

VIVIANE CÁSSIA PEREIRA

ATIVIDADE AGONISTA DO EXTRATO DE *Tabebuia heptaphylla* SOBRE OS  
RECEPTORES PROLIFERADORES PEROXISSOMAS ALFA (PPAR  $\alpha$ ),  
BETA /DELTA (PPAR  $\beta/\delta$ ) E GAMA (PPAR  $\gamma$ )

BRASÍLIA

2008

VIVIANE CÁSSIA PEREIRA

**ATIVIDADE AGONISTA DO EXTRATO DE *Tabebuia heptaphylla* SOBRE OS  
RECEPTORES PROLIFERADORES PEROXISSOMAIS ALFA (PPAR  $\alpha$ ),  
BETA /DELTA (PPAR  $\beta/\delta$ ) E GAMA (PPAR  $\gamma$ )**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Ciência da Saúde, Universidade de Brasília, como  
requisito à obtenção de Título de Mestre em Ciências  
da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves

BRASÍLIA  
2008

À Íris, minha filha, e ao meu marido André.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo milagre da vida!

Ao meu marido, André, pelo amor, paciência, carinho e companheirismo em todos os momentos.

À minha filha, Íris, pela sua alegria e luz na minha vida. Aos meus enteados Tainá, Yuri e Victor pelas brincadeiras e risadas...

Aos meus pais, Valter e Almey, e irmãos Vinícius e Simone, pela presença constante e reconfortante ... pelo amor e apoio incondicional.

Minha eterna gratidão à minha família!

Ao professor Francisco, agradeço pela amizade, orientação e incentivo intelectual e profissional. Sua grande experiência científica e de vida foi especialmente valiosa na minha jornada acadêmica.

Às minhas amigas superpoderosas de laboratório, Adriana, Angélica, Daniela e Karime, pelo auxílio irrestrito, pelas conversas filosóficas, pelos ombros amigos!

À Rilva, Marie, Fátima, pelo apoio técnico, disponibilidade integral e principalmente pelo afeto que me destinaram.

Aos professores Luiz, Carlos Frederico (Universidade Católica), Andréia, Marília, Dâmaris, Carol (Herbário/UnB), pela colaboração sempre que solicitada.

Aos amigos do laboratório: Cristina, Rani, Rut, Karine, Daiany, Gustavo, Tiago, Marlon, Juana, Monalisa, Sócrates, Carlos, Anderson, Cíntia, Elaine e a todo o pessoal do PIBIC pela cooperação constante.

A todos, pelas oportunidades de aprendizagem e crescimento!!!!

## RESUMO

Nas últimas décadas, a prevalência de distúrbios do metabolismo, tais como obesidade, síndrome metabólica e diabetes melito, tem aumentando drasticamente, se tornando uma epidemia global. Dessa forma, novas estratégias terapêuticas para a contenção do avanço dessas patologias terão grande impacto na saúde pública. Os receptores dos proliferadores peroxissomais (PPARs) têm sido utilizados como alvos farmacológicos para o tratamento das alterações fisiológicas supracitadas. PPARs são membros da superfamília de receptores nucleares, os quais são fatores de transcrição que se ligam ao DNA nas regiões regulatórias dos genes alvos. Os três isotipos de receptores dos proliferadores peroxissomais, PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ , atuam como sensores capazes de adaptar a expressão gênica para integrar os sinais lipídicos com genes envolvidos na regulação do metabolismo energético, adipogênese, sensibilidade à insulina e resposta imune. Plantas com propriedades antidiabéticas vêm sendo rotineiramente utilizadas para realização de *screening* de novas substâncias moduladoras da atividade dos PPARs. No Brasil, diversas espécies vegetais são empregadas na medicina tradicional por pacientes diabéticos para reduzir os níveis de glicose sanguínea, dentre elas a *Tabebuia heptaphylla* (Vell) Toledo (conhecida popularmente como “ipê-roxo”). No presente estudo, nós utilizamos ensaios de gene repórter para investigar se extratos da entrecasca de *Tabebuia heptaphylla* são capazes de promover a ativação transcricional mediada pelos PPARs. O extrato hexânico, mas não o aquoso e etanólico, ativou significativamente a transcrição mediada pelo PPAR $\alpha$ , PPAR  $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ . Esses resultados sugerem que a entrecasca da *Tabebuia heptaphylla* possui compostos com alta atividade agonista sobre PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ , o que pode explicar seu uso popular como hipoglicemiante.

**Palavras-chave:** Receptores dos proliferadores peroxissomais PPAR $\alpha$ , PPAR  $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ ; *Tabebuia heptaphylla*; síndrome metabólica; obesidade; dislipidemia; diabetes.

## ABSTRACT

Over recent decades, the prevalence of metabolism disorders such as metabolic syndrome, obesity and diabetes have, increased drastically, becoming a global epidemic. Therefore, new effective therapies to avoid the advance these diseases will have a great impact in the public health. Peroxisome proliferators-activated receptors (PPARs) have used as a pharmacological target for the treatment of above physiological changes. PPARs are members of the nuclear receptor superfamily of transcription factors that bind to DNA in the regulatory regions of target genes. The three isotypes, PPAR $\alpha$ , PPAR  $\beta/\delta$  and PPAR $\gamma$  act like metabolic sensors capable of adapting gene expression to integrate lipid signals with genes involved in regulation of lipid metabolism, adipogenesis, insulin sensitivity and immune response. Plants with anti-diabetic proprieties have been routinely used to screening of news modulators for PPARs activity. In Brazil, many plants have been used in folk medicine by diabetic patients to reduce the glucose levels such as *Tabebuia heptaphylla* (Vell) Toledo (popular known as "ipê-roxo"). In the current study, using reporter gene assay in U937 cells, we investigated whether extracts from the bark of *Tabebuia heptaphylla* are capable to activate the transcription mediated by PPAR receptor. Our results showed that the hexanic extract, but not aqueous and ethanolic extracts, significantly activated the transcription mediated by PPAR $\alpha$ , PPAR  $\beta/\delta$  and PPAR $\gamma$ . These findings suggest that *Tabebuia heptaphylla* may have some compounds with high agonistic activity on PPAR $\alpha$ , PPAR  $\beta/\delta$  and PPAR $\gamma$ , which may explain its use traditional as hypoglycemiant.

**Keywords:** Peroxisome proliferators-activated receptors PPAR $\alpha$ , PPAR  $\beta/\delta$  and PPAR $\gamma$ ; *Tabebuia heptaphylla*; metabolic syndrome; obesity; diabetes mellitus, dyslipidemia.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b>	CLASSES DE RECEPTORES NUCLEARES.	<b>28</b>
<b>FIGURA 2</b>	ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS DOMÍNIOS FUNCIONAIS DOS PPARS.	<b>31</b>
<b>FIGURA 3</b>	COMPARAÇÃO DA IDENTIDADE DE AMINOÁCIDOS DO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO DNA (DBD) E O DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO LIGANTE (LBD) DOS SUBTIPOS DE PPARS EM HUMANOS.	<b>32</b>
<b>FIGURA 4</b>	COMPARAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DEFINIDA POR RAIOS-X DO LBD DOS PPARS.	<b>33</b>
<b>FIGURA 5</b>	ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DOS PPARS.	<b>34</b>
<b>FIGURA 6</b>	LIGANTES SINTÉTICOS DE PPAR $\alpha$ .	<b>37</b>
<b>FIGURA 7</b>	LIGANTES SINTÉTICOS DE PPAR $\gamma$ .	<b>41</b>
<b>FIGURA 8</b>	TRANSPORTE DE ÁCIDOS GRAXOS DO SANGUE ATÉ O PROCESSO DE $\beta$ -OXIDAÇÃO.	<b>47</b>
<b>FIGURA 9</b>	AS TRÊS MAIORES VIAS PELAS QUAIS O HDL PODE MEDIAR O EFLUXO DE COLESTEROL A PARTIR DOS MACRÓFAGOS CARREGADOS DE COLESTEROL.	<b>31</b>
<b>FIGURA 10</b>	ESTRUTURA DE MOLÉCULAS ISOLADAS A PARTIR DE EXTRATOS DE CASCA DE <i>TABEBUIA HEPTAPHYLLA</i> (VELL) TOLEDO.	<b>61-64</b>
<b>FIGURA 11</b>	FOTOS DE DOIS EXEMPLARES DA ESPÉCIE <i>TABEBUIA HEPTAPHYLLA</i> (VELL.) TOLEDO LOCALIZADOS NO PÁTIO DA FACULDADE DE CIÊNCIAS DE SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.	<b>65</b>
<b>FIGURA 12</b>	HIPÓTESES DE ATUAÇÃO DOS POSSÍVEIS LIGANTES DOS RECEPTORES PPARS PRESENTES NA CASCA DE <i>TABEBUIA HEPTAPHYLLA</i> .	<b>93</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1</b>	CRITÉRIO PARA DIAGNÓSTICO DA SÍNDROME METABÓLICA HUMANA.	<b>16</b>
<b>TABELA 2</b>	IMPORTANTES ADIPOCINAS SECRETADAS PELO TECIDO ADIPOSEO BRANCO.	<b>21</b>
<b>TABELA 3</b>	MODULADORES DA ATIVIDADE DOS PPARS IDENTIFICADOS A PARTIR DE ESPÉCIES VEGETAIS.	<b>56</b>

### LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1</b>	CURVAS DOSE-RESPOSTA DE BEZAFIBRATO EM PPAR $\alpha$ E $\beta/\delta$ E DE ROSIGLITAZONA EM PPAR $\gamma$ .	<b>72-73</b>
<b>GRÁFICO 2</b>	AÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSO E ETANÓLICO DE <i>TABEBUIA HEPTAPHYLLA</i> SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL MEDIADA PELOS RECEPTORES PPARS.	<b>74-75</b>
<b>GRÁFICO 3</b>	AÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DE <i>TABEBUIA HEPTAPHYLLA</i> SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL MEDIADA PELO RECEPTOR PPAR $\alpha$ .	<b>77</b>
<b>GRÁFICO 4</b>	AÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DE <i>TABEBUIA HEPTAPHYLLA</i> SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL MEDIADA PELO RECEPTOR PPAR $\beta/\delta$ .	<b>78</b>
<b>GRÁFICO 5</b>	AÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DE <i>TABEBUIA HEPTAPHYLLA</i> SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL MEDIADA PELO RECEPTOR PPAR $\gamma$ .	<b>79</b>
<b>GRÁFICO 6</b>	ATIVIDADE DO EXTRATO HEXÂNICO DE <i>TABEBUIA HEPTAPHYLLA</i> NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DOS RECEPTORES PPARS.	<b>80</b>
<b>GRÁFICO 7</b>	AÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DE <i>TABEBUIA HEPTAPHYLLA</i> SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL MEDIADA PELO RECEPTOR RXR $\alpha$ .	<b>81</b>
<b>GRÁFICO 8</b>	AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE CELULAR DO EXTRATO HEXÂNICO DE <i>TABEBUIA HEPTAPHYLLA</i> EM CÉLULAS U937.	<b>83</b>
<b>GRÁFICO 9</b>	EFEITO DO EXTRATO HEXÂNICO DE <i>TABEBUIA HEPTAPHYLLA</i> SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL MEDIADA POR DIFERENTES RECEPTORES NUCLEARES.	<b>85</b>

<b>GRÁFICO 10</b>	AÇÃO DO SITOSTEROL/ESTIGMASTEROL E LAPACHOL SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL MEDIADA PELOS RECEPTORES PPARs.	<b>86-87</b>
-----------------------	--	--------------

### LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABCA1	Transportadores cassete ligados ao ATPA1
ABCG1	Transportadores cassete ligados ao ATPG1
Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
ACS	Acil-CoA-sintetase
AdipoR1	Receptores de adiponectina 1
AdipoR2	Receptores de adiponectina 2
AF-1	Função de ativação 1
AF-2	Função de ativação 2
AP-1	Proteína de ativação 1
aP2	Proteína ligadora de lipídios
Apo-AI	Apolipoproteína AI
Apo-AII	Apolipoproteína AII
Apo-B	Apolipoproteína B
AR	Receptor de androgênios
ASP	Proteína estimulante de acilação
ATP	Adenosina-trifosfato
Bez	Bezafibrato
C/EBP	Proteínas de ligação ao amplificador CCAAT - CCAAT
CAR	Receptor constitutivo de androstano
CMV	Citomegalovírus
CoA	Coenzima A
CPT-1	Carnitina-palmitoil transferase I
CRP	Proteína C-reativa
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DMEM	Meio Dulbecco modificado por Eagle
DMT2	Diabete melito tipo2
DR-1	Repetição direta-1
EPA	Ácido 5,8,11,14,17-eicosapentanóico

ER	Receptor de estrogênio
ERE	Elemento responsivo ao receptor de estrogênio
FABP	Proteína de ligação de ácidos graxos
FAT	Translocase de ácidos graxos
FATP	Proteína de transporte de ácidos graxos
FXR	Receptor X farnesóide
GLUT-4	Transportador de glicose-4
GR	Receptor de glicocorticóides
HAT	Histona acetil transferase
HDAC	Histonas desacetilases
HDL	Lipoproteína de densidade alta
His	Histidina
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IKK	Inibidor do fator nuclear $\kappa$ B quinase
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
IRS	Substrato para o receptor de insulina
JNK	Serina/treonina quinases c-Jun N-terminal quinase
LBD	Domínio de ligação ao ligante
LCAT	Lecitina/colesterol aciltransferase
LHS	Lipase sensível a hormônio
LNO <sub>2</sub>	Ácido nitrolinoléico
LPL	Lipoproteína-lipase
Luc	Luciferase
LXR	Receptor hepático X
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos-1
MMP-9	Matriz metaloproteinase-9
NCoR	Correpressor nuclear

NF- $\kappa$ B	Fator nuclear $\kappa$ B
NPY	Neuropeptídeo Y
NR	Receptor nuclear
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAI	Inibidor do ativador de plasminogênio
PBP	Proteína de ligação ao PPAR
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PGA1	Prostaglandina A1
PGA2	Prostaglandina A2
PPAR	Receptor dos proliferadores peroxissomais
PPRE	Elemento responsivo ao PPAR
PS	Pressão sanguínea
PXR	Receptor X do pregnano
RAR	Receptor do ácido retinóico
RCQ	Relação entre cintura e quadril
RI	Resistência à insulina
RXR	Receptor do ácido retinóico
SM	Síndrome metabólica
SMRT	Mediador do silenciamento de RAR e TR
SR-B1	Receptor <i>scavenger</i> B1
SRC-1	Co-ativador do receptor esteróide-1
SREBP-1c	Proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TAS	Tecido adiposo sub-cutâneo
TAV	Tecido adiposo visceral
TEA	Taxa de excreção de albumina
TG	Triacilglicerol

