 43 genes (18 ativados e 25 reprimidos) não controlados pela rosiglitazona. A maior semelhança entre o GQ-16 e a rosiglitazona foi sobre a repressão de genes relacionados à resposta inflamatória como o *Dcn*, *Vcam1*, *Orm2* e *Lox*, por exemplo. A comparação do GQ-16 com outros agonistas parciais de PPAR γ (MRL24 e SR1664) revelou efeitos similares, tanto sobre os genes ativados quanto os reprimidos. Nós propomos que o reduzido efeito sobre genes relacionados à adipogênese e a habilidade do GQ-16 em reprimir eficientemente alguns genes responsivos ao PPAR γ relacionados ao processo inflamatório, podem contribuir para o efeito sistêmico sobre a sensibilidade à insulina sem ganho de peso. Novos estudos são necessários para examinar se as similaridades entre a regulação transcricional do GQ-16 e da rosiglitazona estariam envolvidos no efeito terapêutico do GQ-16.

Palavras-chave: receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais; agonista parcial; adipócitos 3T3-L1; expressão gênica.

ABSTRACT

The prevalence of obesity associated with increased insulin resistance and type 2 diabetes has been increasing in the last decades. Thiazolidinediones (TZDs) are peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) agonists that improve insulin resistance. However, TZDs have well-established side effects such as weight gain, fluid retention and edema, congestive heart failure and bone loss. GQ-16 is a specific PPAR γ partial agonist that improves glucose tolerance and insulin sensitivity in a murine model of obesity and diabetes similarly to rosiglitazone, but does so without inducing weight gain or edema. Since one of the main pharmacological targets of TZDs is adipocyte tissue, the aim of this study was to determine how GQ-16 influences PPAR γ activity at the transcriptome wide level on PPAR γ -dependent gene expression in mature 3T3-L1 adipocytes and also to compare these effects with rosiglitazone. Microarray analysis revealed these ligands modify gene expression in a different manner. Rosiglitazone changed the expression of 1156 genes whereas GQ-16 only changed the expression of 89 genes. Of the 544 genes upregulated by rosiglitazone (47%), only 22 (4.2%) were also regulated by GQ-16. Similarly, of the 612 genes repressed by rosiglitazone (53%), only 24 (4%) were by GQ-16. Therefore, just 46 genes were regulated by both ligands. Furthermore, GQ-16 regulated the expression of 43 genes (18 activated and 25 repressed) that were not controlled by rosiglitazone. Whereas GQ-16 showed weak effects upon most rosiglitazone regulated genes, a subset of weakly rosiglitazone induced and strongly rosiglitazone repressed genes displayed disproportionately stronger responses to GQ-16. The greatest similarity between GQ-16 and rosiglitazone was upon repressed genes related to inflammatory response such as *Dcn*, *Vcam*, *Orm2* and *Lox*, for example. Comparison of GQ-16 with other PPAR γ partial agonists (MRL24 and SR1664) revealed similar effects on transcriptional repression. We propose that the ability of GQ-16 displays a continuum of partial agonist effects and that the ability of GQ-16 to efficiently repress some PPAR γ responsive genes may partly explain systemic effects on insulin sensitivity without weight gain. Further studies are necessary to examine whether the similarities between transcriptional regulation of GQ-16 and rosiglitazone were involved in the therapeutic effect of GQ-16.

Keywords: peroxisome proliferator activated receptor gamma; partial agonist; 3T3-L1 adipocytes; gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura dos receptores nucleares.....	12
Figura 2	Heterodímero PPAR-RXR ligado ao PPRE.....	20
Figura 3	Mecanismo de controle da expressão gênica pelos PPARs.....	23
Figura 4	Estrutura tridimensional dos PPARs.....	26
Figura 5	Estrutura tridimensional dos ligantes endógenos ligados ao LBD do PPAR γ	27
Figura 6	Ligação covalente entre GQ-16 e PPAR γ	27
Figura 7	Modo de ligação do GQ-16 ao LBD do PPAR γ	34
Figura 8	Esquema de diferenciação das células 3T3-L1.....	39
Figura 9	Esquema do tratamento das células 3T3-L1.....	40
Figura 10	Ensaio de transfecção e gene repórter com PPAR γ	46
Figura 11	Ensaio de diferenciação de pré-adipócitos.....	47
Figura 12	Efeito do GQ-16 sobre a expressão de genes relacionados à adipogênese, durante o processo de diferenciação.....	49
Figura 13	Efeito do GQ-16 sobre a expressão de genes relacionados à adipogênese, em adipócitos maduros.....	50
Figura 14	Efeito do GQ-16 sobre a expressão do <i>Olr1</i>	51
Figura 15	Representação dos genes responsivos ao tratamento com rosiglitazona, GQ-16 ou ambos.....	53
Figura 16	Resposta ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16 em adipócitos.....	55
Figura 17	Genes com expressão modificada exclusivamente em resposta ao tratamento com rosiglitazona.....	57
Figura 18	Genes com expressão aumentada em resposta ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16.....	60

Figura 19	Genes com expressão diminuída em resposta ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16.....	62
Figura 20	Genes com expressão modificada exclusivamente em resposta ao tratamento com GQ-16 no microarranjo, mas modificada também pela rosiglitazona na avaliação por PCR em tempo real	65
Figura 21	Genes com expressão modificada de modo oposto em resposta ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16 no microarranjo, mas modificada exclusivamente pela rosiglitazona na avaliação por PCR em tempo real.....	67
Figura 22	Efeito de concentrações crescentes de GQ-16 e rosiglitazona sobre a expressão de genes ativados, em adipócitos maduros....	68
Figura 23	Efeito de concentrações crescentes de GQ-16 e rosiglitazona sobre a expressão de genes reprimidos, em adipócitos maduros.	69
Figura 24	Comparação do efeito do GQ-16, MRL24 e SR1664 sobre a expressão de genes ativados, em adipócitos maduros.....	70
Figura 25	Comparação do efeito do GQ-16, MRL24 e SR1664 sobre a expressão de genes reprimidos, em adipócitos maduros.....	71
Figura 26	Ensaio de transfecção e gene repórter com o GAL4-PPAR γ C285S.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação dos receptores nucleares baseada na natureza dos ligantes e funções fisiológicas.....	15
Tabela 2	Classificação dos receptores nucleares baseada na homologia genética.....	17
Tabela 3	Genes com expressão modificada exclusivamente em resposta ao tratamento com rosiglitazona.....	58
Tabela 4	Genes com expressão aumentada em resposta ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16.....	61
Tabela 5	Genes com expressão diminuída em resposta ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16.....	63
Tabela 6	Genes com expressão modificada exclusivamente em resposta ao tratamento com GQ-16 no microarranjo, mas modificada também pela rosiglitazona na avaliação por PCR em tempo real.	66
Tabela 7	Genes com expressão modificada de modo oposto em resposta ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16 no microarranjo, mas modificada exclusivamente pela rosiglitazona na avaliação por PCR em tempo real.....	67

LISTA DE SIGLAS

ACCA1B	acetil coenzima A acetiltransferase 1B (<i>acetyl-coenzyme A acyltransferase 1B</i>)
ACOX1	acil coenzima A oxidase 1 (<i>acyl-Coenzyme A oxidase 1</i>)
ADIPOQ	<i>adiponectina (adiponectin)</i>
AF-1	função de ativação 1 (<i>activation function 1</i>)
AF-2	função de ativação 2 (<i>activation function 2</i>)
AP-1	proteína ativadora 1 (<i>activating protein-1</i>)
AR	receptor de andrógeno (<i>androgen receptor</i>)
ATF3	fator 3 de ativação transcricional (<i>activating transcription factor 3</i>)
BCL-6	proteína 6 linfoma de célula B (<i>B-cell lymphoma 6 protein</i>)
C/EBPs	proteínas de ligação ao amplificador CCAAT (<i>CCAAT-enhancer-binding proteins</i>)
CAR	receptor androstano constitutivo (<i>constitutive androstane receptor</i>)
CBP	proteína ligadora de CREB (<i>CREB-binding protein</i>)
CD36	translocase de ácido graxo CD36 (<i>fatty acid translocase CD36</i>)
CDK5	quinase dependente de ciclina 5 (<i>cyclin-dependent kinase 5</i>)
cDNA	DNA complementar (<i>complementary DNA</i>)
COUP-TF	fator I de transcrição do promotor <i>upstream</i> de ovalbumina de galinha (<i>chicken ovalbumin upstream promoter</i>)
CXCL	ligante 1 da citocina CXC (<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>)
CYB5R4	citocromo b5 redutase 4 (<i>cytochrome b5 reductase 4</i>)
DAX1	sexo reverso dosagem sensível região crítica de hipoplasia adrenal gene 1 (<i>dosage sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1</i>)
DBD	domínio de ligação ao DNA (<i>DNA binding domain</i>)

DM 2	<i>diabetes mellitus</i> tipo 2
DMSO	dimetilsulfóxido (<i>dimethyl sulfoxide</i>)
DR1	repetição direta 1 (<i>direct repetition 1</i>)
EAR2	proteína relacionada ao V-erbA (<i>V-erbA related protein</i>)
ELOVL3	alongamento de ácidos graxos de cadeia muito longa (<i>elongation of very long chain fatty acids-like 3</i>)
ER	receptor de estrógeno (<i>estrogen receptor</i>)
ERR	receptor relacionado ao estrógeno (<i>estrogen receptor-related receptor</i>)
FABP4	proteína 4 ligadora de ácido graxo (<i>fatty acid binding protein 4</i>)
FABP5	proteína 5 ligadora de ácido graxo (<i>fatty acid binding protein 5</i>)
FGF10	fator 10 de crescimento de fibroblasto (<i>fibroblast growth factor 10</i>)
FGF21	fator 21 de crescimento de fibroblasto (<i>fibroblast growth factor 21</i>)
FXR	receptor farnesoide X (<i>farnesoid X receptor</i>)
GCNF	fator nuclear de células germinativas (<i>germ cell nuclear factor</i>)
GLUT4	transportador de glicose 4 (<i>glucose transporter type 4</i>)
GPD1	glicerol 3 fosfato desidrogenase 1 (<i>glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1</i>)
GR	receptor de glicocorticoide (<i>glucocorticoid receptor</i>)
GULP1	adaptador de englobamento domínio PTB contendo 1 (<i>engulfment adaptor PTB domain containing 1</i>)
GYK	glicerol quinase (<i>glycerol kinase</i>)
HBP1	fator de transcrição 1 do grupo de caixa de alta mobilidade (<i>high mobility group box transcription factor 1</i>)
HDACs	desacetilases de histonas (<i>histone deacetylases</i>)
HES1	espesso e potencializador de divisão 1 (<i>hairy and enhancer of split 1</i>)
HNF4	fator nuclear hepatocitário 4 (<i>hepatocyte nuclear factor 4</i>)
HREs	elementos responsivos aos hormônios (<i>hormone response elements</i>)

IBMX	isobutilmetilxantina (<i>isobutylmethylxanthine</i>)
IL	interleucina (<i>Interleukin</i>)
iNOS	sintetase de óxido nítrico indutível (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
IRS1	substrato 1 receptor de insulina (<i>insulin receptor substrate 1</i>)
IRS2	substrato 2 receptor de insulina (<i>insulin receptor substrate 2</i>)
KRT23	queratina 23 (<i>keratin 23</i>)
LBD	domínio de ligação ao ligante (<i>ligand binding domain</i>)
LHFPL2	parceiro de fusão de lipoma HMGIC (<i>lipoma HMGIC fusion partner-like 2</i>)
LPL	lipoproteína lipase (<i>lipoprotein lipase</i>)
LRH1	receptor humano homólogo 1 hepático (<i>human liver receptor homologue-1</i>)
LXR	receptor hepático X (<i>liver X receptor</i>)
MCP-1	proteína 1 quimioatrativa de monócitos (<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>)
MR	receptor mineralocorticoide (<i>mineralocorticoid receptor</i>)
NCoR	correpressor do receptor nuclear (<i>nuclear receptor corepressor</i>)
NF-κB	fator nuclear kappa B (<i>factor nuclear kappa B</i>)
NFAT	fator nuclear de células T ativadas (<i>nuclear factor of activated T-cells</i>)
NGFIB	fator de crescimento do nervo IB (<i>nerve growth factor IB</i>)
NOR1	receptor órfão 1 derivado do neurônio (<i>neuron-derived orphan receptor</i>)
NR	receptor nuclear (<i>nuclear receptor</i>)
NR4A	receptor nuclear 4A (<i>nuclear receptor 4A</i>)
NURR1	receptor nuclear relacionado 1 (<i>nuclear receptor related 1</i>)
OLR1	receptor 1 de lipoproteína oxidada de baixa densidade (<i>oxidized low density lipoprotein receptor 1</i>)

ORM1	orosomucoide 1 (<i>orosomucoid 1</i>)
ORM2	orosomucoide 2 (<i>orosomucoid 2</i>)
PBS	tampão fosfato salina (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PHF20L1	proteína dedo 20 PHD (<i>PHD finger protein 20-like 1</i>)
PPAR	receptor ativado por proliferadores peroxissomais (1)
PPARGC1A	coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferadores peroxissomais gama (<i>peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha</i>)
PPM1L	proteína fosfatase 1 (<i>protein phosphatase 1 (formerly 2C)-like</i>)
PPRE	elemento responsivo aos proliferadores peroxissomais (1)
PR	receptor de progesterona (<i>progesterone receptor</i>)
PRN	receptor nuclear fotorreceptor célula específico (<i>photoreceptor cell-specific nuclear receptor</i>)
PTP4a2	proteína tirosina fosfatase 4a2 (<i>protein tyrosine phosphatase 4a2</i>)
PXR	receptor pregnano X (<i>pregnane X receptor</i>)
RAR	receptor do ácido retinóico (<i>retinoic acid receptor</i>)
RBP4	proteína 4 ligadora de retinol (<i>retinol binding protein 4</i>)
RBP7	proteína 7 ligadora de retinol (<i>retinol binding protein 7</i>)
RNA	ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	ribonuclease (<i>ribonuclease</i>)
ROR	receptor órfão relacionado ao retinoide (<i>retinoid-related orphan receptor</i>)
RXR	receptor retinóide X (<i>retinoid X receptor</i>)
SF1	fator esteroidogênico 1 (<i>steroidgenic factor-1</i>)
SHP	parceiro heterodímero curto (<i>short heterodimer partner</i>)
SMRT	mediador do silenciamento dos receptores retinoide e do hormônio

	tireoidiano (<i>silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors</i>)
SRC-1	coativador 1 do receptor de estrógeno (<i>steroid receptor coactivator-1</i>)
ST3GAL6	ST3 beta galactosidade alfa 2, 3 sialiltransferase 6 (<i>ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6</i>)
STAT1	transdutor de sinal e ativador transcricional 1 (<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>)
TLL	homólogo do gene sem cauda de <i>Drosophila</i> (<i>homologue of the Drosophila tailless gene</i>)
TNFRSF12A	membro 12a da família de receptores do fator de necrose tumoral (<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a</i>)
TNF α	fator de necrose tumoral alfa (<i>tumor necrosis factor alpha</i>)
TR	receptor do hormônio tireoidiano (<i>thyroid hormone receptor</i>)
TR	receptor testicular (<i>testicular receptor</i>)
TZDs	tiazolidinadionas (<i>thiazolidinediones</i>)
UCP1	proteína desacopladora 1 (<i>uncoupling protein 1</i>)
VDR	receptor da vitamina D (<i>vitamin D receptor</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1	O TECIDO ADIPOSO.....	4
2.1.1	Tipos de Tecido Adiposo.....	4
2.1.2	Adipogênese e Obesidade.....	5
2.1.3	Modelos de Estudo da Adipogênese <i>in vitro</i>.....	6
2.1.4	O Programa de Diferenciação em Adipócitos.....	7
2.1.4.1	Alterações Iniciais na Expressão Gênica.....	8
2.1.4.2	Diferenciação Terminal.....	8
2.1.5	Tecido Adiposo, Inflamação e Resistência à Insulina.....	9
2.2	RECEPTORES NUCLEARES.....	10
2.2.1	Estrutura dos Receptores Nucleares.....	10
2.2.2	Classificação dos Receptores Nucleares.....	12
2.2.2.1	Classificação dos Receptores Nucleares Baseada na Natureza dos Ligantes e Funções Fisiológica.....	12
2.2.2.2	Classificação dos Receptores Nucleares Baseada na Homologia Genética.....	16
2.2.3	Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais.....	18
2.2.3.1	Subtipos.....	18
2.2.3.2	Mecanismos de Regulação da Expressão Gênica.....	19
2.2.3.2.1	<i>Repressão Basal Independente de Ligante.....</i>	<i>20</i>
2.2.3.2.2	<i>Ativação Transcricional Dependente de Ligante ou Transativação... ..</i>	<i>21</i>
2.2.3.2.3	<i>Transrepressão Depende de Ligante.....</i>	<i>21</i>

2.3	RECEPTOR GAMA ATIVADO POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAIS.....	24
2.3.1	Gene e Proteína.....	24
2.3.2	Estrutura do Domínio de Ligação do Ligante.....	24
2.3.3	Cisteína 285.....	26
2.3.4	Ligantes Naturais e Sintéticos.....	28
2.3.5	Papéis Fisiológicos.....	28
2.3.5.1	Adipogênese.....	28
2.3.5.2	Sensibilização à Insulina.....	29
2.3.6	PPARγ como Alvo Terapêutico.....	31
2.3.6.1	Tiazolidinadionas.....	32
2.3.6.2	Agonistas parciais de PPAR γ	33
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4	MÉTODOS.....	36
4.1	REAGENTES E MATERIAIS.....	36
4.2	ENSAIO DE GENE REPÓRTER.....	36
4.3	CULTURA E DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS 3T3-L1.....	38
4.4	TRATAMENTO.....	39
4.5	COLORAÇÃO POR ÓLEO VERMELHO O.....	41
4.6	EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR.....	41
4.7	MICROARRANJO.....	41
4.8	PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL.....	43
4.9	MUTAÇÃO SÍTIO DIRIGIDA DO PPAR γ (C285S).....	44
5	RESULTADOS.....	46

5.1	ATIVIDADE AGONISTA DO GQ-16 NO PPARY.....	46
5.2	EFEITO DO GQ-16 SOBRE A ADIPOGÊNESE EM CULTURA DE CÉLULAS.....	47
5.3	EFEITO DO GQ-16 SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA ADIPOGÊNESE.....	48
5.3.1	Efeito do GQ-16 Sobre a Expressão de Genes Envolvidos na Adipogênese, Durante a Diferenciação.....	48
5.3.2	Efeito do GQ-16 Sobre a Expressão de Genes Envolvidos na Adipogênese, em Adipócitos Maduros.....	49
5.4	EFEITO DO GQ-16 SOBRE A EXPRESSÃO DO GENE QUE CODIFICA O RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNA OXIDADA DE BAIXA DENSIDADE.....	50
5.5	EFEITO DO GQ-16 SOBRE PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA NOS ADIPÓCITOS MADUROS, AVALIADO POR MICROARRANJO.....	52
5.6	VALIDAÇÃO DO MICROARRANJO.....	56
5.6.1	Genes com Expressão Modificada Exclusivamente em resposta ao Tratamento com Rosiglitazona.....	56
5.6.2	Genes com Expressão Modificada de Modo Similar em Resposta ao Tratamento com Rosiglitazona e GQ-16.....	58
5.6.3	Genes com Expressão Modificada Exclusivamente em Resposta ao Tratamento com GQ-16.....	64
5.6.4	Genes com Expressão Modificada de Modo Oposto em Resposta ao Tratamento com Rosiglitazona e GQ-16.....	66
5.7	EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE GQ-16 SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA EM ADIPÓCITOS MADUROS....	68
5.8	EFEITO COMPARATIVO DO GQ-16 E OUTROS AGONISTAS PARCIAIS DO PPARY SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA EM ADIPÓCITOS MADUROS.....	69
5.9	EFEITO DA MUTAÇÃO C285S SOBRE A ATIVAÇÃO DO PPARY..	72

6	DISCUSSÃO.....	74
7	SÍNTESE DOS RESULTADOS.....	82
8	CONCLUSÃO.....	83
	REFERÊNCIAS.....	84
	APÊNDICE A – LISTA DE <i>PRIMERS</i>	119
	APÊNDICE B – GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA EXCLUSIVAMENTE EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA.....	121
	APÊNDICE C – GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA EXCLUSIVAMENTE EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM GQ-16.....	131
	APÊNDICE D – GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA DE MODO SIMILAR EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA E GQ-16.....	132
	APÊNDICE E – GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA DE MODO OPOSTO EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA E GQ-16.....	142
	ANEXO A – MODO DE LIGAÇÃO DA ROSIGLITAZONA, GQ-16 E MRL24 AO PPAR γ	143

1 INTRODUÇÃO

A prevalência da obesidade está aumentando em um ritmo alarmante nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (1). Em 2005, 937 milhões ou 23.2% da população adulta mundial era considerada com sobrepeso e 9.8% ou 396 milhões, obesa (2). Em 2014, esses números aumentaram para 1.9 bilhões de pessoas com sobrepeso e 600 milhões com obesidade, representando 39 e 13% da população adulta mundial, respectivamente (1).

No Brasil, a prevalência do sobrepeso e obesidade são ainda maiores. Em 2013, 50.8% da população acima de 18 anos de idade estavam com sobrepeso e 17.5% com obesidade, sendo o sobrepeso cerca de 7% mais prevalência entre os homens que entre as mulheres e obesidade, proporcional entre ambos os sexos (3).

A obesidade é uma doença multifatorial (4) que constitui um importante problema de saúde pública, não apenas por sua elevada prevalência, mas também pela morbimortalidade das doenças a ela associadas, como a hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, *diabetes mellitus* tipo 2 (DM 2) e alguns tipos de neoplasias malignas (5) (6).

O DM 2 é a principal doença associada à obesidade (7). No ano 2000, 171.228 milhões de pessoas no mundo eram acometidas por essa doença e estimativas indicavam um aumento de 114% na sua prevalência até o ano de 2030 (8). Contudo, esse número foi ultrapassado já em 2104, quando a prevalência mundial do diabetes entre adultos era de 387 milhões (9).

No Brasil, a prevalência do diabetes é extremamente preocupante. No ano 2000, o Brasil ocupava o oitavo lugar em número de casos de diabetes no mundo, com 4,6 milhões de pessoas acometidas (8). Em pouco mais de 10 anos esse número quase triplicou e, em 2014, 11.6 milhões de pessoas no Brasil possuíam diagnóstico de diabetes (9).

O DM 2 é um distúrbio metabólico caracterizado por hiperglicemia crônica que resulta da interação de múltiplos fatores, sendo caracterizado basicamente pela redução da secreção pancreática de insulina associada à resistência à ação da

insulina em vários tecidos, com consequente prejuízo da captação de glicose (10).

As terapias atuais para a resistência insulínica associada ao DM 2 incluem a metformina e as tiazolidinadionas (TZDs), que podem ser utilizadas isoladamente ou em associação. As TZDs, agonistas totais do receptor ativado por proliferadores peroxissomais gama (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors* - PPAR γ) (10), são medicamentos bastante eficazes no aumento da sensibilidade insulínica e redução da concentração plasmática de glicose, além de melhorarem o perfil lipídico, reduzirem a pressão arterial e exercerem ações anti-inflamatórias (11) (12).

Infelizmente, paralelamente aos efeitos benéficos, o uso das TZDs está associado a efeitos adversos bem estabelecidos como ganho de peso (13), retenção de fluido e edema (14) (15) (16), insuficiência cardíaca congestiva (17) (18) e perda óssea (19) (20). Além desses efeitos, a TZD rosiglitazona também foi associada ao aumento do risco do infarto do miocárdio (21) e mais recentemente, alguns estudos apontaram um maior risco de câncer de bexiga nos pacientes em uso da TZD pioglitazona (22) (23).

Considerando os efeitos adversos das TZDs, que levaram à suspensão do uso da rosiglitazona na Europa (24) e no Brasil (25) e da pioglitazona em alguns país da Europa como a França e Alemanha (26), esforços têm se concentrado na identificação e desenvolvimento de agonistas específicos de PPAR γ que mantenham os efeitos benéficos da ativação desse receptor, sem contudo produzir efeitos adversos consideráveis.

Com esse intuito, o GQ-16, um composto sintético derivado da 5-benzylideno-3-(4-metil-benzil)-thiazolidine-2,4-diona, foi desenvolvido na Universidade Federal de Pernambuco (27). O GQ-16 é um agonista específico e parcial do PPAR γ que, em um modelo murino de obesidade e diabetes, melhorou a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina de forma similar à rosiglitazona, mas sem indução do ganho de peso promovido por essa TZD (28).

Como o tecido adiposo é um dos principais alvos da terapia de agonistas do PPAR γ e os mecanismos pelos quais o GQ-16 exerce sua ação sensibilizadora da insulina sem indução do ganho de peso não foram completamente elucidados, o

presente estudo, por meio da realização de um microarranjo, comparou o efeito do GQ-16 ao da rosiglitazona na expressão gênica de pré-adipócitos 3T3-L1, após sua diferenciação em adipócitos.

O efeito desse composto foi avaliado em adipócitos maduros objetivando investigar se ele poderia influenciar a expressão de um conjunto específico de genes de forma distinta do agonista total rosiglitazona, como forma de melhor compreender seus efeitos *in vivo*, observados previamente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo desempenha um papel fundamental na regulação da homeostase energética de todo o organismo (29). Além dessa importante função, estudos recentes revelaram que ele está envolvido em outros processos biológicos cruciais (29) (30). O tecido adiposo não somente responde a estímulos nervosos e hormonais, mas também expressa fatores que integram uma complexa rede que coordena a função endócrina e a resposta imune (30).

2.1.1 Tipos de Tecido Adiposo

O tecido adiposo é primariamente composto por adipócitos rodeados por fibroblastos, pré-adipócitos, células endoteliais, nervosas e células do sistema imune (31). Existem, em mamíferos, dois tipos principais de tecido adiposo, o tecido adiposo branco e o tecido adiposo marrom (31).

O tecido adiposo marrom é essencialmente termogênico e está localizado principalmente em pequenos depósitos nas regiões cervical, paravertebral torácica, perirrenal e periadrenal (32). Ele é histologicamente distinto do tecido adiposo branco, sendo composto por adipócitos multiloculados que contêm grande número de mitocôndrias, responsáveis por sua coloração amarronzada (32).

Por muitos anos, acreditou-se que o tecido adiposo marrom estivesse ausente em adultos humanos (33). Contudo, estudos recentes utilizando tomografia por emissão de pósitrons identificaram regiões de alta captação de glicose, compatíveis com tecido adiposo marrom (34) (35).

O tecido adiposo branco por sua vez, caracterizado pela presença de adipócitos contendo grandes gotículas lipídicas uniloculares, é o principal tipo encontrado em humanos adultos (31). Ele distribui-se por todo o corpo, na região

subcutânea e ao redor das vísceras, sendo denominado tecido adiposo subcutâneo e tecido adiposo visceral, respectivamente (31).

A despeito de suas similaridades histológicas, os tecidos adiposos subcutâneo e visceral apresentam distintas funções (36). De fato, o acúmulo de gordura visceral durante o desenvolvimento da obesidade está relacionado ao elevado risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas (37) (38), enquanto o aumento do compartimento subcutâneo correlaciona-se com pouco ou nenhum risco (38) (39).

2.1.2 Adipogênese e Obesidade

Os adipócitos, assim como osteoblastos, miócitos e condrócitos, originam-se a partir de um progenitor comum, as células tronco mesenquimais (40). O processo pelo qual as células tronco mesenquimais se diferenciam em adipócitos, passando pelo estágio de pré-adipócitos, é denominado adipogênese.

Nesse processo, a linhagem MYF⁻ dá origem às células precursoras do tecido adiposo branco, que por sua vez podem originar adipócitos brancos e beges, enquanto a linhagem MYF⁺ dá origem às células precursoras dos tecidos adiposos branco e marrom (41).

Os compartimentos de tecido adiposo branco começam a se desenvolver no final da gestação (42) (43). No período pós-natal, a taxa de adipogênese aumenta rapidamente devido à maior disponibilidade de nutrientes, levando a uma acentuada expansão desse compartimento adiposo (43). Nesse período, as células precursoras convertem-se morfológica e funcionalmente de fibroblastos a adipócitos arredondados e repletos de lipídeos (33).

Após essa expansão inicial, uma expressiva taxa de adipogênese no tecido adiposo branco é observada somente durante a puberdade, tanto em animais quanto em humanos (43) (44). Em humanos adultos, os adipócitos parecem apresentar uma renovação anual de aproximadamente 10% (44), provavelmente com a finalidade de manter os compartimentos de tecido adiposo (33).

Além dessa importante função fisiológica, a adipogênese está provavelmente envolvida na fisiopatogenia da obesidade (33). Em animais, o tratamento com dieta hiperlipídica por tempo prologando promoveu tanto a hipertrofia quanto a hiperplasia dos adipócitos em vários depósitos de tecido adiposo branco (45) (46).

Em humanos, estudos correlacionando massa adiposa com o número de células apresentam resultados conflitantes (33). Alguns estudos associaram a expansão da massa adiposa apenas ao aumento no tamanho dos adipócitos (44), enquanto outros encontram tanto aumento no tamanho quanto no número de células adiposas (47). Essas aparentes discordâncias nos achados podem ser resultado de diferenças nos protocolos de estudos e nas características basais das populações estudadas (33).

Por outro lado, um estudo de superalimentação por curto período em adultos, encontrou diferenças regionais no mecanismo de expansão da massa adiposa (48). O aumento do compartimento adiposo subcutâneo foi primariamente resultado da hipertrofia, enquanto o aumento da massa adiposa visceral foi relacionado predominantemente à hiperplasia dos adipócitos (48). O que parece ser consenso, é que a perda de peso está associada à redução do tamanho, mas sem alteração no número dos adipócitos (44) (49).

2.1.3 Modelos de Estudo da Adipogênese *in vitro*

Os sistemas *in vitro* têm sido extensivamente utilizados para o estudo da adipogênese (50) (51) e permitiram um avanço na compreensão dos mecanismos moleculares e eventos celulares que ocorrem durante a transição de fibroblastos indiferenciados para adipócitos maduros (51).

Nos estudos de diferenciação em adipócitos, várias linhagens celulares e culturas primárias têm sido utilizadas (50) (51). As linhagens precursoras de adipócitos podem ser divididas em duas classes: (i) os fibroblastos pluripotentes que têm a habilidade de se converter em diferentes tipos celulares e (ii) as linhagens que podem se converter apenas em adipócitos, pois estão comprometidas com essa linhagem celular (50).

As linhagens celulares comprometidas com a diferenciação adipocitária constituem excelentes ferramentas para o estudo dos eventos moleculares responsáveis pela conversão de pré-adipócitos em adipócitos (50). Elas constituem uma população homogênea de células que encontram-se no mesmo estágio de diferenciação e fornecem uma consistente fonte de pré-adipócitos para estudo (50).

Entre as linhagens de pré-adipócitos mais utilizadas para o estudo da diferenciação em adipócitos está a linhagem 3T3-L1 (50) (51), derivada de embriões de camundongos Swiss (52). Durante a fase de crescimento, assim como as demais linhagens de pré-adipócitos, as células 3T3-L1 são morfologicamente similares a fibroblastos (52). A diferenciação induzida por tratamento adequado leva a drásticas alterações no aspecto das células, que tornam-se esféricas, acumulam gotas lipídicas e progressivamente adquirem as características morfológicas (53) (54) e bioquímicas de adipócitos brancos maduros (54).

As células 3T3-L1 podem espontaneamente se diferenciar em adipócitos quando mantidas por várias semanas em meio de cultura com soro neonatal bovino (52) (53), mas esse processo pode ser acelerado por agentes indutores como a insulina, a dexametasona e a isobutilmetilxantina (IBMX) (55) (56) (57), um coquetel adipogênico que promove a captação de glicose (58), a síntese de ácidos graxos (59) e a expressão de fatores transcricionais chave para o processo de diferenciação (60) (61).

2.1.4 O Programa de Diferenciação em Adipócitos

A diferenciação de células primárias ou pré-adipócitos em adipócitos inclui uma série de eventos (51). Após a confluência, ocorre a parada do crescimento celular, pré-requisito ao processo de diferenciação (62). Estímulos adequados como os agentes utilizados no coquetel adipogênico, são capazes de iniciar o processo de diferenciação que é precedido por, no mínimo, um ciclo de expansão clonal mitótica (63), e caracterizado por mudanças cronológicas na expressão de genes envolvidos na aquisição do fenótipo de adipócito maduro (54) (64).

2.1.4.1 Alterações Iniciais na Expressão Gênica

Nos estágios iniciais da diferenciação, observa-se a expressão de pelo menos duas famílias de fatores transcricionais, a das proteínas de ligação ao amplificador CCAAT (*CCAAT-Enhancer-Binding Proteins* - C/EBPs) e a dos receptores ativados por proliferadores peroxissomais (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors* – PPARs) (51) (65). Primeiramente ocorre um aumento transitório na expressão do C/EBP β e do C/EBP δ , que por sua vez induzem a expressão do PPAR γ (66).

2.1.4.2 Diferenciação Terminal

Embora muitos fatores transcricionais tenham papel na adipogênese, é a expressão do PPAR γ e do C/EBP α que dirige a expressão dos demais genes responsáveis pela aquisição do fenótipo diferenciado do adipócito (67) (68).

A fase da diferenciação terminal é marcada principalmente por um acentuado aumento na lipogênese e na sensibilidade à insulina (51). A lipogênese está relacionada à indução da expressão de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico como a esteroil-CoA-desaturase (69) e a ácido graxo sintetase (70) e o aumento na sensibilidade à insulina, ao aumento do número de receptores de insulina (51) e transportadores de glicose como o transportador de glicose tipo 4 (*Glucose Transporter Type 4* - GLUT4) (71) (72).

Além das proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico e da glicose, na diferenciação terminal observa-se também o aumento na expressão de proteínas que são adipócito específicas, tais como a proteína ligadora de ácido graxo 4 (*Fatty Acid Binding Protein 4* - FABP4) (73), a translocase de ácido graxo CD36 (*Fatty acid translocase CD36* - FAT/CD36) (74) e a perilipina, uma proteína associada à gota lipídica que está envolvida na sua estabilização e que também participa da lipólise (75).

2.1.5 Tecido Adiposo, Inflamação e Resistência à Insulina

Desde o final dos anos 1980, estudos têm mostrado que os adipócitos são capazes de sintetizar uma série de fatores e que a secreção de alguns deles correlaciona-se com distúrbios metabólicos (76) (77). Contudo, o conceito de tecido adiposo como um órgão endócrino só ganhou aceitação após 1994, com a identificação da leptina (78), uma proteína sintetizada pelos adipócitos que age diretamente no hipotálamo reduzindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto energético (79).

Nos anos seguintes à descoberta da leptina, a função endócrina do tecido adiposo tornou-se um campo de pesquisa bastante explorado e vários outros fatores sintetizados e secretados pelos adipócitos, as então denominadas adipocinas, foram identificados (80).

Muitas das adipocinas secretadas pelo tecido adiposo são mediadores inflamatórios (81), que além de atuarem no próprio tecido adiposo, possuem ação parácrina e endócrina, sendo capazes de promover resistência à insulina em outros órgãos periféricos como o fígado e o músculo esquelético (82) (83) (84).

A inflamação e resistência à insulina relacionadas à obesidade têm sido associadas principalmente ao desenvolvimento tecido adiposo visceral (85) (86). Esse compartimento adiposo é mais vascularizado, innervado e metabolicamente ativo que o subcutâneo e sua drenagem venosa rica em ácidos graxos e adipocinas, é conduzida diretamente ao fígado pelo sistema porta (36). Além disso, o compartimento visceral é formado principalmente por adipócitos grandes que são mais resistentes às ações da insulina e hiperlipolíticos quando comparados aos do tecido adiposo subcutâneo (36).

Contudo, a principal razão para o tecido adiposo visceral estar mais relacionado ao desenvolvimento da resistência à insulina é sua capacidade de secretar uma maior quantidade de proteínas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha* - TNF α) e a interleucina 6 (*Interleukin 6* - IL-6) (87) (88) (89). Essas citocinas promovem resistência à insulina por diferentes mecanismos, incluindo a redução na expressão e na fosforilação do substrato

receptor de insulina 1 (*Insulin Receptor Substrate 1* – IRS1) (90) (91) e na expressão e translocação do GLUT4 do citoplasma para a membrana (90) (92), com prejuízo da captação de glicose pela célula.

2.2 RECEPTORES NUCLEARES

Os receptores nucleares são membros de uma superfamília de fatores transcricionais (93) envolvidos na regulação de importantes processos biológicos como crescimento, desenvolvimento e homeostase (94) (95).

2.2.1 Estrutura dos Receptores Nucleares

Os receptores nucleares possuem uma estrutura organizacional comum composta por diferentes regiões que correspondem a domínios funcionais (94) (96). Um típico receptor nuclear consiste de uma região amino terminal ou domínio A/B, um domínio de ligação ao DNA (*DNA Binding Domain* - DBD) ou região C, uma região D ou dobradiça e uma região E que contém o domínio de ligação ao ligante (*Ligand Binding Domain* - LBD) (96). Alguns receptores nucleares possuem ainda, uma região carboxiterminal ou domínio F, cuja função permanece sob investigação (96) (Figura 1).

O domínio A/B é o mais variável em tamanho e sequência de aminoácidos (94) (96) (97), revelando pouca conservação evolutiva (97). Ele contém um domínio de ativação transcricional denominado função de ativação 1 (*Activation Function 1* - AF-1), que contribui para a ativação transcricional independente de ligante (96) (97) (98). O domínio A/B também é alvo de modificações pós-traducionais como a fosforilação (96) (97) e pode interagir com cofatores transcricionais (97), que são complexos proteicos que podem regular tanto positiva quanto negativamente a atividade transcricional (96).

O DBD é o mais conservado domínio dos receptores nucleares (94) (96) (97). É por meio dele que o receptor nuclear se liga a sequências específicas do DNA nos

genes alvo (96) (97) denominadas elementos responsivos aos hormônios (*Hormone Response Elements* – HREs) (97) (99). O DBD consiste de um conjunto altamente conservado de 66 resíduos de aminoácidos que formam duas estruturas ricas em cisteína denominadas dedos de zinco, duas alfa hélices e uma extensão carboxila (96) (97).

Os aminoácidos responsáveis pela identificação dos HREs estão localizados na base do primeiro dedo de zinco, região denominada “P box” (96) (100) e no segundo dedo de zinco localizam-se os aminoácidos que constituem a “D box”, envolvida na dimerização do receptor (96) (97). O DBD também é alvo de modificações pós-traducionais e está envolvido na localização do receptor no núcleo e interação com cofatores transcrpcionais (97).

O domínio D não é bem conservado entre os diferentes receptores nucleares (94) (96). Ele conecta os domínios DBD e LBD e comporta-se como uma dobradiça, permitindo a rotação do DBD (96). Além disso, ele permite que o DBD e o LBD adotem diferentes conformações, conferindo maior flexibilidade ao receptor (97). Este domínio também abriga alguns elementos de localização nuclear (94) (96) (97) e está envolvido na interação com cofatores transcrpcionais (96).

O LBD exibe uma maior variação estrutural comparado ao DBD (97). É um domínio multifuncional (96) (97) que contém quatro sítios ou superfícies estruturalmente distintas, mas funcionalmente relacionadas (97), incluindo (i) a superfície de dimerização, que medeia a interação com o LBD de outros receptores nucleares para a formação de homo ou heterodímeros, dependendo do receptor em questão; (ii) a bolsa de ligação do ligante, que interage com diversas moléculas lipofílicas; (iii) a superfície de ligação a corretores transcrpcionais; e (iv) a função de ativação 2 (*Activation Function 2* AF-2), uma alfa hélice que medeia a ativação transcrricional dependente do ligante (96) (97), além do recrutamento de corretores transcrpcionais (97).