TGF $\beta$	Fator de crescimento transformante $\beta$
TGP	Tolerância à glicose prejudicada
THA	Extrato aquoso de <i>Tabebuia heptaphylla</i>
THC	Tetrahydrocannabinol
THE	Extrato etanólico de <i>Tabebuia heptaphylla</i>
THH	Extrato hexânico de <i>Tabebuia heptaphylla</i>
Tir	Tirosina
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TR	Receptor do hormônio tireoideano
TRAP	Proteínas associadas ao TR
TRE	Elemento responsivo ao hormônio tireoideano
Trog	Troglitazona
TZD	Tiazolidinedionas
UCP	Proteína desacopladora
VDR	Receptor da vitamina D <sub>3</sub>
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>1</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>18</b>
1.1	Síndrome Metabólica	18
1.1.1	Tecido Adiposo	19
1.1.2	Tecido Adiposo Disfuncional	22
1.2	Os Receptores dos Proliferadores Peroxissomais - PPARs	28
1.2.1	Receptores Órfãos Adotados e PPARs	28
1.2.2	Estrutura dos PPARs	31
1.2.3	Mecanismo de Ação dos PPARs	34
1.2.3.1	Mecanismo Clássico de Ação dos PPARs: Regulação Transcricional por Heterodimerização com RXR	35
1.2.4	PPAR $\alpha$	36
1.2.5	PPAR $\beta/\delta$	38
1.2.6	PPAR $\gamma$	39
1.2.7	Ações Biológicas dos PPARs	42
1.2.7.1	Oxidação de Ácidos Graxos	42
1.2.7.2	Metabolismo de Lipoproteínas e Aterogênese	45
1.2.7.3	Adipogênese	48
1.2.7.4	Sensibilização à Insulina	49
1.2.8	Interesse Clínico por Ligantes de Receptores Nucleares	51
1.2.8.1	Ligantes Sintéticos de PPAR com Atividade Duplo-Agonista e Pan-agonista	54
1.2.8.2	Ligantes para PPAR de Origem Natural	55
1.3	<i>Tabebuia heptaphylla</i> (Vell) Toledo	59
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>67</b>
2.1	Objetivo Geral	67
2.2	Objetivos Específicos	67
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>68</b>
3.1	Preparo dos Extratos	68

3.2	Reagentes e Plasmídeos	68
3.3	Cultura de Células	69
3.4	Ensaio de Gene Repórter por Meio de Transfecção Transiente	69
3.5	Ensaio de Toxicidade Celular (Azul de Trypan)	70
3.6	Análise Estatística	71
4	<b>RESULTADOS</b>	72
4.1	Determinação dos Controles Positivos para os Ensaios de Gene-repórter	72
4.2	Efeito dos Extratos Aquoso e Etanólico de <i>Tabebuia heptaphylla</i> sobre a Atividade Transcricional Mediada pelos Receptores PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$ e PPAR $\gamma$	74
4.3	O Extrato Hexânico de <i>Tabebuia heptaphylla</i> Aumenta a Transcrição do Gene Repórter	76
4.4	O Extrato Hexânico de <i>Tabebuia heptaphylla</i> Interage Diretamente com os Receptores PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$ e PPAR $\gamma$ para Promover a Ativação Transcricional do Gene Repórter	80
4.5	Avaliação de Viabilidade do Extrato Hexânico de <i>Tabebuia heptaphylla</i> sobre as Células U937	82
4.6	Avaliação do Efeito do Extrato Hexânico de <i>Tabebuia heptaphylla</i> sobre a Atividade Transcricional Mediada por Outros Receptores Nucleares (ER $\alpha$ , ER $\beta$ , GR, PXR, TR $\alpha$ , TR $\beta$ e CMV)	84
4.7	Avaliação do efeito de Substâncias Presentes na Casca de <i>Tabebuia heptaphylla</i> sobre a Atividade Transcricional dos Receptores PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$ e PPAR $\gamma$	86
5	<b>DISCUSSÃO</b>	88
6	<b>CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b>	95
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	97

## INTRODUÇÃO

A incidência de desordens metabólicas, tais como obesidade, resistência à insulina, diabetes tipo 2 e dislipidemia, tem crescido dramaticamente nas últimas décadas, com conseqüente incremento de complicações cardiovasculares (GURI; HONTECILLAS; BASSAGANYA-RIERA, 2006). Em função disso, pesquisas visando o desenvolvimento de novos medicamentos são consideradas essenciais à contenção do avanço destes distúrbios fisiológicos, agrupados coletivamente sob o termo “síndrome metabólica”.

Medicamentos ligantes de receptores dos proliferadores peroxissomais (PPARs), tais como os fibratos e tiazolidinedionas (TZDs), são amplamente utilizados no tratamento de dislipidemia e diabetes, respectivamente. Além dos benefícios clínicos efetivamente estabelecidos para estas patologias, vários estudos relatam a utilização de ligantes de PPARs na síndrome metabólica (SM). Os ativadores de PPAR, por atuar na regulação de vias metabólicas envolvidas na SM, têm emergido com grande potencial de atuação no tratamento de pacientes com essa complexa rede de alterações fisiológicas. Várias evidências sugerem que a ativação de PPAR também pode conter a evolução de processos inflamatórios e aterosclerose (FIÉVET; FRUCHART; STAELS, 2006; KASUGA et al., 2006; GURNELL, 2007).

A habilidade de cada subtipo de PPAR em regular vias metabólicas distintas tem incitado pesquisas no sentido de investigar efeitos complementares e combinados de ligantes duplo-agonistas e pan-agonistas destes receptores. A combinação de agonistas objetiva ativar cada subtipo de receptor PPAR com intuito de promover a máxima eficácia na expressão de genes-alvo associados com vias farmacológicas específicas, com minimização de efeitos tóxicos (SHEARER; BILLIN, 2007). Nos últimos anos, em torno de 29 substâncias duplo-agonistas e pan-agonistas entraram em avaliações pré-clínicas e clínicas, sendo que 10 destes estudos foram interrompidos devido a efeitos indesejados, tais como câncer urotelial, ganho de peso, edema, hepatotoxicidade e eventos cardiovasculares (BALAKUMAR et al., 2007). Os fibratos e as TZDs, assim como outros ligantes sintéticos em desenvolvimento, têm igualmente apresentado efeitos adversos importantes, incluindo complicações cardiovasculares.

Em conjunto, o avanço no conhecimento dos efeitos benéficos e das ações tóxicas dos agonistas de PPARs em estudo reafirma a relevância clínica desses receptores, além de contribuir para o interesse em pesquisas com foco em novos ligantes com propriedades mais seletivas e menos tóxicas, tanto de origem sintética quanto natural (BROWN; PLUTZKY, 2007).

## CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 SÍNDROME METABÓLICA

O conjunto das complicações decorrentes da obesidade tem sido agrupado sob o termo **Síndrome Metabólica** (SM). De acordo com a Organização Mundial de Saúde<sup>1</sup>, a presença de pelo menos um dos três maiores parâmetros clínicos seguintes caracteriza a SM, diabetes tipo 2, tolerância à glicose prejudicada ou resistência à insulina, acrescido de pelo menos dois dos parâmetros menores, os quais incluem hipertensão, obesidade, dislipidemia e microalbuminúria (FIÉVET; FRUCHART; STAELS, 2006; KASUGA et al., 2006; GURNELL, 2007) (**Tabela 1**).

OMS 1999				
<b>DMT2 ou TGP ou RI</b>	<b>Dislipidemia</b>	<b>Hipertensão</b>	<b>Obesidade</b>	<b>Microalbuminúria</b>
Associado a dois ou mais dos fatores seguintes:	TG > 1.7 mmol/L e/ou HDL < 0.9 mmol/L (H) HDL < 1.0 mmol (M)	PS ≥ 140/90 mHg ± medicação	IMC ≥ 30 kg/m <sup>2</sup> ou RCQ > 0.9 (H) RCQ > 0.85 (M)	TEA > 20mcg/min

**TABELA 1.** CRITÉRIO PARA DIAGNÓSTICO DE SÍNDROME METABÓLICA HUMANA. WHO: Organização Mundial da Saúde; DMT2: diabete melito tipo 2; TGP: tolerância prejudicada à glicose; RI: resistência à insulina; TG: triacilgliceróis; HDL: lipoproteína de densidade alta; PS: pressão sanguínea; IMC: índice de massa corporal; RCQ: relação entre cintura e quadril; TEA: taxa de excreção de albumina; H: homem; M: mulher (Fonte: GURNELL, 2007).

Tem sido proposto que, de forma integrada, a obesidade visceral, a esteatose hepática e a resistência à insulina componham um mecanismo unificado que gera um estado pro-trombótico e pró-inflamatório. Assim, os pacientes com síndrome metabólica apresentam maior risco de complicações na macro e micro-vasculatura (doenças

<sup>1</sup> Não há consenso sobre a definição do termo "síndrome metabólica". As definições concebidas por diferentes instituições consideram critérios diferentes para estabelecer o diagnóstico de SM (GURNELL, 2007).

cardíacas, enfarto, falência renal, cegueira e amputação de extremidades inferiores) e progressão de DMT2. Conseqüentemente, são necessários benefícios em todos os parâmetros metabólicos para diminuir o risco de doença arterial coronária, condição essa que representa a causa primária de morte entre pacientes com DMT2 e síndrome metabólica (FIÉVET; FRUCHART; STAELS, 2006; KASUGA et al., 2006; GURNELL, 2007).

As complicações da obesidade se originam na capacidade limitada de armazenamento de gordura nos adipócitos, que, após atingir o estado de saturação, liberam o excesso de lipídios na corrente sanguínea, que poderá ser depositado em outros tecidos, tais como fígado, músculo esquelético, pâncreas, coração e vasos sanguíneos (GURI; HONTECILLAS; BASSAGANYA-RIERA, 2006). Mais ainda, a hipertrofia dos adipócitos desencadeia uma série de eventos que desequilibram o metabolismo energético de um modo geral, os quais estão inter-relacionados com o desenvolvimento de diversas alterações metabólicas ligadas à sensibilidade à insulina e dislipidemia (STIENSTRA et al., 2007).

### 1.1.1 Tecido adiposo

O tecido adiposo é o maior reservatório energético do organismo. Ele é composto por adipócitos, por uma matriz de tecido conjuntivo (fibras colágenas e reticulares), tecido nervoso, células do estroma vascular, nódulos linfáticos, células imunes (leucócitos e macrófagos), fibroblastos e pré-adipócitos (células adiposas indiferenciadas). Os adipócitos são células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triacilgliceróis (moléculas compostas por ácidos graxos e glicerol), e dispõem do conjunto de enzimas e proteínas responsáveis pela síntese, armazenamento e mobilização de ácidos graxos, em resposta a alterações na demanda fisiológica. Esses processos são altamente regulados por fatores genéticos, nutricionais, hormonais e parácrinos (AHIMA; FLIER, 2000).

Em mamíferos estão presentes dois tipos de tecido adiposo: tecido adiposo marrom (TAM) e tecido adiposo branco (TAB). O **TAM** está presente durante o desenvolvimento fetal, porém diminui a partir do nascimento durante os primeiros anos de vida, estando praticamente ausente em humanos adultos. É um tecido que atua no

controle da temperatura corporal, por ser especializado na produção de calor. Seus adipócitos possuem grande quantidade de mitocôndrias, as quais são diferenciadas por não conterem enzimas necessárias à síntese de Adenosina-trifosfato (ATP). Dessa forma, a energia produzida pela oxidação de metabólitos não é armazenada na forma de ATP, mas sim dissipada como calor. O mecanismo de desacoplamento da fosforilação oxidativa do transporte de elétrons ocorre devido à presença de proteínas desacopladoras (UCP) na membrana mitocondrial interna, que atuam como canais de prótons, aumentando a permeabilidade de H<sup>+</sup> independente da síntese de ATP, sendo a energia gerada dissipada na forma de calor (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

O **TAB** é um órgão heterogêneo que inclui depósitos múltiplos distintos, tais como depósitos subcutâneo, intra-abdominal e intra-torácico. Além do papel importante de reserva energética corporal, o TAB tem funções endócrinas recentemente descobertas, as quais respondem pela secreção de várias moléculas bioativas, chamadas de adipocinas. Estas substâncias têm produção e atuação tanto nos próprios adipócitos, quanto em outros tecidos do organismo (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004; SÁNCHEZ-MUÑOZ et al., 2005).

As **adipocinas** têm estruturas e funções fisiológicas variadas, compreendendo proteínas que desempenham ações importantes na homeostase energética global, na sensibilidade à insulina (adiponectina, leptina, resistina, visfatina, proteína estimulante da acilação), em respostas imunológicas (fator de necrose tumoral- $\alpha$ , Interleucina-6), na regulação da pressão sanguínea (angiotensinogênio) e da homeostase vascular (Inibidor do ativador dos plasminogênio-1, fator tecidual), entre outras ações (**Tabela 2**).

ADIPOCINAS	EFEITOS BIOLÓGICOS
TNF $\alpha$	Lipolítico, aumenta o consumo energético e reduz a sensibilidade à insulina.
Interleucina 6	Pró-inflamatório, lipolítico, reduz a sensibilidade à insulina.
Resistina	Pró-inflamatório, aumenta a resistência à insulina.
Leptina	Sinaliza ao SNC sobre os estoques corporais de energia.
Adiponectina	Aumento da sensibilidade à insulina, antiinflamatório e atenua a progressão da aterosclerose.
Proteína estimulante de acilação (ASP)	Estímulo da síntese de triacilgliceróis e inibição da lipólise no tecido adiposo branco.
Angiotensinogênio	Precursor da angiotensina II, envolvida na regulação da pressão arterial.
PAI-1	Inibe a ativação do plasminogênio, bloqueando a fibrinólise.
Fator tecidual	Inicia a cascata de coagulação.
Visfatina	Insulinomimético.

**TABELA 2.** IMPORTANTES ADIPOCINAS SECRETADAS PELO TECIDO ADIPOSEO BRANCO (Modificado de: FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

A função endócrina e a capacidade de armazenamento de lipídios do tecido adiposo dependem da localização dos depósitos de lipídios. De modo geral, o tecido adiposo visceral (TAV) é mais endocrinologicamente ativo que o tecido adiposo subcutâneo (TAS). Os depósitos de lipídios expressam e secretam de modo distinto as adipocinas, sendo que o tecido adiposo visceral (TAV) secreta maiores quantidades de adipocinas pró-inflamatórias em comparação com os demais compartimentos de armazenamento de gordura (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004; SHARMA; STAELS, 2007).

Os níveis de adipocinas estão relacionados com os estados de equilíbrio e desequilíbrio do tecido adiposo. Na condição de aumento da massa do tecido adiposo,

a síntese das adipocinas encontra-se desregulada, com predomínio da expressão de proteínas pró-inflamatórias e lipolíticas, que por sua vez desencadeiam diversas complicações associadas à obesidade, como por exemplo, a resistência à insulina. Em decorrência disso, a obesidade tem sido associada à inflamação. Em indivíduos obesos foram encontrados altos níveis de marcadores pró-inflamatórios, tais como citocinas e proteínas de fase aguda como a proteína C-reativa (CRP) (SÁNCHEZ-MUÑOZ et al., 2005; FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

### 1.1.2 Tecido adiposo disfuncional

O TAB controla o fluxo de ácidos graxos pela manutenção do equilíbrio entre a liberação de ácidos graxos livres na circulação, os quais servirão como substratos para outros tecidos oxidativos (estado de jejum), e a remoção dos triacilgliceróis circulantes (estado de saciedade). Compartimentos distintos do TAB respondem diferentemente aos sinais para absorção e liberação de ácidos graxos, como, por exemplo, o TAV, que é o tecido adiposo mais sensível à lipólise por ação de catecolaminas, e mais resistente à sinalização antilipolítica promovida pela insulina. Por outro lado, a liberação espontânea (basal) de ácidos graxos é mais expressiva no TAS. Isso é especialmente relevante à entrega de ácidos graxos e fatores provenientes de outros tecidos ao fígado, visto que apenas o TAV tem acesso direto ao sistema porta (SHARMA; STAELS, 2007).

Em situação de homeostase metabólica, o equilíbrio entre a remoção e a liberação de ácidos graxos na circulação é regulado pela concentração de glicose no sangue, sendo a insulina, o glucagon, epinefrina e norepinefrina os principais agentes controladores do equilíbrio metabólico. Quando os níveis de glicose estão altos no sangue, ocorre a liberação de **insulina**, que promove a captação de glicose pelo tecido adiposo, músculo e fígado, o aumento da glicólise (degradação de glicose para geração de energia) e da síntese de glicogênio no fígado e músculo, a síntese de ácidos graxos no fígado e de triacilgliceróis no tecido adiposo.

Em concentrações diminuídas de açúcar no sangue há a secreção de **glucagon**, que estimula a degradação de glicogênio e o aumento da gliconeogênese (síntese de

glicose a partir de precursores não-glicídicos) para produção e liberação de glicose pelo fígado, mobilização de ácidos graxos para oxidação (produção de energia), e aumento da produção de corpos cetônicos. Nessa condição, a mudança no metabolismo energético para utilização de ácidos graxos como combustível principal no músculo e no fígado tem como objetivo liberar o açúcar para ser utilizado pelo cérebro. A oxidação de ácidos graxos também rende os corpos cetônicos, que podem ser utilizados como fonte alternativa ao açúcar pelo cérebro. Os hormônios **epinefrina** e **norepinefrina** são liberados na corrente sanguínea em resposta ao estresse. No fígado e nas células musculares eles atuam induzindo a degradação de glicogênio para liberação de glicose na corrente sanguínea (fígado) e para produção de energia (músculo). Assim como o glucagon, esses hormônios estimulam a lipólise no tecido adiposo pela liberação de ácidos graxos para serem oxidados em outros tecidos, como fígado e músculo. Também inibem a secreção de insulina e estimulam a secreção de glucagon, reforçando o efeito de mobilização de combustíveis e de inibição do armazenamento de combustíveis (VOET; VOET; PRATT, 2002).

Em estado de desequilíbrio crônico entre o consumo de gordura e sua utilização, o excesso é armazenado primeiramente no tecido adiposo subcutâneo, e após sua saturação, no tecido adiposo visceral, aumentando assim a massa de tecido adiposo geral em função do aumento do número e do tamanho dos adipócitos. O aumento contínuo no diâmetro dos adipócitos acarreta em maior mobilização de ácidos graxos para geração de energia metabólica. Em virtude da capacidade limitada de armazenamento dos adipócitos, a gordura excedente terá de ser compensatoriamente disponibilizada para outros tecidos através da corrente sanguínea (VOET; VOET; PRATT, 2002; GURI; HONTECILLAS; BASSAGANYA-RIERA, 2006). Assim, outros órgãos podem atuar como depósitos para o excesso de gordura, tais como fígado, músculo esquelético, pâncreas, coração, e vasos sanguíneos, locais nos quais os lipídios podem exercer efeitos tóxicos (LACLAUSTRA; CORELLA; ORDOVAS, 2007).

O mecanismo de remoção de triacilgliceróis é fundamental para a proteção contra a lipotoxicidade gerada pelo acúmulo de gordura ectópica. Quando presente no citoplasma de outros tecidos, a metabolização dos triacilgliceróis gera produtos que ativam a enzima **óxido nítrico sintetase induzida (iNOS)**, com conseqüente formação

de óxido nítrico e indução de processo apoptótico pela ativação do **fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)**<sup>2</sup> (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; SHARMA; STAELS, 2007).

A falência funcional do tecido adiposo<sup>3</sup> em armazenar lipídios reduz a remoção de triacilgliceróis a partir das lipoproteínas. O nível aumentado de triacilgliceróis sanguíneos é considerado como fator de risco para doenças cardiovasculares. Simultaneamente, a disponibilidade aumentada de ácidos graxos livres estimula o fígado a condensá-los em triacilgliceróis que serão liberados em lipoproteínas contendo apolipoproteína B, contribuindo para o aumento nos níveis sanguíneos de partículas ricas em triacilgliceróis (GURI; HONTECILLAS; BASSAGANYA-RIERA, 2006; LACLAUSTRA; CORELLA; ORDOVAS, 2007).

A hipertrofia dos adipócitos e a requisição constante de distensão das células para garantir o armazenamento de lipídios geram estresse no retículo endoplasmático, a partir do qual se dá início uma cascata inflamatória, que, entre outras conseqüências, culminará com a inibição da via de sinalização da insulina. O receptor de insulina tem atividade tirosina quinase intrínseca, e, após a ligação da insulina, o receptor sofre autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina. Disto resulta a ativação da quinase do receptor e conseqüente fosforilação em tirosina de substratos do receptor de insulina (IRS). Assim, a insulina necessita da fosforilação e de interações proteína-proteína para transmissão de seu sinal. Estas interações proteína-proteína são fundamentais para transmitir o sinal do receptor em direção ao efeito celular final, tais como translocação de vesículas contendo **transportadores de glicose (GLUT-4)** para a membrana plasmática, ativação da síntese de glicogênio e de proteínas, e transcrição de genes específicos (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; GURI; HONTECILLAS; BASSAGANYA-RIERA, 2006).

No início da cascata inflamatória, induzida pelos adipócitos hipertróficos, ocorre a indução das proteínas **serina/treonina quinases c-Jun N-terminal quinase (JNK)** e

---

<sup>2</sup> NF- $\kappa$ B: fatores de transcrição nuclear cujos principais efeitos são exercidos na regulação da expressão de genes envolvidos no crescimento celular, na inflamação e na apoptose (DELERIVE et al., 2002).

<sup>3</sup> A falência do tecido adiposo pode ocorrer secundariamente a outras causas além da obesidade, tais como diabetes tipo 1 não tratada, síndrome do ovário policístico e lipodistrofia (LACLAUSTRA; CORELLA; ORDOVAS, 2007) .

**inibidora do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) quinase (IKK)**, as quais ativam, respectivamente, a **proteína ativadora-1 (AP-1)** e o **NF- $\kappa$ B**, sendo esses dois últimos fatores de transcrição que aumentam a expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6. **TNF- $\alpha$**  reduz a autofosforilação do receptor de insulina induzida pela insulina, inibindo a subsequente fosforilação do **substrato para o receptor de insulina-1 (IRS-1)**. Além disso, TNF- $\alpha$ , JNK e IKK induzem fosforilação em serina no IRS-1, inibindo sua habilidade de atuar como substrato para o receptor de insulina (GURI; HONTECILLAS; BASSAGANYA-RIERA, 2006). Como consequência, ocorre a redução da síntese e da translocação do transportador de glicose sensível à insulina (GLUT-4) para a membrana celular, reduzindo, assim, a captação pelo tecido adiposo de glicose (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004; GURI; HONTECILLAS; BASSAGANYA-RIERA, 2006; LACLAUSTRA; CORELLA; ORDOVAS, 2007).

A **IL-6** é uma citocina que induz a lipólise pela inibição da lipoproteína lipase<sup>4</sup>, aumenta a gliconeogênese e a secreção hepática de triacilgliceróis, além de contribuir com a resistência à insulina. Tem ainda ações pró-inflamatórias, e seus níveis estão aumentados em indivíduos obesos e são reduzidos com a perda de peso (SÁNCHEZ-MUÑOZ et al., 2005).

Outros tecidos que estão sujeitos ao acúmulo de ácidos graxos também exibem esse mecanismo pró-inflamatório, como o fígado e músculo esquelético. A redução na sensibilidade periférica à insulina aumenta a glicogênese hepática e reduz a captação de glicose pelo tecido adiposo e músculo esquelético, caracterizando-se, assim, um quadro de resistência insulínica. Desse modo, a quebra na via de sinalização por fosforilações inibitórias decorrentes de ações pró-inflamatórias representa o núcleo da resistência à insulina, que pode ser interpretada como uma adaptação homeostática dos tecidos às ações adipogênicas da insulina, embora existam outras propostas de mecanismos conectando o excesso de ácidos graxos disponíveis e a resistência à insulina (LAM et al., 2003; CARVALHO; COLAÇO; FORTES, 2006).

O aumento na quantidade de triacilgliceróis armazenados nos adipócitos desregula ainda a produção de outras adipocinas, estando essa condição associada à

---

<sup>4</sup> Lipoproteína lipase: enzima que promove a hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos livres e monoacilgliceróis para serem captados pelos tecidos (VOET; VOET; PRATT, 2002).

redução na produção de adiponectina e resistência à leptina (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004; SÁNCHEZ-MUÑOZ et al., 2005).

A adipocina **adiponectina** é uma proteína produzida especificamente pelos adipócitos diferenciados, sendo considerada um sinal regulatório relacionado com a capacidade disponível de armazenamento do tecido adiposo, indicando que ainda há espaço para armazenamento de lipídios. Ela modifica o metabolismo de modo a promover a remoção dos ácidos graxos livres a partir da circulação sanguínea, principalmente em direção aos adipócitos. A adiponectina também aumenta a oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético, mas promove preferencialmente a captação e utilização de glicose, além de reduzir a produção hepática de glicose.

Em conjunto, tais efeitos resultam em melhora geral na sensibilidade à insulina, melhor controle dos níveis séricos de glicose, ácidos graxos livres e triacilgliceróis. Em indivíduos obesos e com resistência à insulina os níveis de adiponectina se encontram reduzidos. Suas ações antiinflamatórias e anti-aterogênicas se devem à diminuição da produção e à inibição da ação do TNF- $\alpha$ , com conseqüente diminuição da expressão de moléculas de adesão-1, diminuição da produção da IL-6, da atividade da resistina, da quimiotaxia ao macrófago e inibição da sinalização inflamatória no tecido endotelial (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004; COSTA; DUARTE, 2006; LACLAUSTRA; CORELLA; ORDOVAS, 2007).

A **leptina** é uma adipocina anorexígena, cuja produção está diretamente relacionada à massa de tecido adiposo. Suas ações envolvem a inibição da ingestão alimentar, aumento do gasto energético total e inibição da expressão do neuropeptídeo Y (NPY), envolvido com ações opostas à da leptina. Assim, promove redução de lipídios intracelulares em tecidos adiposos e não adiposos, e, conseqüentemente, melhora na sensibilidade à insulina. Na obesidade é observada a resistência à leptina, onde seus níveis circulantes não promovem as ações supracitadas, o que pode conduzir ao hiperinsulinismo e diabetes tipo 2 associada à obesidade. Na inflamação, a leptina atua diretamente sobre os macrófagos, aumentando suas atividades fagocíticas e a produção de citocinas (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004; SÁNCHEZ-MUÑOZ et al., 2005; COSTA; DUARTE, 2006; LACLAUSTRA; CORELLA; ORDOVAS, 2007).

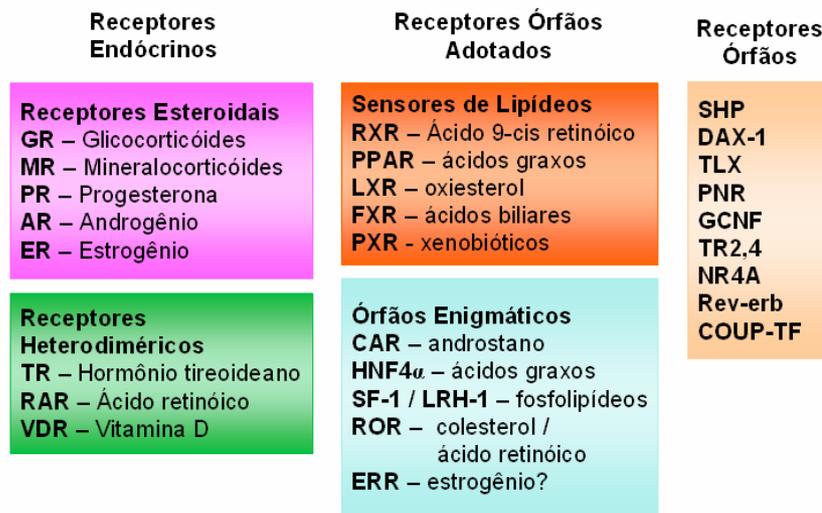
Assim sendo, as adipocinas produzidas em consequência do desequilíbrio no fluxo de ácidos graxos livres, têm representado uma conexão regulatória entre a adiposidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004; SÁNCHEZ-MUÑOZ et al., 2005).

Em adição a mobilização para produção de energia, os ácidos graxos e seus metabólitos se ligam a receptores de nutrientes, ativando mecanismos que permitam aos tecidos se adaptarem ao aumento na concentração de lipídios (GURI; HONTECILLAS; BASSAGANYA-RIERA, 2006). Assim, esses receptores para sinais metabólicos têm sido investigados quanto às suas propriedades em minimizar as complicações decorrentes do desequilíbrio no metabolismo energético. Dentre eles destacam-se os **Receptores de Proliferadores Peroxissomais (PPARs)**, cujas ações estão envolvidas na regulação da homeostase energética e da inflamação. Em razão disso, os PPARs são considerados alvos farmacológicos importantes para o tratamento de obesidade, inflamação e síndrome metabólica.

## 1.2 OS RECEPTORES DOS PROLIFERADORES PEROXISSOMAIS - PPARs

### 1.2.1 Receptores Órfãos Adotados e PPARs

Receptores nucleares (NRs) são fatores de transcrição ativados por ligantes, que atuam em processo fisiológicos através da regulação da expressão de genes-alvo (CHAWLA et al., 2001). Em humanos, a superfamília de receptores nucleares é composta por 48 membros, destacando-se entre eles os receptores de esteróides, do hormônio tireoideano (TR), da vitamina D<sub>3</sub> (VDR), do ácido retinóico (RXR) e os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs). De acordo com os seus ligantes fisiológicos e potenciais funções, os NRs podem ser agrupados em três classes, conforme apresentadas na **Figura 1** (SONODA; PEI; EVANS, 2007).



**FIGURA 1.** CLASSES DE RECEPTORES NUCLEARES. A SUPERFAMÍLIA DE NRS INCLUI 48 MEMBROS. Os ligantes naturais estão descritos à direita. A importância fisiológica da ativação induzida por ligantes foi estabelecida para os receptores endócrinos (rosa: receptores esteroidais que atuam como homodímeros; e verde: receptores que se heterodimerizam com o RXR) e para os receptores órfãos adotados sensores de lipídios. As funções fisiológicas dos receptores órfãos adotados enigmáticos e dos receptores órfãos ainda não foram definidas (SONODA; PEI; EVANS, 2007).