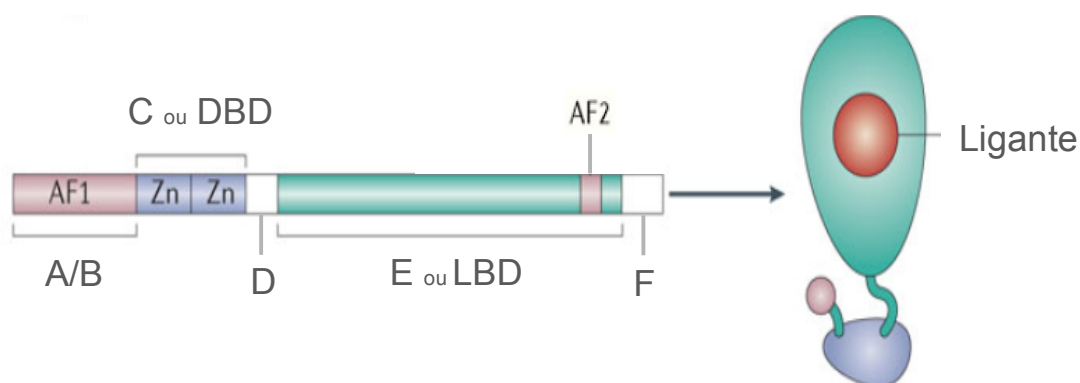


Figura 1. Estrutura dos receptores nucleares. A maioria dos membros da superfamília dos receptores nucleares possui uma estrutura comum composta por um domínio amino terminal A/B que possui uma função de ativação 1 (*Activation Function 1* - AF1), uma região central, C ou domínio de ligação ao DNA formado por duas estruturas denominadas dedos de zinco, uma região carboxiterminal, E ou domínio de ligação do ligante (*Ligand Binding Domain* - LBD) que possui uma função de ativação 2 (*Activation Function 1* - AF2) e uma região D ou dobradiça que conecta o DBD e o LBD. Alguns receptores nucleares possuem ainda um domínio F. Adaptado de: Glass CK, Ogawa S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(1):44-55.

2.2.2 Classificação dos Receptores Nucleares

A técnica de sequenciamento revelou que humanos codificam 48 receptores nucleares e camundongos codificam 49 (94) (97) (101). Tradicionalmente, os receptores nucleares são divididos em três subgrupos ou classes, de acordo com a natureza dos seus ligantes e suas potenciais funções fisiológicas (99). Contudo, uma nova classificação baseada na homologia genética foi recentemente proposta e pode ser encontrada em vários trabalhos científicos (102).

2.2.2.1 Classificação dos Receptores Nucleares Baseada na Natureza dos Ligantes e Funções Fisiológicas

De acordo com a natureza dos seus ligantes e suas potenciais funções fisiológicas, os receptores nucleares são divididos em três subgrupos ou classes (Tabela1).

A primeira classe é composta pelos receptores endócrinos, que possuem alta afinidade por hormônios lipossolúveis e vitaminas e são essenciais para o controle

homeostático do sistema endócrino (99). Nessa classe estão incluídos os receptores dos hormônios esteroides glicocorticoide (*Glucocorticoid Receptor* - GR), mineralocorticoide (*Mineralocorticoid Receptor* - MR), de progesterona (*Progesterone Receptor* - PR), de andrógeno (*Androgen Receptor* - AR) e de estrógeno (*Estrogen Receptor* - ER), o receptor do hormônio tireoidiano (*Thyroid Hormone Receptor* - TR), do ácido retinoico (*Retinoic Acid Receptor* - RAR) e o receptor da vitamina D (*Vitamin D Receptor* - VDR) (99).

A segunda classe é representada pelos receptores órfãos adotados, que foram originalmente identificados por sua homologia estrutural com os receptores endócrinos (99). Por não possuírem, na ocasião de sua identificação, ligantes conhecidos, esses receptores foram inicialmente denominados órfãos, mas posteriormente, com a identificação dos ligantes de ocorrência natural, passaram a ser chamados de órfãos adotados (99). Essa classe é composta por receptores que possuem baixa afinidade por lipídeos dietéticos e xenobióticos e que estão envolvidos com diversos aspectos do metabolismo lipídico e/ou homeostase da glicose (99). Compõe a classe dos receptores órfãos adotados o receptor retinóide X (*Retinoid X Receptor* - RXR), os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* - PPAR), o receptor hepático X (*Liver X Receptor* - LXR), o receptor farnesoide X (*Farnesoid X Receptor* - FXR) e o receptor pregnano X (*Pregnane X Receptor* - PXR) (99).

Os receptores órfãos adotados incluem ainda, os receptores órfãos adotados enigmáticos, cujos ligantes já foram identificados, mas a natureza da regulação dependente de ligante ainda não foi completamente desvendada (99). São eles, o receptor androstano constitutivo (*Constitutive Androstane Receptor* - CAR), o fator nuclear hepatocitário 4 (*Hepatocyte Nuclear Factor 4* - HNF4), o fator esteroidogênico 1 (*Steroidogenic Factor-1* - SF1), o receptor humano homólogo 1 hepático (*Human Liver Receptor Homologue-1* - LRH1), o receptor órfão relacionado ao retinoide (*Retinoid-Related Orphan Receptor* - ROR) e o receptor relacionado ao estrógeno (*Estrogen Receptor-Related Receptor* - ERR) (99).

A terceira classe é composta pelos verdadeiros receptores órfãos, cujos ligantes naturais ou sintéticos ainda não foram identificados (99). São eles o parceiro heterodímero curto (*Short Heterodimer Partner* - SHP), o sexo reverso dosagem

sensitivo região crítica de hipoplasia adrenal, gene 1 (*Dosage Sensitive Sex Reversal, Adrenal Hypoplasia Critical Region, on Chromosome X, Gene 1 - DAX1*), o homólogo do gene sem cauda de *Drosophila* (*Homologue of the Drosophila Tailless Gene – TLL*), o receptor nuclear fotorreceptor célula específico (*Photoreceptor Cell-Specific Nuclear Receptor – PRN*), o fator nuclear de células germinativas (*Germ Cell Nuclear Factor – GCNF*), o receptor testicular (*Testicular Receptor – TR*), o receptor nuclear 4A (*Nuclear Receptor 4A - NR4A*), o Rev-erb (*Rev-erb*) e o fator I de transcrição do promotor *upstream* de ovalbumina de galinha (*Chicken Ovalbumin Upstream Promoter - COUP-TF*) (99).

Tabela 1 - Classificação dos receptores nucleares baseada na natureza dos ligantes e funções fisiológicas

Classe	Nome	Sigla	Subtipo
Endócrinos	Receptor de Glicocorticoide (<i>Glucocorticoid Receptor</i>)	GR	
	Receptor Mineralocorticoide (<i>Mineralocorticoid Receptor</i>)	MR	
	Receptor de Progesterona (<i>Progesterone Receptor</i>)	PR	
	Receptor de Andrógênio (<i>Androgen Receptor</i>)	AR	
	Receptor de Estrógeno (<i>Estrogen Receptor</i>)	ER	Er α , β
	Receptor do Hormônio Tireoidiano (<i>Thyroid Hormone Receptor</i>)	TR	TR α , β
	Receptor do Ácido Retinóico (<i>Retinoic Acid Receptor</i>)	RAR	RAR α , β , γ
	Receptor da Vitamina D (<i>Vitamin D Receptor</i>)	VDR	
Órfãos adotados	Receptor Retinoide X (<i>Retinoid X Receptor</i>)	RXR	RXR α , β , γ
	Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais (<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>)	PPAR	PPAR α , β , γ
	Receptor Hepático X (<i>Liver X Receptor</i>)	LXR	LXR α , β
	Receptor Farnesoide X (<i>Farnesoid X Receptor</i>)	FXR	
	Receptor Pregnano X (<i>Pregnane X Receptor</i>)	PXR	
	Enigmáticos		
	Receptor Androstano Constitutivo (<i>Constitutive Androstane Receptor</i>)	CAR	
	Fator Nuclear Hepatocitário 4 (<i>Hepatocyte Nuclear Factor 4</i>)	HNF4	HNF α , γ
	Fator Esteroidogênico 1 (<i>Steroidogenic Factor-1</i>)	SF1	
	Receptor Humano Homólogo 1 do Fígado (<i>Human Liver Receptor Homologue-1</i>)	LRH1	
	Receptor Órfão Relacionado ao Retinoide (<i>Retinoid-Related Orphan Receptor</i>)	ROR	ROR α , β , γ
	Receptor Relacionado ao Estrógeno (<i>Estrogen Receptor-Related Receptor</i>)	ERR	ERR α , β , γ
Órfãos	Parceiro Heterodímero Curto (<i>Short Heterodimer Partner</i>)	SHP	
	Sexo Reverso Dosagem Sensitivo, Região Crítica de Hipoplasia Adrenal, Gene 1 (<i>Dosage Sensitive Sex Reversal, Adrenal Hypoplasia Critical Region, on Chromosome X, Gene 1</i>)	DAX1	
	Homólogo do Gene Sem Cauda de <i>Drosophila</i> (<i>Homologue of the Drosophila Tailless Gene</i>)	TLL	
	Receptor Nuclear Fotorreceptor Célula Específico (<i>Photoreceptor Cell-Specific Nuclear Receptor</i>)	PRN	
	Fator Nuclear de Células Germinativas (<i>Germ Cell Nuclear Factor</i>)	GCNF	
	Receptor Testicular (<i>Testicular Receptor</i>)	TR	TR2, 4
	Receptor Nuclear 4A (<i>Nuclear Receptor 4A</i>)	NR4A	NR4A α , β , γ
	Rev-erb (<i>Rev-erb</i>)	Rev-erb	Rev-erb α , β
	Fator I de Transcrição do Promotor <i>Upstream</i> de Ovalbumina de Galinha COUP (<i>Chicken Ovalbumin Upstream Promoter</i>)	COUP-TF	COUP-TF α , β , γ

2.2.2.2 Classificação dos Receptores Nucleares Baseada na Homologia Genética

À medida que os receptores nucleares foram descobertos, eles foram recebendo nomenclaturas cada vez mais complexas e rebuscadas, além de diferentes nomes já terem sido atribuídos ao mesmo receptor (102). Buscando resolver esses problemas e criar um sistema de classificação prático e significativo que permitisse a adição simplificada de novos membros, em 1995, durante o Sétimo Simpósio Internacional de Receptores Nucleares Órfãos, na Suécia, foi formado o Comitê de Nomenclatura dos Receptores Nucleares (102).

Como resultado do trabalho desse Comitê, que atuou em conjunto com a União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (*International Union of Basic and Clinical Pharmacology* - IUPHAR), em 1999, foi proposta uma nomenclatura baseada na sequência de alinhamento e construção da árvore filogenética que classifica a superfamília de receptores nucleares humanos em seis grupos evolucionários ou subfamílias (97) (102) (Tabela 2).

É praticamente impossível definir o exato percentual de identidade entre os receptores para pertencer a um determinado grupo, mas de uma forma geral, membros do mesmo grupo compartilham no mínimo 80 a 90% de identidade no domínio de ligação ao DNA e ao menos 40 a 60% no domínio de ligação ao ligante (102).

De uma forma bastante simplificada, o novo sistema de código é composto por letras e números. Ele sempre inicia pelas letras NR (*Nuclear Receptor*) seguida por um número, que representa a subfamília do receptor nuclear, por um letra maiúscula, que representa o grupo a que ele pertence e por outro número, que representa o receptor de forma individual (102). No caso de subtipos do mesmo receptor, outra letra minúscula é acrescentada ao final do nome (102).

A recomendação feita pelo Comitê de Nomenclatura é que, nos trabalhos científicos, o receptor nuclear seja identificado pelo menos uma vez pelo seu nome oficial no sumário e na introdução e posteriormente o autor pode usar o nome tradicional se assim o desejar (97) (102).

Tabela 2. Classificação dos receptores nucleares baseada na homologia genética

Nome Tradicional	Sigla	Subtipo	Nova Nomenclatura
Receptor do Hormônio Tiroideano (<i>Thyroid Hormone Receptor</i>)	TR	TR α TR β	NR1A1 NR1A2
Receptor do Ácido Retinóico (<i>Retinoic Acid Receptor</i>)	RAR	RAR α RAR β RAR γ	NR1B1 NR1B2 NR1B3
Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais (<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptors</i>)	PPAR	PPAR α PPAR β PPAR γ	NR1C1 NR1C2 NR1C3
Rev-erb (<i>Rev-erb</i>)	Rev-erb	Rev-erb α Rev-erb β	NR1D1 NR1D2
Receptor Órfão Relacionado ao Retinóide (<i>Retinoid-Related Orphan Receptor</i>)	ROR	ROR α ROR β ROR γ	NR1F1 NR1F2 NR1F3
Receptor Hepático X (<i>Liver X Receptor</i>)	LXR	LXR β LXR α	NR1H2 NR1H3
Receptor Farnesóide (<i>Farnesoid X Receptor</i>)	FXR	FXR α FXR β *	NR1H4 NR1H5
Receptor da Vitamina D (<i>Vitamin D Receptor</i>)	VDR		NR1I1
Receptor Pregnano X (<i>Pregnane X Receptor</i>)	PXR		NR1I2
Receptor Androstano Constitutivo (<i>Constitutive Androstane Receptor</i>)	CAR		NR1I3
Fator Nuclear Hepatocitário 4 (<i>Hepatocyte Nuclear Factor 4</i>)	HNF4	HNF4 α HNF4 γ	NR2A1 NR2A2
Receptor Retinóide X (<i>Retinoid X Receptor</i>)	RXR	RXR α RXR β RXR γ	NR2B1 NR2B2 NR2B3
Receptor Testicular (<i>Testicular Receptor</i>)	TR	TR2 TR4	NR2C1 NR2C2 NR2E2
Homólogo do Gene sem Cauda de <i>Drosophila</i> (<i>Homologue of the Drosophila Tailless Gene</i>)	TLL		NR2E2
Receptor Nuclear Fotorreceptor Célula Específico (<i>Photoreceptor Cell-Specific Nuclear Receptor</i>)	PRN		NR2E3
Fator I de Transcrição do Promotor <i>Upstream</i> de Ovalbumina de Galinha (<i>Chicken Ovalbumin Upstream Promoter</i>)	COUP-TF	COUP-TFI COUP-TFII	NR2F1 NR2F2
Proteína Relacionada ao V-erbA (<i>V-erbA Related Protein</i>)	EAR2		NR2F6
Receptor de Estrógeno (<i>Estrogen Receptor</i>)	ER	ER α ER β	NR3A1 NR3A2
Receptor Relacionado ao Estrógeno (<i>Estrogen Receptor-Related Receptor</i>)	ERR	ERR α ERR β ERR γ	NR3B1 NR3B2 NR3B3
Receptor de Glicocorticóide (<i>Glucocorticoid Receptor</i>)	GR		NR3C1
Receptor Mineralocorticoide (<i>Mineralocorticoid Receptor</i>)	MR		NR3C2
Receptor de Progesterona (<i>Progesterone Receptor</i>)	PR		NR3C3
Receptor de Andrógeno (<i>Androgen Receptor</i>)	AR		NR3C4
Fator de crescimento do nervo IB (<i>Nerve Growth Factor IB</i>)	NGFIB		NR4A1
Receptor Nuclear Relacionado 1 (<i>Nuclear Receptor Related 1</i>)	NURR1		NR4A2
Receptor Órfão 1 Derivado do Neurônio (<i>Neuron-Derived Orphan Receptor 1</i>)	NOR1		NR4A3
Fator Esteroidogênico 1 (<i>Steroidogenic Factor-1</i>)	SF1		NR5A1
Receptor Humano Homólogo 1 do Fígado (<i>Human Liver Receptor Homologue-1</i>)	LRH1		NR5A2

Tabela 2. Classificação dos receptores nucleares baseada na homologia genética

Conclusão

Nome Tradicional	Sigla	Subtipo	Nova Nomenclatura
Fator Nuclear 1 de Células Germinativas (<i>Germ Cell Nuclear Factor 1</i>)	GCNF1		NR6A1
Sexo Reverso Dosagem Sensitivo, Região Crítica de Hipoplasia Adrenal, Gene 1 (<i>Dosage Sensitive Sex Reversal, Adrenal Hypoplasia Critical Region, on Chromosome X, Gene 1</i>)	DAX1		NR0B1
Parceiro Heterodímero Curto (<i>Short Heterodimer Partner</i>)	SHP		NR0B2

* FXR β é um pseudogene em humanos, mas é um receptor funcional em camundongos.

2.2.3 Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais

2.2.3.1 Subtipos

Os receptores ativados por proliferadores peroxissomais são membros da superfamília de receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição regulados por ligantes (99) (103).

Três isotipos de PPAR são identificados em tecidos de mamíferos, o PPAR α (NR1C1), o PPAR β/δ (NR1C2) e o PPAR γ (NR1C3) (104) (105), cada um codificado por um gene diferente (105) (106) e com padrão de distribuição tecidual (107) (108), papel fisiológico (106) e ligantes característicos (108) (109).

O PPAR α é altamente expresso no fígado, coração e rins (107) e apresenta papel crítico para a regulação da homeostase energética por controlar a expressão de genes envolvidos nas vias de β -oxidação peroxissomal e mitocondrial dos ácidos graxos (110). O PPAR β/δ é expresso em vários tipos de tecidos (107) (111) com predomínio nos músculos esquelético e cardíaco e tecido adiposo (111). Ele é importante para a formação da placenta (112), pele e tecido adiposo e para a mielinização de partes do sistema nervoso central (113). No músculo esquelético, ele também participa do metabolismo dos ácidos graxos (111). O PPAR γ por sua vez, é predominantemente expresso no tecido adiposo, onde desempenha papel

fundamental na diferenciação e função dos adipócitos (114) (115).

A descoberta do primeiro receptor ativado por proliferadores peroxissomais, o PPAR α ocorreu em 1990 (116). Ele foi clonado de camundongos e foi descrito como um fator transcricional ativado por ligante, membro da superfamília dos receptores de hormônios esteroides (116). Ele recebeu essa denominação pois mostrou ser ativado por um grupo diverso de químicos como drogas hipolipemiantes, herbicidas e plasticidas industriais capazes de promover a proliferação de peroxissomos hepáticos em camundongos (116). Já a identificação da subfamília dos PPARs ocorreu em 1992 (117). Os três membros foram clonados de *Xenopus* e identificados por homologia estrutural e funcional com o receptor descoberto dois anos antes (117).

2.2.3.2 Mecanismos de Regulação da Expressão Gênica

No mecanismo clássico de regulação da expressão gênica, os PPARs formam heterodímeros com outro receptor nuclear, o RXR α (NR2B1) (105) (118) (119) e se ligam a sequências específicas do DNA presentes na região promotora dos seus genes alvo, denominadas elementos responsivos aos proliferadores peroxissomais (*Peroxisome Proliferator Response Elements* - PPREs) (118) (119) (120). Essas sequências consistem de duas repetições diretas do hexanucleotídeo AGGTCA separadas por um nucleotídeo espaçador, sendo também conhecidas como DR1 (*Direct Repetition 1* - DR1) (118) (119) (120) (Figura 2).

Os mecanismos conhecidos de controle da expressão gênica pelos receptores nucleares são a repressão basal independente de ligante, a ativação transcricional dependente de ligante ou transativação e a transrepressão depende de ligante.

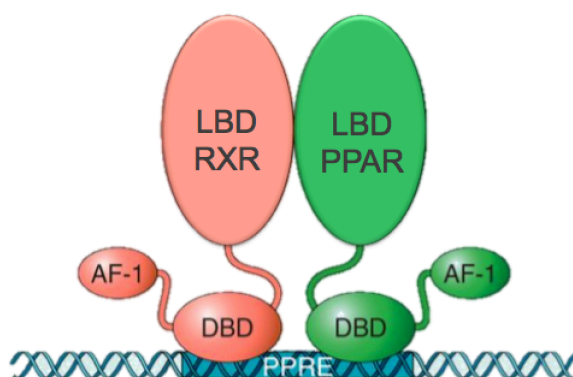


Figura 2. Heterodímero PPAR-RXR ligado ao PPRE. Os PPARs formam heterodímeros com o RXR e se ligam a sequências específicas de DNA no promotor dos seus genes alvo, denominadas elementos responsivos aos proliferadores peroxissomais (PPRE). Adaptado de: Neels JG, Grimaldi PA. Physiological functions of peroxisome proliferator-activated receptor beta. *Physiological reviews*. 2014;94(3):795-858.

2.2.3.2.1 Repressão Basal Independente de Ligante

Na repressão basal, na ausência do ligante, o heterodímero PPAR-RXR α encontra-se ligado na região promotora dos seus genes alvo em um estado de repressão pela interação com proteínas correpressoras como o correpressor do receptor nuclear (*Nuclear Receptor Corepressor* - NCoR) (121) (122) e o mediador do silenciamento dos receptores retinoide e do hormônio tireoidiano (*Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Hormone Receptors* - SMRT) (123).

Essas proteínas correpressoras formam complexos com as desacetilases de histonas (*Histone Deacetylases* – HDACs), enzimas que mantêm a cromatina compacta, impossibilitando o acesso da maquinaria transcricional ao promotor e consequentemente, inibindo a transcrição gênica (124) (125) (126) (Figura 3A).

2.2.3.2.2 Ativação Transcricional Dependente de Ligante ou Transativação

A ativação transcricional dependente de ligante ou transativação é o mecanismo pelo qual os PPARs regulam positivamente a expressão de um grupo de genes envolvidos principalmente na regulação do metabolismo lipídico e da glicose (127).

Como já foi mencionado, no estado basal, o heterodímero PPAR-RXR α encontra-se ligado ao PPRE em um estado de repressão. Por outro lado, a ligação de um agonista desencadeia um complexo processo transcricional que inclui a dissociação de proteínas corressoras e o recrutamento e associação de coativadores transcricionais (128) (129).

As proteínas coativadoras desempenham dois papéis na facilitação ou iniciação da transcrição gênica (130) (131). A primeira função é a remodelação da estrutura da cromatina através da atividade acetilase de histona (130) (131). Este grupo consiste de coativadores como o CBP/p300 e membros da família p160/SRC que deixam a cromatina menos compactada, permitindo o acesso da maquinaria transcricional e a transcrição gênica (132) (133) (134) (Figura 3B).

O segundo grupo de coativadores é constituído por um conjunto de 15 a 30 proteínas que não possuem atividade enzimática conhecida e funcionam como uma plataforma ou ponte para a transferência do sinal do receptor nuclear para a maquinaria de transcrição basal (131) (135) (136).

2.2.3.2.3 Transrepressão Dependente de Ligante

A transrepressão dependente de ligante é o mecanismo pelo qual os PPARs inibem a transcrição de genes inflamatórios (127). Diferente da repressão basal e da transativação, a transrepressão não envolve a ligação do PPAR a um típico elemento responsivo receptor-específico (137) (Figura 3 C). Vários mecanismos foram sugeridos para explicar essa atividade, mas a despeito das intensas investigações, muitos de seus princípios ainda não foram elucidados (127).

Um dos modelos de transrepressão propostos envolve a interação direta entre os PPARs e outros fatores transcricionais, prevenindo a ligação destes a seus elementos responsivos (127). Um estudo mostrou que o PPAR α se liga a subunidades do fator nuclear kappa B (*Factor Nuclear Kappa B* - NF- κ B) e da proteína ativadora 1 (*Activating Protein-1* - AP-1) por meio de interação proteína-proteína, prevenindo a ligação dos mesmos aos elementos responsivos de genes inflamatórios como a IL-6 (138). De forma similar, o PPAR γ inibe a produção de IL-12 em macrófagos pela interação direta com as subunidades do NF- κ B (139) e de IL-2 em linfócitos pela interação com o fator nuclear de células T ativadas (*Nuclear Factor of Activated T-Cells* - NFAT) (140).

Os PPARs podem também inibir a expressão de genes inflamatórios por competir com outros fatores transcricionais como NF- κ B e AP-1 pela ligação a coativadores que estão presentes nas células em quantidades limitadas (127). Um estudo mostrou que o PPAR γ pode inibir a transcrição do gene da sintase de óxido nítrico indutível (*Inducible Nitric Oxide Synthase* - iNOS) por competir com os fatores transcricionais NF- κ B, AP-1 e o transdutor de sinal e ativador transcricional 1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1* - STAT1) pelos coativadores CBP/p300 e SRC-1 (141).

Existem ainda, dois outros modelos de transrepressão que foram descritos posteriormente (127). Um deles é o mecanismo pelo qual o PPAR β/δ controla o *status* inflamatório de macrófagos por meio da associação com o repressor transcricional proteína 6 linfoma de célula B (*B-Cell Lymphoma 6 Protein* - BCL-6) (127). Na ausência de ligante, o PPAR β/δ sequestra o correpressor BCL-6 do promotor dos genes inflamatórios como a proteína quimioatrativa de monócitos 1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1* - MCP-1), levando a um aumento da sua expressão gênica (142). Por outro lado, na presença do ligante, o PPAR β/δ libera o correpressor BCL-6, que se liga ao promotor da MCP-1 e reprime sua transcrição, exercendo um efeito anti-inflamatório (142).

No segundo modelo, o PPAR γ promove, em macrófagos, a repressão de um subconjunto de genes inflamatórios, prevenindo a depuração (*clearance*) de complexos correpressores dos promotores desses genes (127). Em condições basais o complexo correpressor NCoR está presente no promotor da iNOs, mas é

removido após estímulo com lipopolissacarídeos (143). Por outro lado, o tratamento com agonista de PPAR γ previne essa remoção por promover a sumoilação dependente de ligante do LBD do PPAR γ (143). Essa modificação pós-traducional possibilita a ligação do PPAR γ ao NCoR impedindo sua ubiquitinação e consequente remoção pelo sistema ubiquitina proteassoma (143). Como resultado, o PPAR γ ligado ao complexo NCoR permanece ligado ao promotor da iNOs que é mantida em um estado de repressão (143).

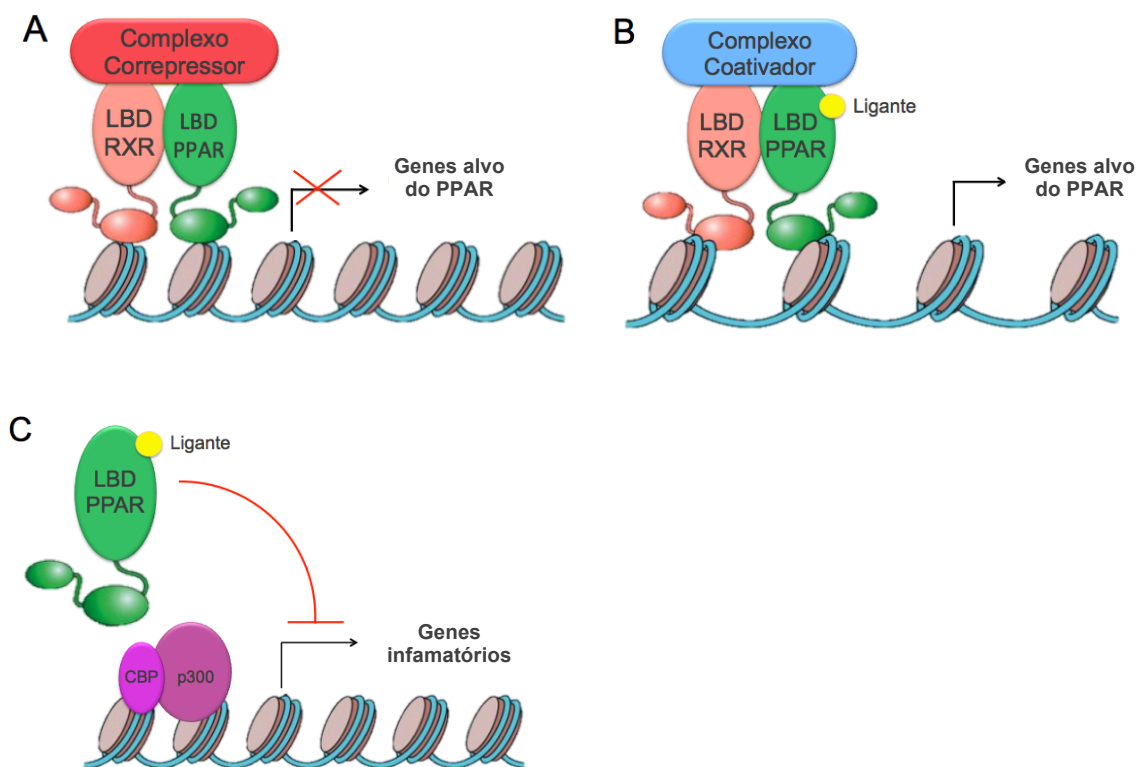


Figura 3. Mecanismo de controle da expressão gênica pelos PPARs. (A) Na repressão basal independente de ligante, o heterodímero PPAR-RXR encontra-se ligado ao PPRE dos seus genes alvo mantendo-os em um estado de repressão pela associação a proteínas correpressoras. (B) Na ativação transcricional dependente de ligante, a ligação de um agonista promove a dissociação de complexos correpressores e a associação de proteínas coativadoras que modificam a estrutura da cromatina, facilitando a ligação da maquinaria transcricional basal ao promotor dos genes alvo, promovendo a transcrição gênica. (C) Na transrepressão dependente de ligante, por diferentes mecanismos, o PPAR reprime a atividade transcricional dos genes inflamatórios, mantendo-os em um estado de repressão. Adaptado de: Neels JG, Grimaldi PA. Physiological functions of peroxisome proliferator-activated receptor beta. *Physiological reviews*. 2014;94(3):795-858.

2.3 RECEPTOR GAMA ATIVADO POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAIIS

2.3.1 Gene e Proteína

O gene PPARG foi clonado de vertebrados, incluindo *Xenopus* (117), camundongos (144) e humanos (145). Análises filogenéticas revelam que sua estrutura é bastante preservada entre humanos e camundongos, apresentando 99% de similaridade e 95% de identidade (146).

Em humanos, o PPARG está localizado no cromossomo 3, na posição 3p25 (146), sendo transcrito em quatro diferentes RNA mensageiros ($-\gamma_1$, $-\gamma_2$, $-\gamma_3$, e $-\gamma_4$) a partir de quatro promotores distintos (146) (147). Contudo, a despeito dos quatro subtipos de RNA mensageiros, apenas duas proteínas, PPAR γ 1 e PPAR γ 2 são sintetizadas, como resultado do uso dos diferentes promotores e processamento (*splicing*) alternativo (146) (148).

Os RNA mensageiros $-\gamma_1$, $-\gamma_3$ e $-\gamma_4$ originam proteínas idênticas, o PPAR γ 1, enquanto o RNA mensageiro $-\gamma_2$ codifica a proteína PPAR γ 2 (148). O PPAR γ 1, composto por 477 aminoácidos, é pouco expresso em vários tipos de tecidos, enquanto o PPAR γ 2, que possui 30 aminoácidos extras na região amino-terminal (148), é seletiva e altamente expresso no tecido adiposo (148) (149).

2.3.2 Estrutura do Domínio de Ligação do Ligante

O LBD do PPAR γ possui uma estrutura semelhante à dos dois outros subtipos de PPAR, sendo composto por 13 hélices alfa (H1 a H12) e 4 folhas beta (S1 a S4) (150). Diferente dos demais receptores nucleares, o LBD dos PPARs possui uma hélice extra, a H2', localizada entre a primeira folha beta e H3 (150). Além disso, as hélices H10 e H11 são na verdade uma hélice contínua, e as hélices H4, H5, H8 e H9 encontram-se entre as hélices H1, H3, H7 e H10/H11 (150) (Figura 4 A).

O sítio de ligação do ligante é uma cavidade bastante ampla no interior da proteína, com um volume total de 1300 a 1400 Å³ (150), o que é substancialmente maior que as encontradas nos demais receptores nucleares (151) (152). Ela é delimitada pelas hélices H2', H3, H4, H5, H7, H10/H11 e folhas beta S3 e S4 (150) (Figura 4 B). Ela possui a forma de “Y” e consiste de uma entrada, que se estende da superfície da proteína e suas duas ramificações que formam bolsas, os braços I e II (150). Cada braço tem aproximadamente 12 Å de comprimento, sendo que o braço I estende-se em direção à hélice 12 e o braço II está situado entre H3 e as folhas beta (150) (Figura 4 C). O braço I é essencialmente polar, enquanto o braço II e a cavidade de entrada são predominantemente hidrofóbicos (150).

A alça (153) entre as hélices H2' e H3, situada na entrada do sítio de ligação, é muito flexível, sugerindo que ela pode potencialmente se adaptar, permitindo que grandes ligantes sejam acomodados sem alterar sua estrutura global de forma significativa. Os ligantes dos PPARs são compostos geralmente formados por uma cabeça polar e uma cauda hidrofóbica e, na maioria dos casos, a cabeça polar forma ligações de hidrogênio com as cadeias laterais do braço I, enquanto a cauda hidrofóbica ocupa o braço II e a parte hidrofóbica da cavidade de entrada (150).

A hélice 12 é muito dinâmica na ausência do ligante, com movimentos na escala de nanossegundos, sugerindo que essa mobilidade é independente do restante do LBD (156). A ligação de um agonista faz com que essa hélice se feche e fique imobilizada na superfície do LBD, promovendo a estabilização global desse domínio (157). Dessa forma, o LBD adquire uma estrutura mais compacta e rígida, favorecendo o recrutamento de proteínas que regulam positivamente a atividade transcricional do receptor (28) (158).

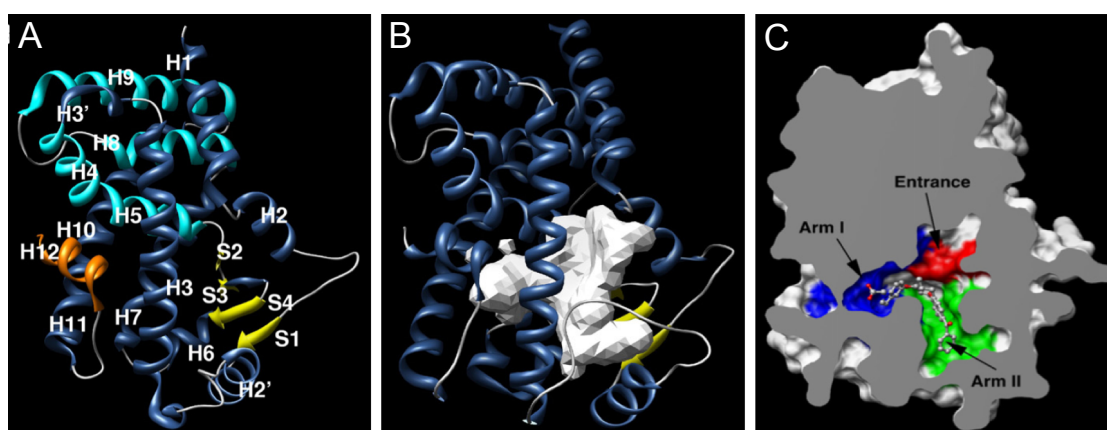


Figura 4. Estrutura tridimensional dos PPARs. (A) PPAR α . Hélices H4, H5, H8 e H9 representadas em azul claro, hélices H1, H2, H2', H3, H6, H7, H8, H10, H11 em azul escuro e hélice H12 em laranja. (B) Cavidade de ligação do ligante (mostrada em branco) delimitada pelas hélices H2', H3, H4, H5, H7, H10/H11 e folhas beta S3 e S4. (C) Cavidade de ligação do ligante em forma de “Y” com a entrada representada em vermelho (*Entrance*) e braços I (*Arm I*) e II (*Arm II*) em azul e verde, respectivamente. Fonte: Zoete V, Grosdidier A, Michielin O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1771(159):915-25.

2.3.3 Cisteína 285

Alguns ligantes naturais do PPAR γ como o ácido eicosatetraenoico, fazem ligação covalente com a cisteína 285 localizada na hélice 3 do LBD do receptor (160) (Figura 5). Essa ligação parece ser importante para a indução da atividade transcricional do PPAR γ mediada por esses ligantes de ocorrência natural (160). Mutações desse aminoácido tornou o PPAR γ totalmente irresponsivo ao tratamento com alguns lipídeos endógenos (161) (162), embora não eliminou a capacidade de ligação dos mesmos ao LBD (162).

Assim como os ligantes naturais, o ligante sintético GW9662, um antagonista do PPAR γ , também se liga covalentemente à cisteína 285 (163). A reanálise, feita pelo nosso grupo de pesquisa, da estrutura cristalográfica do LBD do PPAR γ ligado ao agonista parcial GQ-16 (28), mostrou que esse composto também forma ligação covalente com a cisteína 285 (Figura 6). Contudo, a importância dessa ligação para a atividade transcricional do PPAR γ mediada pelo GQ-16, ainda não foi explorada.

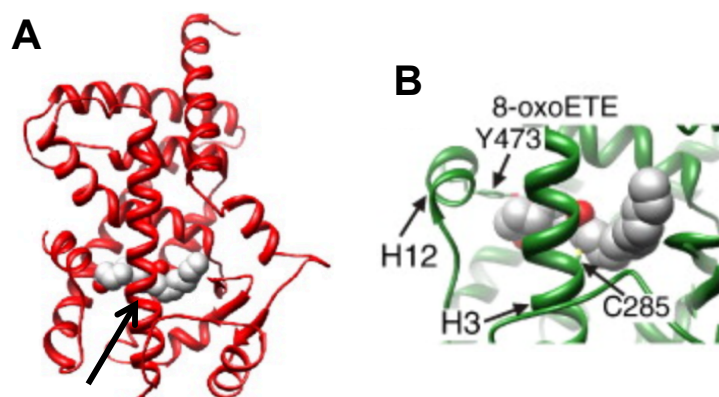


Figura 5. Estrutura tridimensional dos ligantes endógenos ligados ao LBD do PPAR γ . (A) Prostaglandina J2 (*15-Deoxy-Delta-12,14-prostaglandin J2* - 15d-PGJ₂) ligada ao LBD do PPAR γ fazendo contato com hélice 3 (apontada pela seta). (C) Ácido eicosatetraenoico (*8-oxoicosa-5,9,11,14-tetraenoic acid* - 8-oxoETE) ligado à cisteína 285. Fonte: Waku T, Shiraki T, Oyama T, Fujimoto Y, Maebara K, Kamiya N, et al. Structural insight into PPAR γ activation through covalent modification with endogenous fatty acids. *Journal of Molecular Biology*. 2009;385(1):188-99.

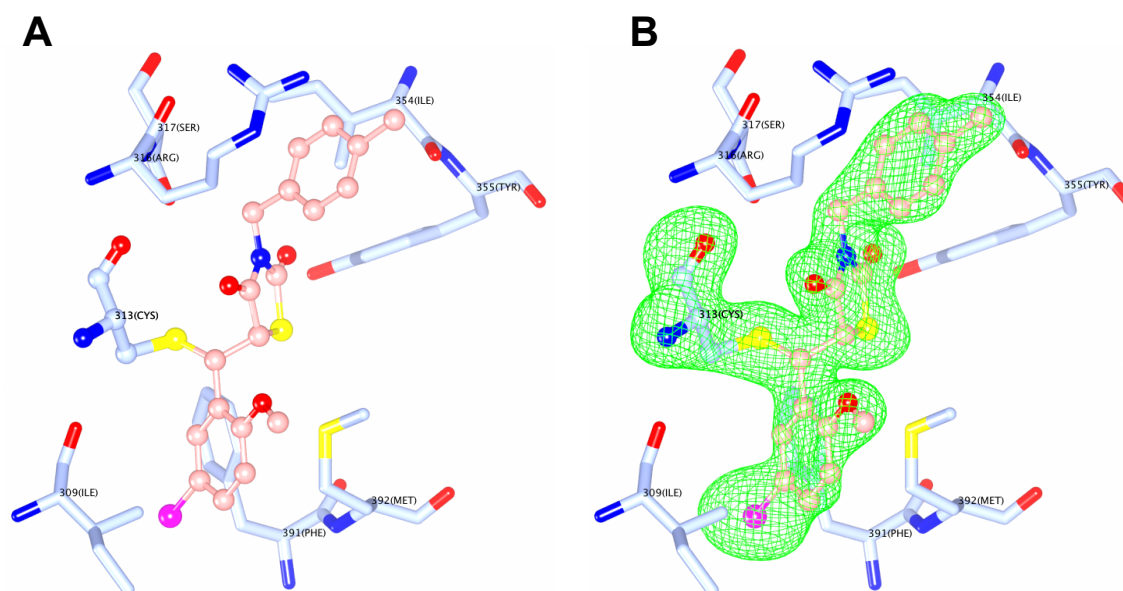


Figura 6. Ligação covalente entre GQ-16 e PPAR γ . (A e B). Estrutura tridimensional do GQ-16 (representado em rosa) ligado covalentemente à cisteína 285 (identificada como cisteína 313 - 313 (CYS)). (B) *Omit Map* (representado em verde) da ligação entre GQ-16 e a cisteína 285. Figura gentilmente cedida pelo Dr. Senapathy Rajagopalan do Instituto de Pesquisa do Hospital Metodista de Houston, Texas.

2.3.4 Ligantes Naturais e Sintéticos

O PPAR γ interage com um amplo espectro de moléculas lipídicas de ocorrência natural (164) (165) (166) (167) e sintéticas (168) (169). Os ligantes naturais incluem ácidos graxos poliinsaturados (164), prostaglandina J2 e seus derivados (165) (166) e ácidos graxos oxidados (167).