A classe dos **receptores órfãos adotados** é de particular importância, pois seus receptores são considerados reguladores fundamentais da homeostase de lipídios e de glicose, e em razão disso, são considerados alvos promissores para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de desordens metabólicas. Os membros desta classe foram descobertos por exibirem homologia de seqüência com os receptores endócrinos. A identificação de seus ligantes ocorreu posteriormente, e em função disso passaram de receptores *órfãos* para receptores *órfãos adotados*. Além do RXR, essa classe abriga os receptores dos proliferadores peroxissomais (PPARs), o receptor hepático X (LXR), o receptor X farnesóide (FXR) e receptor X do pregnano (PXR). Tais receptores possuem baixa afinidade para lipídios e xenobióticos oriundos da dieta, e atuam complexando-se heterodimericamente com o receptor RXR (SONODA; PEI; EVANS, 2007).

O **RXR** é o receptor órfão mais estudado. O primeiro ligante identificado para esse receptor foi o 9-cis ácido retinóico, um derivado da vitamina A. Em seguida foram descobertos ligantes lipídicos provenientes da dieta, tais como o ácido docosahexaenóico, o ácido fitânico e inseticidas derivados do ácido metopreno. O RXR atua como parceiro heterodimérico obrigatório para outros receptores nucleares. Heterodímeros formados pelo RXR com parceiros não permissivos (VDR e TR) podem apenas ser ativados por ligantes específicos para esses parceiros. Por outro lado, alguns receptores podem ser condicionalmente permissivos à ativação pelo ligante do RXR (PPARs, LXR e FXR), indicando que agonistas potentes de RXR podem ter importantes efeitos na homeostase lipídica (CHAWLA et al., 2001; PINAIRE; REIFEL-MILLER, 2007).

**LXRs** são receptores cujos ligantes naturais são oxisteróis. Eles atuam na regulação da expressão de proteínas fundamentais para a manutenção dos níveis normais de colesterol no corpo, tais como aquelas envolvidas no transporte, catabolismo e eliminação de colesterol. Também têm ações importantes no controle de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos (CHAWLA et al., 2001).

O **FXR** atua como sensor para ácido biliar, o produto final do catabolismo de colesterol. Esse receptor interfere com a ação do LXR no metabolismo de colesterol e

de triacilgliceróis e promove a indução do metabolismo de lipoproteínas, além de inibir a lipogênese hepática (SONODA; PEI; EVANS, 2007).

O **PXR** atua como regulador-chave da resposta adaptativa a xenobióticos em mamíferos, sendo altamente expresso no fígado e intestino. O ligante natural do PXR é um metabólito de progesterona, o  $5\beta$ -pregnano-3,20-diona, e sua atividade transcricional regula genes envolvidos em diferentes etapas do metabolismo de xenobióticos (oxidação, conjugação e transporte) (WILLSON; KLIEWER, 2002).

Os **receptores dos proliferadores peroxissomais (PPARs)** foram identificados inicialmente em roedores da década de 90, e desde então suas propriedades fisiológicas vêm sendo pesquisadas (KOTA; HUANG; ROUFOGALIS, 2005). A designação do nome PPAR se deve ao fato da ativação do  $PPAR\alpha$ , primeiro receptor descoberto, mas não de  $PPAR\beta/\delta$  e  $\gamma$ , promover a proliferação de peroxissomos em hepatócitos de roedores (MURPHY; HOLDER, 2000). Os peroxissomos são organelas responsáveis por reações de oxidação ligadas ao metabolismo energético e sua propagação tem resultado em hepatomegalia e carcinogênese em roedores, porém esses efeitos não foram observados em humanos (EVANS; BARISH; WANG, 2004).

Como resultado de diversos estudos, os PPARs são considerados como sensores metabólicos, que, de acordo com os sinais lipídicos, atuam na expressão gênica de modo a promover ações adaptativas relacionadas à homeostase lipídica e energética, atuando especialmente na oxidação de ácidos graxos, diferenciação de adipócitos e sensibilidade à insulina (FEIGE et al., 2006; YU; REDDY, 2007). Além das ações metabólicas, têm sido demonstrados importantes efeitos em diversos processos fisiológicos, tais como no desenvolvimento e diferenciação celular e em processos inflamatórios, entre outros (STRAUS; GLASS, 2007; YU; REDDY, 2007).

Dentro dessa subfamília, três subtipos com significativa homologia de sequência de aminoácidos e codificados por genes diferentes já foram caracterizados, sendo estes o  $PPAR\alpha$  (NR1C1),  $PPAR\delta/\beta$  (NR1C2) e  $PPAR\gamma$  (NR1C3). O  $PPAR\alpha$  foi o primeiro membro da subclasse dos PPARs a ser identificado, tendo sido clonado por Issemann e Greenem 1990, e em 1992, Dreyer identificou os outros dois PPARs (ISSEMANN; GREEN, 1990; DREYER et al., 1992). Os três subtipos de receptores estão presentes na maioria dos tecidos, embora apresentem padrões de expressão tecidual isotipo-

específica, sendo assim, expressos de forma desigual entre os diferentes órgãos (CUZZOCREA, 2006).

A variedade de ações que os PPARs exercem é reflexo da inúmera diversidade de ligantes que podem ser acomodados dentro de suas bolsas de ligação. Os ligantes naturais de PPARs incluem ácidos graxos saturados e insaturados, que podem servir ainda de substratos enzimáticos para geração de seus derivados com atividade agonista sobre esses receptores, tais como prostaglandinas e leucotrienos. A produção dos ligantes naturais pode ser influenciada tanto por condições fisiológicas (alimentação, privação de alimentos e exercício) quanto por condições patofisiológicas (inflamação crônica, diabete, aterosclerose, câncer) (BERGER; MOLLER, 2002; FEIGE et al., 2006; MICHALIK et al., 2006).

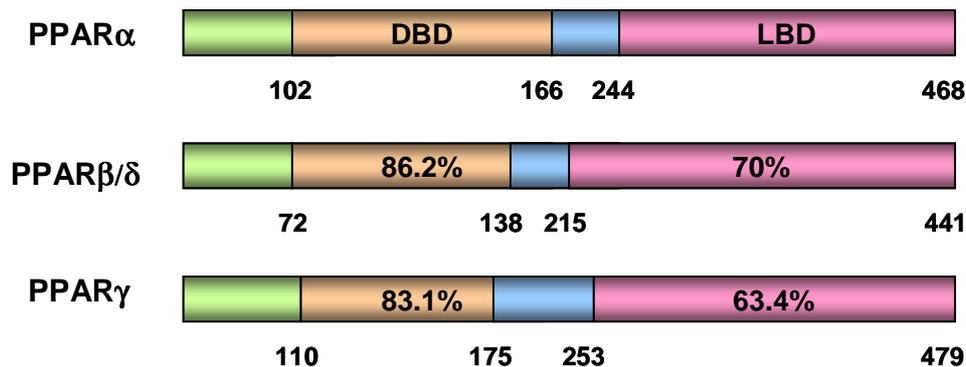
### 1.2.2 Estrutura dos PPARs

Os PPARs, assim como os demais receptores nucleares, possuem os domínios funcionais organizados de modo similar: domínio amino-terminal, responsável pela transativação independente da presença do ligante, composto pela região AF-1; domínio de ligação ao DNA (DBD - *DNA Binding Domain*); região de dobradiça *Hinge*; domínio de ligação ao ligante (LBD - *Ligand Binding Domain*); domínio AF-2, que promove a transativação dependente da presença do ligante (SONODA; PEI; EVANS, 2007) (**Figura 2**).



**FIGURA 2.** ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS DOMÍNIOS FUNCIONAIS DOS PPARs. AF-1 (Domínio com função de transativação 1); DBD (Domínio de ligação ao DNA) ; região *hinge*; LBD (Domínio de ligação ao ligante; e domínio AF-2 (Domínio com função de transativação 2).

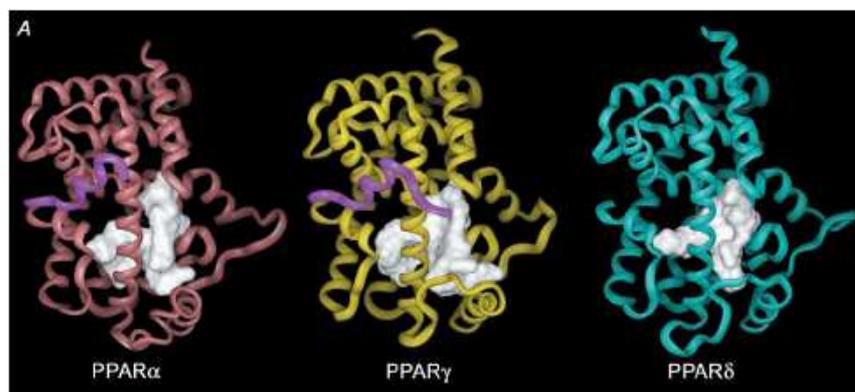
Quanto ao tamanho dos receptores, o PPAR $\alpha$  possui 468 resíduos de aminoácidos em sua estrutura, enquanto o PPAR $\beta/\delta$  apresenta 441 e o PPAR $\gamma$  479 resíduos (VAMECQ; LATRUFFE, 1999). O DBD é a região mais conservada entre os receptores nucleares (**Figura 3**). Esse domínio contém dois segmentos estruturais independentes em forma de alça chamados “dedos de zinco”. Cada segmento possui quatro resíduos de cisteína que formam complexos coordenados por íons de zinco na região central. Tal estrutura confere maior estabilidade de dobramento ao receptor, permitindo interações firmes com os elementos responsivos na região regulatória de genes-alvo dos PPARs (GAMPE et al., 2000; NOLTE et al., 1998; PERAZA et al., 2006).



**FIGURA 3.** COMPARAÇÃO DA IDENTIDADE DE AMINOÁCIDOS DO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO DNA (DBD) E O DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO LIGANTE (LBD) DOS SUBTIPOS DE PPARS EM HUMANOS. As porcentagens de identidade entre os domínios de ligação ao DNA e ao ligante são relacionadas ao PPAR $\alpha$ . Os números abaixo dos receptores são referentes ao número de resíduos a partir da extremidade N-terminal (MURPHY; HOLDER, 2000).

O LBD dos PPARs é composto por 12  $\alpha$ -hélices e 4 folhas- $\beta$  organizados em três camadas, compondo a forma característica de sanduíche  $\alpha$ -helical. A hélice 12 garante flexibilidade conformacional que permite ao LBD perceber a presença de ligantes específicos, aumentando, assim, a interação com proteínas coativadoras e correpressoras, e conseqüentemente determinando o resultado transcricional da sinalização do PPAR. A estrutura do LBD dos PPARs delinea uma bolsa hidrofóbica

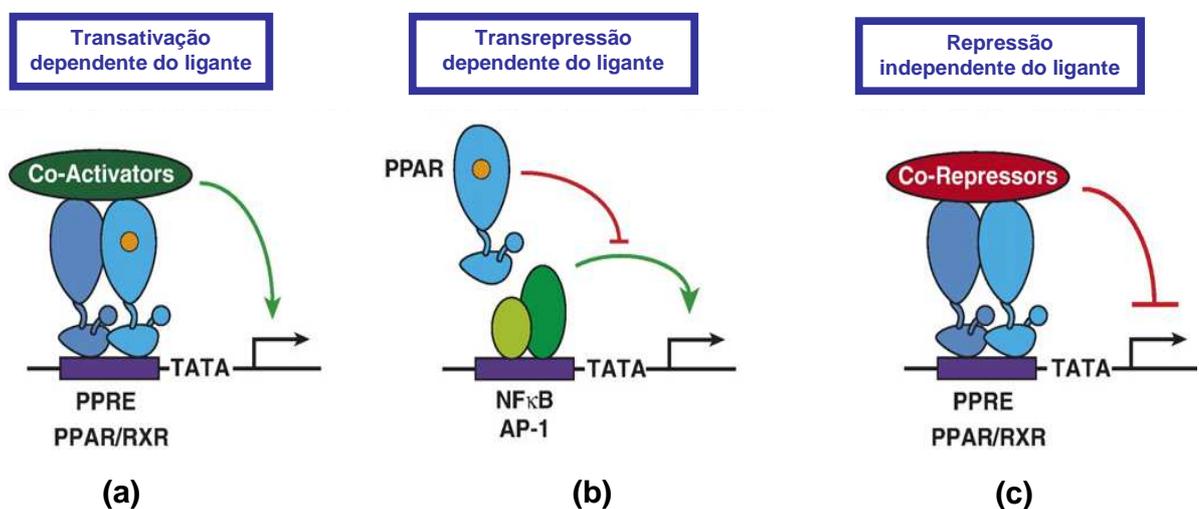
grande em forma de Y, que contribui para a habilidade dos PPARs ligarem-se a diversos tipos de substâncias naturais ou sintéticas lipofílicas com um grupo ácido na cabeça. Os três subtipos de PPARs exibem uma homologia de seqüência de 60% a 70% nos domínios LBDs (**Figura 3**). A comparação das estruturas tridimensionais dos LBDs entre os três PPARs demonstra que, embora o tamanho total das bolsas seja similar, existem diferenças importantes na topologia detalhada. O PPAR $\alpha$  e o PPAR $\gamma$  são mais semelhantes tanto em relação ao tamanho quanto à forma. A principal diferença determinante da seletividade entre eles ocorre pela substituição da Tir-314 no PPAR $\alpha$  por uma His-323 no PPAR $\gamma$ . Esses aminoácidos formam parte de uma rede de resíduos de ligação ao hidrogênio que estão envolvidos na ativação do receptor pelos seus ligantes ácidos. A bolsa de ligação do PPAR $\alpha$  é a mais lipofílica em relação aos demais subtipos, o que pode explicar o fato de não se ligar a certos ácidos graxos hidroxilados, os quais são bons ligantes de PPAR $\gamma$ . Já o PPAR $\beta/\delta$  possui a menor bolsa de ligação entre os PPARs, sendo essa característica a principal determinante na dificuldade de identificação de agonistas fortes e seletivos para esse receptor (GAMPE et al., 2000; NOLTE et al., 1998; UPPENBERG et al., 1998; XU et al., 1999; XU et al., 2001) (**Figura 4**).



**FIGURA 4.** COMPARAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DEFINIDA POR RAIO-X DO LBD DOS PPARS. Em vermelho está representado o PPAR $\alpha$ , em amarelo o PPAR $\beta/\delta$  e em azul o PPAR $\gamma$ . Cada PPAR está complexado com um ligante de alta afinidade. Os PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$  estão complexados também com o peptídeo LxxLL, que é derivado do coativador do receptor esteroide 1 (SRC-1) (cor roxa). Para cada PPAR, a bolsa de ligação ao ligante acessível ao solvente (branco) (XU et al., 2001).

### 1.2.3 Mecanismo de ação dos PPARs

Os PPARs podem exercer seus efeitos regulatórios sobre a transcrição gênica por diferentes mecanismos, tais como **(i)** transativação dependente do ligante, **(ii)** repressão independente do ligante e **(iii)** transrepressão dependente do ligante. No primeiro mecanismo, os PPARs podem ativar a transcrição de maneira dependente do ligante pela ligação direta do complexo heterodimérico PPAR-RXR ao elemento responsivo ao PPAR (PPRE) nos genes-alvo. Esse mecanismo é o modelo clássico de ação dos PPARs, e em função disso, será mais detalhado no próximo tópico. Na transrepressão dependente do ligante, os PPARs reprimem a transcrição por antagonizar as ações de outros fatores de transcrição, tais como o NF- $\kappa$ B e proteína ativadora 1 (AP-1)<sup>5</sup> após a ligação do agonista. Por último, o complexo PPAR-RXR pode se ligar ao elemento responsivo em genes-alvo na ausência de ligantes e recrutar complexos correpressores que medeiam a repressão ativa de genes (RICOTE; GLASS, 2007; STRAUS; GLASS, 2007) (**Figura 5**).



**FIGURA 5.** ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DOS PPARS. PPARS PODEM ATIVAR E INIBIR A EXPRESSÃO GÊNICA. (a) Transativação dependente do ligante. Os PPARs podem ativar a transcrição de maneira dependente do ligante pela ligação direta ao elemento responsivo ao PPAR (PPRE) nos genes-alvo como heterodímero com o receptor RXR. (b) Transrepressão dependente do ligante. PPARs

<sup>5</sup> AP-1: proteína, que, assim como o NF- $\kappa$ B, exerce funções importantes na regulação transcricional de genes pró-inflamatórios e de moléculas de adesão em células endoteliais (WANG et al., 2002).

reprimem a transcrição de modo dependente do ligante por antagonizar as ações de outros fatores de transcrição, tais como NF- $\kappa$ B e a AP-1. (c) Repressão independente do ligante. PPARs se ligam ao elemento responsivo na ausência de ligantes e recrutam complexos correpressores que medeiam a repressão ativa (RICOTE; GLASS, 2007).

### 1.2.3.1 Mecanismo clássico de ação dos PPARs: regulação transcricional por heterodimerização com RXR

Como receptores ligante-dependentes, a ligação de substâncias agonistas aos diferentes subtipos dos receptores PPARs promove respostas fisiológicas específicas e distintas na sinalização celular (HUMMASTI; TONTONAZ, 2006). Apesar de medirem ações diferentes nos diversos tecidos, o mecanismo clássico de ativação transcricional dos subtipos PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$  é similar. A regulação da expressão gênica é conduzida através da associação heterodimérica dos PPARs com os três subtipos conhecidos de RXR, dimerização essa independente do ligante ou da ligação ao DNA (DREYER, 1992; FEIGE et al., 2006) (**Figura 5a**).

Na ausência de substâncias agonistas, a ativação da transcrição é reprimida pela ligação de proteínas correpressoras ao complexo PPAR-RXR tais como o **correpressor de receptores nucleares (NCoR)** ou o **mediador de silenciamento de RXR e TR (SMRT)**. As referidas proteínas têm função de desacetilação de histonas (**HDACs – Histonas Deacetilases**), ou recrutam proteínas que detêm essa ação, podendo ainda possuir outras atividades enzimáticas, de modo que, em conjunto, possam manter a cromatina em sua forma enovelada, o que impede a ligação do receptor e da maquinaria transcricional ao DNA (YU et al., 2005; RIZZO; FIORUCCI, 2006; YU; REDDY, 2007).

Na presença de substâncias agonistas de PPAR, o conjunto repressor é desacoplado a partir do complexo PPAR-RXR, seguindo-se do recrutamento de proteínas coativadoras, tais como o **coativador de receptor de esteróide (SRC) – 1, 2 e 3** e a **proteína de ligação ao PPAR (PBP)**, entre outras. O complexo coativador promove modificações nas histonas (acetilação de histonas) e na estrutura da cromatina de modo a permitir o desenovelamento do DNA, o que facilita o acesso e a interação do complexo heterodimérico ao **elemento responsivo do PPAR (PPRE)**, com a consequente ativação de genes específicos. O PPRE consiste em uma repetição

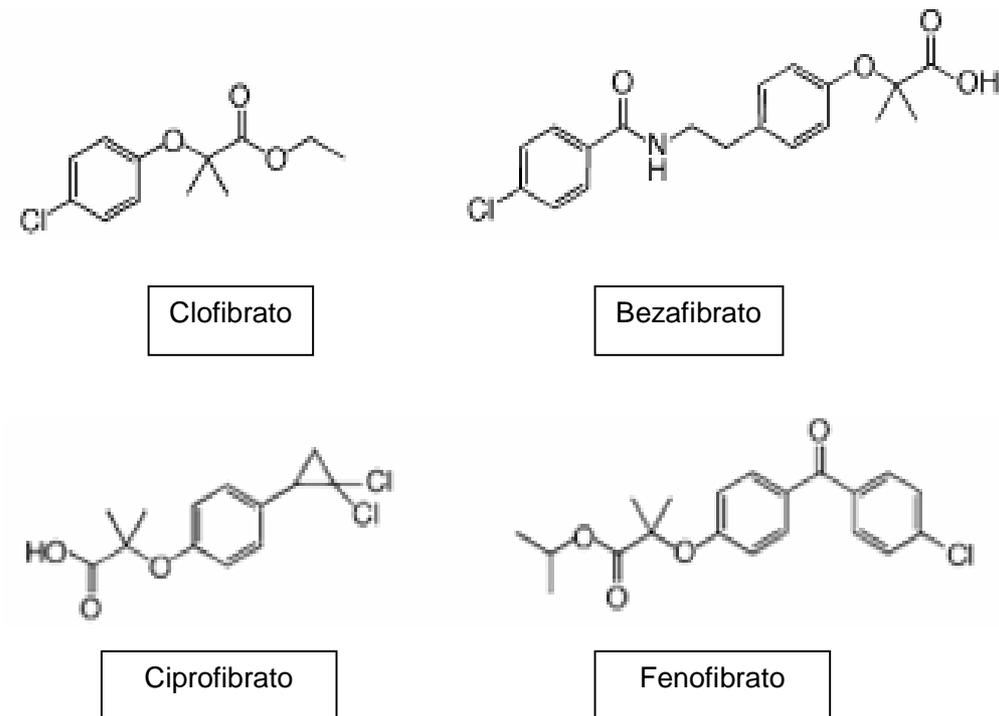
direta de sequências AGGTCA, espaçadas por um nucleotídeo (DR-1 – repetição direta-1), e se encontra na região promotora de genes-alvo (YU; REDDY, 2007; KOTA; HUANG; ROUFOGALIS, 2005; CUZZOCREA, 2006; FEIGE et al., 2006).

Os ligantes endógenos e exógenos de PPARs podem recrutar de maneira diferente os corretores, promovendo o desencadeamento de respostas fisiológicas diversas, tanto da modulação da atividade biológica, quanto das possíveis ações tóxicas decorrentes da ação direta ou indireta dos PPARs sobre seus diversos genes-alvo (PERAZA et al., 2006).

#### 1.2.4 PPAR $\alpha$

O gene do PPAR $\alpha$  humano está localizado no cromossomo 22 adjacente à região 22q12-q13.1. Sua expressão vem sendo rastreada nos diversos tecidos humanos, tendo sido encontrado principalmente em tecidos ativos metabolicamente, tais como o fígado, coração, músculo esquelético, rins e tecido adiposo marrom. Além destes órgãos, é ainda expresso em monócitos, células vasculares endoteliais e células da musculatura lisa vascular (RIZZO; FIORUCCI, 2006).

Após a identificação do PPAR $\alpha$ , foi observada sua ativação por medicamentos da classe dos fibratos, tais como fenofibrato, clofibrato, gemfibrozil e bezafibrato, os quais já eram utilizados no tratamento de hipertrigliceridemia. Além de reduzir os níveis de triacilgliceróis, os fibratos são utilizados clinicamente para aumentar os níveis de HDL em pacientes hiperlipidêmicos, sendo estas ações mediadas pela ativação de PPAR $\alpha$  (SHEARER; BILLIN, 2007). Outros ligantes sintéticos têm sido desenvolvidos, tais como a nafenopina e WY-14643 (BERGER; MOLLER, 2002; KOTA; HUANG; ROUFOGALIS, 2005) (**Figura 6**).



**FIGURA 6.** LIGANTES SINTÉTICOS DE PPAR $\alpha$ .

Posteriormente à descoberta da ativação pelos fibratos, foram identificados agonistas naturais que se ligam com baixa afinidade ao PPAR $\alpha$ , tais como ácidos graxos saturados e insaturados, incluindo os ácidos palmítico, esteárico, oléico, linoléico, araquidônico e eicosapentaenóico (BERGER; MOLLER, 2002; KOTA; HUANG; ROUFOGALIS, 2005).

As informações geradas nos últimos anos, principalmente pelos estudos conduzidos com camundongos nocauteados para o PPAR $\alpha$ , identificaram diversos genes-alvo para esse receptor. Em função das atividades biológicas destes genes, o PPAR $\alpha$  é considerado um receptor sensor de lipídios, com atuação regulatória essencial no metabolismo celular de produção de energia.

Os genes-alvo do PPAR $\alpha$  funcionam em conjunto de modo a sincronizar as complexas mudanças metabólicas necessárias à conservação de energia durante a alimentação e jejum. Durante o jejum prolongado, os ácidos graxos são liberados pelo tecido adiposo e transportados para o fígado. A indução hepática do PPAR $\alpha$  pelos

ácidos graxos promove a oxidação mitocondrial, peroxissomal e microsomal dos ácidos graxos para gerar corpos cetônicos, fonte alternativa de açúcar para tecidos periféricos. Essa ação é particularmente importante por prevenir o acúmulo de ácidos graxos no fígado, e, conseqüentemente, a esteatose hepática. Foi observado que a inativação do gene do PPAR $\alpha$  em modelos animais resulta em acúmulo de lipídios no fígado, severa hipocetonemia, hipoglicemia, hipotermia e elevados níveis plasmáticos de ácidos graxos (EVANS; BARISH; WANG, et al., 2004; FEIGE et al., 2006).

Outras vias sob o controle do PPAR $\alpha$  incluem a gliconeogênese, biotransformação e metabolismo de colesterol. Além dessas ações metabólicas, o PPAR $\alpha$  pode diminuir a expressão de inúmeros fatores de transcrição pró-inflamatórios, tendo exibido efeitos antiinflamatórios no fígado, tecido adiposo e parede vascular, embora os efeitos anti-aterogênicos ainda não sejam conclusivos. No tecido adiposo especificamente, o PPAR $\alpha$  pode controlar o processo inflamatório por três mecanismos: regulação direta da expressão de genes inflamatórios; diminuição da hipertrofia dos adipócitos, a qual está ligada ao estado altamente inflamatório do tecido adiposo; e eventos sistêmicos provenientes do fígado (STIENSTRA et al., 2007).

### 1.2.5 PPAR $\beta/\delta$

O PPAR $\beta/\delta$  foi clonado na década de 90, e, em relação aos demais PPARs, é o menos estudado. O gene do PPAR $\beta/\delta$  humano está localizado no cromossomo 6p21.1-p21.2 (BERGER; MOLLER, 2002). O PPAR $\beta/\delta$  tem expressão ampla por todo o organismo, tendo sido demonstradas importantes funções no músculo esquelético, tecido adiposo, pele, intestino e cérebro, sendo descritas atividades ligadas à adaptação metabólica dos tecidos em resposta a alterações ambientais (MICHALIK et al., 2006; TENENBAUM; MOTRO; FISMAN, 2005).

Assim como o PPAR $\alpha$ , o PPAR $\beta/\delta$  também aceita como agonistas ácidos graxos saturados e insaturados, tais como os ácidos graxos polinsaturados ácido dihomo- $\gamma$ -linolênico, EPA (Ácido 5,8,11,14,17-eicosapentanóico), ácido araquidônico, ácido palmítico e ácido 2-bromopalmítico. Alguns eicosanóides, incluindo a PGA1 (Prostaglandina A1) e PGA2 (Prostaglandina A2) demonstraram ativar esse receptor. A

carbaprostaciclina, uma prostaciclina sintética, e o GW501516 ativam com baixa e alta afinidade, respectivamente, o PPAR $\beta/\delta$  (BERGER; MOLLER, 2002; FEIGE et al., 2006).

Alguns estudos indicam que a ativação do PPAR $\beta/\delta$  exerça efeitos regulatórios no catabolismo de ácidos graxos, no transporte reverso do colesterol e no metabolismo energético. O PPAR $\beta/\delta$  tem sido relacionado à regressão da obesidade, visto que já foi demonstrada em diferentes modelos de obesidade em camundongos, que sua ativação induz à oxidação de ácidos graxos com conseqüente diminuição da massa adiposa. Esse efeito também foi demonstrado no coração e no músculo, sendo que neste último ocorre a aumento da quantidade de fibras musculares do tipo I, as quais promovem um desempenho de maior resistência (STIENSTRA et al., 2007). Além disso, algumas substâncias agonistas de PPAR  $\beta/\delta$  diminuíram a resistência à insulina e reduziram a glicose plasmática em modelos de diabetes tipo 2 em animais (SHEARER; BILLIN, 2007; MICHALIK et al., 2006). O PPAR  $\beta/\delta$  regula o consumo energético em tecidos periféricos por controlar tanto os genes envolvidos na  $\beta$ -oxidação, quanto as proteínas desacopladoras (UCPs - Proteínas Desacopladoras)<sup>6</sup> (FEIGE et al., 2006).

Em estudos utilizando camundongos nocauteados para o gene do PPAR $\beta/\delta$  foram observadas anormalidades que incluíam defeitos de placenta e de mielinização, armazenamento adiposo reduzido e reações inflamatórias de pele desreguladas (STIENSTRA et al., 2007). Alguns trabalhos ressaltam seu envolvimento no controle de mecanismos de reparo tecidual, sendo que, animais nocauteados para PPAR $\beta/\delta$  apresentam dificuldade na cicatrização de feridas. Alguns estudos apontam ações importantes do PPAR $\beta/\delta$  na reprodução, imunidade, formação óssea, desenvolvimento de cérebro e pele, queimaduras e formação de tumor (BARISH; EVANS, 2004; MICHALIK et al., 2006).

### 1.2.6 PPAR $\gamma$

O PPAR $\gamma$  é o PPAR mais estudado. Foram identificadas duas isoformas do PPAR $\gamma$ , PPAR $\gamma$ 1 e PPAR $\gamma$ 2, que são geradas pelo mesmo gene, porém por promotores

---

<sup>6</sup> UCPs: proteínas mitocondriais envolvidas com a produção de energia desacoplante .