Entre os ligantes sintéticos estão as tiazolidinadionas (TZDs), como a rosiglitazona e a pioglitazona, compostos que exibem alta afinidade pelo PPAR γ (169) (170) e que já foram muito utilizados na prática clínica para melhorar a sensibilidade à insulina em pacientes com DM 2 (171) (172) (173).

2.3.5 Papéis Fisiológicos

2.3.5.1 Adipogênese

O PPAR γ desempenha um papel fundamental na diferenciação de adipócitos (114) (115). Sua expressão é cerca de vinte vezes mais elevada no tecido adiposo que na maior parte dos demais tecidos (174). Sua expressão ectópica é capaz de promover adipogênese em fibroblastos não comprometidos com a linhagem adipocitária, como as células NIH-3T3 (114), e até mesmo de promover transdiferenciação de culturas de mioblastos para adipócitos (175).

A regulação da adipogênese pelo PPAR γ ocorre através da sua interação com as proteínas de ligação ao amplificador CCAAT (C/EBP) α , β e δ (176) (66), que são fatores transcricionais expressos nas distintas fases da adipogênese (177). As proteínas C/EBP β e δ são ativadas no estágio inicial da adipogênese em resposta à ação da insulina ou glicocorticoides e induzem a expressão do PPAR γ (66). Nos estágios finais, o PPAR γ ativa a transcrição da C/EBP α , que por um mecanismo de retroalimentação positiva estimula a atividade transcricional do gene do PPAR γ (178).

Ambas as proteínas, PPAR γ e C/EBP α , são responsáveis pelo fenótipo

diferenciado dos adipócitos, embora experimentos tenham mostrado que, na ausência do PPAR γ , fibroblastos são incapazes de completar a adipogênese, mesmo quando C/EBP α é adicionado em altas concentrações (176).

O papel do PPAR γ na adipogênese é bem ilustrado em estudos em que esse gene foi deletado em camundongos (176). A mutação em homozigose é letal no início da gestação (179) (180). Em um estudo em que os embriões com deleção homozigota do gene que codifica o PPAR γ foram suplementados com placentas selvagens por meio de sua agregação com embriões tetraploides (ou seja, contendo 4 cópias do gene que codifica o PPAR γ), foi observado desenvolvimento embrionário e fetal até o termo, porém os camundongos apresentaram ausência de tecido adiposo e morte pouco tempo após o nascimento (180) (181). Em humanos, mutações não-sinônimas (*missense*) do PPAR γ com efeito dominante negativo, tais como R425C, P467L, F388L e C190S, estão associadas a lipodistrofias parciais (182) (183) (184) (185) (186).

2.3.5.2 Sensibilização à Insulina

Os mecanismos pelos quais o PPAR γ melhora a sensibilidade insulínica ainda não estão completamente elucidados e envolvem, provavelmente, vários mecanismos celulares e moleculares (170).

Considerando o bem estabelecido papel do PPAR γ na adipogênese, o aumento da sensibilidade à insulina promovido pela sua ativação pode ser resultado da sua capacidade de expandir o tecido adiposo (187). Em humanos, o tratamento com TZDs leva a um acúmulo seletivo de gordura no tecido adiposo subcutâneo e manutenção ou redução no tecido adiposo visceral (188) (189). Essa remodelação do tecido adiposo pode contribuir para o aumento da sensibilidade à insulina, por favorecer a deposição lipídica em um compartimento mais sensível à ação desse hormônio e sem acesso direto à circulação portal e, conseqüentemente, ao fígado (36).

Em modelos murinos, o tratamento com rosiglitazona promoveu a transcrição de genes relacionados à captação de ácidos graxos, aumentando a capacidade do

tecido adiposo de “sequestrar” e depositar os ácidos graxos dietéticos, mantendo-os menos acessíveis a outros tecidos periféricos sensíveis à insulina, tais como o fígado e o músculo esquelético (190). Consistente com esse resultado, vários estudos clínicos mostraram que aliado à redução da concentração de glicose, as TZDs promovem diminuição da concentração plasmática de ácidos graxos (173) (191) (192).

O aumento da sensibilidade à insulina promovido pelas TZDs também pode estar relacionado à indução da apoptose de adipócitos maduros no tecido adiposo branco (148). Estudos evidenciaram que o tratamento com troglitazona diminuiu a população de adipócitos grandes por meio da indução da apoptose, e simultaneamente estimulou a formação de adipócitos pequenos, mais sensíveis à ação da insulina (193).

Outro mecanismo pelo qual as TZDs aumentam a sensibilidade à insulina em tecidos periféricos envolve a modificação do perfil das citocinas secretadas pelo tecido adiposo (187). Em animais, o tratamento com TZDs aumentou a expressão e a concentração plasmática de adiponectina, uma proteína fortemente correlacionada com a sensibilidade insulínica (194). Por outro lado, as TZDs foram capazes de inibir a expressão de citocinas relacionadas à resistência à insulina como a resistina (195), a proteína carreadora de retinol 4 (*Retinol Binding Protein 4* – RBP4) (196) e o TNF α (197) (198). Este último, uma vez sintetizado, é capaz de promover resistência à insulina tanto no próprio tecido adiposo como em outros tecidos periféricos como o muscular esquelético e o hepático (199) (200).

Dois mecanismos moleculares recentemente descritos e envolvidos na sensibilidade insulínica em resposta à ativação do PPAR γ são a acetilação e a fosforilação desse receptor (201) (202). A ativação da enzima deacetilase SirT1 está associada à biogênese e aumento da atividade mitocondrial (203) (204). Um estudo recente mostrou que o PPAR γ é alvo da SirT1, cuja ativação pode ser induzida por ligantes desse receptor (201). Em animais com superexpressão da SirT1, o tratamento com rosiglitazona foi associado ao “amarronzamento” do tecido adiposo branco, caracterizado pela elevada expressão de genes característicos do tecido adiposo marrom como o da proteína desacopladora 1 (*Uncoupling Protein 1* - Ucp1) e *C/ebp β* e reduzida expressão de genes típicos do tecido adiposo branco como a

quemerina e a *resistina* (201).

A quinase dependente de ciclina 5 (*Cyclin-dependent kinase 5 - cdk5*) é uma enzima que pode ser ativada no tecido adiposo por citocinas inflamatórias como o $TNF\alpha$ e a IL6 (92) (205). Recentemente foi mostrado que essa enzima é capaz de fosforilar o PPAR γ na serina 273 (202), modificação pós-traducional que não altera a capacidade adipogênica do PPAR γ , mas leva à desregulação de genes cuja expressão encontra-se alterada na obesidade (202). A expressão da adiponectina, por exemplo, foi reduzida em cultura de células cujo meio continha ativadores de Cdk5 e aumentada quando o sítio de fosforilação do PPAR γ foi mutado (202).

O aumento da fosforilação do PPAR γ também foi observado em tecidos de camundongos tratados com dieta hiperlipídica, o que foi revertido pelo tratamento com rosiglitazona e agonistas parciais de PPAR γ que também melhoraram a tolerância à glicose e a glicemia de jejum (202). Em humanos, a melhora da sensibilidade à insulina induzida pela rosiglitazona também esteve associada à redução da fosforilação do PPAR γ pela cdk5 (202).

2.3.6 PPAR γ como Alvo Terapêutico

O papel do PPAR γ na regulação do metabolismo lipídico, homeostase da glicose e resposta inflamatória tornou-o alvo atrativo para o desenvolvimento de agentes para o tratamento de doenças metabólicas humanas (206). Contudo, seu amplo padrão de expressão tecidual e suas variadas ações metabólicas também constituem desvantagens, uma vez que o efeito sobre vias de sinalização não envolvidas nos processos patológicos a serem tratados parece estar relacionado aos efeitos adversos de alguns compostos que ativam esse receptor (207).

2.3.6.1 Tiazolidinadionas

As TZDs são antihiperlipemiantes orais efetivos (208) (209) (210), mas infelizmente, um substancial número de pacientes apresenta efeitos adversos graves, o que levou à suspensão do uso da rosiglitazona na Europa (24) e no Brasil (25) e da pioglitazona em alguns países da Europa como a França e Alemanha (26).

O uso clínico das TZDs está associado a uma série de eventos cardiovasculares desfavoráveis tais como a retenção hídrica, edema e aumento da incidência de insuficiência cardíaca (211), além de aumento do risco de infarto do miocárdio (21). A retenção hídrica e o edema parecem ser consequência de um aumento da captação de líquido relacionada à expressão do PPAR γ no ducto coletor (212). Por outro lado, o mecanismo pelo qual as TZDs aumentam o risco de infarto do miocárdio não é conhecido, mas parece ser efeito específico da rosiglitazona, uma vez que tal evento não foi observado com o uso da pioglitazona (213) (214).

A ativação do PPAR γ pelas TDZs também vem sendo associada ao comprometimento da saúde esquelética e aumento do risco de fraturas (215). *In vitro*, o tratamento com pioglitazona induziu a adipogênese em uma linhagem de células progenitoras da medula óssea (216). Em modelos murinos e em humanos, o tratamento com as TZDs foi associado a perda de massa óssea (19) (217), sendo que nos camundongos essa perda foi relacionada ao aumento do número de adipócitos na medula óssea e diminuição da proporção de osteoblastos em relação a osteoclastos (19). Embora não haja consenso (218), vários estudos também associaram o uso da pioglitazona ao aumento do risco de câncer de bexiga em pacientes com DM 2 (22) (23).

Diante desses efeitos adversos e da consequente suspensão e restrições ao uso das TZDs, poucas opções permanecem disponíveis para o tratamento da resistência insulínica associada ao DM 2. De fato, a única alternativa às TZDs para melhorar a sensibilidade insulínica é a biguanida metformina. Contudo, em monoterapia, a metformina é menos eficiente na redução da glicose sanguínea (219) (220). Além disso, os efeitos anti-inflamatórios das TZDs mediados pela ativação do PPAR γ são importantes aspectos do mecanismo de ação dessas drogas, não compartilhados pela meftormina (221) (222).

2.3.6.2 Agonistas Parciais de PPAR γ

As estratégias atuais para o desenvolvimento de agonistas para o PPAR γ consistem na identificação de compostos capazes de ativar seletivamente esse receptor e, conseqüentemente, induzir a expressão de um subconjunto específico de genes alvo, de modo que seja possível obter os efeitos desejáveis da sua ativação, sem efeitos adversos consideráveis (206). É provável ainda, que os efeitos adversos observados com o uso das TZDs sejam resultado da ativação supra-fisiológica induzida por agonistas totais e, portanto, o agonismo parcial é outra estratégia a ser considerada no desenvolvimento de novos ligantes de PPAR γ (206).

Considerando o agonismo parcial como uma estratégia para o desenvolvimento de ligantes de PPAR γ , alguns compostos foram recentemente desenvolvidos, entre os quais o MRL24 (223), o SR1664 (224) e o GQ-16 (27). Embora apresentem estruturas químicas distintas e diferentes modos de ligação ao LBD do PPAR γ , esses três compostos mostraram efeitos similares relativos à adipogênese e melhora da sensibilidade insulínica em estudos realizados em culturas de células e também em modelos animais (28) (202) (223) (224).

O GQ-16 é um composto sintético derivado da 5-benzilideno-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2,4-diona (27). O ensaio de competição com rosiglitazona mostrou que ele se liga diretamente ao LBD do PPAR γ , porém com baixa afinidade (28), e o ensaio de transfecção e gene repórter, que ele é um agonista específico e parcial de PPAR γ , uma vez que não apresentou atividade sobre o PPAR α , PPAR β/δ e RXR α (28) e, mesmo em altas concentrações, promoveu uma ativação máxima de aproximadamente um terço da ativação induzida pela rosiglitazona (28).

Nas linhagens celulares NIH-3T3 e C3H10T1/2, o GQ-16 mostrou reduzido potencial adipogênico (28). O acúmulo de lipídeos e a expressão do marcador de adipócitos FABP4 foram menores quando comparados com os induzidos pelo tratamento com a rosiglitazona (28). Em camundongos com obesidade e resistência à insulina induzidas por dieta hiperlipídica, assim como a rosiglitazona, o GQ-16 melhorou a sinalização insulínica, mas sem induzir ganho de peso e, diferentemente da rosiglitazona, sem induzir edema (28).

A estrutura cristalográfica mostrou que o GQ-16 se liga ao LBD do PPAR γ de um modo diferente da rosiglitazona (28). Enquanto a rosiglitazona se liga perpendicularmente à hélice 3, o GQ-16 ocupa uma posição vertical, paralela àquela hélice e além disso, não faz contato direto com a hélice 12, o que é característico dos agonistas totais (28) (Figura 7).

Embora apresente diferente modo de ligação ao LBD do PPAR γ , o GQ-16 bloqueou a fosforilação da serina 273 de forma tão eficiente quanto a rosiglitazona e a troca de hidrogênio deutério revelou que ele também promoveu a estabilização da hélice 12 de forma similar à rosiglitazona (28).

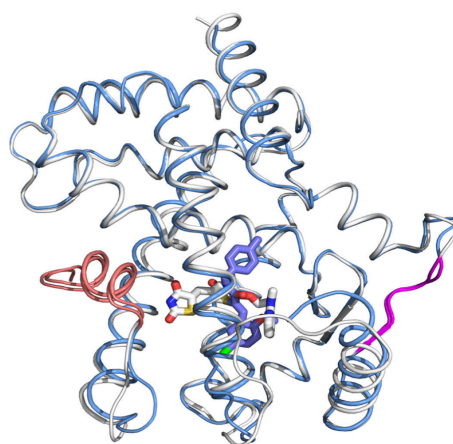


Figura 7. Modo de ligação do GQ-16 ao LBD ao PPAR γ . GQ-16 (lilás) se liga ao LBD do PPAR γ de modo diferente do agonista total rosiglitazona (branco, vermelho, azul e amarelo). GQ-16 dispõe-se verticalmente enquanto a rosiglitazona dispõe-se horizontalmente. Além disso, GQ-16 não faz contato direto com a hélice 12 (representada em vermelho). Fonte: Amato AA, Rajagopalan S, Lin JZ, Carvalho BM, Figueira AC, Lu J, et al. GQ-16, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligand, promotes insulin sensitization without weight gain. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(33):28169-79.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar e comparar o efeito do GQ-16 com a rosiglitazona sobre o perfil de expressão gênica em células 3T3-L1.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do GQ-16 sobre o acúmulo intracelular de lipídeos.
- Avaliar o efeito do GQ-16 sobre a expressão de genes relacionados à adipogênese durante o processo de diferenciação em adipócitos.
- Avaliar o efeito do GQ-16 sobre a expressão de genes relacionados à adipogênese, em adipócitos maduros.
- Avaliar o perfil de expressão gênica modulado pelo GQ-16 em adipócitos maduros.
- Comparar o efeito do GQ-16 com o de outros agonistas parciais do PPAR γ , em adipócitos maduros.
- Avaliar o papel da ligação covalente do GQ-16 com a cisteína 285 do LBD do PPAR γ .

4 MÉTODOS

4.1 REAGENTES E MATERIAIS

O GQ-16 (5-(5-bromo-2-methoxy-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione) foi cedido pelo Professor Ivan da Rocha Pitta da Universidade de Pernambuco e o MRL24 e SR1664 pelo Doutor Patrick Griffin do Instituto de Pesquisa Scripps, *campus* Califórnia. A rosiglitazona foi obtida da Sigma-Aldrich.

As células 3T3-L1 e os meios de cultura para cultivo e diferenciação foram obtidos da Zen Bio.

O FuGENE[®] HD e o Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System foram obtidos da Promega.

O Aurum[™] Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit e o iScript cDNA Synthesis foram obtidos da BioRad.

Os *chips* do microarranjo (BeadyChip Array) foram obtidos da Illumina.

O LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master foi obtido da Roche.

O QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit foi obtido da Agilent Technologies.

4.2 ENSAIO DE GENE REPÓRTER

O gene repórter é um ensaio que permite o estudo da expressão de genes eucarióticos por meio da avaliação da expressão de um gene denominado repórter, que codifica uma proteína cuja expressão pode ser facilmente mensurada.

Nesse ensaio, um plasmídeo quimérico contendo o cDNA da proteína de interesse fusionada a um gene repórter é introduzido em um tipo de célula apropriado por um método denominado transfecção. Após a transfecção, as

sequências do gene que codifica a proteína de interesse e do gene repórter são transcritas e traduzidas e, por meio da quantificação da expressão do gene repórter, ou da atividade de seu produto, pode-se inferir a expressão da proteína de interesse.

Um gene repórter bastante utilizado é o da luciferase, enzima que, na presença do seu substrato luciferina, catalisa uma reação que converte energia química em energia luminosa que pode ser mensurada em um luminômetro.

Para esse ensaio foram utilizadas células HeLa, uma linhagem derivada de tumor cervical uterino estabelecida em 1951 e uma das mais utilizadas em laboratórios de todo o mundo nos mais variados tipos de experimentos por seu fácil cultivo, intensa capacidade de proliferação e de manutenção do genoma (225).

As células foram semeadas no dia anterior à transfecção, em placas de 48 poços e meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), em quantidade suficiente para atingirem de 70 a 90% de confluência no momento da transfecção.

As transfecções foram realizadas com o reagente FuGENE[®] HD (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Foram cotransfectados, por poço, 60 ng do plasmídeo contendo o DNA complementar (cDNA) do receptor nuclear PPAR γ e 240 ng do plasmídeo contendo seu elemento responsivo (PPRE) fusionado ao gene repórter da luciferase ou 60 ng do plasmídeo contendo o DNA complementar do receptor quimérico constituído pelo LBD do PPAR γ fusionado ao DBD do fator de transcrição de leveduras GAL4 (LBD-PPAR γ /DBD-GAL4) e 240 ng do plasmídeo contendo seu elemento responsivo (GAL4) fusionado ao gene repórter da luciferase ou ainda, o receptor mutado GAL4PPAR γ C285S e seu elemento responsivo (GAL4) fusionado ao gene repórter da luciferase e 1 ng do plasmídeo do gene da renilla luciferase, este último utilizado como controle interno.

Seis horas após a transfecção, as células foram tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona 10^{-9} a 10^{-4} M ou GQ-16 10^{-9} a 10^{-5} M por 24 horas. A seguir, as células foram lisadas e uma amostra de cada poço foi utilizada para mensuração da atividade das enzimas luciferase e renilla luciferase. A mensuração foi realizada

em aparelho luminômetro utilizando o *kit* Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. A atividade da luciferase foi normalizada pela atividade da renilla luciferase e calculada como vezes de ativação dos ligantes comparada com o veículo (DMSO). Cada experimento foi realizado em triplicada e repetido no mínimo 3 vezes.

4.3 CULTURA E DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS 3T3-L1

Para o ensaio de diferenciação de pré-adipócitos, foram utilizadas células 3T3-L1. O protocolo utilizado para cultura e diferenciação está representado na figura 8 e descrito no *Cell Care Manual Maintenance and Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes to Adipocytes* da Zen Bio (<http://www.zenbio.com/pdf/ZBM0009.013T3L1CareprotocolRV08.08.pdf>).

As células foram cultivadas em placas de 15 cm de diâmetro ou placas de 6 poços em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Para o ensaio de diferenciação os pré-adipócitos foram semeados em placas de 6 poços e mantidos em meio de cultura para pré-adipócitos (*3T3-L1 Preadipocyte Medium* - Zenbio[®]) composto por DMEM com alta concentração de glicose, HEPES pH 7.4, soro neonatal bovino, penicilina, estreptomicina e anfotericina B até atingirem 100% de confluência (dia -2).

Após alcançarem 100% de confluência, as células foram mantidas sob as mesmas condições por adicionais 48 horas para a promoção da parada do crescimento. Após esse período (dia 0), o meio de cultura para pré-adipócitos foi substituído pelo meio de diferenciação (*3T3-L1 Differentiation Medium* - Zenbio[®]) composto por DMEM/Ham's F-12 (1:1), HEPES pH 7.4, soro fetal bovino, insulina humana 167 nM, dexametasona 1 µM, isobutilmetilxantina 0.5 mM, biotina, pantotenato, penicilina, estreptomicina e anfotericina B, que foi mantido por três dias.

Ao final das 72 horas (dia 3), o meio de diferenciação foi substituído pelo meio de cultura para manutenção de adipócitos (*3T3-L1 Adipocyte Medium* - Zenbio[®]) composto por DMEM/Ham's F-12 (1:1), HEPES pH 7.4, soro fetal bovino, insulina

humana 167 nM, dexametasona 1 μ M, biotina, pantotenato, penicilina e estreptomicina. As células foram mantidas nesse meio de cultura até o dia da fixação ou coleta.

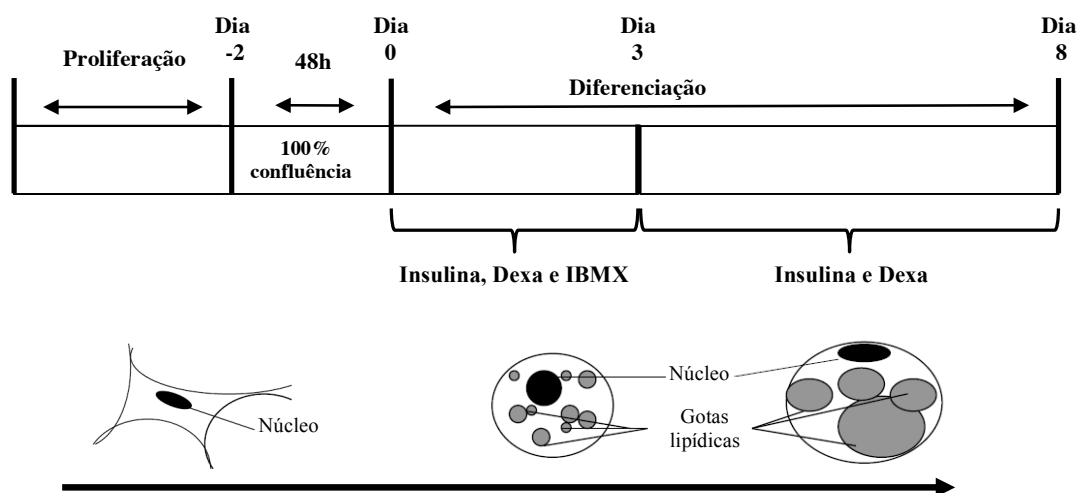


Figura 8. Esquema de diferenciação das células 3T3-L1. As células foram mantidas em meio de cultura para pré-adipócitos até 48 horas após a confluência (dia 0). Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio indutor da diferenciação contendo insulina 167 nM, dexametasona (Dexa) 1 μ M e isobutilmetilxantina (IBMX) 0.5 mM, que foi mantido por 72 horas (dia 0 ao dia 3). Do dia 3 até a coleta ou fixação, as células permaneceram em meio de cultura para manutenção de adipócitos contendo insulina 167 nM e dexametasona 1 μ M.

4.4 TRATAMENTO

O tratamento das células foi realizado em dois momentos distintos. Primeiramente, com o objetivo de avaliar o efeito dos compostos rosiglitazona e GQ-16 no processo de diferenciação, o tratamento com rosiglitazona 100 nM ou GQ-16 5 μ M ou 10 μ M foi realizado no primeiro dia de indução da diferenciação e mantido por três dias (dia 0 ao dia 3 - representado em vermelho na figura 9). Ao final desse período as células foram coletadas para extração do RNA total ou mantidas em meio de cultura para manutenção de adipócitos por adicionais quatro dias, ao final dos quais foram fixadas e coradas com óleo vermelho O.

No segundo momento, objetivando avaliar o efeito dos compostos rosiglitazona, GQ-16, MRL24 e SR1664 em adipócitos maduros, o tratamento foi

realizado no sétimo dia de diferenciação por 24 horas (dia 7 ao dia 8 – representado em azul na figura 9). Ao final desse período, as células foram coletadas para extração do RNA total.

As concentrações dos compostos utilizadas para avaliação da expressão gênica nos adipócitos maduros foram de 100 nM de rosiglitazona e 10 μ M de GQ-16, MRL24 e SR1664. A concentração da rosiglitazona corresponde à menor concentração necessária para ativação transcricional máxima identificada no ensaio de gene repórter e a do GQ-16, à maior concentração em que esse composto foi completamente solúvel em DMSO. As concentrações dos compostos MRL24 e SR1664 foram as mesmas do GQ-16.

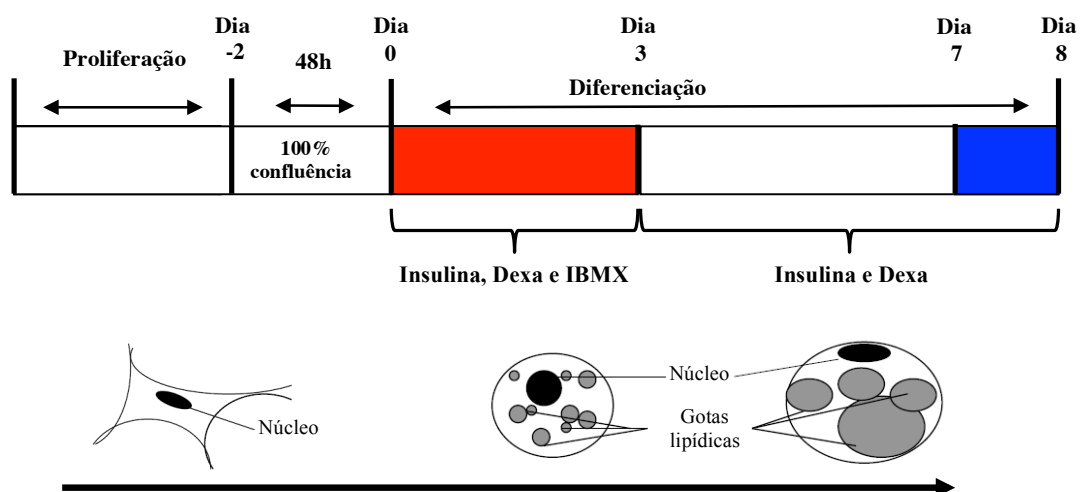


Figura 9. Esquema do tratamento das células 3T3-L1. Com o objetivo de avaliar o efeito dos compostos rosiglitazona e GQ-16 no processo de diferenciação, o tratamento foi realizado no primeiro dia de indução da diferenciação e mantido por três dias (dia 0 ao dia 3 - representado em vermelho) e buscando avaliar o efeito dos compostos rosiglitazona, GQ-16, MRL24 ou SR1664 em adipócitos maduros, o tratamento foi realizado no sétimo dia de diferenciação por 24 horas (dia 7 ao dia 8 – representando em azul).

4.5 COLORAÇÃO POR ÓLEO VERMELHO O

Células 3T3-L1 foram diferenciadas como descrito anteriormente e tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona 100nM, GQ-16 5 μ M ou 10 μ M no primeiro dia de indução da diferenciação por um período de três dias (dia 0 ao dia 3). A seguir, foram mantidas em meio para manutenção de adipócitos.

No oitavo dia de diferenciação, o meio de cultura foi descartado e as células lavadas com tampão fosfato salina (*Phosphate-Buffered Saline* – PBS) duas vezes e então fixadas com formaldeído 4% por 40 minutos. Após 2 lavagens com água seguidas por duas com PBS, as células foram incubadas com o corante para lipídeos óleo vermelho O por uma hora. Em seguida, as células foram lavadas com água para retirada do excesso do corante e fotodocumentadas no microscópio *Regular Inverted BF&Fluorescent Microscope* com aumentos de 4, 20 e 40 vezes.

4.6 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR

O RNA total das células 3T3-L1 no terceiro ou no oitavo dia de diferenciação foi extraído e purificado usando o Aurum Total RNA Fatty and Fibrous kit (BioRad), de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações do RNA total bem como a sua pureza foi mensurada usando o *NanoDrop ND-1000 spectrophometer*. A seguir, um μ g de RNA total foi reversamente transcrito usando o iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad), de acordo com as instruções do fabricante.

4.7 MICROARRANJO

O microarranjo é uma técnica que permite detectar a expressão de transcritos gênicos em larga escala. Para tanto, é utilizando um *chip* que consiste em um arranjo pré-definido de moléculas de DNA quimicamente ligadas a uma superfície sólida.

Os ácidos nucleicos provenientes das amostras biológicas em estudo são aplicados ao *chip* de DNA e, quando há complementariedade entre as bases

nitrogenadas, ocorre a hibridização do ácido nucleico proveniente das amostras com o do *chip*. A detecção da hibridização é possível pois, durante a síntese, os ácidos nucleicos das amostras são marcados com moléculas fluorescentes que geram um sinal que pode ser detectado por meio de leitores (*scanners*).

Para a realização do microarranjo, células 3T3-L1 foram diferenciadas em adipócitos conforme descrito anteriormente. No sétimo dia de diferenciação foram tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona 100 nM ou GQ-16 10 µM. Após 24 horas de tratamento, ou seja, no oitavo dia de diferenciação, as células foram coletadas para avaliação da expressão gênica por meio de microarranjos. Depois da coleta, o RNA mensageiro foi extraído, purificado e mensurado conforme descrito anteriormente.

O *chip* para o microarranjo foi adquirido da Illumina (*BeadChip Array MouseWG-6v2*) e a síntese e marcação do cRNA foi realizado com o Illumina® TotalPrep™-96 RNA Amplification Kit (Ambion).

O *chip* de microarranjo utilizado permitiu a avaliação do perfil de expressão do genoma completo de camundongo, contendo mais de 45.200 sondas (oligonucleotídeos) cujas sequências foram retiradas das bases de dados do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (*National Center for Biotechnology Information Reference Sequence* - NCBI RefSeq) e dos Oligonucleotídeos Exônicos de Camundongo Baseados em Evidência (*Mouse Exonic Evidence Based Oligonucleotide*, MEEBO).

Um total de 400 ng de RNA foi utilizado para a síntese do cDNA que foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, para síntese da primeira fita cDNA, o RNA foi incubado a 42° C por duas horas com um mix contendo dNTP, primer T7 Oligo(dT), inibidor de RNase e a enzima transcriptase reversa (*ArrayScript™ Reverse Transcriptase*). Na segunda etapa, para síntese da fita dupla de cDNA a fita simples de cDNA foi incubada por duas horas a 16° C com um mix composto por dNTP e as enzimas DNA Polimerase e RNase H.

Após a purificação, o cDNA de fita dupla foi utilizado para a geração de *pools* de cRNA marcados com biotina. Para tanto, o cDNA foi incubado por 13 horas a

37°C com um mix composto por Biotina-NTP e a enzima T7. Após a síntese, o cRNA foi purificado e sua concentração mensurada utilizando o Quant-iT™ RNA Assay Kit (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante.

Posteriormente, 750 ng de cRNA biotilado proveniente de cada amostra foi hibridizado com um microarranjo de DNA a 58°C por 18 horas, de acordo com o protocolo do fabricante. Após a incubação os *chips* foram lavados para remoção do cRNA não hibridizado com as sondas de DNA e então encubados com estreptavidina (Cys3- Streptavidin) sob agitação por 10 minutos. Após a incubação, os *chips* foram novamente lavados para remoção do excesso de estreptavidina e então secos por centrifugação.

A intensidade do sinal da fluorescência emitida pelo cRNA marcado e ligado às sondas dos microarranjos foi mensurada pelo *scanner BeadArray Reader*. As medidas foram obtidas no *GenomeStudio* e subtraídas e normalizadas usando o *lumi package* (226) e analisado com o *limma package* (227).

Todas as análises realizadas foram corrigidas pelo teste de múltiplas hipóteses (228) e a mudança na expressão gênica foi considerada como significativa quando maior ou igual a 1,5 vezes e o valor de *p* menor ou igual a 0,05 quando comparado com o veículo (DMSO). Para facilitar as comparações entre os tratamentos, todos os dados foram organizados na base de dados SQLite (<http://www.sqlite.org/>).

4.8 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

Para avaliar a expressão dos genes relacionados à adipogênese durante o processo de diferenciação (terceiro dia) e nos adipócitos maduros (oitavo dia) realizada previamente ao microarranjo, e para validar os resultados observados na análise de microarranjo, vários transcritos gênicos foram analisados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitativa em tempo real (*Real-Time PCR*) realizada no aparelho Roche LightCycler 480 II Instrument com SYBR Green Mastermix (Roche). Os *primers* (Apêndice A) foram desenhados para abranger as junções éxon-éxon para evitar a amplificação de DNA genômico. Os parâmetros utilizados

para amplificação foram: um ciclo de pré-incubação a 95°C por 5 minutos, 45 ciclos de amplificação a 95°C por 10 segundos, 60°C por 10 segundos e 72°C por 10 segundos, um ciclo de curva de *melting* a 95°C por 5 segundos, 65°C por 1 minuto e 97°C e um ciclo de resfriamento a 40°C por 30 segundos.

Os valores de Ct normalizados (Ct alvo – Ct 18S) de pelo menos três triplicatas biológicas foram calculados usando o método $2^{-\Delta CT}$ e analisados por ANOVA seguido do pós teste Bonferroni. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism (GraphPad Software, versão 5.01; GraphPad).

4.9 MUTAÇÃO SÍTIO DIRIGIDA DO PPARY (C285S)

A mutação sítio dirigida é uma técnica na qual um ou poucos aminoácidos de uma proteína são substituídos por outros aminoácidos por alterações nos correspondentes nucleotídeos do gene. Uma de suas aplicações é o estudo da relação entre a estrutura da proteína e sua função.

Buscando avaliar o possível papel funcional da ligação covalente do GQ-16 com a cisteína 285 do LBD do PPARY, foi realizada a mutação sítio dirigida desse resíduo. A mutação foi realizada no plasmídeo contendo o cDNA do receptor quimérico DBD-GAL4/LBD-PPARY com o *kit* QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies), de acordo com as instruções do fabricante.

A mutação planejada foi a troca da timina (t) pela adenina (a) no códon tgc, de modo que a cisteína (C) correspondente fosse substituída pelo aminoácido serina (S) como segue:

Sequência original:

DNA: aagaggtggccatccgcatcttcagggctg~~gc~~cagtttcgctccgtggaggctgtgcaggagatcac
 Proteína: EVAIRIFQGCQFRSVEAVQEI

Sequência mutada:

DNA: aagaggtggccatccgcatcttcagggcagcagtttcgctccgtggaggctgtgcaggagatcac
 Proteína: EVAIRIFQGSSFRSVEAVQEI

A geração do plasmídeo com a mutação foi realizada através da reação de PCR com o plasmídeo contendo o cDNA do DBD-GAL4/LBD-PPAR γ e dois *primers* com a mutação desejada (F1- ccgcatctttcagggc**agc**cagtttcgctccgtg e R1 – cacggagcgaactggctgccctgaaagatgcg)

Essa reação consistiu na desnaturação do cDNA molde (sem a mutação), anelamento dos *primers* contendo a mutação desejada e extensão dos *primers* pela ação da DNA polimerase. O programa utilizado foi: 1 ciclo de 30 segundos a 98° C, 18 ciclos de 10 segundos a 98° C, 1 minuto a 55° C e 3 minutos a 72° C e 1 ciclo de 10 minutos a 72° C.

Ao fim da reação, o cDNA molde metilado foi digerido com a enzima *Dpn I*. O cDNA contendo a mutação foi transformado em células competentes XL1-Blue e purificado. Após sequenciamento para a confirmação da mutação, o produto gerado na reação de PCR, ou seja, o plasmídeo com a mutação C285S (GAL4-PPAR γ C285S) foi utilizado em ensaios de transfecção e gene repórter conforme descrito anteriormente.

5. RESULTADOS

5.1 ATIVIDADE AGONISTA DO GQ-16 NO PPAR γ

O efeito do GQ-16 sobre a atividade transcricional do PPAR γ foi investigado em ensaio de transfecção transiente e gene repórter utilizando células HeLa.

Nesse ensaio, foram utilizadas concentrações de rosiglitazona (controle positivo) de 10^{-9} a 10^{-4} M e de GQ-16 de 10^{-9} a 10^{-5} M, concentração máxima em que esse composto foi completamente solúvel em DMSO.

Como mostrado na Figura 10, o GQ-16 se comportou como um agonista parcial de PPAR γ . A ativação induzida pela maior concentração de GQ-16 utilizada foi aproximadamente um terço da ativação induzida pela rosiglitazona.

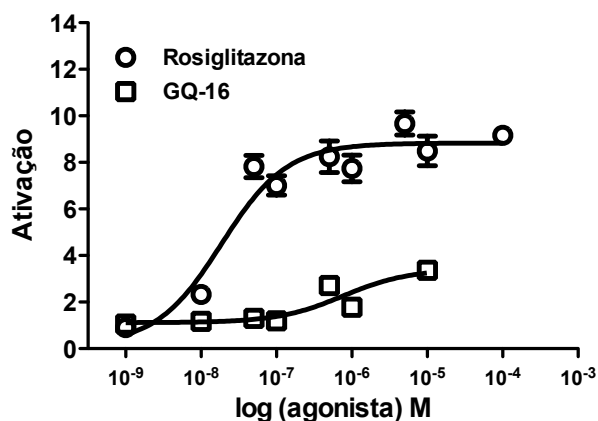


Figura 10. Ensaio de transfecção e gene repórter com PPAR γ . Células HeLa foram transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do PPAR γ , seu elemento responsivo PPRE fusionado ao gene repórter da luciferase e o gene repórter da renilla luciferase e tratadas com DMSO (veículo, controle negativo), rosiglitazona 10^{-9} a 10^{-4} M ou GQ-16 10^{-9} a 10^{-5} M durante 24 horas. A atividade da luciferase foi normalizada pela atividade da renilla luciferase e representada como média \pm desvio padrão da média da ativação dos ligantes comparada com o veículo (DMSO). A figura representa os resultados de três experimentos independentes em triplicata.

5.2 EFEITO DO GQ-16 SOBRE A ADIPOGÊNESE EM CULTURA DE CÉLULAS

Considerando a reduzida capacidade do GQ-16 em ativar o PPAR γ comparado com o agonista total rosiglitazona, foi realizado ensaio de diferenciação de pré-adipócitos com células 3T3-L1 visando avaliar o efeito adipogênico desse composto.

Como é possível observar na Figura 11, o tratamento com GQ-16 promoveu um acúmulo de lipídeos significativamente menor quando comparado ao promovido pela rosiglitazona, mesmo na concentração máxima utilizada de 10^{-5} M.

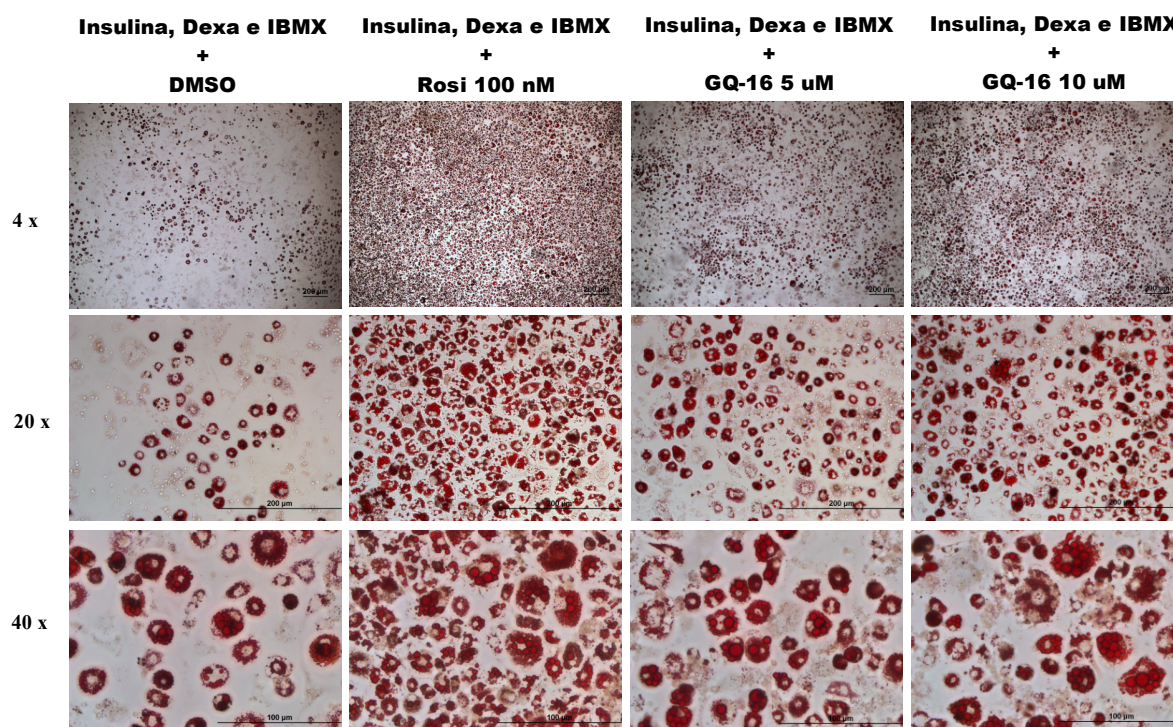


Figura 11. Ensaio de diferenciação de pré-adipócitos. Células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com insulina 167 nM, dexametasona 1 μ M e isobutilmetilxantina 0,5 mM e tratadas com DMSO, Rosiglitazona (Rosi) 100 nM, GQ-16 5 μ M ou GQ-16 10 μ M por 72 horas. A seguir, as células foram mantidas em meio de cultura com insulina 167 nM e dexametasona 1 μ M. No oitavo dia de diferenciação, as células foram fixadas, coradas com óleo vermelho O e fotodocumentadas com aumentos de 4, 20 e 40 vezes.