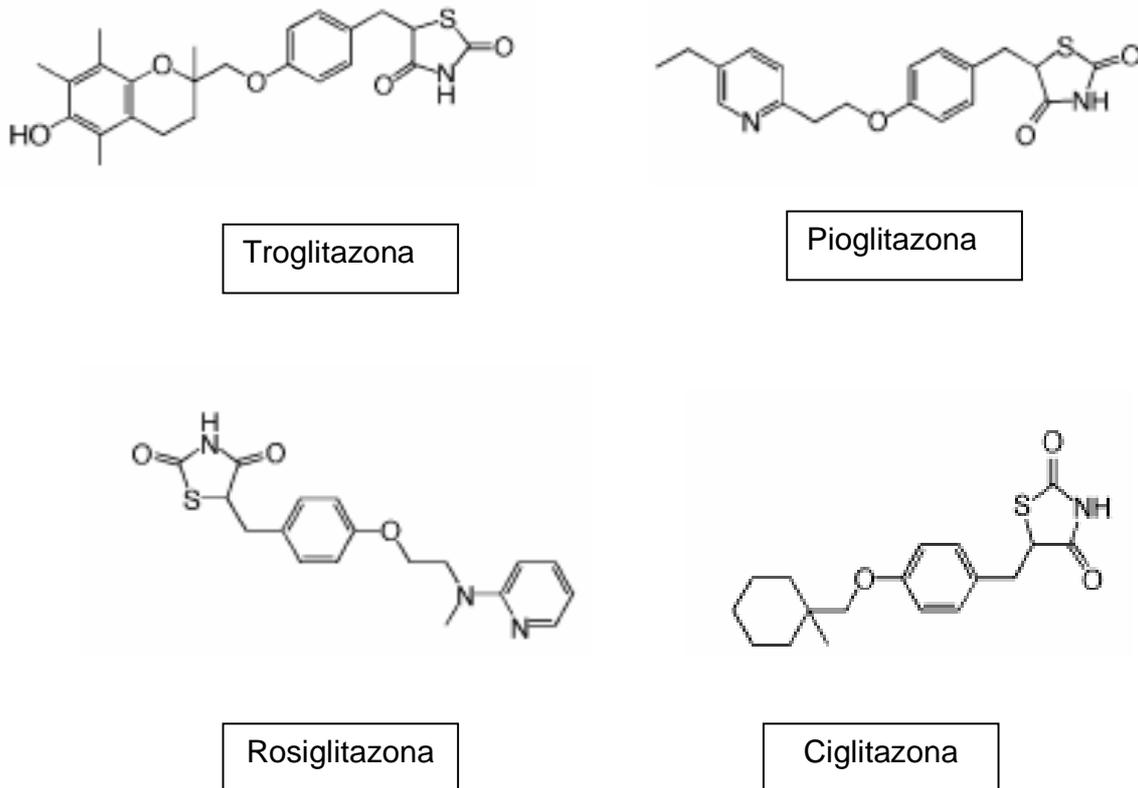
distintos e mecanismos de *splicing* alternativo. Elas diferem entre si apenas em seus domínios A/B na região amino-terminal, na qual o PPAR $\gamma$ 2 contém 30 aminoácidos adicionais. As duas isoformas de PPAR $\gamma$ ,  $\gamma$ 1 e  $\gamma$ 2, são expressas em tecidos adiposos marrom e branco, atuando na diferenciação de adipócitos, armazenamento de lipídios e na homeostase de glicose. A isoforma  $\gamma$ 1 ainda pode ser detectada em outros tecidos como intestino e células imunes (TONTONNOZ, et al., 1994; YU et al., 2005).

O PPAR $\gamma$  foi originalmente descrito como tendo uma função primária na diferenciação de adipócitos, sendo ainda hoje considerado como um elemento essencial nesse processo. Posteriormente, com o avanço nos estudos a respeito de suas funções biológicas, foram atribuídas outras ações importantes ao PPAR $\gamma$ , tais como em processos inflamatórios, na sensibilização à insulina, no metabolismo lipídico, aterosclerose, controle de ciclo celular, apoptose e proliferação celular (COHEN, 2006).

O primeiro ligante natural de PPAR $\gamma$  descoberto foi a 15-deoxi-prostagladinaJ2 (15d-PGJ2), que se liga de maneira irreversível ao receptor. Em seguida, outras substâncias lipofílicas endógenas também exibiram ação agonista sobre este receptor, tais como eicosanóides e ácidos graxos polinsaturados, embora eles apresentem baixa afinidade. Recentemente, o ácido graxo derivado do ácido nitrolinoléico (LNO<sub>2</sub>), o qual é produzido a partir de reações inflamatórias oxidativas dependentes de óxido nítrico, foi identificado como um novo agonista, sendo considerado até o momento um dos mais potentes ligantes naturais de PPAR $\gamma$  (DUBOQUOY et al., 2006).

O PPAR $\gamma$  possui uma bolsa de ligação capaz de acomodar ligantes lipofílicos compostos por grupos químicos diversos, tais como as tiazolidinedionas (TZD), e os medicamentos da classe do glitazar, os quais se ligam tanto a PPAR $\gamma$  quanto a PPAR $\alpha$  (DUBOQUOY et al., 2006) (**Figura 7**). As TZDs melhoram a sensibilidade à insulina nos tecidos-alvo e reduzem os níveis de glicose e de ácidos graxos livres em pacientes com diabetes do tipo 2. Glitazar é uma nova família de agonistas de PPAR $\alpha/\gamma$  que foi desenvolvida para o tratamento oral para anormalidades nos níveis de glicose e de lipídios associados com diabetes tipo 2 e síndrome metabólica. Entretanto, os medicamentos dessa família tiveram os estudos clínicos descontinuados em função dos efeitos tóxicos observados. Medicamentos antiinflamatórios não esteroidais, tais como indometacina, fenoprofeno e ibuprofeno, também demonstraram ativar PPAR $\gamma$  *in vitro*,

embora apresentem baixa afinidade *in vivo* (DUBOQUOY et al., 2006; ROSENSON, 2007; SHEARER; BILLIN, 2007). Na função de antagonista, o GW0072 inibiu o processo de adipogênese em experimentos utilizando cultura de células (BERGER; MOLLER, 2002).



**FIGURA 7.** LIGANTES SINTÉTICOS DE PPAR $\gamma$ .

Assim como PPAR $\beta/\delta$ , experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o PPAR $\gamma$  ativado regula a expressão gênica de proteínas desacoplantes UCP-1, UCP-2 e UCP-3 (BERGER; MOLLER 2002; FEIGE et al., 2006). Outro efeito importante atribuído ao PPAR $\gamma$  é o de redução da inflamação do tecido adiposo, que pode decorrer de dos seguintes mecanismos: promoção da adipogênese, que origina adipócitos menores, os quais secretam menos substâncias inflamatórias; indução da produção de adiponectina pelos adipócitos, que tem fortes efeitos antiinflamatórios; e redução da expressão

gênica de adipocinas e de outras moléculas pró-inflamatórias secretadas pelos macrófagos (STIENSTRA et al., 2007).

### 1.2.7 Ações biológicas dos PPARs

#### 1.2.7.1 Oxidação de ácidos graxos

Os triacilgliceróis são transportados no corpo pelas lipoproteínas, juntamente com o colesterol. Os triacilgliceróis da dieta são absorvidos como quilomícrons para a corrente sanguínea, sendo que uma parte é absorvida para os tecidos muscular e adiposo; os quilomícrons remanescentes continuam na circulação até serem captados pelo fígado. A partir do fígado, há formação de VLDL, composta por colesterol, proteínas e restos de triacilgliceróis, que carrearão os triacilgliceróis restantes para serem absorvidos nos tecidos musculares e principalmente no tecido adiposo (VOET; VOET; PRATT, 2002).

Para serem absorvidos pelos tecidos muscular e adiposo, os triacilgliceróis são hidrolisados pela enzima lipoproteína-lipase (LPL) em ácidos graxos livres. Embora sejam moléculas lipofílicas, os ácidos graxos requerem transportadores para otimizar sua passagem pela membrana citoplasmática em tecidos com alta atividade metabólica ou de armazenamento. Os carreadores de ácidos graxos presentes nos adipócitos são o FAT (Translocase de ácidos graxos)<sup>7</sup> e o FATP (Proteína de transporte de ácidos graxos), e nos músculos além destes transportadores, também foi identificado a FABP (Proteína de ligação de ácidos graxos) (ANDRADE; RIBEIRO; CARMO, 2006) (**Figura 8**).

Os fibratos, classe de agonistas exógenos de PPAR $\alpha$ , já provaram induzir a expressão do gene da LPL, além de reprimir a expressão do gene que codifica a apolipoproteína-C-III, responsável pela inibição da LPL. Além disso, a ativação de PPAR $\alpha$  induz a expressão de FAT e FATP, sendo que tais ações justificam o efeito hipotrigliceridêmico dos fibratos. A ativação do PPAR $\gamma$  também induz a transcrição do gene da LPL e de FATP-1 no tecido adiposo e CD-36 em macrófagos, bem como o

---

<sup>7</sup> FAT: também chamada de CD-36 em macrófagos (FEIGE et al., 2006).

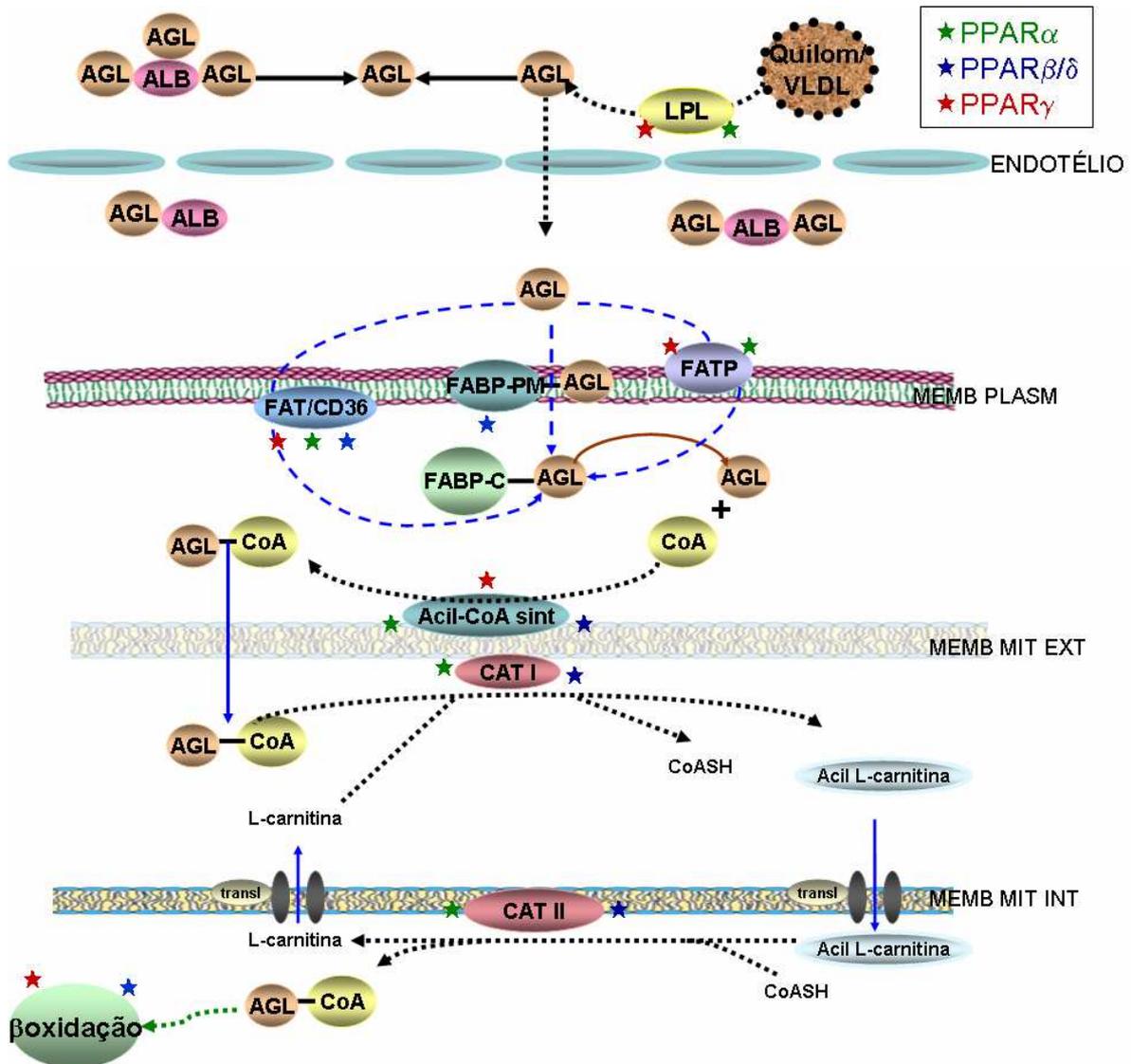
PPAR $\beta/\delta$  ativado induz a síntese de FAPB-3 e FAT no tecido muscular (STAELS et al., 1998; BERGER; MOLLER, 2002; FEIGE et al., 2006).

Nos adipócitos, os ácidos graxos são armazenados na forma de triacilgliceróis, os quais ficam aí retidos até que ocorra uma demanda energética, quando então sofrem a ação da enzima lipase sensível a hormônio (LHS), que libera os ácidos graxos livres. Seguem então complexados com a albumina, pela corrente sanguínea, até as células do fígado e do tecido muscular. Para geração de energia metabólica, os ácidos graxos sofrem a  $\beta$ -oxidação, que consiste em uma série de reações catalisadas por enzimas as quais retiram sucessivamente unidades de dois carbonos, até a formação do acetil-CoA, que será metabolizado no ciclo de Krebs. A  $\beta$ -oxidação pode ocorrer nas mitocôndrias, nos peroxissomos e nos microsossomos. Para serem adequadamente degradados, os ácidos graxos passam por três etapas fundamentais: i) ativação; ii) transporte para a mitocôndria; iii)  $\beta$ -oxidação (VOET; VOET; PRATT, 2002).

A etapa de ativação ocorre no citosol, e consiste na preparação do ácido graxo através de uma reação de acilação dependente de ATP, catalisada pela acil-CoA-sintetase (ACS), para dar origem ao acil-CoA-graxo. Para atravessar a membrana mitocondrial interna, a porção acil da acil-CoA citosólica é transferida ao transportador carnitina-palmitoil transferase I (CPT-I), formando a acil-carnitina, que é transportada à matriz mitocondrial por uma proteína carreadora. O conjunto CoA, já dentro da mitocôndria, recebe seu grupo acil pela carnitina-palmitoil transferase II. O acil-CoA graxo regenerado sofrerá, então, reações sucessivas de oxidação que são catalisadas por enzimas específicas, tais como as enzimas mitocondriais acil-CoA-desidrogenase, enoil-CoA-hidratase, hidroxiacil-CoA-desidrogenase e  $\beta$ -cetoacil-CoA-tiolase, entre outras, e as enzimas peroxissomais acil-CoA-oxidase, enoil-CoA-hidratase e tiolase. A  $\beta$ -oxidação peroxissomal tem como finalidade encurtar cadeias muito longas de ácidos graxos (maior que 22 carbonos), os quais entrarão por difusão na mitocôndria, local onde serão completamente degradadas (VOET; VOET; PRATT, 2002) (**Figura 8**).

Seguindo as etapas descritas na via catabólica de ácidos graxos, além dos genes já citados, vários outros foram identificados como sendo induzidos pela ativação dos PPARs, sendo alguns desses: LHS, alvo do PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$ ; ACS, alvo do PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ ; carnitina-palmitoil-transferases, alvo de PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$

e PPAR $\gamma$ ; genes de enzimas envolvidas na  $\beta$ -oxidação, alvos do PPAR $\alpha$  e PPAR $\beta/\delta$  (BERGER; MOLLER, 2002; FEIGE et al., 2006). Assim, os PPARs têm demonstrado estar envolvido em todas as principais etapas da via de oxidação de ácidos graxos, tais como na captação celular, na ativação e na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, conforme pode ser visto na **Figura 8**.



**FIGURA 8.** TRANSPORTE DE ÁCIDOS GRAXOS DO SANGUE ATÉ O PROCESSO DE  $\beta$ -OXIDAÇÃO. As marcações com  $\star$  indicam os pontos de indução pelos receptores PPARs (verde: PPAR $\alpha$ ; azul: PPAR $\beta/\delta$ ; e Vermelho: PPAR $\gamma$ ). Acil-CoA sint: acil-CoA-sintetase; AGL: ácidos graxos livres; ALB: albumina; CAT I: carnitina acil (palmitoil) transferase I; CAT II: carnitina acil (palmitoil) transferase II; CoA: coenzima A; FABP-PM: proteína para ligação com ácidos graxos na membrana plasmática; FABP-C: proteína para ligação com ácidos graxos no citoplasma; FAT-CD36: ácido graxo translocase; FATP: proteína de transporte de ácidos graxos; LPL: enzima lipoproteína lipase; TG: triacilglicerol (Elaboração própria).

### 1.2.7.2 Metabolismo de lipoproteínas e aterogênese

Os lipídios, como os fosfolipídios, os triacilgliceróis e o colesterol, por serem pouco solúveis em água, são transportados pela circulação complexados com proteínas, formando assim, as lipoproteínas quilomícrons, VLDL (Lipoproteína de densidade muito baixa), IDL (Lipoproteína de densidade intermediária), LDL (Lipoproteína de densidade baixa), HDL (Lipoproteína de densidade alta)<sup>8</sup> (VOET; PRATT, 2002).

O colesterol obtido da dieta é absorvido na forma de quilomícrons para a corrente sanguínea; os quilomícrons permanecem na circulação até serem captados pelo fígado. A partir do fígado, há formação de VLDL (colesterol, proteínas, triacilgliceróis), que continua na circulação na forma de IDL. As IDLs são captadas pelo fígado via receptor ou continuam na corrente sanguínea na forma de LDL. As LDLs também podem ser captadas pelo fígado através dos receptores de LDL, ou permanecem na circulação levando o colesterol até os tecidos extra-hepático (periféricos). A LDL é composta basicamente de proteínas e colesterol, sendo esta a maior carreadora de colesterol no sangue para os tecidos periféricos. Nestes tecidos extra-hepáticos, a LDL será removida por receptores de LDL, os quais desempenham importante função na manutenção dos níveis plasmáticos de LDL-colesterol. O colesterol captado pelos tecidos é removido pela HDL que o conduzirá até o fígado, local onde será armazenado ou dará origem aos ácidos biliares que serão utilizados na digestão de lipídios. Os ácidos biliares podem ser reabsorvidos ou excretados nas fezes. A não reabsorção dos ácidos biliares promove um aumento de sua produção hepática a partir do colesterol, o que implica em maior captação da LDL circulante (VOET; PRATT, 2002).

Existem três vias importantes de efluxo de colesterol a partir dos macrófagos, e sua compreensão é fundamental para o entendimento da influência dos PPARs no processo de formação da placa de ateroma. A primeira via consiste na troca por difusão passiva do colesterol livre entre a membrana celular e o  $\alpha$ -HDL maduro, que através da

---

<sup>8</sup> **Quilomícrons:** transportam triacilgliceróis e colesterol exógenos do intestino para os tecidos.

**VLDL, IDL e LDL:** transportam triacilgliceróis e colesterol endógeno do fígado para os tecidos.

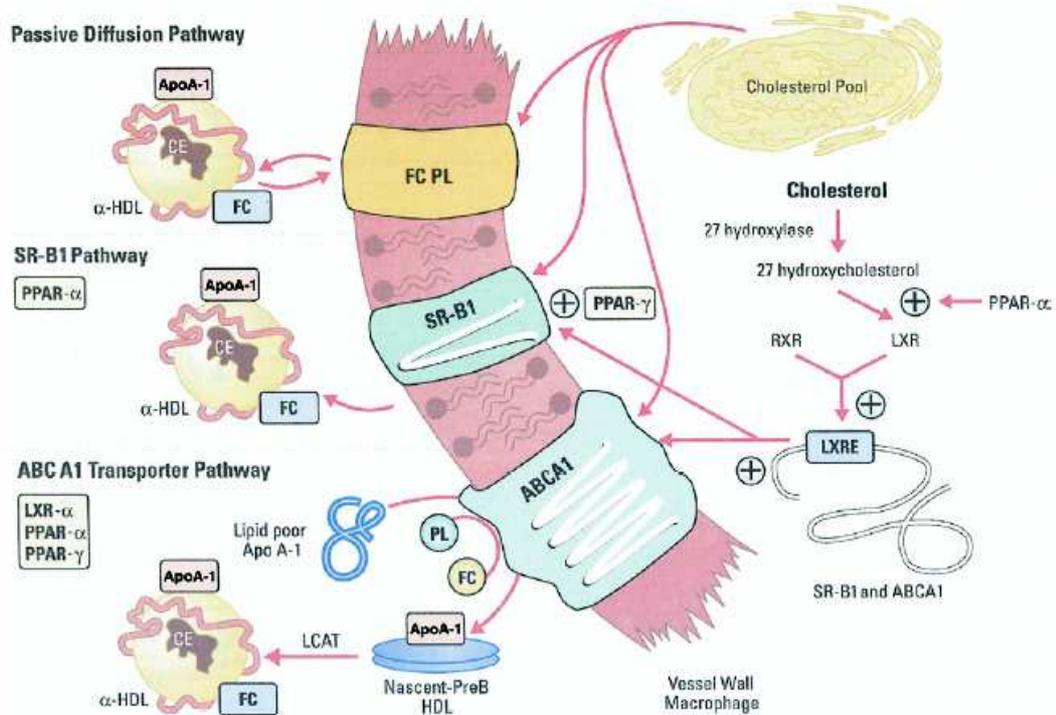
**HDL:** transportam colesterol endógeno dos tecidos para o fígado.

ação da enzima LCAT (Lecitina/Colesterol Acetiltransferase), é convertido em colesterol esterificado. A segunda via é mediada pelo receptor SR-BI (Receptor *scavenger* B-I), o qual transfere o colesterol livre para o  $\alpha$ -HDL. A última via é mediada pelo transportador ABC-A1, no qual se liga a ApoA-I pobre em lipídios, que recebe fosfolipídios e colesterol celular. Após a esterificação do colesterol livre pela LCAT, há a formação do  $\alpha$ -HDL maduro, que através da corrente sanguínea, carrega o colesterol para o fígado. Ambas as vias dos transportadores SR-BI e ABC-A1 são reguladas pelo conteúdo celular de oxisteróis, os quais controlam a expressão do LXR e dos genes dos transportadores SR-BI e ABC-A1 (BREWER JR, 2004) (**Figura 9**).

Os PPARs participam da regulação do **metabolismo de lipoproteínas** principalmente através da indução de genes envolvidos na captação de LDLs oxidadas pelos macrófagos e no efluxo do colesterol a partir de tecidos periféricos e de macrófagos arteriais para ser captado pelo fígado (CHINETTI et al., 2000).

O PPAR $\alpha$  atua no transporte reverso de colesterol regulando diretamente a expressão do transportador SR-B1 (Receptor *scavenger* B1), o qual transporta colesterol através da membrana plasmática para corrente sanguínea, e do receptor LXR $\alpha$  (Receptores Hepáticos X), indutor da produção dos transportadores ABCA1 (Transportadores cassete ligados ao ATP A1), ABCG1 (Transportadores cassete ligados ao ATP G1), os quais também medeiam o efluxo de colesterol, e SR-B1. Além disso, a ativação de PPAR $\alpha$  induz a transcrição gênica das lipoproteínas ApoA-I e ApoA-II que compõem a HDL (STAELS et al., 1998; CHINETTI et al., 2000; CHINETTI et al., 2001; FEIGE et al., 2006; ROSENSON, 2007) (**Figura 9**).

O PPAR $\gamma$  também regula positivamente o efluxo de colesterol, tanto agindo diretamente na expressão do LXR $\alpha$  como gerando ligante para esse receptor, através da ativação da transcrição da CYP27, enzima responsável por catalisar a formação do 27-hidroxicolesterol, ligante de LXR $\alpha$  (FEIGE et al., 2006). O PPAR $\gamma$  ainda induz a expressão dos receptores *scavenger* CD-36 para LDLs oxidadas em macrófagos, dificultando, assim, a formação das células espumosas que compõem as placas aterosclerosas (GURI; HONTECILLAS; BASSAGANYA-RIERA, 2006) (**Figura 9**).



**FIGURA 9.** TRÊS MAIORES VIAS PELAS QUAS O HDL PODE MEDIAR O EFLUXO DE COLESTEROL A PARTIR DOS MACRÓFAGOS CARREGADOS DE COLESTEROL. A primeira via, difusão passiva, envolve a troca de colesterol livre (FC) entre  $\alpha$ -HDL madura e a membrana celular. O efluxo ocorre após a conversão de FC em colesterol esterificado (CE) pelas enzimas LCAT (lecitina/colesterol aciltransferase). Na via SR-B1, o FC é transportado ao  $\alpha$ -HDL madura. A terceira via, que envolve o transportador ABCA1 (Transportadores cassete ligados ao ATP A1), o receptor preferido do colesterol celular é a apoA-1 pobremente lipidada, a qual se liga ao transportador ABCA1 e facilita o efluxo do colesterol celular a partir do compartimento endocítico, diminuindo assim, o conteúdo celular de colesterol. O efluxo do colesterol e fosfolípidios a partir de macrófagos e outros tecidos periféricos resulta em formação da pré- $\beta$ -HDL, a qual é ultimamente convertida em  $\alpha$ -HDL esférica madura após a esterificação do FC a CE pela LCAT. Ambas as vias do SR-B1 e o transportador ABCA1 são reguladas pelo conteúdo celular de oxicoolesterol. O excesso de colesterol celular é convertido, pelo menos em parte, a 27-hidroxicolesterol pela enzima hidrolase. O 27-hidroxicolesterol se liga ao LXR (Receptor hepático X), que induz a expressão dos genes do SR-B1 e do transportador ABCA1. Então, ambas  $\alpha$ -HDL esférica madura e pré- $\beta$ -HDL facilitam o efluxo de colesterol e participam do transporte reverso de colesterol para o fígado (ROSENSON, 2007).

Além dos efeitos no transporte reverso de colesterol, a detecção de expressão de PPAR  $\alpha$  e PPAR  $\gamma$  em tipos celulares presentes na parede arterial, tais como macrófagos, células endoteliais e células de musculatura lisa, sugerem que ações vasculares diretas promovidas por esses receptores podem contribuir para potenciais **efeitos anti-aterogênicos** (BERGER; MOLLER 2002).

Em células endoteliais e de musculatura lisa, o PPAR $\alpha$  pode inibir a inflamação vascular, o estresse oxidativo e o crescimento e migração celular. Essas ações podem ser promovidas pela inibição das vias de sinalização do NF $\kappa$ B, do fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) e da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (GUAN, 2004). Além disso, O PPAR $\alpha$  ativado reprime a expressão induzida pelo TNF $\alpha$  de VCAM-1 (Molécula de adesão à célula vascular induzida por citocinas-1) e de outras citocinas, diminuindo, assim, a adesão e o extravasamento de leucócitos através do endotélio vascular, e conseqüentemente reduzindo a resposta inflamatória (FEIGE et al., 2006).

O PPAR $\gamma$  igualmente inibe a expressão de moléculas inflamatórias, como o TNF $\alpha$  e moléculas de adesão. As glitazonas demonstraram reduzir a produção de MCP-1 (Proteína quimiotática para monócitos-1), MMP-9 (matriz metaloproteinase-9), enzima envolvida na quebra da placa aterosclerótica, e endotelina-1, um fator de vasoconstrição endotelial (VERGÈS, 2004).

Em modelos animais o PPAR $\beta/\delta$  apresentou efeitos anti-aterogênicos e antiinflamatórios. Porém o uso clínico ainda não está estabelecido (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2006).

Em decorrência dos efeitos antiinflamatórios, das ações no transporte reverso de colesterol e nos níveis de lipídios circulantes já citados, os PPARs têm sido investigados quanto ao seu papel potencial na prevenção e no tratamento da aterosclerose.

### **1.2.7.3 Adipogênese**

O processo de diferenciação do tecido adiposo conhecido como adipogênese é extensivamente estudado com o objetivo de se determinar tanto o mecanismo de desenvolvimento do tecido adiposo, quanto o seu funcionamento em condições normais e em situações patológicas. Foram identificados alguns fatores de transcrição que compõem uma rede de controle do processo adipogênico, cujas expressões estão aumentadas durante esse evento, tais como o PPAR $\gamma$ , o SREBP-1c (Proteína 1c

ligadora do elemento regulado por esteróis) e C/EBP (proteínas de ligação ao amplificador CCAAT - CCAAT) (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

O PPAR $\gamma$ , assim como a C/EBP $\alpha$ , se liga na região promotora de genes-alvo fundamentais à adipogênese, tais como a proteína ligadora de lipídios (aP2), expressa apenas no tecido adiposo, e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), a qual atua na síntese de glicerol para formação de triacilgliceróis (TONTONOZ et al., 1994; ROSEN et al., 2002). Em fibroblastos, foi demonstrado que a expressão ectópica de PPAR $\gamma$  e o tratamento com agonistas específicos eram capazes de causar o acúmulo de lipídios e a expressão de marcadores de diferenciação de adipócitos (FEIGE et al., 2006).

Além de estimular a adipogênese, a ativação do PPAR $\gamma$  promove a apoptose de adipócitos maduros saturados de lipídios, sendo que este efeito estimula a adipogênese a partir de precursores maduros (KOTA; HUANG; ROUFOGALIS, 2005).

As ações do PPAR $\beta/\delta$  na adipogênese ainda estão sendo investigadas. Até o momento, existem sugestões de sua atuação nos passos iniciais da adipogênese, não tendo sido ainda definidas suas funções nesse evento (FEIGE et al., 2006).

O aumento na adipogênese pode ser um efeito indesejado por comprometer o metabolismo ósseo. Os adipócitos e os osteoblastos são originados a partir de um progenitor mesenquimal comum, sendo que a adipogênese direciona a diferenciação para os adipócitos, podendo ocasionar perda óssea. Este efeito foi observado em alguns animais em uso de TZDs, mas não em todos. Em estudos com humanos foram constatados efeitos esqueléticos prejudiciais e uma incidência maior de fraturas ósseas (ALI et al., 2005; BERBEROGLU et al., 2007).