5.3 EFEITO DO GQ-16 SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA ADIPOGÊNESE

5.3.1 Efeito do GQ-16 Sobre a Expressão de Genes Envolvidos na Adipogênese, Durante a Diferenciação

Buscando compreender o reduzido acúmulo de lipídeos induzido pelo tratamento com GQ-16 nas células 3T3-L1, o efeito desse composto sobre a expressão de genes envolvidos na adipogênese, durante o processo de diferenciação, foi avaliado por PCR quantitativa em tempo real.

Os genes avaliados foram o *Ppar γ* , *Cebpa*, Adiponectina (*Adipoq*), *Fabp4* e *Lpl*. Como mostrado na figura 12, com exceção do *Ppar γ* , o tratamento com GQ-16 induziu de forma menos intensa, comparado à rosiglitazona, a expressão dos genes avaliados.

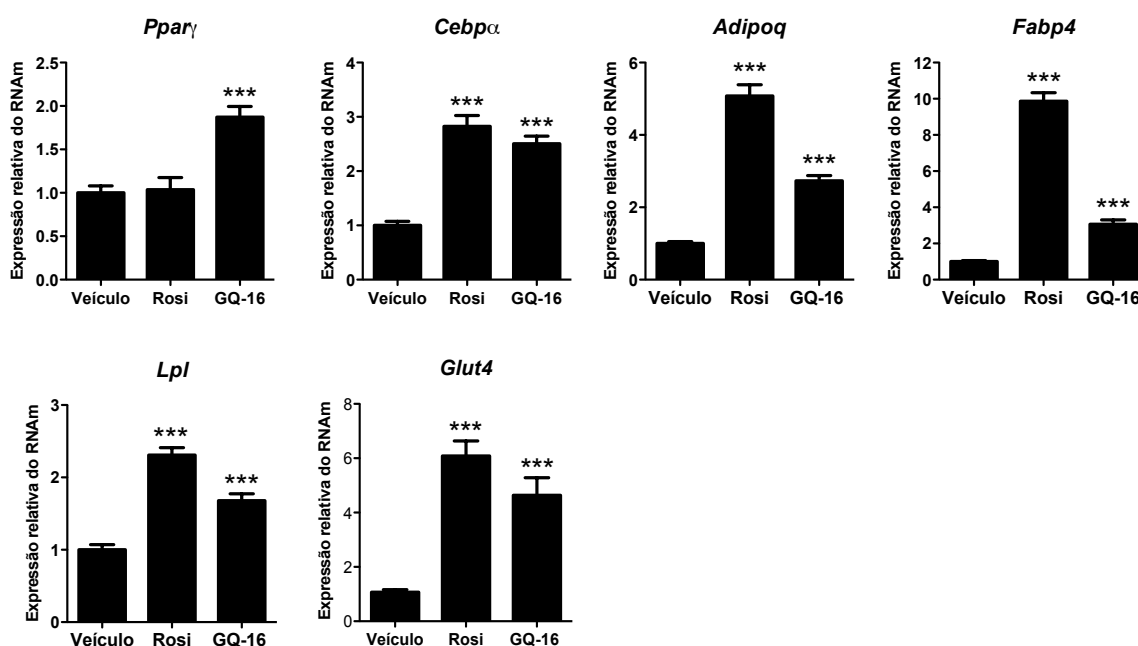


Figura 12. Efeito do GQ-16 sobre a expressão de genes relacionados à adipogênese, durante o processo de diferenciação. Células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com insulina 167 nM, dexametasona 1 μ M e isobutilmetilxantina 0,5 mM e tratadas com DMSO, Rosiglitazona (Rosi) 100 nM ou GQ-16 10 μ M por 72 horas. Após o tratamento, as células foram coletadas e a expressão do RNAm dos genes *Pparγ*, *Cebpα*, Adiponectina (*Adipoq*), *Fabp4* e *Lpl* foi avaliada por PCR quantitativa em tempo real. Os dados são apresentados com vezes de ativação dos ligantes em relação ao veículo (DMSO). *** $p \leq 0.001$.

5.3.2 Efeito do GQ-16 sobre a Expressão de Genes Envolvidos na Adipogênese, em Adipócitos Maduros

Após a avaliação do efeito do GQ-16 sobre a expressão de genes relacionados à adipogênese durante o processo de diferenciação, decidiu-se investigar se o GQ-16 possui algum efeito em adipócitos maduros. Para tanto, foi avaliada a expressão dos mesmos genes estudados anteriormente, ou seja, *Pparγ*, *Cebpα*, Adiponectina (*Adipoq*), *Fabp4* e *Lpl*, mas em células já completamente diferenciadas que foram tratadas por 24 horas com GQ-16.

Como é possível observar na figura 13, tanto a rosiglitazona quanto o GQ-16 exerceram, nos adipócitos maduros, pouco ou nenhum efeito sobre a expressão dos genes relacionados à adipogênese, quando comparado ao efeito nas células tratadas durante a indução da diferenciação.

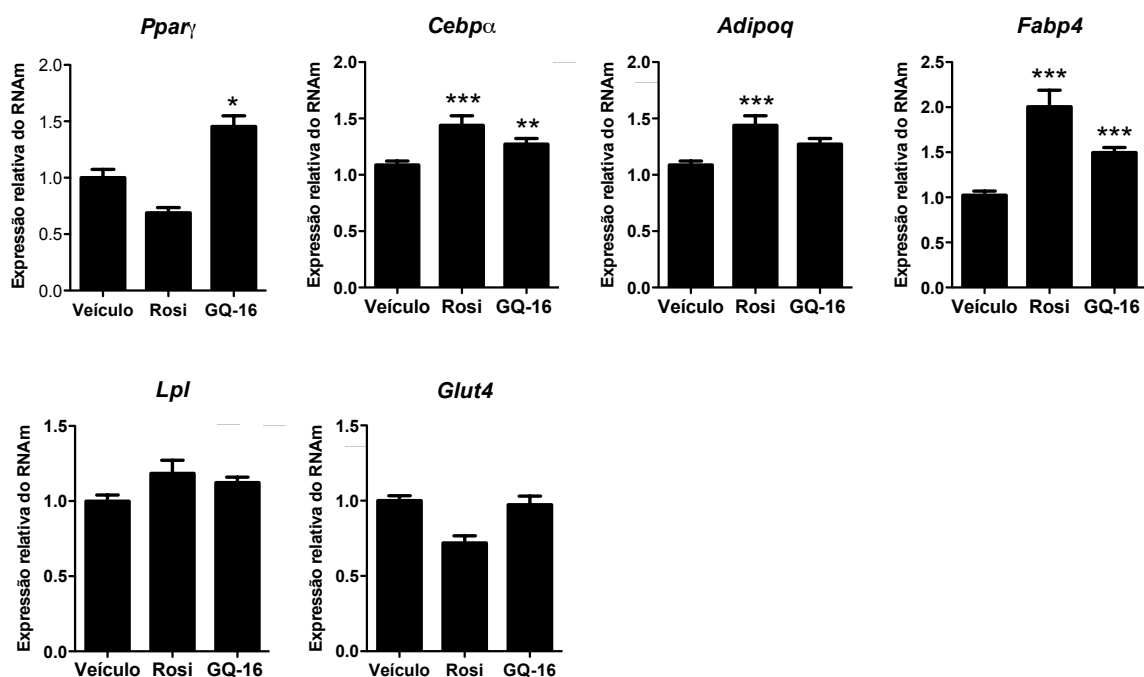


Figura 13. Efeito do GQ-16 sobre a expressão de genes relacionados à adipogênese, em adipócitos maduros. Células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com insulina 167 nM, dexametasona 1 μ M e isobutilmetilxantina 0,5 mM por 72 horas, mantidas em meio de cultura com insulina 167 nM e dexametasona 1 μ M por adicionais 4 dias e tratadas com DMSO, Rosiglitazona (Rosi) 100 nM ou GQ-16 10 μ M por 24 horas. Após o tratamento, as células foram coletadas e a expressão do RNAm dos genes *Pparγ*, *Cebpa*, adiponectina (*Adipoq*), *Fabp4* e *Lpl* foi avaliada por PCR quantitativa em tempo real. Os dados são apresentados com vezes de ativação dos ligantes em relação ao veículo (DMSO). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

5.4 EFEITO DO GQ-16 SOBRE A EXPRESSÃO DO GENE QUE CODIFICA O RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNA OXIDADA DE BAIXA DENSIDADE

Considerando o reduzido efeito do GQ-16 sobre a expressão dos genes envolvidos na adipogênese, em adipócitos maduros, decidiu-se investigar seu efeito sobre a expressão do receptor 1 de lipoproteína oxidada de baixa densidade (*oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1* – OLR1). O OLR1 é um receptor de membrana envolvido no metabolismo lipídico e dos carboidratos, que é alvo direto do PPAR γ e cujo aumento na expressão induzido pelo tratamento com rosiglitazona em adipócitos maduros foi previamente demonstrado (229).

Inicialmente o efeito do GQ-16 na expressão do RNAm do *Olr1* foi avaliado após 24 horas de tratamento e, como mostra a figura 14 A, embora o efeito do GQ-

16 tenha sido menor quando comparado ao da rosiglitazona, ele foi significativo, promovendo aumento da expressão gênica.

Em um segundo experimento, foi avaliado o efeito do GQ-16 sobre a expressão do RNAm do *Olr1* após 6, 12, 24, 36 e 48 horas de tratamento. Como é possível verificar na figura 14 B, a rosiglitazona promoveu uma rápida indução na expressão desse gene a partir das 6 horas de tratamento e essa ativação aumentou gradualmente, atingindo mais de 8 vezes após 48 horas de tratamento. O GQ-16 por sua vez, induziu a expressão do RNAm do *Olr1* de forma menos intensa, porém constante nos diferentes momentos avaliados. Pode-se observar um pequeno pico de ativação após 12 horas de tratamento, mas este não foi estatisticamente significativo.

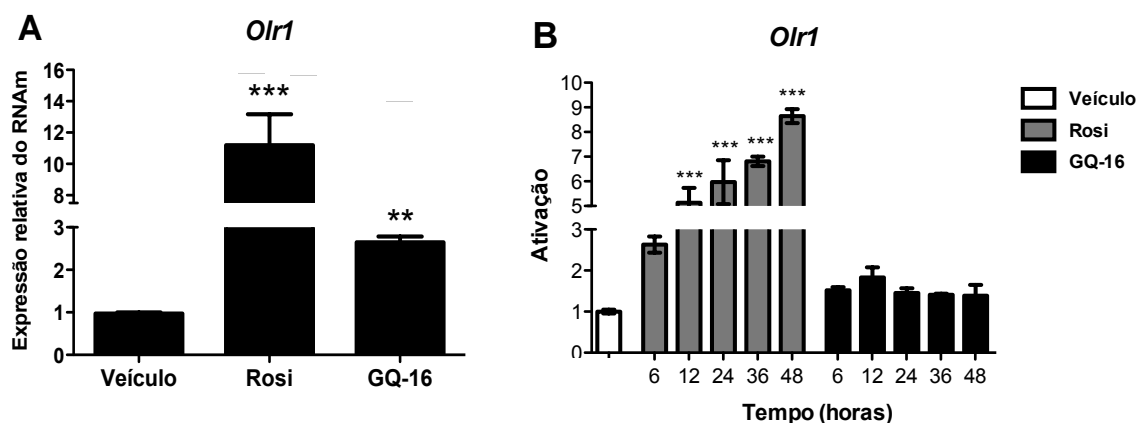


Figura 14. Efeito do GQ-16 sobre a expressão do *Olr1*. Células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com insulina 167 nM, dexametasona 1 μ M e isobutilmetilxantina 0,5 mM por 72 horas, mantidas em meio de cultura com insulina 167 nM e dexametasona 1 μ M por adicionais 4 dias e tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona (Rosi) 100 nM ou GQ-16 10 μ M. (A) Tratamento com rosiglitazona ou GQ-16 por 24 horas. (B) Tratamento com rosiglitazona ou GQ-16 por 6, 12, 24, 36 e 48 horas. Após o tratamento as células foram coletadas e a expressão do RNAm do *Olr1* foi avaliada por PCR quantitativa em tempo real. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

5.5 EFEITO DO GQ-16 SOBRE PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA NOS ADIPÓCITOS MADUROS, AVALIADO POR MICROARRANJO

A avaliação do perfil de expressão gênica modulado pelo GQ-16 em adipócitos 3T3-L1 foi realizada através da técnica de microarranjo. Utilizando como referência o padrão de expressão do RNAm do *Olr1* induzido pelo GQ-16, o tratamento dos adipócitos com rosiglitazona 100 nM ou GQ-16 10 μ M foi realizado no sétimo dia de diferenciação por um período de 24 horas.

Como mostra a figura 15 A, a rosiglitazona modificou a expressão de 1.156 genes. Desses, 544 tiveram sua expressão aumentada (47%) e 612 reprimida (53%). O GQ-16, por sua vez, modificou a expressão de apenas 89 genes, sendo 40 ativados (45%) e 49 reprimidos (55%).

Entre os genes com expressão modificada pela rosiglitazona, 46 também tiveram sua expressão modificada pelo tratamento com GQ-16, sendo 22 ativados e 24 reprimidos. Por outro lado, 43 genes mostraram ser responsivos somente ao tratamento com GQ-16, sendo 18 ativados e 25 reprimidos (Figura 15 B).

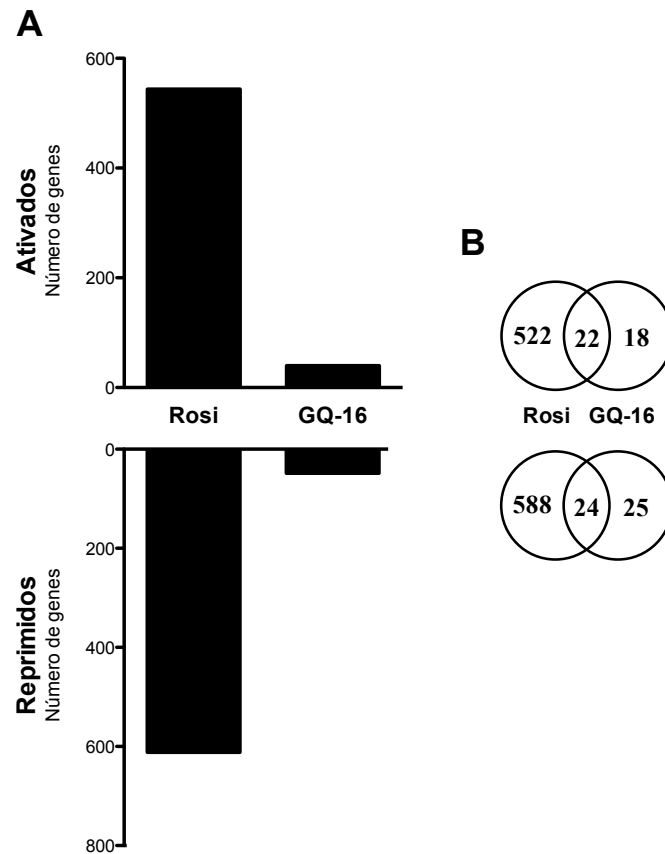


Figura 15. Representação dos genes responsivos ao tratamento com rosiglitazona, GQ-16 ou ambos. (A) Número de genes ativados e reprimidos pelo tratamento com rosiglitazona ou GQ-16. (B) Número de genes ativados e reprimidos exclusivamente por rosiglitazona ou GQ-16 e ativados e reprimidos por ambos os tratamentos. O RNA complementar sintetizado a partir do RNA total extraído de adipócitos maduros tratados com rosiglitazona ou GQ-16 foi hibridizado com o *chip* de DNA e escaneado. Os dados brutos foram obtidos do *GenomeStudio*, subtraídos e normalizados usando o *lumi package* e analisados com o *limma package*. Todas as análises foram corrigidas pelo teste de múltiplas hipóteses (Benjamini Hochberg) e o efeito foi determinado como significativo quando $\geq 1,5$ vezes e o valor de $p \leq 0,05$ quando comparado com o veículo (DMSO).

Para melhor compreender as diferenças entre as respostas induzidas pelos tratamentos com a rosiglitazona e GQ-16 detectadas no microarranjo, foi construído um diagrama de dispersão (Figura 16). Os valores que correspondem às alterações na expressão dos genes promovidas pelo tratamento com rosiglitazona encontram-se no eixo x e os valores que correspondem às alterações induzidas pelo tratamento com GQ-16, no eixo y.

Os genes com expressão modificada pelo tratamento com rosiglitazona, GQ-16 ou ambos, foram agrupados em quatro categorias: (i) genes regulados exclusivamente pelo tratamento com rosiglitazona, incluindo os genes ativados e reprimidos (representados pelo símbolo “x”, em vermelho, na figura 16 e listados no apêndice B); (ii) genes com expressão modificada exclusivamente pelo tratamento com GQ-16, incluindo os ativados e reprimidos (representados como pontos azuis na figura 16 e listados no apêndice C); (iii) genes com expressão modificada de forma similar pelo tratamento com rosiglitazona e GQ-16, incluindo genes ativados ou reprimidos por ambos (representados como quadrados pretos na figura 16 e listados no apêndice D); (iv) genes regulados de modo oposto em resposta ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16, ou seja, enquanto um composto ativou a expressão de determinado gene, o outro reprimiu e vice-versa (representados como triângulos verdes na figura 16 e listados no apêndice E).

Analisando o diagrama de dispersão, é possível identificar que um grande grupo de genes respondeu exclusivamente ao tratamento com rosiglitazona (representados como “x” em vermelho). Entre os genes que responderam de forma similar a ambos os tratamentos (representados como quadrados pretos), um grande grupo foi induzido fracamente, enquanto um pequeno grupo mostrou resposta acentuada ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16. Adicionalmente, o GQ-16 mostrou reprimir de forma efetiva um subgrupo de genes também inibidos pela rosiglitazona. Também é possível constatar que todos os genes identificados como responsivos exclusivamente ao GQ-16, tanto os ativados quanto os reprimidos (representados como pontos azuis) mostraram pequena resposta ao tratamento.

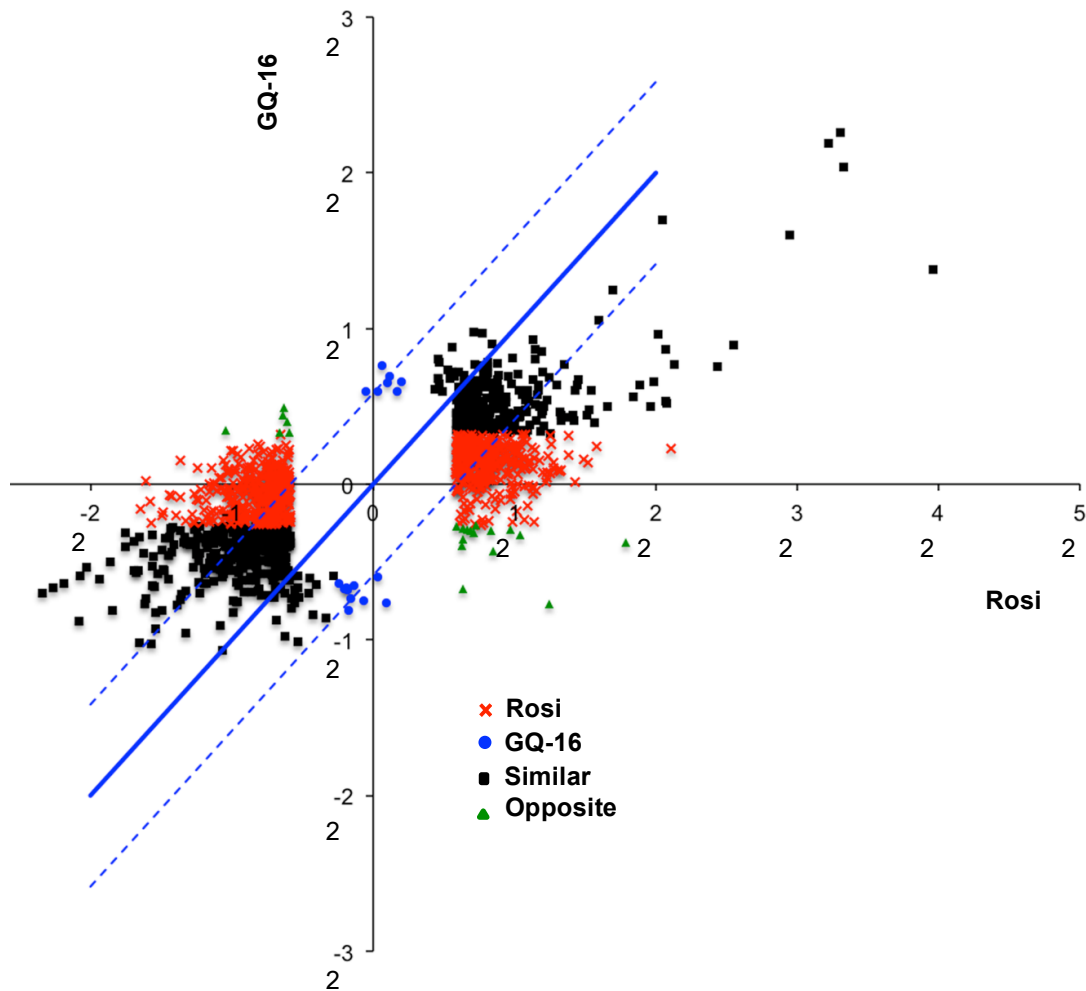


Figura 16. Resposta ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16 em adipócitos. Os valores que correspondem às alterações na expressão dos genes promovidas pelo tratamento com rosiglitazona (Rosi) encontram-se no eixo x e os valores que correspondem às alterações induzidas pelo tratamento com GQ-16 no eixo y. Os x vermelhos representam genes que mostraram resposta exclusiva ao tratamento com rosiglitazona, os pontos azuis os genes que mostraram-se responsivos exclusivamente ao tratamento com o GQ-16, os quadrados pretos, os genes cuja expressão foi regulada de forma similar pelo tratamento por ambos os ligantes e os triângulos verdes os genes que mostraram respostas opostas ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16. A linha sólida azul representa a teórica correlação perfeita entre as resposta aos tratamentos com rosiglitazona e GQ-16 e as linhas tracejadas azuis delimitam 1.5 vezes em relação à linha sólida. Para esse experimento, o RNA complementar sintetizado a partir do RNA total extraído dos adipócitos maduros e tratados com rosiglitazona ou GQ-16 foi hibridizado com o *chip* de DNA e escaneado. Os dados brutos foram obtidos do *GenomeStudio*, subtraídos e normalizados usando o *lumi package* e analisados com o *limma package*. Todos as análises foram corrigidas pelo teste de múltiplas hipóteses (Benjamini Hochberg) e o efeito foi determinado como significativo quando $\geq 1,5$ vezes e o valor de $p \leq 0,05$ quando comparado com o veículo (DMSO).

5.6 VALIDAÇÃO DO MICROARRANJO

A validação dos dados observados no microarranjo foi realizada por meio da PCR quantitativa em tempo real. Foram selecionados genes das quatro categorias descritas anteriormente: genes com expressão modificada (i) exclusivamente pelo tratamento com rosiglitazona, (ii) exclusivamente pelo tratamento com GQ-16, (iii) de forma similar pelo tratamento com rosiglitazona e GQ-16 e (iv) de modo oposto em resposta ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16.

Os critérios para a escolha dos genes a serem avaliados por PCR em tempo real foram: (i) expressão modificada exclusivamente pelos tratamentos com rosiglitazona ou GQ-16 e (ii) função conhecida e relacionada com os processos envolvendo adipogênese e função do adipócito.

5.6.1 Genes com Expressão Modificada Exclusivamente em Resposta ao Tratamento com Rosiglitazona

Os genes com expressão modificada exclusivamente pelo tratamento com a rosiglitazona validados pela PCR foram: *Cxcl1* (*chemokine (C-X-C motif) ligand 1* - ligante 1 da citocina CXC), *Atf3* (*activating transcription factor 3* - fator 3 de ativação transcricional), *Fgf10* (*fibroblast growth factor 10* - fator 10 de crescimento de fibroblasto), *Fabp5* (*fatty acid binding protein 5* - proteína 5 de ligação ao ácido graxo), *Ppargc1a* (*peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha* - coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferadores peroxissomais gama) e *Hes1* (*hairy and enhancer of split 1* – espesso e potencializador de divisão 1) (Figura 17). Com exceção do *Hes1*, cuja expressão foi reprimida, a expressão de todos os demais genes foi ativada pelo tratamento com rosiglitazona, mas não afetada pelo tratamento com o GQ-16.

Como mostra a tabela 3, os genes ativados pelo tratamento com a rosiglitazona *Fgf10*, *Ppargc1a* e *Fabp5* estimulam a adipogênese e o acúmulo intracelular de lipídeos. O gene *Hes1*, que inibe a diferenciação em adipócitos, foi reprimido, ao passo que o *Cxcl1* (que codifica proteína com atividade pró-inflamatória) e o *Atf3* (cujo produto é descrito na literatura como inibidor da

adipogênese) também foram ativados.

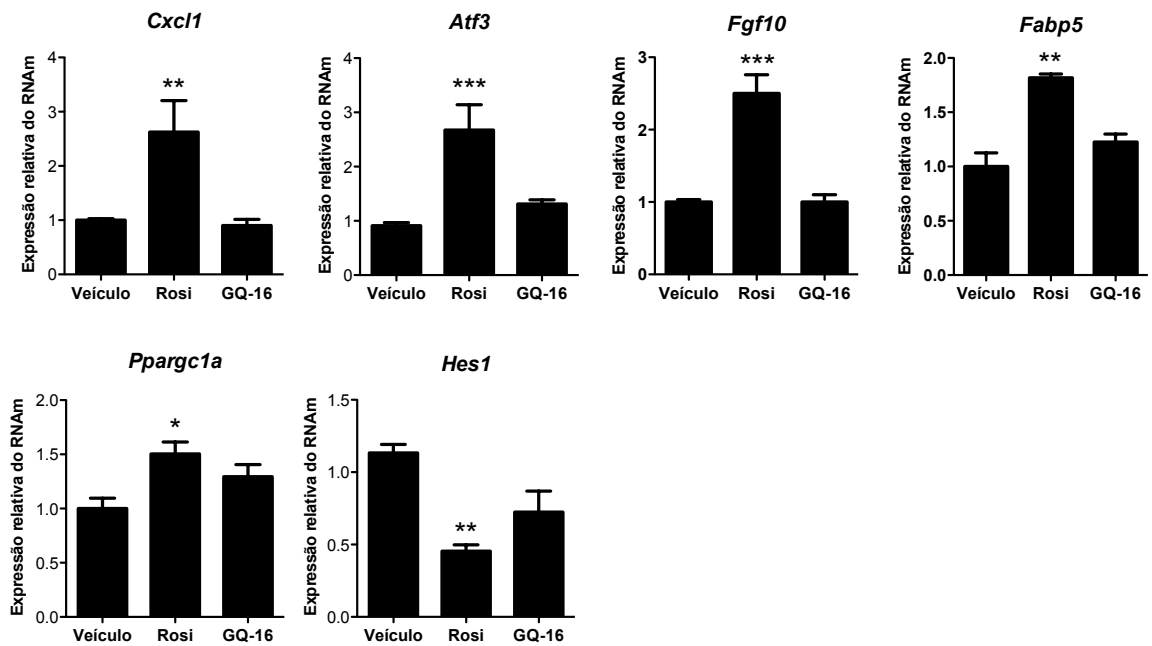


Figura 17. Genes com expressão modificada exclusivamente em resposta ao tratamento com rosiglitazona. Genes que mostraram alteração na expressão em resposta ao tratamento com rosiglitazona e/ou GQ-16 $\geq 1,5$ vezes e com valor de $p \leq 0,05$ foram analisados por PCR quantitativa em tempo real. Os dados são apresentados como vezes de ativação dos ligantes em relação ao veículo (DMSO). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Tabela 3 - Genes com expressão modificada exclusivamente em resposta ao tratamento com rosiglitazona.

Símbolo	Nome	Função
Cxcl1	Ligante 1 da citocina CXC (<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>)	Membro da família de citocinas CXC que participa do recrutamento e ativação dos leucócitos (230)
Atf3	Fator 3 de ativação transcricional (<i>Activating transcription factor 3</i>)	Fator de transcrição induzido por estresse fisiológico (231). Sua expressão relaciona-se com a inibição da adipogênese (232)
Fgf10	Fator 10 de crescimento de fibroblasto (<i>Fibroblast growth factor 10</i>)	Membro da família de fatores de crescimento de fibroblastos que induz a adipogênese contribuindo para a expressão de C/EBP β (233). Seu nocaute em animais reduziu a expressão de C/EBP β e o desenvolvimento do tecido adiposo branco (233)
Fabp5	Proteína 5 de ligação ao ácido graxo (<i>Fatty acid binding protein 5</i>)	Proteína citoplasmática que se liga a ácidos graxos de cadeia longa e participa da sua captação, transporte e metabolismo (230). Sua inibição em pré- adipócitos reduziu a expressão de PPAR γ e C/EBP α e a viabilidade celular (234)
Ppargc1a	Coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferadores peroxissomais gama (<i>peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha</i>)	Coativador transcricional envolvido na biogênese mitocondrial (235). Sua expressão em células mesenquimais induziu marcadores de tecido adiposo marrom e seu nocaute inibiu a diferenciação (236)
Hes1	Espesso e potencializador de divisão 1 (<i>hairy and enhancer of split 1</i>)	Fator transcricional que inibe a adipogênese tanto em células 3T3-L1 quanto em camundongos (237) (238)

5.6.2 Genes com Expressão Modificada de Modo Similar em Resposta ao Tratamento com Rosiglitazona e GQ-16

Os genes com expressão modificada de forma similar em resposta ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16 também incluem genes ativados e reprimidos. Os genes ativados por ambos os ligantes na avaliação pelo microarranjo, subsequentemente validada pela PCR em tempo real, foram o *Acaa1b* (*acetyl-coenzyme A acyltransferase 1B* - acetil coenzima A acetiltransferase 1B), *Fgf21* (*fibroblast growth factor 21* – fator 1 de crescimento de fibroblasto), *Rbp7* (*retinol binding protein 7* - proteína 7 ligadora de retinol), *Elovl3* (*elongation of very long chain fatty acids-like 3* - alongamento de ácidos graxos de cadeia muito longa), *Gpd1* (*glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1* - glicerol 3 fosfato desidrogenase 1), *Irs2* (*insulin receptor substrate 2* - substrato 2 receptor de insulina), *Acox1* (*acyl-coenzyme A oxidase 1* - acil coenzima A oxidase 1), *Lhfp12* (*lipoma HMGIC fusion partner-like 2* - parceiro de fusão de lipoma HMGIC), *Krt23* (*keratin 23* - queratina

23) e *St3gal6* (*ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6* - ST3 beta galactosidade alfa 2,3 sialiltransferase 6) (Figura 18).

Os genes reprimidos foram o *Lgals9* (*lectin, galactose binding, soluble 9* - lecitina solúvel 9 ligadora de galactose), *Fn1* (*fibronectin 1* - fibronectina 1), *Dcn* (*decorin* – decorina,) *Trp63* (*transformation related protein 63* - proteína 63 relacionada à transformação), *Rgs2* (*regulator of G-protein signaling 2* - regulador 2 da proteína G sinalizadora), *Insig2* (*insulin induced gene 2* - gene 2 da insulina induzida), *Acsm3* (*acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3* - membro 3 da família acil CoA sintetase de cadeia média), *Vcam1* (*vascular cell adhesion molecule 1* - molécula 1 de adesão celular vascular), *Xdh* (*xanthine dehydrogenase* - xantina desidrogenase), *Orm2* (*orosomucoid 2* - orosomucoide 2), *Lox* (*lysyl oxidase* - lisil oxidase), *S100a8* (*S100 calcium binding protein A8* - proteína A8 ligadora de cálcio S100) e *Slc12a2* (*solute carrier family 12, member 2* - membro 2 da família de carreadores solutos 12) (Figura 19 A). No grupo de genes reprimidos por ambos os ligantes também foram incluídos os genes *Ptigs* (*prostaglandin I2 synthase* - prostaglandina I2 sintase), *Orm1* (*orosomucoid 1* - orosomucoide 1), *Hp* (*haptoglobin* - hepatoglobina) e *Hspb1* (*heat shock protein 1* - proteína 1 de choque térmico), que mostraram ser reprimidos exclusivamente pela rosiglitazona no ensaio de microarranjo, mas também foram reprimidos pelo GQ-16 na avaliação por PCR em tempo real (Figura 19 B).

Como mostra a tabela 4, muitos dos genes ativados por ambos os ligantes (*Acaa1b*, *Fgf21*, *Rbp7*, *Elovl3*, *Gpd1*, *Irs2* e *Acox1*) codificam proteínas envolvidas no processo de adipogênese e no metabolismo lipídico e da glicose, enquanto os genes *Lhfp12*, *Krt23* e *St3gal6* possuem função desconhecida ou até o momento não relacionada com a adipogênese ou função do adipócito.

A tabela 5 mostra que muitos dos genes reprimidos por ambos os tratamentos (*Lgals9*, *Fn1*, *Trp63*, *Vcam1*, *Orm2*, *S100a8*, *Ptigs*, *Orm1*, *Hp* e *Hspb1*) estão relacionados com a resposta inflamatória. Alguns deles, incluindo o *Lgals9*, *Fn1* e *Ptigs* além do *Rgs2* e *Xdh*, já foram associados com obesidade e DM 2. Os genes *Insig2* e *Acsm3*, com expressão elevada durante a adipogênese e *Lox* e *Slc12a2*, que assim como alguns genes ativados pela rosiglitazona, não possuem

função conhecida relacionada à adipogênese ou ao adipócito, também foram reprimidos.

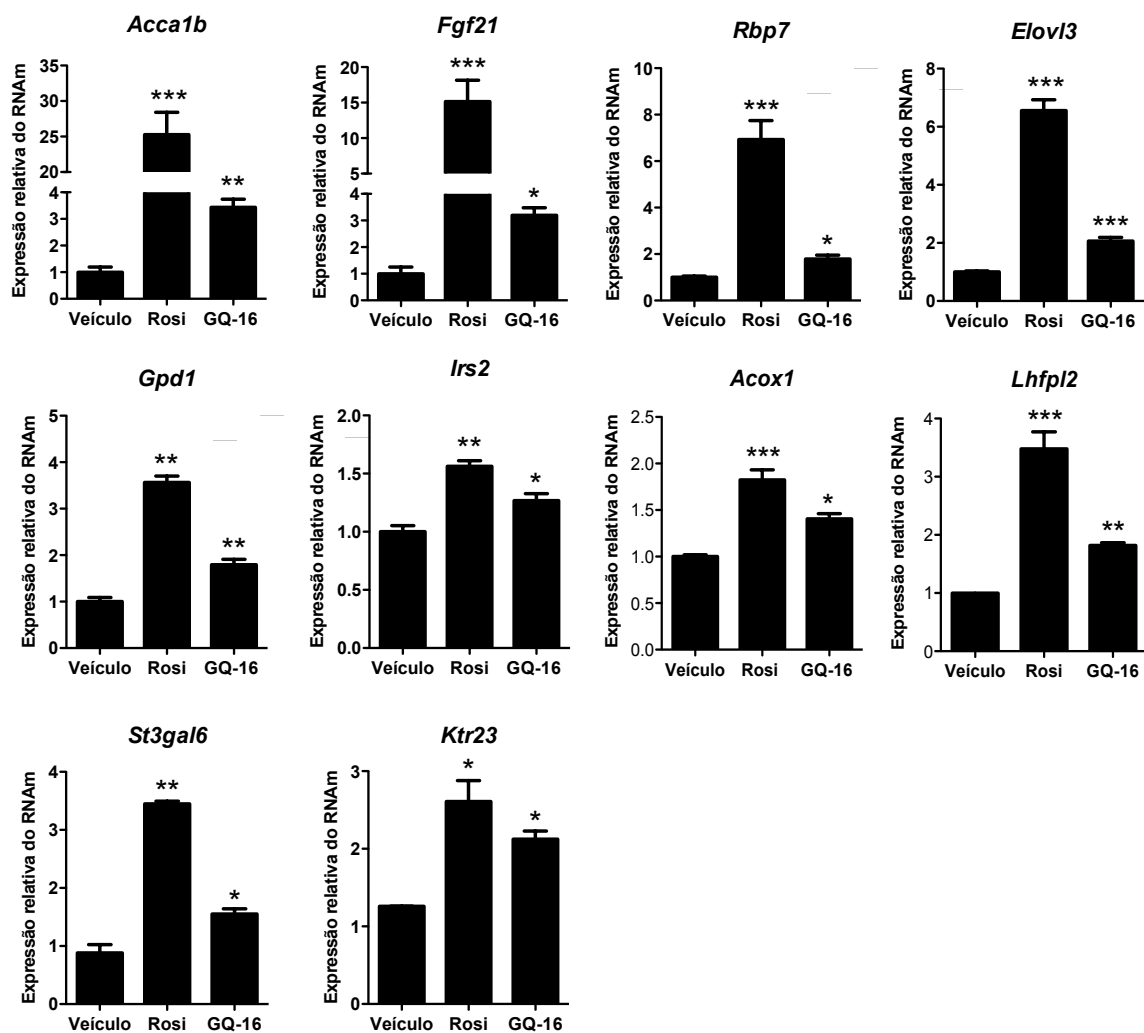
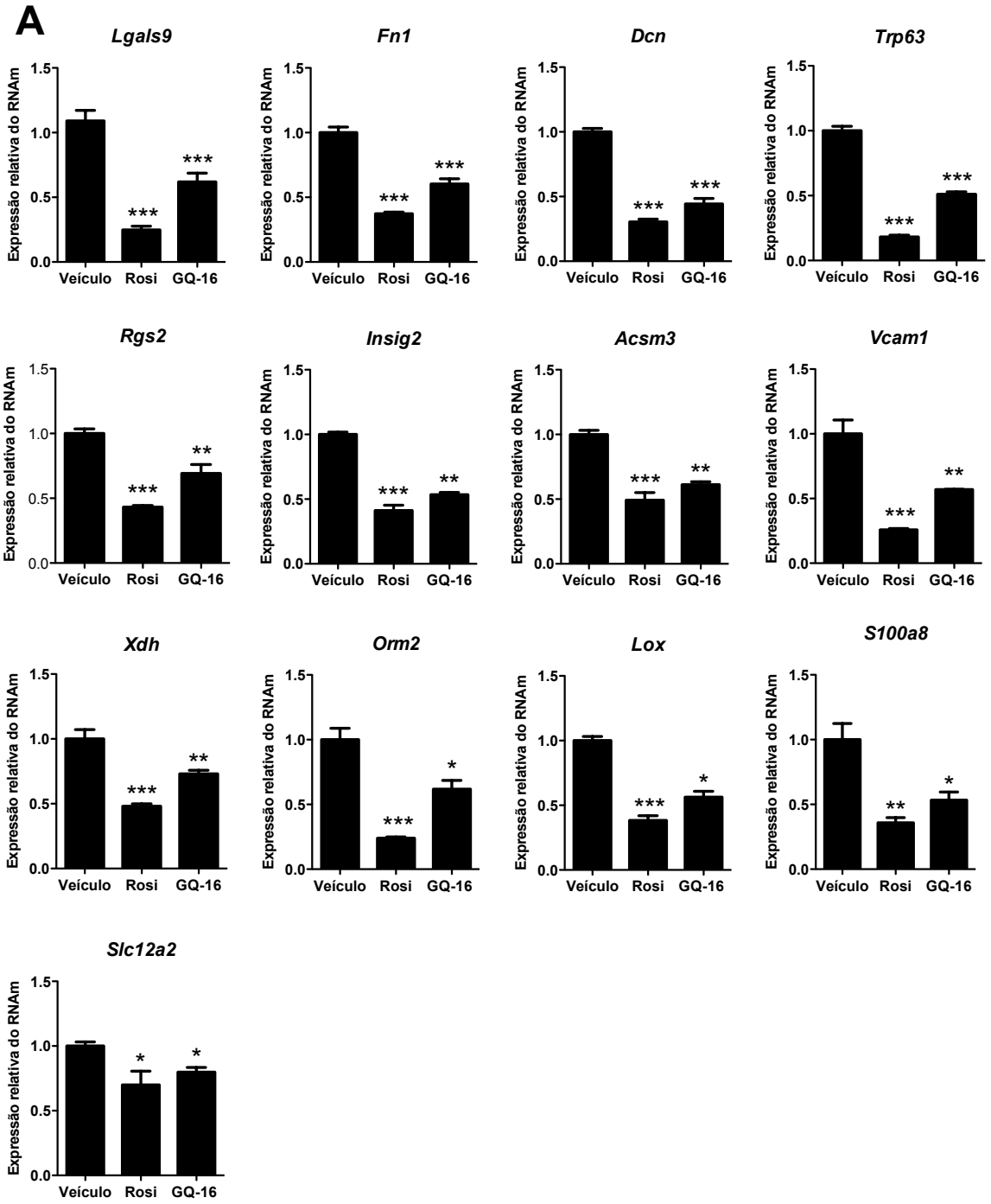


Figura 18. Genes com expressão aumentada em resposta ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16. Genes que mostraram alteração na expressão em resposta ao tratamento com rosiglitazona e/ou GQ-16 $\geq 1,5$ vezes e com valor de $p \leq 0,05$ foram analisados por PCR quantitativa em tempo real. Os dados são apresentados com vezes de ativação em relação ao veículo (DMSO). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Tabela 4 - Genes com expressão aumentada em resposta ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16.

Símbolo	Nome	Função
Acaa1b	Acetil coenzima A acetiltransferase 1B (<i>Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1B</i>)	Enzima com propriedade aciltransferase que participa da oxidação peroxissomal dos ácidos graxos (239) (240)
Fgf21	Fator 21 de crescimento de fibroblasto (<i>Fibroblast growth factor 21</i>)	Membro da família de fatores de crescimento de fibroblastos envolvido no metabolismo lipídico, homeostase da glicose e positivamente relacionado com a sensibilidade insulínica (241). Sua expressão relaciona-se com o amarronzamento do tecido adiposo branco (242)
Rbp7	Proteína 7 ligadora de retinol (<i>Retinol binding protein 7</i>)	Membro da família de proteínas de ligação ao retinol relacionada com o metabolismo lipídico (243). Sua expressão relaciona-se com a obesidade (244)
Elovl3	Alongamento de ácidos graxos de cadeia muito longa (<i>Elongation of very long chain fatty acids-like 3</i>)	Enzima que estimula a adipogênese e o acúmulo intracelular de lipídeos (245)
Gpd1	Glicerol 3 fosfato desidrogenase 1 (<i>glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1</i>)	Membro da família glicerol-3-fosfato desidrogenase que participa do metabolismo dos carboidratos e dos lipídeos (230)
Irs2	Substrato 2 receptor de insulina (<i>Insulin receptor substrate 2</i>)	Proteína citoplasmática que media os efeitos da insulina (230). Estimula a diferenciação por aumentar a expressão do C/EBP α e PPAR γ (246)
Acox1	Acil coenzima A oxidase 1 (<i>Acyl-Coenzyme A oxidase 1</i>)	Membro da família acetil coenzima A que participa da beta oxidação de ácidos graxos nos peroxissomos (230). Sua expressão encontra-se aumentada na adipogênese (247)
Lhfp12	Parceiro semelhante 2 de Lipoma HMGIC (<i>Lipoma HMGIC fusion partner-like 2</i>)	Proteína de função desconhecida com expressão elevada em alguns tipos de câncer (230) (248)
Krt23	Queratina 23 (<i>Keratin 23</i>)	Proteína com função estrutural localizada nos filamentos intermediários (230)
St3gal6	ST3 beta galactosidade alfa 2,3 sialiltransferase 6 (<i>ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6</i>)	Enzima que transfere o ácido siálico (sialização) para glicolipídeos e glicoproteínas (230)



Continua

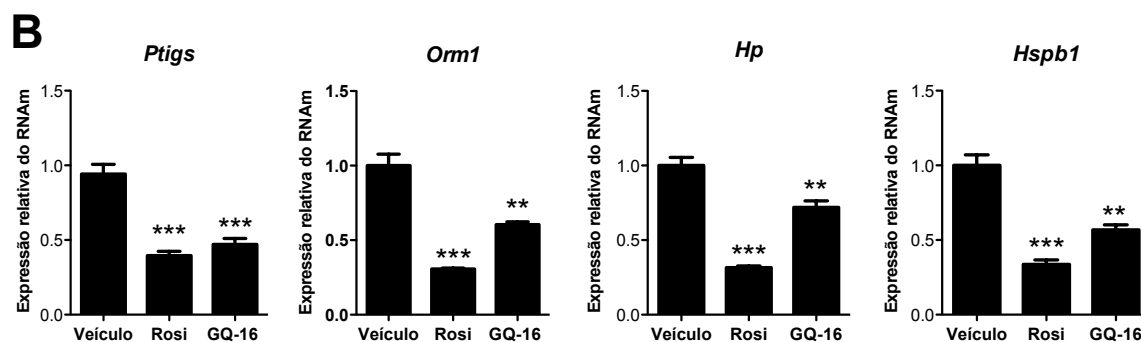


Figura 19. Genes com expressão diminuída em resposta ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16. (A) Genes regulados pela rosiglitazona e GQ-16 no microarranjo e (B) Genes que não mostraram ser regulados por GQ-16 no microarranjo, mas foram reprimidos na avaliação por PCR em tempo real. Genes que mostraram alteração na expressão em resposta ao tratamento com rosiglitazona e/ou GQ-16 $\geq 1,5$ vezes e com valor de $p \leq 0,05$ foram analisados por PCR quantitativa em tempo real. Os dados são apresentados como vezes de ativação dos ligantes em relação ao veículo (DMSO). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Tabela 5 - Genes com expressão diminuída em resposta ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16.

Símbolo	Nome	Função
Lgals9	Lecitina solúvel 9 ligadora de galactose (<i>Lectin, galactose binding, soluble 9</i>)	Membro da família das lecitinas relacionada com a resposta inflamatória (249). Sua concentração sérica encontra-se elevada em animais (250) e humanos diabéticos (251)
Fn1	Fibronectina 1 (<i>Fibronectin 1</i>)	Glicoproteína envolvida na migração de células inflamatórias (230). Sua concentração plasmática correlaciona-se com a obesidade (252)
Dcn	Decorina (<i>Decorin</i>)	Proteoglicana relacionada à inibição da proliferação de pré-adipócitos (253). Atua como um receptor para a resistina em células mesenquimais (254)
Trp63	Proteína 63 relacionada à transformação (<i>transformation related protein 63</i>)	Membro da família p53 de fatores transcricionais envolvido no desenvolvimento e resposta celular ao estresse (230)
Rgs2	Regulador 2 da proteína G sinalizadora (<i>regulator of G-protein signaling 2</i>)	Membro da família reguladora da proteína G (230). Sua expressão encontra-se aumentada no início e reduzida nos estágios finais da adipogênese (255). O polimorfismo C1114G está associado à obesidade (256)
Insig2	Gene 2 da insulina induzida (<i>Insulin induced gene 2</i>)	Proteína que bloqueia ativação de fatores que regulam enzima lipolíticas (230). Sua expressão encontra-se elevada na adipogênese (257). O polimorfismo rs7566605 associa-se à obesidade (258)

Tabela 5 - Genes com expressão diminuída em resposta ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16.

Conclusão

Símbolo	Nome	Função
AcsM3	Membro 3 da família acil CoA sintetase de cadeia média (<i>Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3</i>)	Enzima que participa da biossíntese dos ácidos graxos (230). Sua expressão encontra-se elevada na adipogênese (259)
Vcam1	Molécula 1 de adesão celular vascular (<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>)	Citocina pró-inflamatória relacionada ao recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório (260). Está relacionada ao desenvolvimento da arteriosclerose (261) (262)
Xdh	Xantina desidrogenase (<i>Xanthine dehydrogenase</i>)	Membro da família xantina desidrogenase expressa no início da adipogênese e correlacionada com aumento da massa adiposa em camundongos (263)
Orm2	Orosomucoide 2 (<i>Orosomucoid 2</i>)	Proteína inflamatória da fase aguda (230) (264)
Lox	Lisil oxidase (<i>Lysyl oxidase</i>)	Enzima extracelular que promove a ligação entre colágeno e elastina (230). Sua expressão é elevada do início e reduzida no estágios finais da adipogênese (265)
S100a8	Proteína A8 ligadora de cálcio S100 (<i>S100 calcium binding protein A8</i>)	Proteína envolvida na regulação do ciclo e diferenciação celular que pode atuar como uma citocina pró-inflamatória (230). Sua expressão relacionada com adiposidade visceral (266) e é reprimida por agonistas de PPAR γ (267)
Slc12a2	Membro 2 família de carreadores solutos 12 (<i>Solute carrier family 12, member 2</i>)	Proteína que medeia o transporte e reabsorção de sódio e cloreto (230)
Ptgs	Prostaglandina I2 sintase (<i>Prostaglandin I2 synthase</i>)	Enzima que cataliza a conversão da prostaglandina em prostaciclina (230). Sua expressão encontra-se elevada no tecido adiposo visceral (268)
Orm1	Orosomucoide 1 (<i>Orosomucoid 1</i>)	Imunomodulador induzido por condições de estresse como infecções (230) (264)
Hp	Hepatoglobina (<i>Haptoglobin</i>)	Proteína que se liga à hemoglobina (230). Sua expressão aumenta no tecido adiposo em resposta a processos inflamatórios (269)
Hspb1	Proteína 1 de choque térmico (<i>Heat shock protein 1</i>)	Proteína do choque térmico ou estresse, envolvida na resposta celular ao estresse (230) (270)

5.6.3 Genes com Expressão Modificada Exclusivamente em Resposta ao Tratamento com GQ-16

Alguns genes com expressão modificada exclusivamente em resposta ao tratamento com GQ-16, na avaliação por meio de microarranjo, também foram avaliados por PCR em tempo real. Como mostra a figura 20, nenhum gene selecionado foi validado como regulado somente pelo tratamento com GQ-16. A

PCR mostrou que os genes *Hbp1* (*high mobility group box transcription factor 1* - fator de transcrição 1 do grupo de caixa de alta mobilidade), *Ppm1l* (*protein phosphatase 1* - proteína fosfatase 1), *Cyb5r4* (*cytochrome b5 reductase 4* - citocromo b5 redutase 4), *Ptp4a2* (*protein tyrosine phosphatase 4a2* - proteína tirosina fosfatase 4a2), *Gulp1* (*engulfment adaptor PTB domain containing 1* - adaptador de englobamento contendo domínio PTB 1) e *Phf20l1* (*PHD finger protein 20-like* - proteína dedo 20 PHD) foram reprimidos por ambos os ligantes, rosiglitazona e GQ-16. Com exceção dos *Ppm1l* e *Cyb5r4*, nenhum dos genes avaliados tem relação conhecida com a adipogênese ou função adipocitária (Tabela 6).

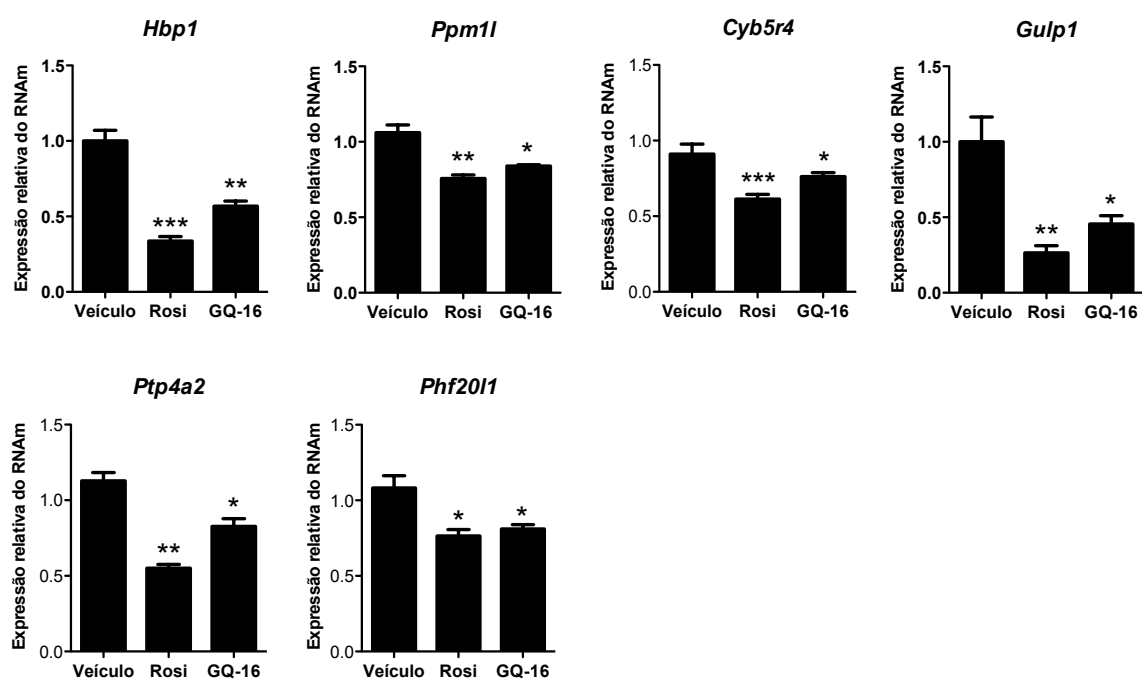


Figura 20. Genes com expressão modificada exclusivamente em resposta ao tratamento com GQ-16 no microarranjo, mas modificada também pela rosiglitazona na avaliação por PCR em tempo real. Genes que mostraram alteração na expressão em resposta ao tratamento com rosiglitazona e/ou GQ-16 $\geq 1,5$ vezes e com valor de $p \leq 0,05$ foram analisados por PCR quantitativa em tempo real. Os dados são apresentados como vezes de ativação dos ligantes em relação ao veículo (DMSO). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Tabela 6 - Genes com expressão modificada exclusivamente em resposta ao tratamento com GQ-16 no microarranjo, mas modificada também pela rosiglitazona na avaliação por PCR em tempo real.

Símbolo	Nome	Função
Hbp1	Fator de transcrição 1 do grupo de caixa de alta mobilidade (<i>High mobility group box transcription factor 1</i>)	Proteína inibidora do ciclo celular (230)
Ppm1l	Proteína fosfatase 1 (<i>protein phosphatase 1 (formerly 2C)-like</i>)	Proteína com atividade fosfatase envolvida em vários processos celulares (230) e associado à obesidade (271)
Cyb5r4	Citocromo b5 redutase 4 (<i>cytochrome b5 reductase 4</i>)	Proteína com atividade redutase (230). Sua mutação e deleção relaciona-se a lipodistrofia e diabetes (272) (273)
Ptp4a2	Proteína tirosina fosfatase 4a2 (<i>Protein tyrosine phosphatase 4a2</i>)	Proteína da classe das tirosinas fosfatases que atuam como moléculas sinalizadoras envolvidas em vários processos celulares (230)
Gulp1	GULP, adaptador de englobamento domínio PTB contendo 1 (<i>GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1</i>)	Proteína envolvida na apoptose e transporte de lipídeos (230)
Phf201l	Proteína dedo 20 PHD (<i>PHD Finger protein 20-like 1</i>)	Molécula ligadora de íons e proteínas com função desconhecida <i>in vivo</i> (230)

5.6.4 Genes com Expressão Modificada de Modo Oposto em Resposta ao Tratamento com Rosiglitazona e GQ-16

Entre os genes que apresentaram resposta oposta ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16 no microarranjo, apenas dois, *Gyk* (*glycerol kinase* - glicerol quinase) e *Tnfrsf21* (*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a* - membro 12a da família de receptores do fator de necrose tumoral), mostraram ser responsivos a pelo menos um dos tratamentos na avaliação por PCR em tempo real. Ambos foram ativados exclusivamente pela rosiglitazona (Figura 21). Nenhum gene exibindo resposta oposta ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16 no microarranjo foi validado por PCR em tempo real. Como mostra a tabela 7, *Gyk* está positivamente relacionado com a adipogênese e o *Tnfrsf12a* com o processo apoptótico.

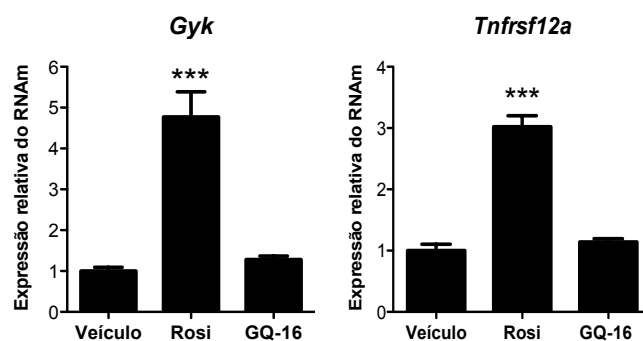


Figura 21. Genes com expressão modificada de modo oposto em resposta ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16 no microarranjo, mas modificada exclusivamente pela rosiglitazona na avaliação por PCR em tempo real. Genes que mostraram alteração na expressão em resposta ao tratamento com rosiglitazona e/ou GQ-16 ≥ 1.5 vezes e com valor de $p \leq 0,05$ foram analisados por PCR quantitativa em tempo real. Os dados são apresentados como vezes de ativação em relação ao veículo (DMSO).*** $p \leq 0,001$.

Tabela 7 - Genes com expressão modificada de modo oposto em resposta ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16 no microarranjo, mas modificada exclusivamente pela rosiglitazona na avaliação por PCR em tempo real.

Símbolo	Nome	Função
Gyk	Glicerol quinase (<i>Glycerol kinase</i>)	Enzima chave na regulação da captação e metabolismo do glicerol (230). Está positivamente relacionada com a adipogênese (274)
Tnfrsf12a	Membro 12a da família de receptores do fator de necrose tumoral (<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a</i>)	Membro da família de receptores do fator de necrose tumoral relacionado com o processo apoptótico (230)

5.7 EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE GQ-16 SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA EM ADIPÓCITOS MADUROS

A seguir, o efeito do GQ-16 nas concentrações de 10^{-8} a 10^{-5} M foi avaliado em adipócitos maduros. Para essa avaliação, foram selecionados alguns genes ativados ou reprimidos na avaliação por microarranjo e validados pela PCR em tempo real. Como mostrado nas figuras 22 e 23, o tratamento com GQ-16 exerceu efeito tanto ativador quanto repressor da expressão gênica somente na concentração mais elevada (10^{-5} M), diferente da rosiglitazona, que mostrou efeito significativo mesmo nas menores concentrações.

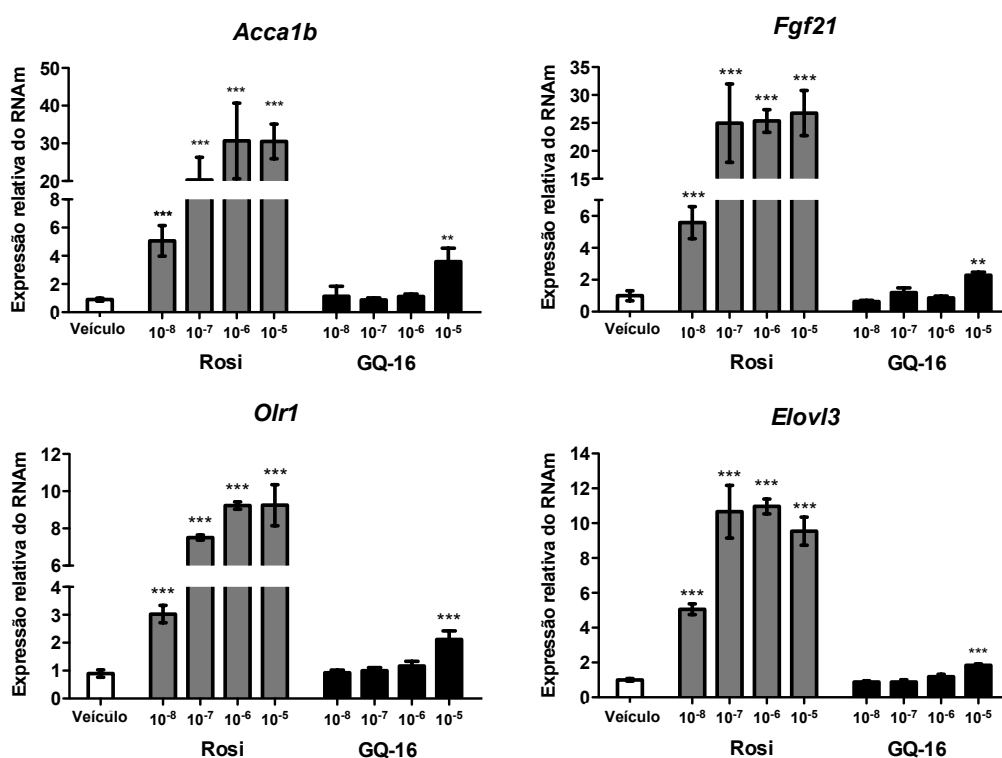


Figura 22. Efeito de concentrações crescentes de GQ-16 e rosiglitazona sobre a expressão de genes ativados, em adipócitos maduros. Células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com insulina 167 nM, dexametasona 1 μ M e isobutimetilxantina 0,5 mM por 72 horas, mantidas em meio de cultura com insulina 167 nM e dexametasona 1 μ M por 4 dias adicionais e tratadas com DMSO, rosiglitazona ou GQ-16 nas concentrações de 10^{-8} a 10^{-5} M por 24 horas. Após o tratamento as células foram coletadas e a expressão do RNAm do *Acca1b*, *Fgf21*, *Olr1* e *Elovl3* foi avaliada por PCR quantitativa em tempo real. Os dados são apresentados como vezes de ativação dos ligantes em relação ao veículo (DMSO). ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

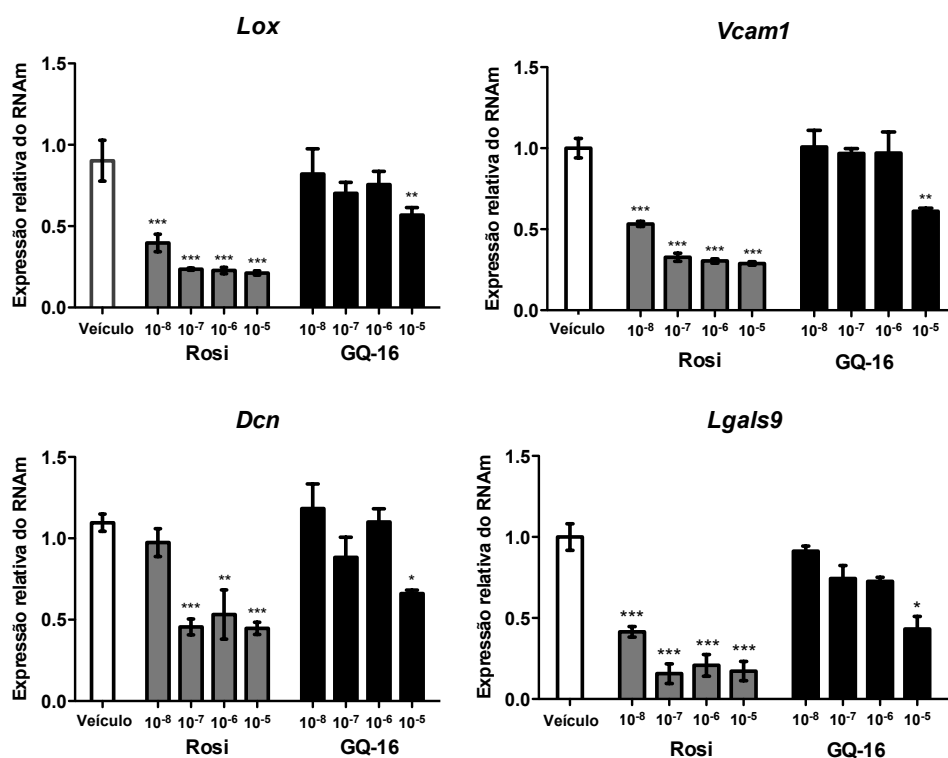


Figura 23. Efeito de concentrações crescentes de GQ-16 e rosiglitazona sobre a expressão de genes reprimidos, em adipócitos maduros. Células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com insulina 167 nM, dexametasona 1 μ M e isobutimetilxantina 0,5 mM por 72 horas, mantidas em meio de cultura com insulina 167 nM e dexametasona 1 μ M por 4 dias adicionais e tratadas com DMSO, rosiglitazona ou GQ-16 nas concentrações de 10^{-8} a 10^{-5} M por 24 horas. Após o tratamento as células foram coletadas e a expressão do RNAm do *Lox*, *Vcam1*, *Dcn* e *Lgals9* foi avaliada por PCR quantitativa em tempo real. Os dados são apresentados como vezes de ativação dos ligantes em relação ao veículo (DMSO). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

5.8 EFEITO COMPARATIVO DO GQ-16 E OUTROS AGONISTAS PARCIAIS DO PPAR γ SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA EM ADIPÓCITOS MADUROS

O efeito do GQ-16 sobre alguns genes ativados ou reprimidos na avaliação por microarranjo e validados por PCR em tempo real também foi comparado ao de outros agonistas parciais de PPAR γ . Como mostrado nas Figuras 24 e 25, GQ-16 possui efeito similar ao dos agonistas parciais MRL24 e SR1664 sobre a expressão dos genes avaliados, tanto sobre os ativados quanto os reprimidos.

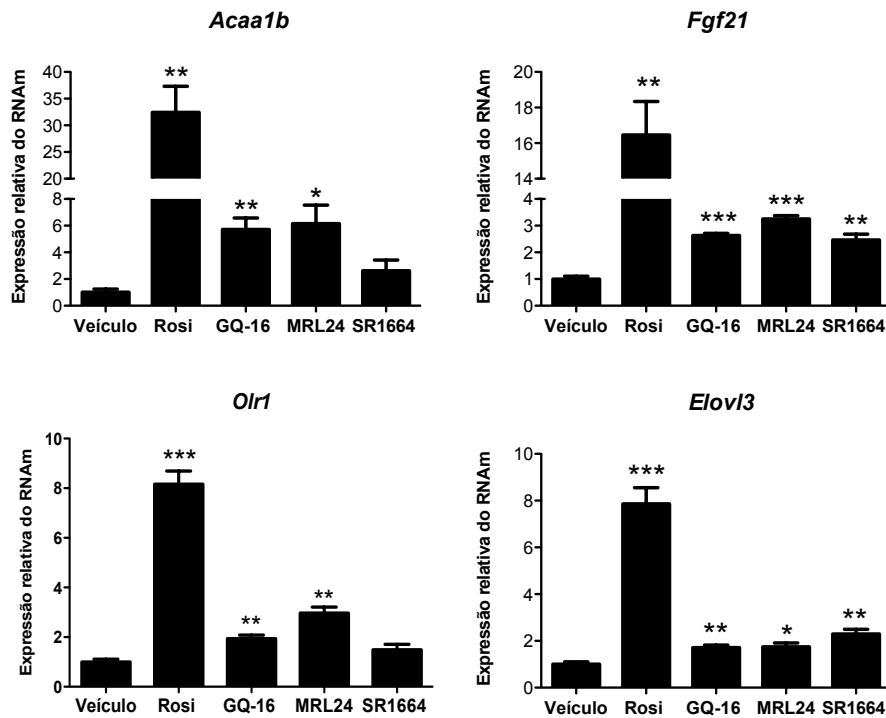


Figura 24. Comparação do efeito do GQ-16, MRL24 e SR1664 sobre a expressão de genes ativados, em adipócitos maduros. Células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com insulina 167 nM, dexametasona 1 μ M e isobutilmetilxantina 0,5 mM por 72 horas, mantidas em meio de cultura com insulina 167 nM e dexametasona 1 μ M por 4 dias adicionais e tratadas com DMSO, rosiglitazona 10^{-7} M, GQ-16 10^{-5} M, MRL24 10^{-5} M ou SR1664 10^{-5} M por 24 horas. Após o tratamento as células foram coletadas e a expressão do RNAm do *Acaa1b*, *Fgf21*, *Olr1* e *Elovl3* foi avaliada por PCR quantitativa em tempo real. Os dados são apresentados como vezes de ativação dos ligantes em relação ao veículo (DMSO). * $p \leq 0,5$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

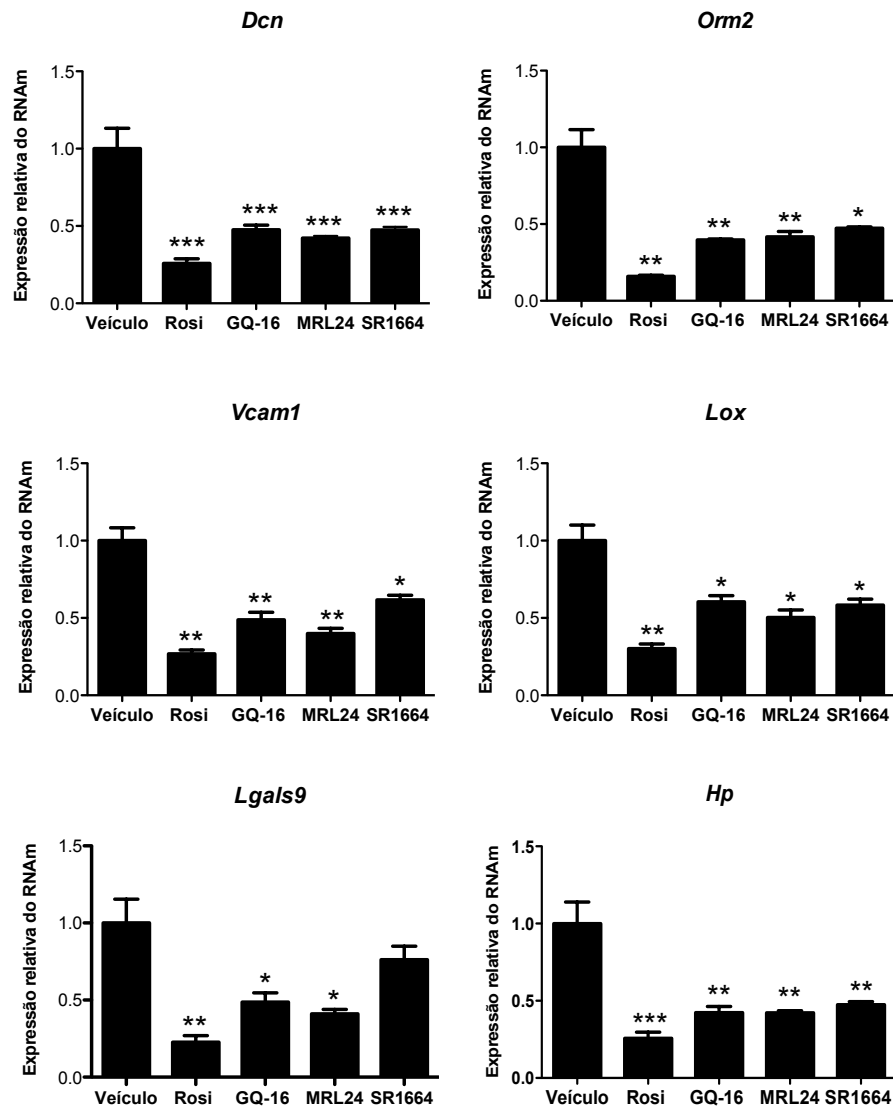


Figura 25. Comparação do efeito do GQ-16, MRL24 e SR1664 sobre a expressão de genes reprimidos, em adipócitos maduros. Células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com insulina 167 nM, dexametasona 1 μ M e isobutilmetilxantina 0,5 mM por 72 horas, mantidas em meio de cultura com insulina 167 nM e dexametasona 1 μ M por 4 dias adicionais e tratadas com DMSO, rosiglitazona 10^{-7} M, GQ-16 10^{-5} M, MRL24 10^{-5} M ou SR1664 10^{-5} M por 24 horas. Após o tratamento as células foram coletadas e a expressão do RNAm do *Dcn*, *Orm2*, *Vcam1*, *Lox*, *Lgals9* e *Hp* foi avaliada por PCR quantitativa em tempo real. Os dados são apresentados com vezes de ativação dos ligantes em relação ao veículo (DMSO). * $p \leq 0,5$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

5.9 EFEITO DA MUTAÇÃO C285S SOBRE A ATIVAÇÃO DO PPAR γ

Considerando que o GQ-16, assim como alguns lipídeos endógenos fazem ligação covalente com a cisteína 285 do PPAR γ (160) e que essa ligação é fundamental para a atividade transcricional do PPAR γ mediada por esses compostos (161) (162), decidiu-se investigar o papel dessa ligação na atividade do PPAR γ induzida pelo GQ-16.

Para tanto, foi realizada a substituição da cisteína 285 por uma serina (C285S) no plasmídeo quimérico GAL4-PPAR γ , que foi utilizado em ensaios de transfecção transiente e gene repórter.

Nesse ensaio, células HeLa foram transfectadas com cDNA do PPAR γ selvagem (GAL4-PPAR γ), utilizado como controle positivo, ou com o cDNA do PPAR γ com a mutação C285S (GAL4-PPAR γ C285S) e tratadas com rosiglitazona (controle positivo) ou GQ-16 na concentração de 10 μ M por 24 horas.

Como mostrado na Figura 26, a mutação C285S aboliu a atividade transcricional do PPAR γ induzida pelo GQ-16, mas a resposta ao tratamento com a rosiglitazona não foi alterada.

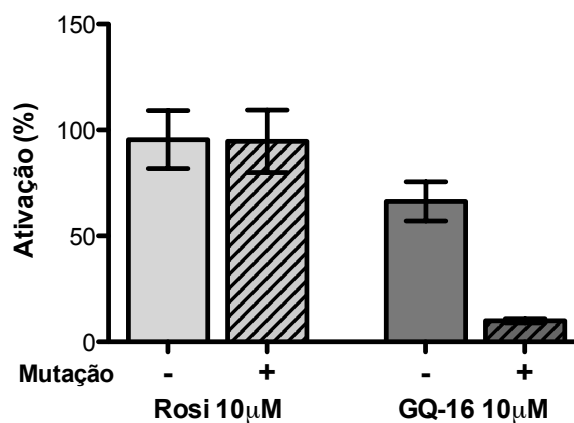


Figura 26. Ensaio de transfecção e gene repórter com o GAL4-PPAR γ C285S. Células HeLa foram transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do GAL4-PPAR γ ou o cDNA do GAL4-PPAR γ C285S, o elemento responsivo GAL4 fusionado ao gene repórter da luciferase e o gene repórter da renilla luciferase e tratadas com DMSO (veículo, controle negativo), rosiglitazona ou GQ-16 10 μ M durante 24 horas. A atividade da luciferase foi normalizada pela atividade da renilla luciferase e representada como porcentagem de ativação do plasmídeo com a mutação comparada com a do plasmídeo selvagem (considerada 100%). A figura representa os resultados de três experimentos independentes em triplicata.

6 DISCUSSÃO

O GQ-16 pertence a uma classe de agonistas parciais de PPAR γ com eficiente atividade sensibilizadora da insulina e que não está associada aos efeitos adversos de ganho de peso e edema induzidos pelo uso das TZDs (28).

Nos ensaios de gene repórter com células HeLa, GQ-16 induziu aproximadamente um terço da ativação máxima induzida pela rosiglitazona, corroborando com o estudo de Amato e colaboradores, no qual o GQ-16 apresentou atividade agonista parcial no PPAR γ , em células U937, além de ter apresentado menor afinidade pelo receptor. (28). O reduzido efeito adipogênico do GQ-16 previamente mostrado por Amato e colaboradores (28) também foi confirmado. Em células 3T3-L1, o tratamento com GQ-16 induziu menor acúmulo intracelular de lipídeos comparado com a rosiglitazona.

Objetivando melhor compreensão dessa característica do GQ-16, realizou-se a avaliação da expressão de genes envolvidos na adipogênese, durante o processo de diferenciação. Os resultados revelaram que o reduzido potencial adipogênico está, provavelmente, relacionado à menor ativação de genes relacionados com a diferenciação.

O tratamento com GQ-16 durante o processo de adipogênese induziu de forma menos intensa a expressão dos genes *Cebpa*, (que, juntamente com o *Ppar γ* é responsável pela aquisição do fenótipo maduro do adipócito (275)) e da *Adipoq* *Fabp4* e *Lpl*, que estão positivamente relacionados com a adipogênese e diretamente envolvidos no metabolismo lipídico e da glicose e acúmulo intracelular de lipídeos (276) (277) (278).

Embora a atividade do GQ-16 tivesse sido anteriormente avaliada por Amato e colaboradores por meio de ensaios de transativação e de adipogênese em cultura de células, seu efeito sobre a expressão de um conjunto de genes relacionados à função das células adiposas não havia sido explorado. Além disso, em seu trabalho, Amato e colaboradores mostraram que o GQ-16 exerce sua atividade sensibilizadora da insulina sem induzir ganho de peso relacionado a edema ou

desenvolvimento da massa adiposa. Dessa forma, o presente trabalho também tem por objetivo contribuir para a compreensão desses efeitos observados *in vivo*.

A investigação dos efeitos do GQ-16 em adipócito maduros, foco desse trabalho, foi iniciada com a avaliação da expressão dos mesmos genes investigados no processo de diferenciação, ou seja, *Ppar γ* , *Cebpa*, *Fabp4* e *Lpl*. Os resultados dessa avaliação mostraram que, nesse contexto, tanto a rosiglitazona quanto o GQ-16 exerceram pouco ou nenhum efeito sobre a expressão desses genes.

Interessantemente, a expressão do *Ppar γ* foi reprimida de forma significativa pela rosiglitazona, resultado também encontrado por Wang e colaboradores, que trataram adipócitos 3T3-L1 completamente diferenciados com rosiglitazona por 48 horas (279). Nesse trabalho, também foi observada redução do conteúdo lipídico dos adipócitos, sugerindo que a rosiglitazona poderia exercer um efeito lipolítico em células completamente diferenciadas (279). Esse aspecto que não foi avaliado nesse trabalho.

Considerando o reduzido efeito observado pelo tratamento com a rosiglitazona e o GQ-16 em adipócitos maduros, decidiu-se investigar o efeito do GQ-16 sobre a expressão do *Olr1*, gene que codifica o receptor de lipoproteína oxidada 1, pouco expresso em adipócitos maduros em condições basais, mas altamente induzido pelo tratamento com rosiglitazona (229).

Em concordância com o descrito na literatura, a rosiglitazona aumentou a expressão do *Olr1* mais de 10 vezes após 24 horas de tratamento, enquanto o GQ-16 induziu 2,6 vezes. A avaliação da expressão após 6, 12, 24, 36 e 48 horas de tratamento permitiu observar que a rosiglitazona induz um aumento progressivo na expressão desse gene, mais pronunciado nas primeiras 12 horas, enquanto o GQ-16 induz uma expressão constante ao longo do tempo.

Após essas análises iniciais, realizou-se a avaliação do perfil de expressão gênica modulado pelo tratamento com GQ-16 em adipócitos 3T3-L1 por meio da técnica de microarranjo. Para definição do tempo de tratamento, utilizou-se com referência o padrão de expressão do *Olr1*. Como a expressão induzida pelo tratamento com GQ-16 foi constante, com um pequeno pico de ativação não

significativo com 12 horas, optou-se por realizar o tratamento dos adipócitos por um período de 24 horas. Foram considerados diferentemente regulados pelos tratamentos, os genes cuja expressão foi alterada, positiva ou negativamente, mais ou 1,5 vezes e com o valor de p maior ou igual a 0,05.

Foram identificados 1156 genes com expressão diferencialmente induzida pelo tratamento com rosiglitazona e 89 pelo tratamento com GQ-16. Para melhor análise desses resultados, esses genes foram agrupados em quatro categorias: (i) genes regulados exclusivamente pelo tratamento com rosiglitazona, (ii) genes regulados exclusivamente pelo tratamento com GQ-16, (iii) genes regulados de forma similar pelo tratamento com rosiglitazona e GQ-16 e (iv) genes que mostraram respostas opostas ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16. A validação do resultado do microarranjo por PCR em tempo real não confirmou, contudo, a existência de genes pertencentes às duas últimas categorias, ou seja, regulados exclusivamente pelo tratamento com GQ-16 ou que mostraram respostas opostas ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16. Os genes inicialmente identificados como responsivos exclusivamente ao GQ-16 foram, na avaliação por PCR, regulados de forma similar por ambos os ligantes e entre os que mostraram respostas opostas, apenas dois, *Gyk* e *Tnfrsf12a*, responderam a pelo menos um dos tratamentos, no caso, foram ativados pela rosiglitazona.

A identificação, no microarranjo, de genes com expressão diferencialmente induzida pelo tratamento com rosiglitazona e GQ-16, não validada pela PCR em tempo real deve-se, provavelmente, a limitações na técnica de microarranjo. O microarranjo é uma ferramenta que permite avaliar a expressão de muitos genes simultaneamente, mas possui limitações relacionadas, entre outros aspectos, à quantidade de sondas de um determinado gene no *chip*, existência de variantes na amostra que podem não encontrar sondas correspondentes e ocorrência de ligações inespecíficas entre os oligonucleotídeos da amostra e os do *chip* de DNA (280).

No caso específico dos genes inicialmente identificados como regulados exclusivamente pelo tratamento com GQ-16, a avaliação dos dados originais (apêndice C) revela que, em muitos casos, a diferença na expressão promovida pelos dois tratamentos foi pequena. Dessa forma, eles não foram identificados como regulados também pela rosiglitazona porque não atenderam ao critério de alteração

maior ou igual a 1,5 vezes na expressão, valor de p maior ou igual a 0,05 ou ambos os critérios.

Para fins de análise da função biológica, os genes validados por meio da PCR em tempo real podem ser incluídos em apenas duas categorias: (i) genes regulados exclusivamente pelo tratamento com rosiglitazona e (ii) genes regulados de forma similar pelo tratamento com rosiglitazona e GQ-16.

Entre os genes que responderam exclusivamente ao tratamento com rosiglitazona, o *Fgf10* (233), *Ppargc1a* (236), *Fabp5* (234) e *Gyk* (274), que estão positivamente relacionados com a adipogênese, foram ativados, enquanto o *Hes1*, que codifica um fator transcricional relacionado com a inibição da adipogênese *in vitro* e *in vivo*, foi reprimido (237) (238). Esses resultados estão de acordo com o grande potencial adipogênico exibido pela rosiglitazona.

Curiosamente, também foram ativados os genes *Cxcl1*, que codifica uma citocina pró-inflamatória envolvida no recrutamento e ativação dos neutrófilos (281), *Atf3*, um fator de transcrição induzido por estresse fisiológico (231) que inibe a adipogênese (232) e o *Tnfrsf12a*, que codifica um receptor do TNF relacionado com o processo apoptótico (230).

O efeito da rosiglitazona e GQ-16 sobre a expressão do *Cxcl1* pode estar relacionado à capacidade do PPAR γ ativado se ligar a proteínas correpressoras, deixando "livre" o promotor dos genes inflamatórios, que são então transcritos. Um estudo em que a expressão dos correpressores transcricionais GPS2 e SMRT foi reprimida em culturas de adipócitos humanos, observou-se aumento da expressão de proteínas inflamatórias relacionadas à obesidade como a IL-8, MCP-1 e CXCL1 (282). Por outro lado, esse mecanismo não parece estar relacionado com a ativação do *Atf3* pela rosiglitazona e GQ-16. Esse fator transcricional interage com o PPAR γ reprimindo sua atividade transcricional e prevenindo sua ligação ao promotor de genes importantes para a adipogênese como o *Fabp4* (283). Contudo, uma vez induzido por LPS o ATF3, reprimiu a expressão do TNF α em macrófagos, exercendo um efeito antiinflamatório (284). Nenhum estudo em que agonistas de PPAR γ influenciaram a expressão do *Tnfrsf12a* foi encontrado. Sua expressão foi correlacionada com a obesidade mórbida (285).

Os genes regulados de forma similar pelo tratamento com rosiglitazona e GQ-16 também incluem genes ativados e genes reprimidos. Entre os genes ativados, a maioria está envolvida no processo de adipogênese e com o metabolismo lipídico e ou da glicose, como o *Acaa1b* (239) (240), *Fgf21* (241) (286) (287) *Rbp7* (243), *Elovl3* (245), *Gpd1* (288), *Irs2* (246) (289) (290) e o *Acox1* (247). *Acaa1b* (291), *Fgf21* (292) (293) (294), *Rbp7* (243), *Elovl3* (245), *Gpd1* (288) e *Irs2* (295), já foram descritos com alvos diretos de PPAR γ induzidos em adipócitos isolados ou no tecido adiposo branco em resposta a agonistas desse receptor.

Entre os genes reprimidos, a maioria está relacionada com a resposta inflamatória, obesidade e diabetes. Foram reprimidos *Orm1* e *Orm2*, que codificam proteínas inflamatórias da fase aguda (264) induzidas pelo tratamento com as interleucinas 1 e 6 (296), além do *Hp*, cuja expressão aumenta no tecido adiposo em resposta a processos inflamatórios (269). Também foram reprimidos *Trp63* (230), membro da família p53 de fatores transcricionais, e *Hspb1* (230) (270), que codifica a proteína 1 de choque térmico, envolvidos na resposta celular ao estresse. O gene *Dcn*, que codifica a decorina, proteoglicana relacionada à obesidade e DM2 (297) recentemente descrita como receptor para a resistina em células mesenquimais (254), também foi reprimido por ambos os ligantes.

Genes com expressão associada a distúrbios metabólicos também foram reprimidos. *Xdh* (263) e *Ppm1l* (271) já foram associados à obesidade. *Lgals9* correlaciona-se com a obesidade (252) e encontra-se aumentado tanto em animais (250) quanto em humanos diabéticos (251). *está envolvido na migração de células inflamatórias (230) e também correlaciona-se com a obesidade (252), sendo estimulado pelo TNF- α (298) e reprimido em resposta ao tratamento com rosiglitazona (299).*

Os genes *Vcam1* (300), *S100a8b* (266) e *Ptgis* (268), com expressão elevada no tecido adiposo visceral de humanos saudáveis (*Ptgis*) e obesos (*Vcam1* e *S100a8b*) também foram reprimidos por ambos os ligantes. *Vcam1* codifica uma proteína envolvida no recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório (260) e com o desenvolvimento da arteriosclerose (261) (262). *S100a8b* codifica uma proteína que pode atuar como citocina pró-inflamatória (230) e *Ptgis*, uma enzima que catalisa a conversão da prostaglandina em prostaciclina (230).

Curiosamente, genes com expressão elevada na adipogênese como *Insig2* (257) e *Acs3* (259) também foram reprimidos. *Acs3* codifica uma enzima que participa da biossíntese dos ácidos graxos (230) e *Insig2*, uma proteína do retículo endoplasmático cujo polimorfismo rs7566605 está associado à obesidade (258).

Alguns genes com expressão aumentada no início e reduzida ao final da adipogênese também foram reprimidos pelo tratamento do adipócito 3T3-L1 maduro com rosiglitazona e GQ-16. Embora não existam estudos com essa abordagem, a repressão de genes como o *Rgs2* (255) e *Lox* (265), na célula diferenciada, pode ser importante para a manutenção do fenótipo e das funções do adipócito maduro. Da mesma forma, é possível que a repressão do gene *Hbp1*, que codifica um inibidor do ciclo celular (230), e do *Gulp1*, envolvido no processo apoptótico (230), possa ter algum significado fisiológico no adipócito maduro.

Os genes *Lhpl2*, *Krt23*, *Slc12a2*, *Ptp4a2* e *Phf2011* foram diferencialmente regulados no microarranjo pelo tratamento com rosiglitazona ou GQ-16, e este comportamento foi validado pela PCR em tempo real. Entretanto, não foi encontrada, na literatura pesquisada, relação da função dos produtos destes genes com a adipogênese ou função adipocitária.

O resultado da validação dos dados do microarranjo foi consistente com a ideia de que o GQ-16 induz de forma pouco intensa a expressão de genes regulados positivamente pelo PPAR γ . Não foram identificados genes altamente responsivos ao tratamento com GQ-16. De forma similar, foram identificados poucos genes que responderam com intensidade semelhante ao tratamento com rosiglitazona e GQ-16, como o *Irs2* e *Acox1*. Por outro lado, o GQ-16 mostrou um eficiente efeito repressor sobre a expressão de vários genes. Foram validados vários genes proporcionalmente reprimidos pelo tratamento com a rosiglitazona e GQ-16 como *Fn1*, *Dcn*, *Insig2* e *Acs3*, por exemplo.

O reduzido efeito do GQ-16 sobre a atividade transcricional de genes regulados positivamente pelo PPAR γ pode estar relacionado ao recrutamento menos eficiente de coativadores transcricionais, como foi mostrado por Amato e colaboradores (28). Além disso, os genes ativados pelo GQ-16 podem ser sensíveis a outros mecanismos de ativação PPAR γ dependentes, incluindo bloqueio da

fosforilação da serina 273 (224) (301) e liberação de correpressores transcricionais (274).

Por outro lado, os mecanismos pelos quais o GQ-16 exerce eficiente regulação negativa da atividade transcricional de alguns genes não é tão claro. Enquanto a rosiglitazona reprime genes pró-inflamatórios por promover a sumoilação do PPAR γ e sua ligação a correpressores transcricionais no promotor desses genes (143), não está claro se o GQ-16 promove esse tipo de regulação negativa ou se outros mecanismos como a inibição da atividade do fator transcricional NF- κ B (302) (303) podem estar associados à sua ação repressora.

O efeito do GQ-16 sobre alguns genes regulados nos adipócitos também foi comparado ao de dois outros agonistas parciais de PPAR γ , o MRL24 e o SR1664. Semelhante ao GQ-16, esses compostos bloqueiam a fosforilação do PPAR γ mediada pela Cdk5 (28) (224) (202). Em cultura de células, assim como o GQ-16, SR1664 apresentou reduzido efeito adipogênico e induziu de forma pouco intensa a expressão de genes envolvidos no processo de diferenciação em adipócitos (28) (224). Em modelos animais, os três compostos mostraram efeito semelhante no aumento da sensibilidade à insulina e diferentemente do agonista total rosiglitazona, não induziram ganho peso associado à retenção de líquido ou acúmulo de gordura (28) (224) (223).

A avaliação da estrutura desses compostos sugere que essas semelhanças provavelmente não estão relacionadas ao modo de ligação ao LBD do PPAR γ , pois enquanto o GQ-16 e MRL24 adotam posição vertical mas não idênticas (28) (202), o SR1664 ocupa posição transversal, semelhante à da rosiglitazona (224). Além disso, enquanto o GQ-16 e o MRL24 estabilizam a hélice 12 de forma semelhante à rosiglitazona (28) (202), o SR1664 não estabiliza essa hélice e além disso, aumenta a mobilidade da hélice H11 (224).

A reanálise da estrutura cristalográfica do GQ-16 ligado ao LBD do PPAR γ mostrou a possibilidade de formação de uma ligação covalente com a cisteína 285, semelhante a alguns ligantes naturais desse receptor (304). Essa ligação e sua importância para a habilidade de ativação do PPAR γ pelo GQ-16 foram confirmadas pela mutação dessa cisteína, que levou à abolição do efeito ativador do GQ-16,

como mostrado ensaio de gene repórter. Contudo, essa ligação covalente não parece ser a responsável pelos efeitos do GQ-16 nos genes avaliados, pois considerando o modo de ligação ao LBD do PPAR γ , o MRL24 não se liga a essa cisteína (anexo A), mas regulara os genes avaliados de forma similar ao GQ-16.

Dessa forma, acredita-se que os efeitos que esses compostos apresentam sobre a sensibilidade insulínica esteja relacionada basicamente a duas propriedades. Em primeiro lugar, o agonismo parcial promove menor indução de genes associados à obesidade e resistência à insulina, provavelmente associada à menor capacidade de recrutar coativadores transcricionais (28) (224) (305). Em segundo lugar, os agonistas parciais bloqueiam a fosforilação do PPAR γ na serina 273 de forma semelhante os agonistas totais (28) (202), o que representa uma possível explicação para a observação de que ambos os tipos de agonistas apresentem efeitos comparáveis em modelos de resistência insulínica e diabetes.

O fato do GQ-16 reprimir de forma tão eficiente um grupo de genes relacionados à obesidade, inflamação e DM 2 sugere que esse efeito deveria ser explorado em um contexto onde a sensibilidade sistêmica à insulina pudesse ser avaliada. A resistência à insulina está associada à inflamação que por sua vez relaciona-se ao desenvolvimento tecido adiposo e os ligantes de PPAR γ podem reverter essa inflamação através da repressão de genes pró-inflamatórios em adipócitos (306) (307), macrófagos (308) (309) e outras células do sistema imune (310). Embora esse estudo não tenha sido conduzido na presença de estímulos inflamatórios, a comparação com dados da literatura fornece subsídios para afirmar que muitos dos genes reprimidos estão envolvidos no processo inflamatório relacionado à obesidade.

Analisados em conjunto, esses resultados podem ser importantes para a compreensão de como o GQ-16 e outros agonistas parciais de PPAR γ podem influenciar o início e estabelecimento da inflamação no tecido adiposo. Além disso, eles contribuem para a nova concepção de que o ganho de peso associado ao agonismo total não é realmente necessário para o efeito sensibilizador da insulina e que o efeito anti-inflamatório, resultado da ativação do PPAR γ no tecido adiposo provavelmente desempenha um papel crucial nesse processo.

7 SÍNTESE DOS RESULTADOS

GQ-16 apresentou atividade agonista parcial em PPAR γ .

GQ-16 promoveu acúmulo de lipídeos, em células 3T3-L1, significativamente menor quando comparado à rosiglitazona.

GQ-16 induz de forma menos intensa, comparado à rosiglitazona, a expressão de genes relacionados à adipogênese, durante o processo de diferenciação.

Semelhante à rosiglitazona, GQ-16 apresentou pouco ou nenhum efeito sobre a expressão de genes relacionados à adipogênese, em adipócitos maduros.

GQ-16 induziu a expressão do RNAm do *Olr1* de forma menos intensa quando comparado à rosiglitazona, porém de forma constante ao longo do tempo.

GQ-16 promoveu, em adipócitos maduros, a ativação de genes relacionados ao metabolismo lipídico e da glicose, de forma menos intensa quando comparado à rosiglitazona.

GQ-16 promoveu, em adipócitos maduros, a repressão de genes relacionados ao processo inflamatório, de forma similar à rosiglitazona.

GQ-16 exerceu efeito ativador ou repressor da expressão gênica somente na concentração de 10 μ M (maior concentração utilizada).

GQ-16 apresentou efeito similar ao do MRL24 e SR1664 sobre a expressão dos genes avaliados (ativados e reprimidos).

A ligação covalente entre o GQ-16 e a cisteína 285 do PPAR γ é fundamental para a atividade transcricional do PPAR γ mediada pelo GQ-16, que foi abolida pela mutação desse aminoácido.

8 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que, em adipócitos maduros como o 3T3-L1, agonistas parciais como o GQ-16, embora modulem a expressão gênica de forma bem diferenciada da rosiglitazona, promovem a repressão da transcrição de genes inflamatórios regulados pelo PPAR γ , de forma similar à rosiglitazona, sem induzir a expressão de genes relacionados à adipogênese. Esses achados podem explicar, em parte, os efeitos do GQ-16 em camundongos submetidos à dieta rica em lipídeos, onde esse ligante melhorou a sensibilidade à insulina, sem promover ganho de peso. Novos estudos são necessários para analisar se as semelhanças entre a regulação negativa da transcrição promovida pelo GQ-16 e rosiglitazona, no tecido adiposo, estão envolvidos no efeito terapêutico do GQ-16.

REFERÊNCIAS

1. WHO. Obesity and Overweight. World Health Organization. 2015.
2. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *International journal of obesity*. 2008;32(9):1431-7.
3. ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. 2015.
4. Wells JC, Siervo M. Obesity and energy balance: is the tail wagging the dog? *European journal of clinical nutrition*. 2011;65(11):1173-89.
5. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet*. 2005;366(9492):1197-209.
6. WHO. Global Health Observatory (GHO). World Health Organization. 2008.
7. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444(7121):840-6.
8. 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*. 2004;27(5):1047-53.
9. IDF. International Diabetes Federation. 2015.
10. Cheng AY, Fantus IG. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2005;172(2):213-26.
11. Parulkar AA, Pendergrass ML, Granda-Ayala R, Lee TR, Fonseca VA. Nonhypoglycemic effects of thiazolidinediones. *Annals of internal medicine*. 2001;134(1):61-71.
12. Kalaitzidis RG, Sarafidis PA, Bakris GL. Effects of thiazolidinediones beyond glycaemic control. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(5):529-36.

13. Khan MA, St Peter JV, Xue JL. A prospective, randomized comparison of the metabolic effects of pioglitazone or rosiglitazone in patients with type 2 diabetes who were previously treated with troglitazone. *Diabetes care*. 2002;25(4):708-11.
14. Tang WH, Francis GS, Hoogwerf BJ, Young JB. Fluid retention after initiation of thiazolidinedione therapy in diabetic patients with established chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;41(8):1394-8.
15. Guan Y, Hao C, Cha DR, Rao R, Lu W, Kohan DE, et al. Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPARgamma stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption. *Nature medicine*. 2005;11(8):861-6.
16. Niemeyer NV, Janney LM. Thiazolidinedione-induced edema. *Pharmacotherapy*. 2002;22(7):924-9.
17. Singh S, Loke YK, Furberg CD. Thiazolidinediones and heart failure: a teleo-analysis. *Diabetes care*. 2007;30(8):2148-53.
18. Hernandez AV, 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*. 2011;11(2):115-28.
19. Schwartz AV, Sellmeyer DE, Vittinghoff E, Palermo L, Lecka-Czernik B, Feingold KR, et al. Thiazolidinedione use and bone loss in older diabetic adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(9):3349-54.
20. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, Yamamoto M, Yamauchi M, Kurioka S, et al. Baseline atherosclerosis parameter could assess the risk of bone loss during pioglitazone treatment in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2010;21(12):2013-8.

21. Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *The New England journal of medicine*. 2007;356(24):2457-71.
22. Lewis JD, Ferrara A, Peng T, Hedderson M, Bilker WB, Quesenberry CP, Jr., et al. Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: interim report of a longitudinal cohort study. *Diabetes care*. 2011;34(4):916-22.
23. Azoulay L, Yin H, Filion KB, Assayag J, Majdan A, Pollak MN, et al. The use of pioglitazone and the risk of bladder cancer in people with type 2 diabetes: nested case-control study. *Bmj*. 2012;344:e3645.
24. Agency EM. European Medicines Agency recommends suspension of Avandia, Avandamet and Avaglim. European Medicines Agency. 2010.
25. Sanitária ANdV. CARTA CIRCULAR No. 08 - GFARM/NUVIG/ANVISA/MS - ASSUNTO: Cancelamento de registro do medicamento Avandia® (rosiglitazona) . 2010.
26. Faillie JL, Petit P, Montastruc JL, Hillaire-Buys D. Scientific Evidence and Controversies About Pioglitazone and Bladder Cancer: Which Lessons Can Be Drawn? *Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience*. 2013.
27. da Costa Leite LF, Veras Mourao RH, de Lima Mdo C, Galdino SL, Hernandez MZ, de Assis Rocha Neves F, et al. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of arylidene-thiazolidinediones with potential hypoglycemic and hypolipidemic activities. *European journal of medicinal chemistry*. 2007;42(10):1263-71.
28. Amato AA, Rajagopalan S, Lin JZ, Carvalho BM, Figueira AC, Lu J, et al. GQ-16, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligand, promotes insulin sensitization without weight gain. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(33):28169-79.

29. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;316(2):129-39.
30. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(6):2548-56.
31. Cinti S. The adipose organ. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids. 2005;73(1):9-15.
32. Frontini A, Cinti S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell metabolism*. 2010;11(4):253-6.
33. Cristancho AG, Lazar MA. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2011;12(11):722-34.
34. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *The New England journal of medicine*. 2009;360(15):1500-8.
35. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine*. 2009;360(15):1509-17.
36. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2010;11(1):11-8.
37. Hamdy O, Porramatikul S, Al-Ozairi E. Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. *Current diabetes reviews*. 2006;2(4):367-73.
38. Kissebah AH, Krakower GR. Regional adiposity and morbidity. *Physiological reviews*. 1994;74(4):761-811.
39. Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell metabolism*. 2008;7(5):410-20.

40. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*. 2007;131(2):242-56.
41. Peirce V, Carobbio S, Vidal-Puig A. The different shades of fat. *Nature*. 2014;510(7503):76-83.
42. Kirtland J, Harris PM. Changes in adipose tissue of the rat due early undernutrition followed by rehabilitation. 3. Changes in cell replication studied with tritiated thymidine. *The British journal of nutrition*. 1980;43(1):33-43.
43. Hirsch J, Han PW. Cellularity of rat adipose tissue: effects of growth, starvation, and obesity. *Journal of lipid research*. 1969;10(1):77-82.
44. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008;453(7196):783-7.
45. Lemonnier D. Effect of age, sex, and sites on the cellularity of the adipose tissue in mice and rats rendered obese by a high-fat diet. *The Journal of clinical investigation*. 1972;51(11):2907-15.
46. Faust IM, Johnson PR, Stern JS, Hirsch J. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *The American journal of physiology*. 1978;235(3):E279-86.
47. van Harmelen V, Skurk T, Rohrig K, Lee YM, Halbleib M, Aprath-Husmann I, et al. Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2003;27(8):889-95.
48. Tchoukalova YD, Votruba SB, Tchkonina T, Giorgadze N, Kirkland JL, Jensen MD. Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(42):18226-31.
49. Singh P, Somers VK, Romero-Corral A, Sert-Kuniyoshi FH, Pusalavidyasagar S, Davison DE, et al. Effects of weight gain and weight loss on regional fat distribution. *The American journal of clinical nutrition*. 2012;96(2):229-33.

50. Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *The Journal of nutrition*. 2000;130(12):3122S-6S.
51. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiological reviews*. 1998;78(3):783-809.
52. Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*. 1974;3(2):127-33.
53. Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*. 1975;5(1):19-27.
54. Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD. Regulation of adipocyte development. *Annual review of nutrition*. 1994;14:99-129.
55. Klemm DJ, Leitner JW, Watson P, Nesterova A, Reusch JE, Goalstone ML, et al. Insulin-induced adipocyte differentiation. Activation of CREB rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(30):28430-5.
56. Chapman AB, Knight DM, Ringold GM. Glucocorticoid regulation of adipocyte differentiation: hormonal triggering of the developmental program and induction of a differentiation-dependent gene. *The Journal of cell biology*. 1985;101(4):1227-35.
57. Petersen RK, Madsen L, Pedersen LM, Hallenborg P, Hagland H, Viste K, et al. Cyclic AMP (cAMP)-mediated stimulation of adipocyte differentiation requires the synergistic action of Epac- and cAMP-dependent protein kinase-dependent processes. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(11):3804-16.
58. Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *The New England journal of medicine*. 1999;341(4):248-57.
59. Sul HS, Latasa MJ, Moon Y, Kim KH. Regulation of the fatty acid synthase promoter by insulin. *The Journal of nutrition*. 2000;130(2S Suppl):315S-20S.

60. Kim SP, Ha JM, Yun SJ, Kim EK, Chung SW, Hong KW, et al. Transcriptional activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma requires activation of both protein kinase A and Akt during adipocyte differentiation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;399(1):55-9.
61. Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes & development*. 1991;5(9):1538-52.
62. Scott RE, Florine DL, Wille JJ, Jr., Yun K. Coupling of growth arrest and differentiation at a distinct state in the G1 phase of the cell cycle: GD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982;79(3):845-9.
63. Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(1):44-9.
64. MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annual review of biochemistry*. 1995;64:345-73.
65. Brun RP, Kim JB, Hu E, Altiock S, Spiegelman BM. Adipocyte differentiation: a transcriptional regulatory cascade. *Current opinion in cell biology*. 1996;8(6):826-32.
66. Wu Z, Bucher NL, Farmer SR. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(8):4128-36.
67. Lefterova MI, Zhang Y, Steger DJ, Schupp M, Schug J, Cristancho A, et al. PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes & development*. 2008;22(21):2941-52.
68. Siersbaek R, Nielsen R, John S, Sung MH, Baek S, Loft A, et al. Extensive chromatin remodelling and establishment of transcription factor 'hotspots' during early adipogenesis. *The EMBO journal*. 2011;30(8):1459-72.

69. Weiner FR, Smith PJ, Wertheimer S, Rubin CS. Regulation of gene expression by insulin and tumor necrosis factor alpha in 3T3-L1 cells. Modulation of the transcription of genes encoding acyl-CoA synthetase and stearyl-CoA desaturase-1. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(35):23525-8.
70. Paulauskis JD, Sul HS. Cloning and expression of mouse fatty acid synthase and other specific mRNAs. Developmental and hormonal regulation in 3T3-L1 cells. *The Journal of biological chemistry*. 1988;263(15):7049-54.
71. Wu Z, Xie Y, Morrison RF, Bucher NL, Farmer SR. PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(1):22-32.
72. Gray S, Feinberg MW, Hull S, Kuo CT, Watanabe M, Sen-Banerjee S, et al. The Kruppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(37):34322-8.
73. Bernlohr DA, Angus CW, Lane MD, Bolanowski MA, Kelly TJ, Jr. Expression of specific mRNAs during adipose differentiation: identification of an mRNA encoding a homologue of myelin P2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984;81(17):5468-72.
74. Sfeir Z, Ibrahim A, Amri E, Grimaldi P, Abumrad N. Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 1997;57(1):17-21.
75. Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Moos MC, Jr., Londos C, Kimmel AR. Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(24):12035-9.
76. Cook KS, Min HY, Johnson D, Chaplinsky RJ, Flier JS, Hunt CR, et al. Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science*. 1987;237(4813):402-5.

77. Flier JS, Cook KS, Usher P, Spiegelman BM. Severely impaired adiponin expression in genetic and acquired obesity. *Science*. 1987;237(4813):405-8.
78. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-32.
79. Coppari R, Ichinose M, Lee CE, Pullen AE, Kenny CD, McGovern RA, et al. The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell metabolism*. 2005;1(1):63-72.
80. Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes*. 2006;55(6):1537-45.
81. Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. *Cytokine & growth factor reviews*. 2007;18(3-4):313-25.
82. Hotamisligil GS. Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 1999;107(2):119-25.
83. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87-91.
84. Hotamisligil GS. The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *Journal of internal medicine*. 1999;245(6):621-5.
85. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes*. 2007;56(4):1010-3.
86. Samaras K, Botelho NK, Chisholm DJ, Lord RV. Subcutaneous and visceral adipose tissue FTO gene expression and adiposity, insulin action, glucose metabolism, and inflammatory adipokines in type 2 diabetes mellitus and in health. *Obesity surgery*. 2010;20(1):108-13.

87. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 2004;145(5):2273-82.
88. Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, Maeda K, Kotani K, Nakamura T, et al. Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nature medicine*. 1996;2(7):800-3.
89. Ishikawa K, Takahashi K, Bujo H, Hashimoto N, Yagui K, Saito Y. Subcutaneous fat modulates insulin sensitivity in mice by regulating TNF-alpha expression in visceral fat. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2006;38(10):631-8.
90. Stephens JM, Lee J, Pilch PF. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(2):971-6.
91. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes*. 2002;51(12):3391-9.
92. Nohara A, Okada S, Ohshima K, Pessin JE, Mori M. Cyclin-dependent kinase-5 is a key molecule in tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(38):33457-65.
93. Laudet V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *Journal of molecular endocrinology*. 1997;19(3):207-26.
94. Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H, Laudet V. The nuclear receptor superfamily. *Journal of cell science*. 2003;116(Pt 4):585-6.
95. Evans RM. The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology. *Molecular endocrinology*. 2005;19(6):1429-38.

96. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological reviews*. 2001;81(3):1269-304.
97. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacological reviews*. 2006;58(4):685-704.
98. Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS. Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(32):20230-5.
99. Sonoda J, Pei L, Evans RM. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS letters*. 2008;582(1):2-9.
100. Zilliacus J, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA, Wright AP. Evolution of distinct DNA-binding specificities within the nuclear receptor family of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(10):4175-9.
101. Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell*. 2006;126(4):789-99.
102. Nuclear Receptors Nomenclature C. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*. 1999;97(2):161-3.
103. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nature medicine*. 2004;10(4):355-61.
104. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*. 1992;68(5):879-87.
105. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocrine reviews*. 1999;20(5):649-88.

106. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annual review of medicine*. 2002;53:409-35.
107. Braissant O, Fougère F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. *Endocrinology*. 1996;137(1):354-66.
108. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(15):7355-9.
109. Willson TM, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Current opinion in chemical biology*. 1997;1(2):235-41.
110. Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Sorting out the roles of PPAR α in energy metabolism and vascular homeostasis. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(3):571-80.
111. Grimaldi PA. Regulatory functions of PPAR β in metabolism: implications for the treatment of metabolic syndrome. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1771(8):983-90.
112. Nadra K, Anghel SI, Joye E, Tan NS, Basu-Modak S, Trono D, et al. Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor β/δ . *Molecular and cellular biology*. 2006;26(8):3266-81.
113. Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, et al. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor $\beta(\delta)$. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(14):5119-28.
114. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 1994;79(7):1147-56.

115. Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology*. 1994;135(2):798-800.
116. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990;347(6294):645-50.
117. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the Peroxisomal Beta-Oxidation Pathway by a Novel Family of Nuclear Hormone Receptors. *Cell*. 1992;68(5):879-87.
118. Juge-Aubry C, Pernin A, Favez T, Burger AG, Wahli W, Meier CA, et al. DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(40):25252-9.
119. Krey G, Keller H, Mahfoudi A, Medin J, Ozato K, Dreyer C, et al. Xenopus peroxisome proliferator activated receptors: genomic organization, response element recognition, heterodimer formation with retinoid X receptor and activation by fatty acids. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1993;47(1-6):65-73.
120. Tugwood JD, Issemann I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL, Green S. The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *The EMBO journal*. 1992;11(2):433-9.
121. Dowell P, Ishmael JE, Avram D, Peterson VJ, Nevriy DJ, Leid M. Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacting protein. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(22):15901-7.
122. Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*. 1995;377(6548):397-404.

123. Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*. 1995;377(6548):454-7.
124. Heinzl T, Lavinsky RM, Mullen TM, Soderstrom M, Laherty CD, Torchia J, et al. A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature*. 1997;387(6628):43-8.
125. Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, et al. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell*. 1997;89(3):373-80.
126. Pazin MJ, Kadonaga JT. What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell*. 1997;89(3):325-8.
127. Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1771(8):926-35.
128. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes & development*. 2000;14(2):121-41.
129. Rosenfeld MG, Lunyak VV, Glass CK. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes & development*. 2006;20(11):1405-28.
130. Roeder RG. Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS letters*. 2005;579(4):909-15.
131. Dilworth FJ, Chambon P. Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene*. 2001;20(24):3047-54.
132. Martinez-Balbas MA, Bannister AJ, Martin K, Haus-Seuffert P, Meisterernst M, Kouzarides T. The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. *The EMBO journal*. 1998;17(10):2886-93.

133. Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. 1996;87(5):953-9.
134. Spiegelman BM, Heinrich R. Biological control through regulated transcriptional coactivators. *Cell*. 2004;119(2):157-67.
135. Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, Lee CG, Hurwitz J, Parvin JD, et al. RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell*. 1997;90(6):1107-12.
136. Malik S, Roeder RG. Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends in biochemical sciences*. 2000;25(6):277-83.
137. Pascual G, Glass CK. Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2006;17(8):321-7.
138. Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(45):32048-54.
139. Chung SW, Kang BY, Kim SH, Pak YK, Cho D, Trinchieri G, et al. Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(42):32681-7.
140. Yang XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, DaSilva L, et al. Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(7):4541-4.

141. Li M, Pascual G, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(13):4699-707.
142. Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM, et al. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science*. 2003;302(5644):453-7.
143. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature*. 2005;437(7059):759-63.
144. Zhu Y, Alvares K, Huang Q, Rao MS, Reddy JK. Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(36):26817-20.
145. Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, et al. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene expression*. 1995;4(4-5):281-99.
146. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(30):18779-89.
147. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS letters*. 1998;438(1-2):55-60.
148. Zieleniak A, Wojcik M, Wozniak LA. Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2008;56(5):331-45.
149. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes & development*. 1994;8(10):1224-34.

150. Zoete V, Grosdidier A, Michielin O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1771(8):915-25.
151. Bourguet W, Ruff M, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature*. 1995;375(6530):377-82.
152. Renaud JP, Rochel N, Ruff M, Vivat V, Chambon P, Gronemeyer H, et al. Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature*. 1995;378(6558):681-9.
153. Loop S, Pieler T. Nuclear import of mPER3 in *Xenopus* oocytes and HeLa cells requires complex formation with mPER1. *The FEBS journal*. 2005;272(14):3714-24.
154. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, et al. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Molecular cell*. 1999;3(3):397-403.
155. Lu IL, Huang CF, Peng YH, Lin YT, Hsieh HP, Chen CT, et al. Structure-based drug design of a novel family of PPARgamma partial agonists: virtual screening, X-ray crystallography, and in vitro/in vivo biological activities. *Journal of medicinal chemistry*. 2006;49(9):2703-12.
156. Kallenberger BC, Love JD, Chatterjee VK, Schwabe JW. A dynamic mechanism of nuclear receptor activation and its perturbation in a human disease. *Nature structural biology*. 2003;10(2):136-40.
157. Johnson BA, Wilson EM, Li Y, Moller DE, Smith RG, Zhou G. Ligand-induced stabilization of PPARgamma monitored by NMR spectroscopy: implications for nuclear receptor activation. *Journal of molecular biology*. 2000;298(2):187-94.
158. Burgermeister E, Schnoebelen A, Flament A, Benz J, Stihle M, Gsell B, et al. A novel partial agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) recruits PPARgamma-coactivator-1alpha, prevents triglyceride

accumulation, and potentiates insulin signaling in vitro. *Molecular endocrinology*. 2006;20(4):809-30.

159. James Maguire R, Chau YK, Bengert GA, Hale EJ, Wong PTS, Kramar O, ., 16, 698, 1982.). Occurrence of organotin compounds in Ontario lakes and rivers. *Environ Sci Technol*. 1982;16(10):698–702.

160. Waku T, Shiraki T, Oyama T, Fujimoto Y, Maebara K, Kamiya N, et al. Structural insight into PPARgamma activation through covalent modification with endogenous fatty acids. *Journal of molecular biology*. 2009;385(1):188-99.

161. Shiraki T, Kamiya N, Shiki S, Kodama TS, Kakizuka A, Jingami H. Alpha,beta-unsaturated ketone is a core moiety of natural ligands for covalent binding to peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(14):14145-53.

162. Waku T, Shiraki T, Oyama T, Morikawa K. Atomic structure of mutant PPARgamma LBD complexed with 15d-PGJ2: novel modulation mechanism of PPARgamma/RXRalpha function by covalently bound ligands. *FEBS letters*. 2009;583(2):320-4.

163. Leesnitzer LM, Parks DJ, Bledsoe RK, Cobb JE, Collins JL, Consler TG, et al. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry*. 2002;41(21):6640-50.

164. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(9):4318-23.

165. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*. 1995;83(5):803-12.

166. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*. 1995;83(5):813-9.
167. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*. 1998;93(2):229-40.
168. Henke BR, Blanchard SG, Brackeen MF, Brown KK, Cobb JE, Collins JL, et al. N-(2-Benzoylphenyl)-L-tyrosine PPARgamma agonists. 1. Discovery of a novel series of potent antihyperglycemic and antihyperlipidemic agents. *Journal of medicinal chemistry*. 1998;41(25):5020-36.
169. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(22):12953-6.
170. Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*. 1998;47(4):507-14.
171. Saltiel AR, Olefsky JM. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes*. 1996;45(12):1661-9.
172. Nolan JJ, 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*. 1994;331(18):1188-93.
173. Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Glass L, Mahankali S, Ferrannini E, et al. Improved glycemic control and enhanced insulin sensitivity in type 2 diabetic subjects treated with pioglitazone. *Diabetes care*. 2001;24(4):710-9.
174. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annual review of biochemistry*. 2008;77:289-312.
175. Hu E, Tontonoz P, Spiegelman BM. Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America. 1995;92(21):9856-60.

176. Rosen ED, Spiegelman BM. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(41):37731-4.

177. Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(46):30057-60.

178. Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, et al. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Molecular cell*. 1999;3(2):151-8.

179. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Molecular cell*. 1999;4(4):597-609.

180. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, et al. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Molecular cell*. 1999;4(4):585-95.

181. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Molecular cell*. 1999;4(4):611-7.

182. Jeninga EH, van Beekum O, van Dijk AD, Hamers N, Hendriks-Stegeman BI, Bonvin AM, et al. Impaired peroxisome proliferator-activated receptor gamma function through mutation of a conserved salt bridge (R425C) in familial partial lipodystrophy. *Molecular endocrinology*. 2007;21(5):1049-65.

183. Agarwal AK, Garg A. A novel heterozygous mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in a patient with familial partial lipodystrophy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(1):408-11.

184. Savage DB, Tan GD, Acerini CL, Jebb SA, Agostini M, Gurnell M, et al. Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes*. 2003;52(4):910-7.
185. Hegele RA, Cao H, Frankowski C, Mathews ST, Leff T. PPAR γ F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. *Diabetes*. 2002;51(12):3586-90.
186. Ludtke A, Buettner J, Wu W, Muchir A, Schroeter A, Zinn-Justin S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma C190S mutation causes partial lipodystrophy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(6):2248-55.
187. Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(3):581-9.
188. Kelly IE, Han TS, Walsh K, Lean ME. Effects of a thiazolidinedione compound on body fat and fat distribution of patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*. 1999;22(2):288-93.
189. Mori Y, Murakawa Y, Okada K, Horikoshi H, Yokoyama J, Tajima N, et al. Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients. *Diabetes care*. 1999;22(6):908-12.
190. Ye JM, Dzamko N, Cleasby ME, Hegarty BD, Furler SM, Cooney GJ, et al. Direct demonstration of lipid sequestration as a mechanism by which rosiglitazone prevents fatty-acid-induced insulin resistance in the rat: comparison with metformin. *Diabetologia*. 2004;47(7):1306-13.
191. Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Mahankali S, Hardies J, Cusi K, et al. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(6):2784-91.

192. Raskin P, Rappaport EB, Cole ST, Yan Y, Patwardhan R, Freed MI. Rosiglitazone short-term monotherapy lowers fasting and post-prandial glucose in patients with type II diabetes. *Diabetologia*. 2000;43(3):278-84.
193. Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, et al. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(6):1354-61.
194. Yang WS, Jeng CY, Wu TJ, Tanaka S, Funahashi T, Matsuzawa Y, et al. Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone, increases plasma levels of adiponectin in type 2 diabetic patients. *Diabetes care*. 2002;25(2):376-80.
195. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001;409(6818):307-12.
196. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*. 2005;436(7049):356-62.
197. Peraldi P, Xu M, Spiegelman BM. Thiazolidinediones block tumor necrosis factor-alpha-induced inhibition of insulin signaling. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(7):1863-9.
198. Wu ZH, Zhao SP, Chu LX, Ye HJ. Pioglitazone reduces tumor necrosis factor-alpha serum concentration and mRNA expression of adipose tissue in hypercholesterolemic rabbits. *International journal of cardiology*. 2010;138(2):151-6.
199. Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine & growth factor reviews*. 2003;14(5):447-55.
200. Warne JP. Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass. *The Journal of endocrinology*. 2003;177(3):351-5.

201. Qiang L, Wang L, Kon N, Zhao W, Lee S, Zhang Y, et al. Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Ppargamma. *Cell*. 2012;150(3):620-32.
202. Choi JH, Banks AS, Estall JL, Kajimura S, Bostrom P, Laznik D, et al. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5. *Nature*. 2010;466(7305):451-6.
203. Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, et al. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*. 2007;450(7170):712-6.
204. Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 2009;458(7241):1056-60.
205. Quintanilla RA, Orellana DI, Gonzalez-Billault C, Maccioni RB. Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Experimental cell research*. 2004;295(1):245-57.
206. Rubenstrunk A, Hanf R, Hum DW, Fruchart JC, Staels B. Safety issues and prospects for future generations of PPAR modulators. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1771(8):1065-81.
207. Gelman L, Feige JN, Desvergne B. Molecular basis of selective PPARgamma modulation for the treatment of Type 2 diabetes. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1771(8):1094-107.
208. Phillips LS, Grunberger G, Miller E, Patwardhan R, Rappaport EB, Salzman A, et al. Once- and twice-daily dosing with rosiglitazone improves glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2001;24(2):308-15.
209. Rosenstock J, Einhorn D, Hershon K, Glazer NB, Yu S, Pioglitazone 014 Study G. Efficacy and safety of pioglitazone in type 2 diabetes: a randomised, placebo-controlled study in patients receiving stable insulin therapy. *International journal of clinical practice*. 2002;56(4):251-7.

210. Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, Lebon V, Befroy D, Cline GW, et al. The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(3):797-802.
211. Berthet S, Olivier P, Montastruc JL, Lapeyre-Mestre M. Drug safety of rosiglitazone and pioglitazone in France: a study using the French Pharmacovigilance database. *BMC clinical pharmacology*. 2011;11:5.
212. Zhang H, Zhang A, Kohan DE, Nelson RD, Gonzalez FJ, Yang T. Collecting duct-specific deletion of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks thiazolidinedione-induced fluid retention. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(26):9406-11.
213. Lincoff AM, Wolski K, Nicholls SJ, Nissen SE. Pioglitazone and risk of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized trials. *Jama*. 2007;298(10):1180-8.
214. Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2005;366(9493):1279-89.
215. Loke YK, Singh S, Furberg CD. Long-term use of thiazolidinediones and fractures in type 2 diabetes: a meta-analysis. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2009;180(1):32-9.
216. Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA, Rodriguez BR, Kliewer SA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation by thiazolidinediones induces adipogenesis in bone marrow stromal cells. *Molecular pharmacology*. 1996;50(5):1087-94.
217. Ali AA, Weinstein RS, Stewart SA, Parfitt AM, Manolagas SC, Jilka RL. Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrinology*. 2005;146(3):1226-35.

218. Tseng CH. Pioglitazone and bladder cancer in human studies: is it diabetes itself, diabetes drugs, flawed analyses or different ethnicities? *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 2012;111(3):123-31.
219. Seufert J, Lubben G, Dietrich K, Bates PC. A comparison of the effects of thiazolidinediones and metformin on metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clinical therapeutics*. 2004;26(6):805-18.
220. Saenz A, Fernandez-Esteban I, Mataix A, Ausejo M, Roque M, Moher D. Metformin monotherapy for type 2 diabetes mellitus. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2005(3):CD002966.
221. Stocker DJ, Taylor AJ, Langley RW, Jezior MR, Vigersky RA. A randomized trial of the effects of rosiglitazone and metformin on inflammation and subclinical atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *American heart journal*. 2007;153(3):445 e1-6.
222. Kim HJ, Kang ES, Kim DJ, Kim SH, Ahn CW, Cha BS, et al. Effects of rosiglitazone and metformin on inflammatory markers and adipokines: decrease in interleukin-18 is an independent factor for the improvement of homeostasis model assessment-beta in type 2 diabetes mellitus. *Clinical endocrinology*. 2007;66(2):282-9.
223. Acton JJ, 3rd, Black RM, Jones AB, Moller DE, Colwell L, Doebber TW, et al. Benzoyl 2-methyl indoles as selective PPARgamma modulators. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2005;15(2):357-62.
224. Choi JH, Banks AS, Kamenecka TM, Busby SA, Chalmers MJ, Kumar N, et al. Antidiabetic actions of a non-agonist PPARgamma ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. *Nature*. 2011;477(7365):477-81.
225. Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(4):315-9.
226. Du P, Kibbe WA, Lin SM. lumi: a pipeline for processing Illumina microarray. *Bioinformatics*. 2008;24(13):1547-8.

227. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology*. 2004;3:Article3.
228. Hochberg YBaY. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society*. 1995;57(1):289-300.
229. Chui PC, Guan HP, Lehrke M, Lazar MA. PPARgamma regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(8):2244-56.
230. NCBI: National Center for Biotechnology Information [Internet]. Estados Unidos: National Library of Medicine. 1988 - . [citado em 2015 Jan 20]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
231. Liang G, Wolfgang CD, Chen BP, Chen TH, Hai T. ATF3 gene. Genomic organization, promoter, and regulation. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(3):1695-701.
232. Jang MK, Kim CH, Seong JK, Jung MH. ATF3 inhibits adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;421(1):38-43.
233. Sakaue H, Konishi M, Ogawa W, Asaki T, Mori T, Yamasaki M, et al. Requirement of fibroblast growth factor 10 in development of white adipose tissue. *Genes & development*. 2002;16(8):908-12.
234. Ma X, Ren X, Han P, Hu S, Wang J, Yin J. SiRNA against Fabp5 induces 3T3-L1 cells apoptosis during adipocytic induction. *Molecular biology reports*. 2010;37(8):4003-11.
235. Spiegelman BM, Puigserver P, Wu Z. Regulation of adipogenesis and energy balance by PPARgamma and PGC-1. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2000;24 Suppl 4:S8-10.

236. Huang PI, Chen YC, Chen LH, Juan CC, Ku HH, Wang ST, et al. PGC-1alpha mediates differentiation of mesenchymal stem cells to brown adipose cells. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2011;18(11):966-80.
237. Ross DA, Rao PK, Kadesch T. Dual roles for the Notch target gene Hes-1 in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(8):3505-13.
238. Soukas A, Socci ND, Saatkamp BD, Novelli S, Friedman JM. Distinct transcriptional profiles of adipogenesis in vivo and in vitro. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(36):34167-74.
239. Chevillard G, Clemencet MC, Latruffe N, Nicolas-Frances V. Targeted disruption of the peroxisomal thiolase B gene in mouse: a new model to study disorders related to peroxisomal lipid metabolism. *Biochimie*. 2004;86(11):849-56.
240. Antonenkov VD, Van Veldhoven PP, Waelkens E, Mannaerts GP. Comparison of the stability and substrate specificity of purified peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolases A and B from rat liver. *Biochimica et biophysica acta*. 1999;1437(2):136-41.
241. Lin Z, Tian H, Lam KS, Lin S, Hoo RC, Konishi M, et al. Adiponectin mediates the metabolic effects of FGF21 on glucose homeostasis and insulin sensitivity in mice. *Cell metabolism*. 2013;17(5):779-89.
242. Fisher FM, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdeguer F, et al. FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes & development*. 2012;26(3):271-81.
243. Zizola CF, Schwartz GJ, Vogel S. Cellular retinol-binding protein type III is a PPARgamma target gene and plays a role in lipid metabolism. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2008;295(6):E1358-68.
244. Morton NM, Nelson YB, Michailidou Z, Di Rollo EM, Ramage L, Hadoke PW, et al. A stratified transcriptomics analysis of polygenic fat and lean mouse adipose tissues identifies novel candidate obesity genes. *PloS one*. 2011;6(9):e23944.

245. Kobayashi T, Fujimori K. Very long-chain-fatty acids enhance adipogenesis through coregulation of Elovl3 and PPARgamma in 3T3-L1 cells. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2012;302(12):E1461-71.
246. Miki H, Yamauchi T, Suzuki R, Komeda K, Tsuchida A, Kubota N, et al. Essential role of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(7):2521-32.
247. Yin C, Xiao Y, Zhang W, Xu E, Liu W, Yi X, et al. DNA microarray analysis of genes differentially expressed in adipocyte differentiation. *Journal of biosciences*. 2014;39(3):415-23.
248. Hatfield KJ, Reikvam H, Bruserud O. Identification of a subset of patients with acute myeloid leukemia characterized by long-term in vitro proliferation and altered cell cycle regulation of the leukemic cells. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2014;18(11):1237-51.
249. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert reviews in molecular medicine*. 2008;10:e17.
250. Xue B, Sukumaran S, Nie J, Jusko WJ, Dubois DC, Almon RR. Adipose tissue deficiency and chronic inflammation in diabetic Goto-Kakizaki rats. *PloS one*. 2011;6(2):e17386.
251. Kurose Y, Wada J, Kanzaki M, Teshigawara S, Nakatsuka A, Murakami K, et al. Serum galectin-9 levels are elevated in the patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *BMC nephrology*. 2013;14:23.
252. Andersen T, Dejgaard A, Astrup A, Gluud C. Increased plasma fibronectin concentrations in obesity: normalization during weight loss. *Acta medica Scandinavica*. 1987;222(3):275-9.
253. Ward M, Ajuwon KM. Regulation of pre-adipocyte proliferation and apoptosis by the small leucine-rich proteoglycans, biglycan and decorin. *Cell proliferation*. 2011;44(4):343-51.

254. Daquinag AC, Zhang Y, Amaya-Manzanares F, Simmons PJ, Kolonin MG. An isoform of decorin is a resistin receptor on the surface of adipose progenitor cells. *Cell stem cell*. 2011;9(1):74-86.
255. Imagawa M, Tsuchiya T, Nishihara T. Identification of inducible genes at the early stage of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;254(2):299-305.
256. Sartori M, Ceolotto G, Dorigatti F, Mos L, Santonastaso M, Bratti P, et al. RGS2 C1114G polymorphism and body weight gain in hypertensive patients. *Metabolism: clinical and experimental*. 2008;57(3):421-7.
257. Krapivner S, Popov S, Chernogubova E, Hellenius ML, Fisher RM, Hamsten A, et al. Insulin-induced gene 2 involvement in human adipocyte metabolism and body weight regulation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(5):1995-2001.
258. Hotta K, Nakamura M, Nakata Y, Matsuo T, Kamohara S, Kotani K, et al. INSIG2 gene rs7566605 polymorphism is associated with severe obesity in Japanese. *Journal of human genetics*. 2008;53(9):857-62.
259. Oger F, Dubois-Chevalier J, Gheeraert C, Avner S, Durand E, Froguel P, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates genes involved in insulin/insulin-like growth factor signaling and lipid metabolism during adipogenesis through functionally distinct enhancer classes. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(2):708-22.
260. Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G, et al. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*. 1989;59(6):1203-11.
261. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM, Jr., et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation*. 1997;96(12):4219-25.

262. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(10):1255-62.
263. Cheung KJ, Tzamelis I, Pissios P, Rovira I, Gavrilova O, Ohtsubo T, et al. Xanthine oxidoreductase is a regulator of adipogenesis and PPAR γ activity. *Cell metabolism*. 2007;5(2):115-28.
264. Fournier T, Medjoubi NN, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1482(1-2):157-71.
265. Dimaculangan DD, Chawla A, Boak A, Kagan HM, Lazar MA. Retinoic acid prevents downregulation of ras reversion gene/lysyl oxidase early in adipocyte differentiation. *Differentiation; research in biological diversity*. 1994;58(1):47-52.
266. Sekimoto R, Kishida K, Nakatsuji H, Nakagawa T, Funahashi T, Shimomura I. High circulating levels of S100A8/A9 complex (calprotectin) in male Japanese with abdominal adiposity and dysregulated expression of S100A8 and S100A9 in adipose tissues of obese mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;419(4):782-9.
267. Hiuge-Shimizu A, Maeda N, Hirata A, Nakatsuji H, Nakamura K, Okuno A, et al. Dynamic changes of adiponectin and S100A8 levels by the selective peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist rivoglitazone. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(4):792-9.
268. Michaud A, Lacroix-Pepin N, Pelletier M, Daris M, Biertho L, Fortier MA, et al. Expression of genes related to prostaglandin synthesis or signaling in human subcutaneous and omental adipose tissue: depot differences and modulation by adipogenesis. *Mediators of inflammation*. 2014;2014:451620.
269. Friedrichs WE, Navarrijo-Ashbaugh AL, Bowman BH, Yang F. Expression and inflammatory regulation of haptoglobin gene in adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;209(1):250-6.

270. Arrigo AP. Structure-functions of HspB1 (Hsp27). *Methods in molecular biology*. 2011;787:105-19.
271. Chen Y, Zhu J, Lum PY, Yang X, Pinto S, MacNeil DJ, et al. Variations in DNA elucidate molecular networks that cause disease. *Nature*. 2008;452(7186):429-35.
272. Larade K, Jiang Z, Zhang Y, Wang W, Bonner-Weir S, Zhu H, et al. Loss of Ncb5or results in impaired fatty acid desaturation, lipoatrophy, and diabetes. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(43):29285-91.
273. Andersen G, Wegner L, Rose CS, Xie J, Zhu H, Larade K, et al. Variation in NCB5OR: studies of relationships to type 2 diabetes, maturity-onset diabetes of the young, and gestational diabetes mellitus. *Diabetes*. 2004;53(11):2992-7.
274. Guan HP, Ishizuka T, Chui PC, Lehrke M, Lazar MA. Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes & development*. 2005;19(4):453-61.
275. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, et al. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes & development*. 2002;16(1):22-6.
276. Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *Journal of lipid research*. 2005;46(7):1369-79.
277. Samulin J, Berget I, Lien S, Sundvold H. Differential gene expression of fatty acid binding proteins during porcine adipogenesis. *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology*. 2008;151(2):147-52.
278. Gonzales AM, Orlando RA. Role of adipocyte-derived lipoprotein lipase in adipocyte hypertrophy. *Nutrition & metabolism*. 2007;4:22.
279. Wang P, Renes J, Bouwman F, Bunschoten A, Mariman E, Keijer J. Absence of an adipogenic effect of rosiglitazone on mature 3T3-L1 adipocytes: increase of lipid catabolism and reduction of adipokine expression. *Diabetologia*. 2007;50(3):654-65.

280. Draghici S, Khatri P, Eklund AC, Szallasi Z. Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends in genetics : TIG*. 2006;22(2):101-9.
281. Schumacher C, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. High- and low-affinity binding of GRO alpha and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(21):10542-6.
282. Toubal A, Clement K, Fan R, Ancel P, Pelloux V, Rouault C, et al. SMRT-GPS2 corepressor pathway dysregulation coincides with obesity-linked adipocyte inflammation. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(1):362-79.
283. Jang MK, Jung MH. ATF3 inhibits PPARgamma-stimulated transactivation in adipocyte cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;456(1):80-5.
284. Suganami T, Yuan X, Shimoda Y, Uchio-Yamada K, Nakagawa N, Shirakawa I, et al. Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated Fatty acid/toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. *Circulation research*. 2009;105(1):25-32.
285. Chacon MR, Richart C, Gomez JM, Megia A, Vilarrasa N, Fernandez-Real JM, et al. Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in human subcutaneous adipose tissue. Relationship with other inflammatory cytokines in obesity. *Cytokine*. 2006;33(3):129-37.
286. Moyers JS, Shiyanova TL, Mehrbod F, Dunbar JD, Noblitt TW, Otto KA, et al. Molecular determinants of FGF-21 activity-synergy and cross-talk with PPARgamma signaling. *Journal of cellular physiology*. 2007;210(1):1-6.
287. Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(6):1627-35.

288. Patsouris D, Mandard S, Voshol PJ, Escher P, Tan NS, Havekes LM, et al. PPARalpha governs glycerol metabolism. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(1):94-103.
289. Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *The Journal of endocrinology*. 2014;220(2):T1-T23.
290. Serrano R, Villar M, Martinez C, Carrascosa JM, Gallardo N, Andres A. Differential gene expression of insulin receptor isoforms A and B and insulin receptor substrates 1, 2 and 3 in rat tissues: modulation by aging and differentiation in rat adipose tissue. *Journal of molecular endocrinology*. 2005;34(1):153-61.
291. Le Bouter S, Rodriguez M, Guigal-Stephan N, Courtade-Gaiani S, Xuereb L, de Montrion C, et al. Coordinate Transcriptomic and Metabolomic Effects of the Insulin Sensitizer Rosiglitazone on Fundamental Metabolic Pathways in Liver, Soleus Muscle, and Adipose Tissue in Diabetic db/db Mice. *PPAR research*. 2010;2010.
292. Dutchak PA, Katafuchi T, Bookout AL, Choi JH, Yu RT, Mangelsdorf DJ, et al. Fibroblast growth factor-21 regulates PPARgamma activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell*. 2012;148(3):556-67.
293. Muise ES, Souza S, Chi A, Tan Y, Zhao X, Liu F, et al. Downstream signaling pathways in mouse adipose tissues following acute in vivo administration of fibroblast growth factor 21. *PloS one*. 2013;8(9):e73011.
294. Wang H, Qiang L, Farmer SR. Identification of a domain within peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulating expression of a group of genes containing fibroblast growth factor 21 that are selectively repressed by SIRT1 in adipocytes. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(1):188-200.
295. Smith U, Gogg S, Johansson A, Olausson T, Rotter V, Svalstedt B. Thiazolidinediones (PPARgamma agonists) but not PPARalpha agonists increase IRS-2 gene expression in 3T3-L1 and human adipocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2001;15(1):215-20.

296. van Dijk W, Pos O, van der Stelt ME, Moshage HJ, Yap SH, Dente L, et al. Inflammation-induced changes in expression and glycosylation of genetic variants of alpha 1-acid glycoprotein. Studies with human sera, primary cultures of human hepatocytes and transgenic mice. *The Biochemical journal*. 1991;276 (Pt 2):343-7.
297. Bolton K, Segal D, McMillan J, Jowett J, Heilbronn L, Abberton K, et al. Decorin is a secreted protein associated with obesity and type 2 diabetes. *International journal of obesity*. 2008;32(7):1113-21.
298. Do MS, Jeong HS, Choi BH, Hunter L, Langley S, Pazmany L, et al. Inflammatory gene expression patterns revealed by DNA microarray analysis in TNF-alpha-treated SGBS human adipocytes. *Yonsei medical journal*. 2006;47(5):729-36.
299. Gerhold DL, Liu F, Jiang G, Li Z, Xu J, Lu M, et al. Gene expression profile of adipocyte differentiation and its regulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *Endocrinology*. 2002;143(6):2106-18.
300. Bosanska L, Michalsky D, Lacinova Z, Dostalova I, Bartlova M, Haluzikova D, et al. The influence of obesity and different fat depots on adipose tissue gene expression and protein levels of cell adhesion molecules. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2010;59(1):79-88.
301. Choi JH, Choi SS, Kim ES, Jedrychowski MP, Yang YR, Jang HJ, et al. Thrap3 docks on phosphoserine 273 of PPARgamma and controls diabetic gene programming. *Genes & development*. 2014;28(21):2361-9.
302. Marx N, Mach F, Sauty A, Leung JH, Sarafi MN, Ransohoff RM, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit IFN-gamma-induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells. *Journal of immunology*. 2000;164(12):6503-8.
303. Takata Y, Kitami Y, Yang ZH, Nakamura M, Okura T, Hiwada K. Vascular inflammation is negatively autoregulated by interaction between CCAAT/enhancer-binding protein-delta and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Circulation research*. 2002;91(5):427-33.

304. Itoh T, Fairall L, Amin K, Inaba Y, Szanto A, Balint BL, et al. Structural basis for the activation of PPARgamma by oxidized fatty acids. *Nature structural & molecular biology*. 2008;15(9):924-31.
305. Oberfield JL, Collins JL, Holmes CP, Goreham DM, Cooper JP, Cobb JE, et al. A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(11):6102-6.
306. Ruan H, Pownall HJ, Lodish HF. Troglitazone antagonizes tumor necrosis factor-alpha-induced reprogramming of adipocyte gene expression by inhibiting the transcriptional regulatory functions of NF-kappaB. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(30):28181-92.
307. Juge-Aubry CE, Somm E, Giusti V, Pernin A, Chicheportiche R, Verdumo C, et al. Adipose tissue is a major source of interleukin-1 receptor antagonist: upregulation in obesity and inflammation. *Diabetes*. 2003;52(5):1104-10.
308. Dushkin MI, Khoshchenko OM, Posokhova EN, Schvarts Y. Agonists of PPAR-alpha, PPAR-gamma, and RXR inhibit the formation of foam cells from macrophages in mice with inflammation. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2007;144(5):713-6.
309. Wan Y, Evans RM. Rosiglitazone activation of PPARgamma suppresses fractalkine signaling. *Journal of molecular endocrinology*. 2010;44(2):135-42.
310. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 1998;391(6662):82-6.

APÊNDICE A – LISTA DE PRIMERS

Gene	Primer Forward (5' - 3')	Primer Reverse (3' – 5')
<i>Acaa1b</i>	CAG GAC GTG AAG CTA AAG CCT	CTC CGA AGT TAT CCC CAT AGG AA
<i>Acms3</i>	CTT TGG CCC CAG CAG TAG ATG	GGC TGT CAC TGG CAT ATT TCA T
<i>Acox1</i>	GCA GGA GCG TTT CTT CAT GC	CGA AGA TGA GTT CCA TGA CCC A
<i>Atf3</i>	AGA GTG CCT GCA GAA AGA GTC	GAG GTT CCT CTC GTC TTC CG
<i>Adipoq</i>	GTT CCC AAT GTA CCCA TTC GC	TGC TGC CGT CAT AAT GAT TCT
<i>Cebpa</i>	GCG GGA ACG CAA CAA CAT C	GTC ACT GGT CAA CTC CAG CAC
<i>Cxcl1</i>	AGA CCA TGG CTG GGA TTC AC	AGT GTG GCT ATG ACT TCG GT
<i>Cyb5r4</i>	CCG GAA CAG GAT TCA CAC CA	TCA CCT TCC TGA GAC TGG ACA
<i>Elovl3</i>	TGC CAT CTA CAC GGA TGAC G	CCG TGT CTC CCA GTT CAA CAA
<i>Dcn</i>	TCA CAG AAG CGG TAA CGA GC	TCA TGT ATT TTC ACG ACC TTC TGA
<i>Fabp4</i>	ATCAGCGTAAATGGGGATTTG	GTCTGCGGTGATTTTCATCGAA
<i>Fabp5</i>	TGA AAG AGC TAG GAG TAG GAC TG	CTC TCG GTT TTG ACC GTG ATG
<i>Fgf21</i>	GTG TCA AAG CCT CTA GGT TTC TT	GGT ACA CAT TGT AAC CGT CCT C
<i>Fn1</i>	CTG CGC TCC ATT CCA CCT TA	GGT CGT ACA CCC AGC TTG AA
<i>Gpd1</i>	CCT TGT GGA CAA GTT CCC CTT	GAC AGT CCT GAT GAC GGG TG
<i>Gulp1</i>	AGC CAG GGG TAC TGG GTA TTA	TCA GGC GTA TGC ATC CAT GT
<i>Gyk</i>	GTC ACA ATG GAG CGG TTT GAA	TTA TGG GAT ACC ACT TTC TGG AG
<i>Insig2</i>	TGA GCT GGA CTA GCT TGC TT	GGG ACC TAC CAG AAA TCC TTC A
<i>Irs2</i>	GCA CCT ATG CAA GCA TCG AC	GCG CTT CAC TCT TTC ACG AC
<i>Hbp1</i>	AGT GTG ATC CTT GGT GAC AGG	CTG TTG AGA GCC TGA GTT GGT
<i>Hes1</i>	CAA CAC GAC ACC GGA CAA AC	GGA ATG CCG GGA GCT ATC TT
<i>Hp</i>	TCT GGG GTC AGC TTT TTG CT	TTT GGG CAG CTG TCA TCT TCA
<i>Hspb1</i>	TCA CCC GGA AAT ACA CGC TC	GGC CTC GAA AGT AAC CGG AA
<i>Ktr23</i>	TGA TTC AGC TCC GCC AAG AC	CCA TCG TCC CTT CAG TGT CTC
<i>Lgals9</i>	TAC CAA CAC CGC GTA CCC TA	GCT GCA GAG TTC TGG AAG GTG
<i>Lhfp12</i>	CTG GCA GGC TAC CGC TAT TT	GGA TAA GGA ACA GAC CTG CGA
<i>Lox</i>	ACA AGT ACT CCG ACG ACA ACC	GGG AGA CCG TAC TGG AAG TAA
<i>Lpl</i>	GCT GGG CCT AAC TTT GAG TATG	AAA TCAG CGT CAT CAG GAG AA
<i>Olr1</i>	CTG CAC TCC TTC TTC CC TTT	GCC TGC ACT TGA GGA GGA TTT
<i>Orm1</i>	CCT GAG CTG GCT CTC TGA CA	TGA ATT GCC TGC CTG TAC TCG

APÊNDICE A – LISTA DE PRIMERS

Conclusão

Gene	Primer Forward (5' - 3')	Primer Reverse (3' - 5')
<i>Orm2</i>	ATT GGT GCG GCT GTC CTA AA	ACA CAG TGG TCA TCT ATG GTG T
<i>Phf20l1</i>	TGA AGA GTG CCT ATG CTG GC	CAC TCC ATC TCT GAC CCG GA
<i>Ppary</i>	TTT TCC GAA GAA CCA TCC GAT	ATG GCA TTG TGA GAC ATC CCC
<i>Ppargc1a</i>	TCT GGA ACT GCA GGC CTA AC	TGC CTT GGG TAC CAG AAC AC
<i>Ppm1l</i>	GGA GGC CGA GTT TTC CAA GA	ATA TTC CGC TGC AGT CTC GC
<i>Ptgis</i>	ATG CAG TGT CAA AAA CCG CC	TGG GAC CCA TAT TCC CCT GT
<i>Ptp4a2</i>	GGA GAA GGG TGT GTG AAG GA	TCA AAA GGG TTC AGG GTT TG
<i>Rgs2</i>	CTC CTG GGA AGC CCA AAA CT	TGC AGC CAG CCC ATA TTT ACT
<i>Rbp7</i>	GGG ACT CCT TCA CCA TCC AG	GGT AAC CAG GCT CGT GCA TT
<i>Slc12a2</i>	AGG GTG TAT TAG TCC GCT GC	TCC TCC TCT CAC GAA CCC AT
<i>St3gal6</i>	GGG GAA CAA ATG GCT ATT GGT	AGG GCA ACG GAA AAT TAT TGG T
<i>S100a8</i>	TTC AAG ACA TCG TTT GAA AGG AAA	AGG TTG CTC AAG GCC TTC TC
<i>Tnfrsf12a</i>	GTG TTG GGA TTC GGC TTG GT	GTC CAT GCA CTT GTC GAG GTC
<i>Trp63</i>	AGA ACG GCG ATG GTA CGA AG	TCT CAC GAC CTC TCA CTG GT
<i>Vcam1</i>	ATG TCA ACG TTG CCC CCA A	GCT GTC TGC TCC ACA GGA TT
<i>Xdh</i>	TAT GCA TCC AAG GCT GTC GG	GAT CCA CAC AAG CGT TTC GG
<i>18s</i>	CGG ACA GGA TTG ACA GAT TG	CAA ATC GCT CCA CCA ACT AA

**APÊNDICE B – GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA EXCLUSIVAMENTE
EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA**

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16	Gene	Rosi	GQ-16
Cxcl1	4.315	1.173	Plekhg5	0.319	0.894
Snai3	2.984	1.185	Itih4	0.327	1.014
Sdcbp2	2.872	1.101	Fxyd3	0.335	0.925
Prei4	2.805	1.118	Bcl9l	0.336	0.842
Eps8	2.685	1.008	Pld1	0.354	0.870
Fabp5	2.613	1.239	2310076O14Rik	0.358	0.882
Lzic	2.610	1.136	Il17re	0.368	0.953
LOC240672	2.511	1.063	Slc22a4	0.372	0.949
Sdcbp2	2.505	1.061	Gstm7	0.381	0.869
Fos	2.477	1.066	Gck	0.388	1.111
Sgk2	2.422	1.076	Plekhg5	0.389	0.946
Hspd1	2.418	1.100	Rgr	0.398	0.851
Aqp7	2.402	1.193	Cited2	0.412	0.872
Upp1	2.387	1.242	Trafd1	0.414	0.847
Npal1	2.382	1.047	Gli2	0.416	0.847
Cst6	2.355	1.134	Orm1	0.416	0.841
Rnf125	2.349	1.052	Nrbp2	0.416	0.956
Aqp7	2.347	1.031	Atad4	0.421	0.933
Birc4	2.333	1.008	LOC100045567	0.423	1.074
Fhl1	2.293	1.052	Mgp	0.426	0.931
Egr2	2.256	1.109	Klf13	0.430	0.978
9930122J16Rik	2.227	0.973	LOC100044204	0.433	0.844
Fabp5	2.210	1.166	Mxra8	0.436	0.890
Tmem45b	2.201	1.121	Rnd2	0.440	0.863
Ubqln1	2.200	0.845	Hdac7	0.441	0.929
Fgf10	2.194	0.990	1500017E21Rik	0.447	0.966
Tgoln1	2.188	0.981	Ipas	0.449	0.845
Gys2	2.188	0.956	Camp	0.449	1.001
Cast	2.185	1.070	Gstm2	0.450	0.881
Impa2	2.177	1.178	C4a	0.451	0.858
Hdlbp	2.155	1.113	Rgr	0.453	0.990
Map3k5	2.145	1.106	Tmed10	0.453	1.075
Met	2.144	0.996	Ampd3	0.455	0.991
Ermp1	2.129	0.908	Aldh3b1	0.457	1.004
Neu2	2.124	1.207	1300007L22Rik	0.458	0.851
Phlda1	2.123	1.078	Pmp22	0.458	0.888
Suclg2	2.110	1.245	Ift122	0.464	0.973
Ermp1	2.105	1.121	Gstm2	0.471	0.889
Asns	2.104	0.852	Ear4	0.471	1.030
Osr2	2.104	0.990	LOC100047268	0.474	0.981

**APÊNDICE B - GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA EXCLUSIVAMENTE EM
RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA**

Continua

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16	Gene	Rosi	GQ-16
Nat1	2.097	1.073	Ehd3	0.474	1.030
Cdk6	2.086	1.224	Slc35e4	0.478	0.851
Clcf1	2.073	1.249	Hes1	0.480	0.891
Idh3a	2.072	1.124	Nrap	0.481	1.111
Clcf1	2.066	1.072	Apoc3	0.483	0.978
2310016C08Rik	2.063	1.145	LOC100048332	0.484	0.876
AI850995	2.056	1.188	Hspb1	0.486	1.091
Cmb1	2.046	1.092	Hp	0.488	0.943
Ccrn4l	2.040	1.109	Selenbp2	0.489	1.059
Pvr	2.035	1.043	LOC100047126	0.489	1.050
Mtmr2	2.033	1.002	Sncg	0.493	1.071
Erlin2	2.026	1.150	Slc29a1	0.493	0.944
5031436O03Rik	2.021	1.192	Atad4	0.494	0.976
Tmem120a	2.021	1.160	Adamts2	0.496	0.980
Megf9	2.018	0.885	AI607873	0.496	0.866
Atf3	2.014	1.181	Gas6	0.498	1.161
Actb	2.009	1.146	1110003O08Rik	0.499	0.840
Fgf10	2.006	0.966	Dm15	0.499	0.838
Srxn1	1.989	1.108	Lman1l	0.499	0.876
Pvr	1.988	1.161	Tmem176b	0.499	0.964
Serpib9f	1.985	0.959	Cyp17a1	0.500	0.936
Krt1-5	1.983	1.189	Sec14l1	0.501	0.935
Ppfibp1	1.983	0.990	Egfr	0.502	0.922
Cdc42bpa	1.982	0.845	9030607L17Rik	0.503	1.004
Fhl1	1.981	1.098	Epb4.9	0.504	1.159
Tpsab1	1.981	1.154	Cited2	0.507	0.905
Wdr67	1.973	1.006	Mlxipl	0.507	0.872
Sdcbp2	1.970	1.089	D0H4S114	0.507	0.931
Calu	1.965	1.104	AI646023	0.508	0.885
2310045K21Rik	1.965	0.957	Slc1a4	0.508	0.853
Clcf1	1.965	1.226	Gnmt	0.509	1.069
Dhrs9	1.960	0.935	Ras111a	0.509	1.054
Stard5	1.945	1.054	Cd82	0.509	0.919
Slc25a26	1.939	1.175	Lrig1	0.511	0.869
Acadl	1.936	1.045	Ifitm3	0.512	0.906
Samd4	1.933	1.243	Anxa8	0.513	0.872
Pck1	1.929	1.123	Prtn3	0.513	1.142
1500003O03Rik	1.929	1.202	Wisp1	0.514	0.841

**APÊNDICE B - GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA EXCLUSIVAMENTE EM
RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA**

Continuação

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16	Gene	Rosi	GQ-16
Ppargc1a	1.923	1.051	Rras	0.515	0.966
Ppp2r1b	1.920	1.105	LOC100047937	0.516	0.970
Plscr1	1.914	1.142	Ddit4	0.517	1.096
Entpd5	1.909	1.127	2610528A11Rik	0.519	0.975
Psmc2	1.896	1.188	Os9	0.521	0.859
Atp5o	1.891	1.246	Syn2	0.523	1.129
Itgad	1.886	1.176	Snta1	0.523	1.003
E130016E03Rik	1.871	1.122	Pdlim4	0.525	0.876
Zdhhc13	1.871	1.020	Lass5	0.526	0.905
Stard7	1.869	0.931	Adamts2	0.527	0.944
2310079P10Rik	1.867	1.074	Thrsp	0.527	0.908
Nbr1	1.859	1.111	Bmp1	0.527	0.852
Prune	1.854	0.959	B230312E02Rik	0.527	0.988
Gys2	1.848	1.104	Epb4.9	0.529	0.974
Pigl	1.846	1.205	Cryab	0.530	1.010
Zfp655	1.846	1.183	Cldn15	0.531	1.018
Ehd4	1.846	1.173	Ptgis	0.532	0.901
Siah2	1.837	1.091	Hpd	0.533	1.070
Lrrc39	1.834	1.158	Mll3	0.533	0.843
Eprs	1.831	1.102	Apoc1	0.534	0.852
Seh1l	1.830	1.085	Rgl2	0.535	0.881
Etv5	1.830	1.208	A130062D16Rik	0.537	0.870
Brp44	1.824	1.159	Sox4	0.537	0.963
Atl3	1.821	0.895	Dnm3os	0.537	1.042
1700034P14Rik	1.818	1.031	Gstk1	0.540	1.076
Ubqln1	1.818	1.069	Hcls1	0.541	0.992
LOC384054	1.818	1.202	Pmp22	0.541	1.028
Aifm2	1.816	1.219	Sirt7	0.541	1.010
LOC270491	1.816	0.933	9030607L17Rik	0.544	0.912
Sept9	1.813	1.131	Adamts15	0.545	1.169
Ier3	1.807	1.159	Spon2	0.545	1.082
LOC245892	1.805	1.152	Grik5	0.548	0.859
Ppp2r2a	1.804	1.019	Gpihbp1	0.548	1.027
Pde1b	1.802	1.229	Ssbp4	0.548	0.942
Nbr1	1.801	1.149	Dtx4	0.548	1.021
Ptgr2	1.800	1.114	Ear3	0.549	0.976
2900060B14Rik	1.794	0.946	Tmem63a	0.551	1.079
H2afy2	1.792	1.178	Abhd14b	0.553	0.877

**APÊNDICE B - GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA EXCLUSIVAMENTE EM
RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA**

Continuação

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16	Gene	Rosi	GQ-16
2900062L11Rik	1.786	1.154	Atn1	0.554	0.967
Dusp4	1.784	1.206	Sall2	0.555	0.955
Npr3	1.783	1.122	Sfxn2	0.558	1.004
Synj2bp	1.781	1.186	Mbd4	0.558	1.111
Ubd	1.780	1.057	Igsf3	0.559	0.988
Tpm4	1.780	1.019	Mmp2	0.561	0.838
Ephx2	1.779	1.082	1200009O22Rik	0.561	0.969
Mmd2	1.775	1.102	Sp3	0.561	0.868
2810407C02Rik	1.774	1.065	Ggcx	0.561	0.838
Tubb2b	1.769	1.095	2810423O19Rik	0.562	0.875
Aifm2	1.768	1.231	Bid	0.562	1.068
Cul2	1.766	1.083	2310021P13Rik	0.563	0.995
Sorbs1	1.766	1.026	Ift172	0.563	0.881
Cdt1	1.763	1.073	Dab2	0.564	0.850
Ccrn4l	1.761	0.850	Ear2	0.565	0.865
Sel1l	1.759	1.017	Apoa4	0.565	0.991
Sgk2	1.759	1.019	Bmp1	0.565	1.024
Foxred1	1.754	1.024	Cldn15	0.566	0.949
Surf4	1.753	1.147	Arl3	0.566	0.963
Lrrc39	1.752	1.129	Lamb3	0.567	0.936
Psm2	1.751	1.191	LOC100046232	0.568	0.898
Gtpbp10	1.748	0.991	Lcn2	0.569	1.003
Uba1	1.747	1.223	LOC100047937	0.569	1.145
Xpnp1	1.745	1.169	Tspan4	0.569	0.933
Pak2	1.735	1.061	Igsf3	0.570	1.193
Crat	1.735	1.089	Fam110b	0.570	0.879
Mpl	1.734	1.068	Cchcr1	0.570	0.836
Birc4	1.734	0.911	Col1a1	0.570	0.953
Mgll	1.733	1.106	Kcnk3	0.572	0.854
Arhgef2	1.732	1.155	Usp2	0.572	1.017
Jun	1.729	1.022	C130092E12	0.572	0.921
Polh	1.729	1.047	Porcn	0.572	0.901
Galnt12	1.729	1.018	Ahnak2	0.573	1.039
Rora	1.728	1.193	Vdr	0.574	1.181
Heatr5b	1.726	1.013	LOC100048721	0.574	0.843
D930001I22Rik	1.725	1.208	6330414G02Rik	0.574	0.929
Capzb	1.723	1.040	Anxa11	0.578	0.876
Rrp15	1.723	1.180	Adamts14	0.578	0.867

**APÊNDICE B - GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA EXCLUSIVAMENTE EM
RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA**

Continuação

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16	Gene	Rosi	GQ-16
Pigh	1.719	1.207	Hdac11	0.580	1.102
Peli3	1.717	1.169	LOC100046207	0.581	0.839
5830435K17Rik	1.714	0.842	Kifc2	0.581	0.886
2700024D06Rik	1.709	1.172	Grem1	0.581	0.926
Eif4g2	1.707	0.853	Ephb4	0.581	0.988
Ccdc109a	1.706	0.986	Tmod4	0.582	0.853
1810014F10Rik	1.705	1.242	Lrp12	0.582	1.032
Ccdc109a	1.705	1.017	Mmp14	0.582	0.980
D12Ertd551e	1.705	1.125	Thy1	0.582	1.156
Galnt12	1.704	1.043	Serpina3n	0.582	1.040
Ndufb10	1.704	1.168	Tenc1	0.583	0.948
Ppapdc1b	1.704	1.195	Bahd1	0.583	0.863
1110007A13Rik	1.699	1.037	Ogfrl1	0.586	0.931
BC049349	1.699	0.835	A930005G04Rik	0.586	0.978
2010004N17Rik	1.697	1.025	LOC100044430	0.586	0.841
LOC380707	1.695	1.043	Tpcn1	0.587	0.856
Htra3	1.693	1.083	Dync2li1	0.587	0.976
Mrpl15	1.693	1.121	1500011B03Rik	0.588	0.957
Lcor	1.690	0.981	0610007N19Rik	0.588	1.074
Actn4	1.687	1.105	Slc44a2	0.589	0.845
Efr3a	1.685	1.095	Aldh3b1	0.589	0.980
Ppcs	1.684	1.147	Osbp13	0.590	0.985
Zc3h13	1.684	1.051	A130030M01Rik	0.590	0.924
Prmt7	1.683	1.217	Per1	0.592	1.072
D630014A15Rik	1.681	0.979	2310067B10Rik	0.592	0.969
Gch1	1.678	1.137	Nfic	0.592	0.884
Rcan1	1.674	0.969	Ssh3	0.593	0.920
Tuba6	1.671	1.090	Lbp	0.593	0.922
Pde4dip	1.669	0.998	Bcl2l11	0.593	0.904
Acbd4	1.668	1.223	Plxnb2	0.594	1.092
Trfp	1.668	1.205	Igfbp6	0.594	0.836
EG433144	1.667	0.935	Prkcbp1	0.595	0.988
Hipk2	1.661	1.170	Cdsn	0.596	0.929
4931426K16Rik	1.658	1.225	9430030N17Rik	0.596	0.956
Csda	1.657	1.157	Amotl1	0.597	0.861
1300010F03Rik	1.657	0.997	Grasp	0.597	1.037
A730008H23Rik	1.655	1.152	Ras111a	0.597	1.105
Ube2e1	1.655	1.116	Chd9	0.598	1.058

**APÊNDICE B - GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA EXCLUSIVAMENTE EM
RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA**

Continuação

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16	Gene	Rosi	GQ-16
C430049K18Rik	1.655	1.164	Tcf4	0.598	0.910
Gcnt2	1.654	1.132	1810031K17Rik	0.599	1.014
Cetn3	1.652	1.190	Appl2	0.600	0.952
A930002H24Rik	1.652	1.120	Nisch	0.600	1.007
LOC384382	1.650	1.001	Nte	0.600	0.927
Nadsyn1	1.650	1.159	Gab3	0.600	1.012
D730003I15Rik	1.650	1.104	4432405B04Rik	0.601	0.875
Mobk13	1.649	1.021	Bmp1	0.601	0.963
AI448196	1.649	0.838	Steap2	0.602	0.886
D12Ert551e	1.647	1.016	B930075F07	0.602	0.990
E430003D02Rik	1.647	1.033	Trp53inp1	0.603	0.889
1300010F03Rik	1.647	1.115	Tmem180	0.604	1.052
Adfp	1.637	1.040	LOC100048083	0.604	1.143
Plekha8	1.631	1.211	Nid2	0.604	0.847
Dhx30	1.630	1.160	Shc1	0.605	0.936
3010026O09Rik	1.629	1.197	Numbl	0.605	0.945
Tnfrsf4	1.628	1.190	Tmie	0.605	0.892
Picalm	1.627	0.982	Plixnd1	0.605	1.014
Angptl4	1.625	1.229	Lphn1	0.606	0.894
Pex10	1.623	1.054	Il17re	0.606	0.950
4933408F15	1.622	1.086	Snai2	0.606	0.880
2810035J02Rik	1.622	1.126	Vdr	0.607	0.837
Sfrs10	1.621	1.115	Wnk4	0.607	1.086
Popdc3	1.620	1.025	Usp54	0.608	0.850
Dhrs7b	1.616	1.250	Aldh1l1	0.608	1.154
Nedd4l	1.611	0.917	2310075M15Rik	0.608	0.861
Calr3	1.611	1.228	Cdc42ep5	0.609	0.957
Yaf2	1.605	0.892	LOC100046608	0.609	0.878
Usp18	1.605	1.105	2510048L02Rik	0.609	0.835
Epb4.1l4b	1.604	1.043	Slc9a3r1	0.609	0.924
2410001C21Rik	1.604	1.221	Lrrc8	0.610	1.120
Prei3	1.604	1.234	Ebpl	0.610	1.043
Ubac2	1.603	1.198	Fzd2	0.610	1.088
Tnfrsf22	1.603	0.987	Igfbp4	0.610	0.960
D10Wsu102e	1.599	1.162	Rab3d	0.611	0.973
Retsat	1.599	1.080	Klc4	0.611	1.029
P2rx4	1.597	1.090	LOC100047214	0.611	0.919
LOC545750	1.597	1.060	Bicc1	0.611	0.980

**APÊNDICE B - GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA EXCLUSIVAMENTE EM
RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA**

Continuação

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16	Gene	Rosi	GQ-16
Krt36	1.596	1.072	Ctca1	0.611	0.938
1500041J02Rik	1.594	1.150	Vim	0.611	0.884
A330021D07Rik	1.594	1.187	1190005I06Rik	0.611	1.052
LOC215879	1.592	1.032	Nuak2	0.613	0.936
Mrs2	1.592	1.240	Map3k6	0.613	1.037
Cmtm4	1.590	1.033	Gdpd1	0.613	0.986
Pla2g12a	1.590	0.904	Slc12a6	0.614	0.841
LOC219106	1.589	1.147	Trrp1	0.614	0.842
LOC100043192	1.588	1.176	Itm2b	0.615	0.886
Zhx1	1.587	1.105	Jmjd2b	0.616	0.851
Hdhd2	1.585	1.188	Agt	0.616	0.918
1500005K14Rik	1.584	1.239	8430426J06Rik	0.616	0.880
Fam160a2	1.584	1.147	1700038P13Rik	0.618	0.881
Ascc2	1.582	1.200	Gga2	0.618	0.844
Etfdh	1.582	1.128	Itpkb	0.619	0.837
Mapk1ip1l	1.582	1.118	Sema4g	0.619	1.093
Skz1-pending	1.582	1.047	9430029L20Rik	0.619	0.863
Erb2ip	1.579	1.046	Fam176b	0.619	0.922
Calu	1.579	1.021	LOC98434	0.620	0.866
Mcart1	1.578	1.111	BC017643	0.620	0.912
LOC208414	1.576	1.032	Zfand6	0.620	0.855
Smox	1.575	1.201	Slc16a5	0.620	0.990
Mark3	1.573	0.888	Parvg	0.621	1.009
Abhd12	1.572	1.142	Ncdn	0.621	0.970
Tmem147	1.570	1.193	Slc25a29	0.622	1.166
Sesn2	1.569	1.182	Agrp	0.622	0.841
Mmp11	1.568	1.218	Plekhf1	0.622	1.087
D230004N01Rik	1.566	1.141	Pias3	0.622	0.840
Trim29	1.566	1.202	Cxxc6	0.623	0.909
Caprin2	1.565	0.856	Grik5	0.624	0.929
4933401B08Rik	1.565	1.144	Plac8	0.624	0.934
Mrpl51	1.564	1.042	MGC18837	0.625	0.991
Sf1	1.563	1.153	LOC639715	0.625	1.093
Upp1	1.562	1.032	Sparc	0.625	0.927
Ldb3	1.561	1.214	Nqo1	0.625	0.896
Gm608	1.561	1.062	9330175B01Rik	0.626	0.905
LOC385957	1.560	0.919	Slc23a3	0.626	0.924
Dusp1	1.559	1.053	Tulp3	0.626	1.027

**APÊNDICE B - GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA EXCLUSIVAMENTE EM
RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA**

Continuação

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16	Gene	Rosi	GQ-16
Nol5a	1.559	1.010	Pex1	0.627	1.174
Tomm40l	1.556	1.052	Slc6a6	0.628	0.954
Klhl24	1.556	0.851	Ssbp3	0.628	0.901
Gipc1	1.556	1.127	Lef1	0.629	0.853
Trit1	1.556	1.195	Tcf7l2	0.629	1.048
Afg3l2	1.554	1.061	Gnmt	0.629	0.915
Zfp326	1.553	1.133	Tle6	0.630	1.003
Tdg	1.552	1.178	LOC100046207	0.630	0.941
Mrpl1	1.552	1.161	Rab31	0.630	0.971
LOC545056	1.550	1.131	C4b	0.631	0.908
Osbp11	1.550	0.943	Chst12	0.632	0.935
Acot8	1.550	1.228	Hsd11b1	0.632	0.936
Mtus1	1.550	1.034	Sncg	0.632	0.993
Prei4	1.549	1.168	Prkcd	0.632	0.888
Snrk	1.549	1.212	LOC381770	0.633	0.996
Lsm1	1.547	1.207	Garnl3	0.633	0.983
Cmpk	1.547	1.148	Ihpk1	0.633	0.909
Ppt1	1.546	1.027	Itpr3	0.633	0.949
6330548G22Rik	1.544	1.167	Ppap2a	0.633	1.000
Siat10	1.543	1.044	Khk	0.633	0.995
Ak2	1.542	1.182	Pxmp2	0.634	1.247
Epb4.1l4b	1.542	1.170	Phxr4	0.637	0.909
Mospd1	1.541	1.004	Wdr78	0.637	0.889
Nrg1	1.540	1.240	Cbx7	0.638	0.898
Tmem11	1.540	1.236	Glipr2	0.638	1.080
Suv420h2	1.540	1.145	Plscr4	0.638	1.026
Ard1	1.538	1.061	Nfic	0.639	1.073
Snrk	1.536	1.160	2610202E01Rik	0.639	0.862
Zfp746	1.535	1.136	Sc5d	0.639	0.970
Copg	1.534	1.159	Slc25a42	0.640	1.089
Vps26a	1.534	0.875	D230020C06Rik	0.640	0.871
Heatr5b	1.534	1.162	Wnk4	0.641	0.943
Dusp4	1.530	1.041	BC030863	0.641	0.846
Tigd2	1.530	0.982	Twf2	0.642	1.113
Apitd1	1.529	1.143	Chd4	0.643	0.843
Syne2	1.529	0.843	Cbr2	0.643	1.034
Tarbp2	1.528	1.240	0610031J06Rik	0.644	0.955
Csnk1d	1.527	1.218	Mbd5	0.646	0.933

**APÊNDICE B - GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA EXCLUSIVAMENTE EM
RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA**

Continuação

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16	Gene	Rosi	GQ-16
Als2cr4	1.526	1.176	Dlgap4	0.647	1.067
Tomm40	1.526	1.102	Comp	0.647	0.873
Mrpl37	1.524	0.987	Sepx1	0.648	0.859
Brp	1.523	1.139	Lpin3	0.648	0.961
lars	1.523	1.096	Rcan2	0.649	1.032
4930406P12Rik	1.521	0.976	Snopc3	0.650	0.852
Rad23a	1.521	1.167	Cd2bp2	0.650	1.029
Mcm7	1.521	1.227	Hsd11b1	0.650	0.934
Afap1	1.519	1.238	Mustn1	0.651	1.188
Strbp	1.519	1.079	5031439A09Rik	0.652	0.958
Sft2d2	1.517	1.150	Obfc1	0.653	0.882
2600010E01Rik	1.515	1.096	Mov10	0.653	0.984
Nudt19	1.514	1.245	Acap3	0.653	1.003
Tspan18	1.514	1.114	Itgae	0.654	0.983
Itpril2	1.514	0.965	Aup1	0.655	1.066
Entpd5	1.513	1.180	Gs2na-pending	0.655	1.003
Sfpi1	1.513	1.124	Egfl7	0.655	1.133
Wdr73	1.512	1.025	Smarce1	0.655	0.856
Mcm5	1.512	1.227	2310001H17Rik	0.656	0.972
Ide	1.511	1.163	Nfia	0.656	0.921
Cisd1	1.510	0.980	Plekhg2	0.656	1.070
Zfp3	1.510	1.137	LOC100046608	0.657	0.864
Timm9	1.508	1.208	D10Ert641e	0.657	0.881
Sh3kbp1	1.508	1.071	9030024J15Rik	0.658	1.033
Pisd	1.505	1.126	Rarres2	0.658	1.030
Nup62	1.505	0.972	5730410E15Rik	0.658	0.938
Poldip2	1.502	1.179	S100a3	0.658	0.846
Rusc2	1.502	1.165	Evc	0.659	1.039
Bpnt1	1.501	1.211	Zfp395	0.659	1.010
Pik3cb	1.501	1.046	Atp6v0d1	0.659	0.991
Ap1s1	1.500	1.054	Tnxb	0.660	1.013
			Arl2bp	0.660	0.946
			4833441J24Rik	0.660	0.929
			Gpr19	0.660	1.020
			sc10003799.1_2	0.661	0.922
			B130019G13Rik	0.661	1.126
			Cdsn	0.661	1.148
			Lef1	0.661	0.867

**APÊNDICE B - GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA EXCLUSIVAMENTE EM
RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA**

Conclusão

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16	Gene	Rosi	GQ-16
			Kif1b	0.661	0.990
			Sfxn2	0.662	1.053
			Tmem49	0.662	1.035
			Irf7	0.662	0.948
			Pcdhgb4	0.663	1.003
			Mpv17	0.663	0.853
			Fes	0.663	0.913
			Mark2	0.664	1.168
			Slc25a35	0.664	1.012
			Phip	0.665	1.009
			9530050F08Rik	0.665	0.871
			Snta1	0.665	0.954
			Amigo2	0.666	0.860
			Foxo1	0.666	0.843

**APÊNDICE C - GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA EXCLUSIVAMENTE EM
RESPOSTA AO TRATAMENTO COM GQ-16**

Ativados			Reprimidos		
Gene	GQ-16	Rosi	Gene	Rosi	GQ-16
Metrn	1.475	1.841	Phf2011	0.692	0.497
Wdr89	1.375	1.742	Top1	0.795	0.551
Hist1h2af	1.383	1.722	Mobk1b	0.745	0.56
4921536K21Rik	1.046	1.698	Psme4	0.886	0.569
LOC100042179	1.441	1.662	Dmxl1	0.671	0.575
Supt16h	1.475	1.645	Utx	0.682	0.588
Hoxa5	1.488	1.619	Gulp1	1.068	0.59
Mprp	1.085	1.616	Ptp4a2	0.957	0.595
EG666668	1.376	1.603	Hbp1	0.895	0.6
Nudt1	1.377	1.6	BC023892	0.67	0.602
Afg3l1	1.459	1.598	E130102H24Rik	0.695	0.605
Mad2l1bp	1.147	1.576	Prkdc	0.73	0.617
Bola1	1.072	1.57	Mtf2	0.88	0.624
Ddx49	1.381	1.56	LOC245000	0.679	0.625
Deadc1	1.351	1.527	Smarca3	0.868	0.627
Mtvr2	1.024	1.513	Ppm1l	0.692	0.63
Zdhhc1	0.967	1.51	Tmed7	0.875	0.63
Rps19	1.402	1.509	Cyb5r4	0.908	0.637
Rnaseh2a	1.122	1.509	Ube2n	0.757	0.641
			LOC280487	0.844	0.644
			Pbx1	0.733	0.659
			Ddx6	1.02	0.66
			Mier3	0.691	0.664
			Ttll4	0.823	0.664

**APÊNDICE D – GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA DE MODO SIMILAR
EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA E GQ-16**

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16	Gene	Rosi	GQ-16
Acaa1b	15.574	2.603	Orm2	0.198	0.615
Rn18s	10.047	4.114	Tmem176a	0.208	0.630
LOC673501	9.892	4.790	Olfml2b	0.219	0.644
LOC385068	9.303	4.555	Serpina3c	0.236	0.542
Rn18s	7.727	3.040	Zan	0.237	0.665
Elovl3	5.863	1.855	Errfi1	0.245	0.691
Fgf21	5.411	1.687	Syt12	0.262	0.655
Krt23	4.367	1.708	Prodh	0.275	0.708
5430433G21Rik	4.219	1.434	Insig2	0.278	0.569
Elovl3	4.194	1.449	Lgi4	0.296	0.807
Dmkn	4.191	1.826	Itih4	0.296	0.756
Rn18s	4.137	3.241	Emp1	0.309	0.682
Dmkn	4.049	1.948	Cyb561	0.310	0.775
Cbr3	3.952	1.581	Plekhg5	0.312	0.675
Bhlhb9	3.900	1.411	Cyp1b1	0.316	0.680
Agpat9	3.701	1.553	Rgs2	0.317	0.792
Ptrf	3.576	1.478	Phkg1	0.318	0.493
Pcx	3.241	2.377	Cpm	0.324	0.736
Cyp2c70	3.152	1.414	Vcam1	0.326	0.585
4930455C21Rik	3.030	2.079	Tgfbi	0.328	0.601
Dhrs9	2.961	1.314	Lox	0.338	0.492
Tmem86a	2.913	1.521	Sparcl1	0.338	0.635
Rbp7	2.888	1.394	Olfml3	0.339	0.800
Ces3	2.849	1.360	LOC100047419	0.339	0.695
2310016C08Rik	2.730	1.590	Ppil6	0.340	0.724
Decr1	2.719	1.554	S100a8	0.342	0.634
Nipsnap1	2.698	1.521	Abi3bp	0.344	0.524
St3gal6	2.682	1.326	Lgals9	0.345	0.564
Plk3	2.659	1.358	Amy2-2	0.348	0.672
Acox1	2.568	1.346	Pik3ip1	0.354	0.745
Krt79	2.548	1.704	D4Erttd681e	0.356	0.569
Csde1	2.518	1.363	Aldh3b1	0.357	0.685
LOC666038	2.517	1.325	Trp63	0.359	0.682
Cxx1b	2.495	1.379	Xdh	0.360	0.785
LOC384583	2.460	1.556	Prodh	0.366	0.727
Pmepa1	2.387	1.255	scl0002547.1_9	0.366	0.655
Nat8l	2.366	1.612	Rdh12	0.367	0.728
Slc25a20	2.345	1.454	Gstm2	0.369	0.790
Agpat9	2.312	1.296	Mxra8	0.370	0.822

**APÊNDICE D – GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA DE MODO SIMILAR
EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA E GQ-16**

Continua

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16	Gene	Rosi	GQ-16
Gpr109a	2.309	1.415	Cyp2f2	0.373	0.739
Las1l	2.302	1.386	Tnfrsf25	0.374	0.825
Cbr3	2.301	1.649	Hr	0.377	0.763
E030040G24Rik	2.289	1.367	Papss2	0.383	0.583
Klf5	2.289	1.807	Rgs2	0.388	0.598
2310058J06Rik	2.276	1.418	Pcdh21	0.389	0.813
LOC100044087	2.274	1.266	Figf	0.390	0.611
Aox3	2.264	1.416	Sema3f	0.396	0.771
Lhfp12	2.253	1.520	C1qtnf5	0.397	0.790
Gpd1	2.247	1.552	Fam134b	0.399	0.515
Acot2	2.236	1.493	Fn1	0.399	0.623
Krt36	2.219	1.329	Car12	0.400	0.769
Irs2	2.218	1.820	Cited2	0.401	0.768
Wwtr1	2.217	1.429	Rhoj	0.407	0.765
Cyb5r3	2.214	1.750	Acsm3	0.411	0.775
Mrto4	2.188	1.907	Flt1	0.414	0.691
Chchd10	2.185	1.594	LOC100044204	0.417	0.819
Cmtm4	2.158	1.303	Dpep1	0.418	0.763
Tnfrsf12a	2.143	1.448	Gstm1	0.420	0.822
Tbrg4	2.134	1.519	Serpina3m	0.420	0.733
Twist2	2.128	1.272	Mrgprf	0.422	0.734
Myl4	2.127	1.470	LOC100045005	0.423	0.791
Wars	2.122	1.380	X99384	0.425	0.711
Slc25a25	2.114	1.257	Lgals9	0.425	0.645
Pde1b	2.110	1.390	Trafd1	0.427	0.616
Clstn3	2.107	1.454	A130047F11Rik	0.428	0.736
Cdc42bpa	2.091	1.267	Itih4	0.428	0.831
Cenpa	2.082	1.492	Ear3	0.431	0.787
Cxx1a	2.052	1.356	Slc2a13	0.436	0.642
Gng2	2.050	1.521	Wdr6	0.437	0.787
Nrg4	2.047	1.269	Bmf	0.437	0.688
Daam1	2.041	1.344	Lctl	0.438	0.671
Nat8l	2.033	1.635	Tbc1d2b	0.441	0.774
Col6a1	2.030	1.387	Rdh12	0.442	0.642
Eif5a	2.029	1.370	Col18a1	0.442	0.772
9330133O14Rik	2.015	1.366	LOC638301	0.444	0.755
1700041B20Rik	2.000	1.303	Fam107a	0.444	0.797
Oscar	1.997	1.341	4932417I16Rik	0.445	0.781

**APÊNDICE D – GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA DE MODO SIMILAR
EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA E GQ-16**

Continuação

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16	Gene	Rosi	GQ-16
Tubb2b	1.992	1.282	Col4a5	0.449	0.705
Sorbs1	1.991	1.270	Gstt3	0.450	0.722
Ati3	1.988	1.336	Sertad4	0.456	0.690
LOC386534	1.984	1.750	Car12	0.456	0.797
Pfkm	1.983	1.363	Ncam1	0.457	0.729
D6Wsu176e	1.971	1.562	AW112037	0.458	0.647
Mrpl15	1.952	1.305	Aqp1	0.459	0.769
Wars	1.949	1.326	Ceacam2	0.460	0.726
Col6a3	1.941	1.615	Hp	0.461	0.806
Aifm2	1.934	1.372	Ly6c1	0.461	0.687
Dctd	1.934	1.316	1700113I22Rik	0.463	0.735
Bach2	1.931	1.261	Furin	0.463	0.821
Foxred1	1.924	1.323	Ctsl	0.464	0.784
Rpia	1.916	1.478	Ctla2b	0.464	0.696
Rnf185	1.914	1.442	Il17re	0.467	0.712
6820406G21Rik	1.908	1.357	Dusp7	0.472	0.534
4632418H02Rik	1.903	1.370	Il15	0.473	0.684
Gpr146	1.899	1.289	A530050D06Rik	0.473	0.822
Eif6	1.895	1.425	Cp	0.473	0.690
4930504E06Rik	1.893	1.281	Col18a1	0.474	0.812
Peg10	1.872	1.279	Dcn	0.476	0.701
Cdc25a	1.857	1.332	Slc2a13	0.477	0.774
Chchd6	1.857	1.525	Prkd3	0.477	0.477
Bcs1l	1.853	1.399	Msl2l1	0.478	0.661
LOC100048622	1.849	1.479	Al464131	0.479	0.680
Sh3tc2	1.845	1.627	Ddr1	0.479	0.716
Mrpl30	1.844	1.468	Pkd2l1	0.479	0.773
LOC434200	1.844	1.294	Anxa8	0.479	0.802
Pabpc1	1.841	1.548	Gbp3	0.480	0.700
Tgif1	1.840	1.315	Col5a2	0.481	0.672
Cdca3	1.838	1.711	1110018J23Rik	0.485	0.829
Pex16	1.836	1.592	Pias3	0.485	0.825
Nus1	1.825	1.297	Trps1	0.486	0.756
Zfp259	1.825	1.417	1700113I22Rik	0.491	0.820
LOC384727	1.823	1.521	Npc2	0.492	0.692
6330505N24Rik	1.823	1.306	Apbb2	0.492	0.736
Wars	1.820	1.501	Dusp14	0.494	0.741
Rnf166	1.816	1.512	Ecm1	0.494	0.747

**APÊNDICE D – GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA DE MODO SIMILAR
EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA E GQ-16**

Continuação

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16	Gene	Rosi	GQ-16
Ccdc85b	1.815	1.447	Phka2	0.496	0.771
Itgad	1.810	1.254	Cpm	0.498	0.714
Dlc1	1.805	1.256	Sp2	0.498	0.758
Osr2	1.801	1.401	Slc16a4	0.501	0.681
Kars	1.800	1.416	Mb	0.503	0.723
2410001C21Rik	1.796	1.493	Furin	0.503	0.565
Fus	1.791	1.867	Syn2	0.504	0.594
Pard6a	1.790	1.470	Setd1b	0.504	0.807
Ard1a	1.785	1.279	Camk2b	0.504	0.769
Als2cr4	1.772	1.305	scl0001849.1_2273	0.505	0.747
LOC383561	1.771	1.385	Fer1l3	0.508	0.724
LOC676974	1.769	1.312	Tgfb1	0.511	0.789
Snrp70	1.769	1.374	C130080K17Rik	0.511	0.772
6330562C20Rik	1.768	1.572	Pcolce2	0.512	0.593
Mrpl55	1.765	1.565	Antxr1	0.512	0.646
Sbk	1.761	1.351	Sdc2	0.513	0.732
Mrpl15	1.760	1.295	Tex19.1	0.514	0.592
LOC100041835	1.760	1.399	Slc45a3	0.515	0.738
4631434O19Rik	1.753	1.376	Aqp1	0.515	0.821
Sulf2	1.752	1.688	Card10	0.515	0.832
C330006A16Rik	1.752	1.640	Kitl	0.516	0.682
scl0002368.1_75	1.751	1.723	Xlr4a	0.516	0.787
Fbxo9	1.748	1.394	2810026P18Rik	0.517	0.638
D730042P09Rik	1.745	1.538	Rhou	0.517	0.830
Srr	1.744	1.594	Aldh1a1	0.518	0.675
LOC637353	1.741	1.470	1110032E23Rik	0.519	0.789
1110007M04Rik	1.738	1.284	Dtx4	0.519	0.794
4930563B10Rik	1.731	1.304	Ssbp2	0.520	0.721
D6Wsu176e	1.730	1.613	Mapk6	0.521	0.697
Eif1ad	1.729	1.573	6720418B01Rik	0.522	0.759
Snx27	1.721	1.401	Gstk1	0.523	0.835
Ung	1.720	1.414	Stim1	0.524	0.706
Vars	1.718	1.595	Htra4	0.524	0.812
Gatad1	1.716	1.653	LOC100046207	0.525	0.651
Mrpl15	1.716	1.390	6430527G18Rik	0.525	0.829
Hsd17b12	1.710	1.297	Grk5	0.526	0.715
LOC385632	1.709	1.340	2010003K11Rik	0.527	0.723
scl0002368.1_75	1.708	1.961	Rnf145	0.527	0.687

**APÊNDICE D – GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA DE MODO SIMILAR
EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA E GQ-16**

Continuação

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16	Gene	Rosi	GQ-16
Abcf1	1.707	1.265	Col16a1	0.527	0.766
Pih1d1	1.706	1.338	Gdap10	0.528	0.768
Stambp11	1.705	1.579	Dusp18	0.528	0.774
Set	1.700	1.427	Tmem43	0.530	0.729
Gosr2	1.698	1.418	Samd9l	0.531	0.739
Mrpl15	1.696	1.277	4933439C20Rik	0.531	0.786
Med18	1.691	1.312	Tfrc	0.531	0.620
Ndufb7	1.691	1.589	LOC100046744	0.534	0.820
Krt14	1.691	1.314	Trip12	0.534	0.775
Cabp4	1.688	1.358	Atp1b1	0.534	0.796
Mfge8	1.686	1.256	Mapk6	0.536	0.711
5730494J16Rik	1.686	1.412	Layn	0.539	0.791
Rin1	1.685	1.263	Fas	0.539	0.697
EG245651	1.683	1.356	Amigo2	0.541	0.804
2600001B17Rik	1.681	1.691	Gstm5	0.541	0.706
LOC619973	1.678	1.368	Stxbp1	0.541	0.787
Mrpl2	1.678	1.585	Aqp1	0.543	0.783
Ppp2r5d	1.678	1.695	D9Ert392e	0.543	0.807
Htati2	1.678	1.448	Chst8	0.545	0.783
A530078M04Rik	1.675	1.317	Zzz3	0.545	0.755
Pmm1	1.674	1.574	Fkbp5	0.545	0.788
Mrps16	1.672	1.511	B3galnt1	0.545	0.651
Cma1	1.671	1.272	Zfp185	0.547	0.661
Ehd2	1.670	1.303	BC018242	0.547	0.723
Mical3	1.670	1.378	Zfp361l	0.551	0.618
Cul4a	1.668	1.325	Enpp2	0.552	0.731
Raet1b	1.667	1.366	Timp1	0.556	0.789
Phospho1	1.667	1.448	Tmem82	0.556	0.813
Frap1	1.666	1.479	Sec14l1	0.557	0.794
Impa2	1.665	1.312	Cetn4	0.557	0.791
Chst11	1.661	1.345	Sephs1	0.561	0.694
Blvra	1.661	1.340	C4a	0.562	0.748
Mfge8	1.659	1.253	Lgmn	0.562	0.721
Bag4	1.656	1.317	Wbscr14	0.562	0.826
Noc4l	1.655	1.384	Per3	0.563	0.653
Rhot2	1.653	1.406	Sec14l1	0.563	0.717
Mtap9	1.650	1.276	1810011O10Rik	0.563	0.785
Gdf15	1.649	1.336	St5	0.564	0.830

**APÊNDICE D – GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA DE MODO SIMILAR
EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA E GQ-16**

Continuação

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16			
			Ddef2	0.564	0.670
Birc5	1.648	1.702	Col3a1	0.564	0.814
Tagln2	1.645	1.378	Nod1	0.564	0.692
Pkp4	1.644	1.321	1700027M01Rik	0.566	0.768
Fmnl3	1.641	1.423	5730406M06Rik	0.567	0.746
Hdhd2	1.639	1.343	Stat3	0.567	0.818
Pak4	1.636	1.364	Tlr4	0.568	0.622
Capn10	1.635	1.417	Nrn1	0.569	0.760
Nr1h3	1.635	1.421	4632401N01Rik	0.570	0.826
Afg3l1	1.634	1.968	Etv1	0.571	0.628
LOC622404	1.627	1.539	Trafd1	0.574	0.827
Coq6	1.627	1.587	C030014I23Rik	0.574	0.776
Pmm1	1.621	1.506	1700027M01Rik	0.575	0.815
Tbrg4	1.619	1.459	2810426P10Rik	0.576	0.672
Atp5f1	1.616	1.346	Nox4	0.576	0.711
4632411B12Rik	1.616	1.471	Slc12a9	0.577	0.786
Qsox1	1.615	1.316	Ptpn21	0.577	0.832
Mrps10	1.614	1.489	Nampt	0.578	0.828
2700038C09Rik	1.613	1.343	Rbms2	0.578	0.806
Mrps10	1.612	1.460	Camkk1	0.579	0.810
Ablim2	1.612	1.385	D230048P18Rik	0.579	0.611
Ffar2	1.612	1.362	Swap70	0.580	0.770
Fzd5	1.609	1.346	Slc27a3	0.581	0.775
Coq6	1.608	1.264	Zhx2	0.585	0.757
LOC100040353	1.605	1.316	Col5a2	0.585	0.808
Abcf1	1.605	1.290	BC014795	0.588	0.817
Akt2	1.602	1.295	Tmem45a	0.588	0.754
Ndufs6	1.597	1.376	Ii15	0.588	0.762
Rangap1	1.597	1.332	Spna2	0.588	0.834
Prmt7	1.596	1.316	Tcn2	0.588	0.754
Csnk1d	1.594	1.425	5730406M06Rik	0.589	0.819
Cd3eap	1.593	1.515	Pparg	0.591	0.824
Med28	1.587	1.442	Ptpdc1	0.591	0.756
Gys3	1.585	1.363	LOC621824	0.591	0.742
E130216C05Rik	1.582	1.327	D230045O07Rik	0.591	0.821
Slc2a1	1.582	1.343	Bcl7c	0.592	0.758
Ascc2	1.582	1.320	Sdc3	0.593	0.823
5330426P16Rik	1.580	1.495	Ly6e	0.594	0.814
G630016D24Rik	1.578	1.400	Ahdc1	0.595	0.833

**APÊNDICE D – GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA DE MODO SIMILAR
EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA E GQ-16**

Continuação

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16	Gene	Rosi	GQ-16
Tsku	1.575	1.487	Aoc3	0.595	0.671
Cma1	1.572	1.377	Gab3	0.596	0.779
Psmb10	1.571	1.500	Art3	0.596	0.780
2700089E24Rik	1.570	1.314	Ibsp	0.596	0.749
Ubqln1	1.569	1.251	Cp	0.596	0.797
1700029P11Rik	1.566	1.350	Setd5	0.598	0.708
BC037704	1.565	1.268	Sla	0.598	0.770
Epb7.2	1.562	1.269	Sidt2	0.599	0.726
Hist1h2ah	1.561	1.628	LOC100045280	0.601	0.709
Kntc1	1.561	1.467	Ncdn	0.601	0.767
Rshl2a	1.561	1.567	Gcat	0.601	0.814
9530058B02Rik	1.560	1.522	Zfp3611	0.603	0.815
Mphosph6	1.560	1.391	Zfp288	0.603	0.609
Rrm2	1.559	1.255	Sdf4	0.604	0.748
Fsd2	1.557	1.398	Muc13	0.604	0.736
Mtx1	1.557	1.293	Ogfrl1	0.606	0.758
Pole3	1.556	1.502	Zfp521	0.606	0.816
Atp5k	1.555	1.386	Rgr	0.607	0.828
Cox6a2	1.552	1.306	Btrc	0.607	0.784
Copg	1.552	1.276	Tmem43	0.608	0.669
Ranbp1	1.543	1.399	LOC100040244	0.609	0.709
Gins2	1.541	1.381	Ppp1r9b	0.609	0.812
Ddx28	1.540	1.316	Cdk5	0.609	0.791
Ppp1ca	1.536	1.401	Ifitm1	0.609	0.806
Tnfaip2	1.535	1.426	Epn2	0.610	0.717
Itpka	1.532	1.289	Bcl9	0.610	0.811
9830166G06Rik	1.528	1.369	Rasl12	0.611	0.820
9530058B02Rik	1.525	1.539	D830014B20Rik	0.614	0.653
Psen1	1.525	1.296	Nfat5	0.614	0.661
Spag4	1.524	1.369	Hspa2	0.614	0.831
Unc119	1.524	1.421	4931408A02Rik	0.615	0.825
Dhrs7b	1.522	1.318	LOC100044133	0.615	0.733
Sbf1	1.521	1.329	Sptlc1	0.617	0.604
Cttn	1.520	1.250	Slc12a2	0.617	0.662
Hist1h2ad	1.519	1.646	Irf4	0.617	0.825
Mrpl36	1.517	1.306	Pik3r1	0.617	0.741
Snrpf	1.517	1.471	Foxred2	0.617	0.695
2700038C09Rik	1.517	1.539	Lamp2	0.618	0.634

**APÊNDICE D – GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA DE MODO SIMILAR
EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA E GQ-16**

Continuação

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16	Gene	Rosi	GQ-16
Ciapin1	1.515	1.469	Agl	0.618	0.788
Rhot2	1.514	1.370	Smarca2	0.618	0.830
Taf1d	1.508	1.308	Scaper	0.620	0.778
Tdrkh	1.506	1.371	Slc2a4	0.620	0.664
Fmnl3	1.505	1.453	2410066E13Rik	0.621	0.717
4921513D23Rik	1.505	1.311	B430216N15Rik	0.621	0.798
Gdf10	1.504	1.357	Dtx3l	0.622	0.774
Eif1ad	1.503	1.273	5730410E15Rik	0.623	0.832
Dhrs7b	1.501	1.371	Tbl2	0.623	0.751
1110008J03Rik	1.501	1.271	Lnx2	0.623	0.772
Hoxa5	1.488	1.619	Sema3f	0.623	0.724
Metrn	1.475	1.841	Birc2	0.624	0.545
Supt16h	1.475	1.645	Zfand6	0.624	0.779
Afg3l1	1.459	1.598	Rcan2	0.624	0.771
LOC100042179	1.441	1.662	Pygb	0.624	0.765
Rps19	1.402	1.509	Cp	0.625	0.740
Hist1h2af	1.383	1.722	9830134K01Rik	0.625	0.793
Ddx49	1.381	1.560	C130008L17Rik	0.625	0.786
Nudt1	1.377	1.600	Fas	0.626	0.797
EG666668	1.376	1.603	4833414E09Rik	0.626	0.770
Wdr89	1.375	1.742	Ak3	0.628	0.743
Deadc1	1.351	1.527	A430075F05Rik	0.630	0.626
			Unc84a	0.632	0.728
			Oprs1	0.633	0.763
			Dcn	0.633	0.677
			Timp4	0.633	0.756
			E130318A13Rik	0.633	0.816
			Pccb	0.633	0.781
			Rock1	0.633	0.664
			Chd9	0.635	0.786
			A630082K20Rik	0.636	0.730
			A230107C01Rik	0.636	0.810
			LOC100044314	0.637	0.738
			Insig2	0.637	0.627
			2310009E04Rik	0.637	0.693
			Lman1l	0.638	0.801
			4933407H18Rik	0.639	0.831
			Fn1	0.639	0.697

**APÊNDICE D – GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA DE MODO SIMILAR
EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA E GQ-16**

Continuação

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16	Gene	Rosi	GQ-16
			Trib2	0.640	0.821
			Atl2	0.640	0.756
			Mertk	0.640	0.752
			LOC234911	0.642	0.734
			Acsn3	0.642	0.797
			Setd2	0.643	0.790
			C130067A03Rik	0.643	0.798
			6330503K22Rik	0.643	0.778
			5730419I09Rik	0.644	0.806
			Ostm1	0.645	0.797
			Rcbtb2	0.645	0.742
			Tspan3	0.645	0.678
			Epb4.115	0.646	0.716
			Ccnt2	0.647	0.814
			Hnrnpa2b1	0.647	0.744
			Enpp2	0.648	0.717
			Akap11	0.648	0.508
			Tgs1	0.649	0.615
			2700025J07Rik	0.649	0.666
			4732486I23Rik	0.653	0.722
			Ddx17	0.653	0.692
			Mb	0.655	0.834
			Il1rap	0.656	0.756
			Aldh4a1	0.657	0.820
			Dvl1	0.657	0.801
			Sav1	0.659	0.654
			Ets1	0.659	0.678
			BC038156	0.659	0.673
			Ep300	0.659	0.682
			Zfp606	0.661	0.776
			Slc43a1	0.663	0.790
			Zdhhc21	0.663	0.652
			Alg2	0.664	0.761
			Capn7	0.664	0.659
			Rsrc1	0.665	0.773
			Amy1	0.665	0.769
			Cp	0.666	0.795
			BC023892	0.670	0.602

**APÊNDICE D – GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA DE MODO SIMILAR
EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA E GQ-16**

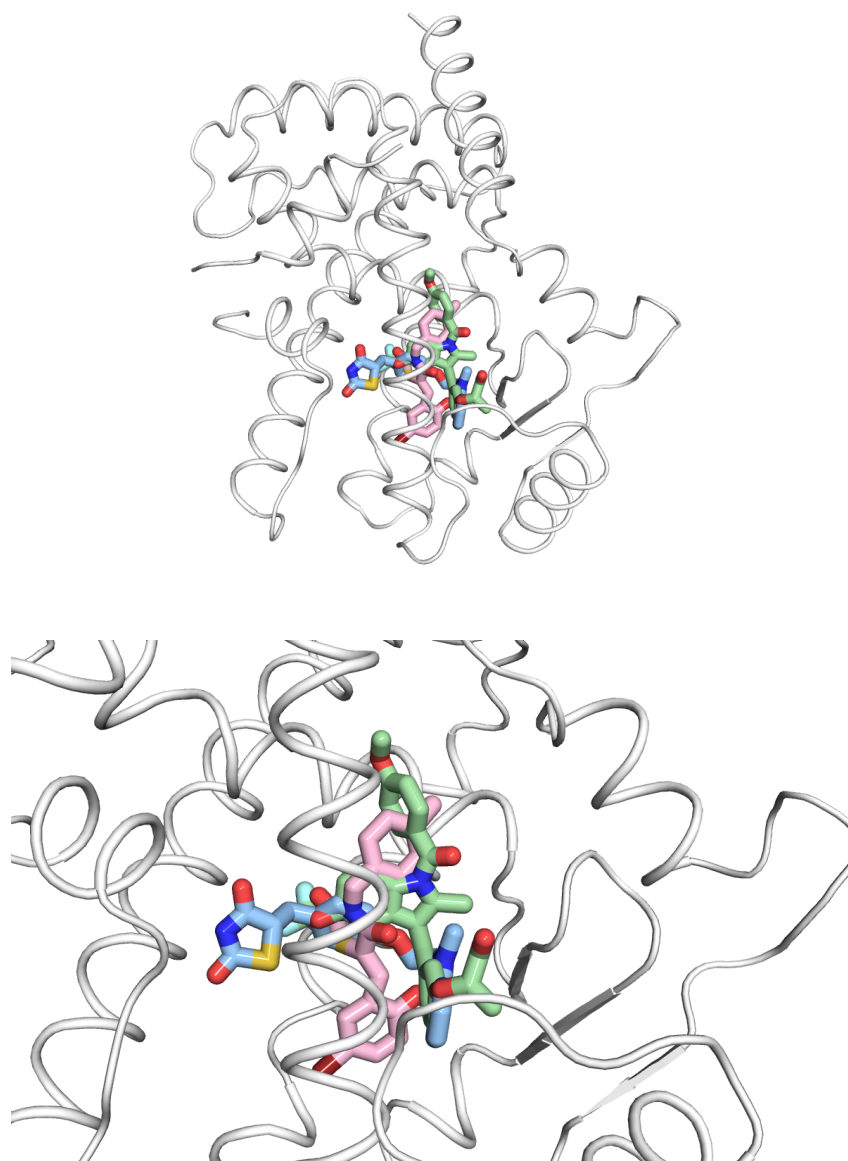
Conclusão

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16	Gene	Rosi	GQ-16
			Ep300	0.659	0.682
			Zfp606	0.661	0.776
			Slc43a1	0.663	0.790
			Zdhhc21	0.663	0.652
			Alg2	0.664	0.761
			Capn7	0.664	0.659
			Rsrc1	0.665	0.773
			Amy1	0.665	0.769
			Cp	0.666	0.795
			BC023892	0.670	0.602
			Dmx11	0.671	0.575
			LOC245000	0.679	0.625
			Utx	0.682	0.588
			Mier3	0.691	0.664

**APÊNDICE E - GENES COM EXPRESSÃO MODIFICADA DE MODO OPOSTO EM
RESPOSTA AO TRATAMENTO COM ROSIGLITAZONA E GQ-16**

Ativados			Reprimidos		
Gene	Rosi	GQ-16	Gene	Rosi	GQ-16
Prei4	3.447	0.771	Mustn1	0.486	1.272
Gyk	2.366	0.586	1190007F08Rik	0.632	1.258
Jarid1a	2.060	0.799	B9d1	0.644	1.362
Mospd1	1.962	0.818	Ccdc28b	0.645	1.405
KIhl5	1.803	0.742	Tmem205	0.656	1.323
Pign	1.778	0.813	Ptk7	0.664	1.261
Rpl7a	1.656	0.834	Mustn1	0.486	1.272
Dlat	1.635	0.807	1190007F08Rik	0.632	1.258
Dhrs9	1.615	0.814	B9d1	0.644	1.362
LOC100045950	1.589	0.819			
Pnpla8	1.555	0.628			
lpmk	1.550	0.820			
Otud6b	1.549	0.784			
Ddx10	1.548	0.761			
Tnfrsf21	1.505	0.828			

ANEXO A – MODO DE LIGAÇÃO DA ROSIGLITAZONA, GQ-16 E MRL24 AO PPAR γ



Modo de ligação da rosiglitazona (representado em azul), GQ-16 (representando em rosa) e MRL24 (representando em verde) ao LBD do PPAR γ . Figura gentilmente cedida pelo Dr. Senapathy Rajagopalan do Instituto de Pesquisa do Hospital Metodista de Houston, Texas.