#### **1.2.7.4 Sensibilização à insulina**

A insulina é um hormônio que atua sobre o fluxo global de combustíveis. Com o influxo de nutrientes excedendo as necessidades simultâneas de energia e a velocidade de anabolismo, a insulina secretada induz o armazenamento de nutrientes, promovendo assim a captação tecidual de glicose, ácidos graxos e aminoácidos,

consequentemente diminuindo seus níveis plasmáticos (VOET; VOET; PRATT, 2002, Berne).

No metabolismo de carboidratos, a insulina estimula a oxidação e o armazenamento da glicose, e reprime a produção de glicose. No fígado, a insulina atua promovendo menor produção de glicose através da estimulação da glicólise (quebra de glicose), e inibição da glicogenólise (produção de glicose pela quebra de glicogênio) e da gliconeogênese (formação de glicose a partir de fontes diferentes de carboidratos). No músculo e no tecido adiposo, a insulina promove o deslocamento dos transportadores de glicose (GLUT-4) para a membrana plasmática, com consequente aumento na captação de glicose, além de estimular sua utilização por esses tecidos (VOET; VOET; PRATT, 2002; BERNE; LEVY, 1996).

No metabolismo de lipídios, a insulina promove como efeito final o aumento no armazenamento e o bloqueio da mobilização e oxidação de ácidos graxos. No tecido adiposo, a insulina inibe a atividade da lipase sensível a hormônio e estimula a lipoproteína lipase, promovendo, assim, a repressão da liberação e indução do armazenamento de ácidos graxos pelos adipócitos, respectivamente. Já no músculo ocorre a supressão da lipoproteína lipase, o que acarreta em redução na captação de ácidos graxos por esse tecido, além da oxidação de ácidos graxos também ser reprimida. No fígado, a insulina também é lipogênica e favorece a síntese hepática de colesterol. No metabolismo protéico, a insulina estimula a captação de aminoácidos e a síntese protéica em todos tecidos-alvo, e inibe a proteólise (BERNE; LEVY, 1996).

O PPAR $\gamma$  é um regulador chave da sensibilidade à insulina. A principal hipótese para o efeito sensibilizador dos agonistas de PPAR $\gamma$ , é a de que, quando ativado, ele regule a transcrição de genes que expressam proteínas que participam da captação e do armazenamento de ácidos graxos, e redirecionamento dos lipídios depositados no músculo e no fígado para os adipócitos. Além disso, o PPAR $\gamma$  promove a diferenciação de adipócitos, originando adipócitos novos menores, os quais são mais sensíveis à insulina e representam, também, um aumento na capacidade de armazenamento de ácidos graxos, reduzindo o acúmulo em tecidos periféricos (FEIGE et al., 2006; GURI; HONTECILLAS; BASSAGANYA-RIERA, 2006).

O PPAR $\gamma$  atua na produção de adipocinas, aumentando a produção de adiponectina, que promove maior captação de ácidos graxos, maior captação e utilização da glicose no tecido adiposo e muscular e a menor produção hepática de glicose, promovendo, assim, melhor controle dos níveis séricos de glicose, de ácidos graxos livres e de triacilgliceróis (FONSECA-ALANIZ, 2006; FEIGE et al., 2006). Já o PPAR $\alpha$  induz significativamente a expressão dos receptores de adiponectina, AdipoR1 e AdipoR2, no tecido adiposo branco. Os PPARs podem também atuar inibindo algumas adipocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6. O conjunto de ações no controle de adipocinas favorece o restabelecimento da funcionalidade dos receptores de insulina e, conseqüentemente a diminuição da resistência à insulina (FEIGE et al., 2006). Em virtude das ações no controle das adipocinas, as ativações do PPAR $\alpha$  e do PPAR $\gamma$  podem ser relevantes nas estratégias de controle da síndrome metabólica (GURI; HONTECILLAS; BASSAGANYA-RIERA, 2006).

PPAR $\alpha$  e PPAR $\beta/\delta$  são estudados pelos seus efeitos moderados na sensibilização à insulina, ação essa provavelmente decorrente de suas funções oxidativas de ácidos graxos em tecidos periféricos, as quais inibem assim o armazenamento lipídico pelo tecido adiposo, e conseqüentemente a hipertrofia dos adipócitos. Porém, o mecanismo da ação supracitada não está bem definido (FEIGE et al., 2006).

Assim sendo, os PPARs, atuando de modo integrado, podem promover: i) melhora na captação, armazenamento e no catabolismo de ácidos graxos; ii) indução na produção de adipocinas com ação de aumento de sensibilização à insulina; e iii) inibição dos níveis circulantes e de ações de adipocinas que induzem a resistência à insulina.

### **1.2.8 Interesse clínico por ligantes de PPARs**

A maioria das células especializadas que compõem os organismos multicelulares detém a habilidade de modificar os padrões de expressão de diversos grupos de genes em resposta a alterações extracelulares, influenciando, assim, a síntese protéica. O passo inicial da expressão gênica é a transcrição, o que confere a essa etapa grande

importância regulatória, visto que, é nessa fase que ocorre a indução ou inibição da expressão de um determinado gene. Assim, a maioria dos eventos regulatórios de produção de proteínas ocorre na iniciação da transcrição, sendo que essa produção pode ser controlada ainda em outras etapas subseqüentes, como no processamento e transporte de RNA, tradução, degradação de RNAm e atividade protéica (VOET; VOET; PRATT, 2002).

Os receptores nucleares atuam diretamente no processo transcricional, governando a expressão de genes-alvo que regulam diversos processos biológicos como a reprodução, o desenvolvimento e o metabolismo geral.

Uma área importante no campo de pesquisas metabólicas se refere às funções dos receptores nucleares PPARs como alvos terapêuticos para desordens no metabolismo de lipídios e glicose em virtude da ligação desses fatores estarem associados a doenças como diabete, dislipidemia, aterosclerose, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (SHEARER; BILLIN, 2007).

O uso clínico de agonistas de PPARs como os fibratos e tiazolidinedionas (TZDs), em conjunto com evidências que sugerem que a ativação de PPAR também pode conter a evolução de processos inflamatórios e aterosclerose têm instigado o interesse e a busca por novos ligantes. Somam-se a esses fatores os efeitos indesejados provocados pelos fibratos, TZDs, e por outros ligantes sintéticos em avaliações clínicas, além dos resultados obtidos em estudos cardiovasculares. Em conjunto, as ações benéficas e os efeitos indesejados provocados pelos fibratos, TZDs, e por outros ligantes sintéticos em avaliações clínicas têm fortalecido a relevância clínica dos PPARs, e contribuído com o aumento em pesquisas com foco em substâncias com propriedades mais seletivas e menos tóxicas (BROWN; PLUTZKY, 2007).

Os fibratos atuam primariamente por meio da ativação do PPAR $\alpha$ . Clinicamente, agonistas de PPAR $\alpha$  têm demonstrado reduzir os níveis plasmáticos de triacilgliceróis, aumento de HDL e modificações no tamanho e na densidade de LDL em pacientes hiperlipidêmicos através da regulação de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos e lipoproteínas (ROSENSON, 2007). Em função dos efeitos hipolipidêmico, antiinflamatório e vasculares observados em humanos e animais, muitos estudos

clínicos têm se focado na avaliação do efeito dos agonistas de PPAR $\alpha$  em eventos cardiovasculares. Grande parte dos estudos tem revelado efeito cardioprotetor, porém, essa ação ainda está sendo mais bem avaliada (VERGÈS, 2004; MICHALIK et al., 2006).

Estudos em roedores demonstraram efeito proliferativo em células hepáticas, informações essas que apontam para hepatocarcinogênese. Entretanto, em humanos, as ações hepatotóxicas decorrentes de ativação em PPAR $\alpha$  ainda são inconclusivas (PERAZA et al., 2006).

Após pesquisas confirmando os efeitos do PPAR $\beta/\delta$  na regulação da homeostase energética e do metabolismo lipídico, seus agonistas estão sendo investigados quanto à possibilidade de uso em tratamento de resistência à insulina, dislipidemias e obesidade. Também foi demonstrado efeito no controle de mecanismos de reparo-tecidual, aventando-se a possibilidade do uso de ligantes de PPAR $\beta/\delta$  na cicatrização de tecidos danificados (MICHALIK et al., 2006).

As tiazolidinedionas (TZDs), agonistas de PPAR $\gamma$ , são utilizadas clinicamente em tratamento de diabetes tipo 2. Agonistas de PPAR $\gamma$  também apresentaram efeitos anti-aterogênicos em modelos animais. Entretanto, tais substâncias podem promover efeitos colaterais clinicamente significantes, como ganho de peso, em função de retenção de líquido e do aumento na adiposidade, ações essas que parecem ser potencializadas quando as TZDs são utilizadas em associação à insulina. Alguns estudos apontam para o aumento dos efeitos da rosiglitazona no risco de infarto de miocárdio e na morte por doenças cardiovasculares, embora essas informações ainda não sejam conclusivas. Efeitos hepatotóxicos têm sido associados ao uso de troglitazona, além de prejuízo no metabolismo ósseo (MICHALIK et al, 2006; BROWN; PLUTZKY, 2007; BERBEROGLU et al, 2007; NISSEN; WOLSKI, 2007).

Além dos benefícios clínicos bem estabelecidos em diabetes e dislipidemia, vários estudos relatam a utilização de ligantes de PPARs na síndrome metabólica (SM). Os ligantes de PPAR, por atuar na regulação de vias metabólicas envolvidas nas desordens que acompanham a síndrome metabólica, têm emergido com grande potencial de atuação no tratamento de pacientes com essa complexa rede de

alterações fisiológicas (FIÉVET; FRUCHART; STAELS, 2006; KASUGA et al., 2006; GURNELL, 2007).

#### **1.2.8.1 Ligantes sintéticos de PPAR com atividade duplo-agonista e pan-agonista**

A habilidade de cada subtipo de PPAR em regular vias metabólicas distintas tem encorajado pesquisas visando a investigação dos efeitos combinados e complementares de ligantes desses receptores. O principal objetivo da combinação de agonistas é ativar cada subtipo de receptor para promover eficácia máxima em genes-alvo apropriados associados com vias farmacológicas específicas com minimização de efeitos indesejados (SHEARER; BILLIN, 2007).

Os **agentes duplo-agonistas de PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$**  foram desenvolvidos para atuar complementarmente no metabolismo humano e diminuir as taxas de mortalidade associadas com diabetes tipo 2, por reduzir a resistência à insulina, a hiperglicemia e dislipidemia aterogênica. Além disso, o efeito da ativação do PPAR $\alpha$  em reduzir a obesidade em ratos, poderia minimizar os efeitos colaterais de ganho de peso provocados pelos agonistas de PPAR $\gamma$ , caso essa ação fosse reproduzida em humanos. Embora os duplo-agonistas tenham apresentado diversos benefícios clínicos, os efeitos indesejados têm sido responsáveis pela suspensão de inúmeros estudos clínicos. O desenvolvimento de medicamentos da família glitazar foi interrompido no estágio dos estudos clínicos em função do aumento de eventos cardiovasculares com muraglitazar e toxicidade renal com tesaglitazar. Essas ocorrências não têm diminuído o interesse pelo desenvolvimento de duplo-agonistas, sendo que vários estudos continuam em andamento (ROSENSON, 2007; SHEARER; BILLIN, 2007).

Sobre **agentes duplo-agonistas de PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$**  existem poucos trabalhos. Os objetivos do desenvolvimento desses compostos são de sua utilização para o tratamento de diabetes tipo 2, com ações na sensibilização à insulina, na melhora do perfil lipídico e na diminuição do ganho de peso. Poucos agentes vêm sendo

testados em animais, sendo que alguns estudos apresentaram resultados promissores (TENENBAUM; MOTRO; FISMAN, 2005; SHEARER; BILLIN, 2007).

As pesquisas de duplo-agonistas têm indicado novas abordagens para o desenvolvimento dos **agentes pan-agonistas**, embora poucos compostos tenham sido testados clinicamente. Com a proposta de uma única substância ativar os três isotipos de PPAR, o pan-agonista idealmente seria capaz de melhorar algumas desordens metabólicas tais como resistência à insulina, obesidade, dislipidemia, hipertensão, além de exercer ações antiinflamatórias e vasculares importantes. Assim como esperado para os duplo-agonistas, a ativação de PPAR $\alpha$  e PPAR $\beta/\delta$  poderia deter o ganho de peso promovido pela ativação de PPAR $\gamma$  através de ações sinérgicas, além de em conjunto deterem o potencial de gerar benefícios anti-aterogênicos (TENENBAUM; MOTRO; FISMAN, 2005; SHEARER; BILLIN, 2007).

#### **1.2.8.2 Ligantes para PPARs de origem natural**

Se por um lado o desenvolvimento de moduladores sintéticos da expressão gênica em níveis transcricionais é realizado a muito tempo, a busca por substâncias isoladas a partir de plantas medicinais que detenham atividade transcricional é mais recente. Nos últimos anos, agonistas e antagonistas dos receptores PPARs foram isolados a partir de espécies vegetais (HUANG et al., 2005). A atividade dos extratos, de frações de extratos e de substâncias isoladas sobre a ativação transcricional dos receptores PPARs tem sido avaliada basicamente com a realização de ensaios de gene repórter em cultura de células, ensaios de competição pela ligação e teste de diferenciação de adipócitos, sendo que alguns trabalhos recorrem aos testes em animais para correlacionar os efeitos observados *ex vivo* com os efeitos *in vivo* (**Tabela 3**).

Origem / Planta	Extrato / princípio ativo	Atividade	Referência
-	Flavonóides: apigenina, crisina e kaempferol.	Ativador de PPAR $\gamma$ .	LIANG et al., 2001.
<i>Astragalus membranaceus</i>	Biocanina A, formononetina.	Ativador de PPAR $\alpha$ e PPAR $\gamma$ .	SHEN et al., 2006.
<i>Camelia sinensis</i>	Extratos de chá verde, chá preto e galato epigalocatequina.	Ativador de PPAR $\alpha$ .	LEE, 2004.
<i>Cannabis sativa</i>	Ácido julêmico (análogo sintético do THC).	Ativador de PPAR $\gamma$ .	LIU et al., 2003.
<i>Clematis pickeringii</i>	Extrato do caule e frações.	Ativador de PPAR $\alpha$ e PPAR $\gamma$ .	LI et al., 2006.
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisher	Prenilflavonóides: glicicumarina, glicirina, dehidrogliasperina C, dehidrogliasperina D.	Ativador de PPAR $\gamma$ .	KURODA et al., 2003.
<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	Gipenosídeo XLIX.	Ativador de PPAR $\alpha$ .	HUANG et al., 2006.
<i>Hibiscus sabdariffa</i> Linn	Extrato das flores secas.	Inibidor de PPAR $\gamma$ .	KIM et al., 2003.
<i>Lagerstroemia speciosa</i> L	Extrato das folhas.	Inibidor de PPAR $\gamma$ 2.	LIU et al., 2001.
<i>Momordica charantia</i> L	Extrato do fruto e compostos isolados.	Ativador de PPAR $\alpha$ .	CHAO; HUANG, 2003. CHUANG et al., 2006

<i>Panax ginseng</i>	Extrato de ginseng vermelho coreano e ginsenosídeos.	Inibidor de PPAR $\alpha$ .	YOON; THOMAS, 2003.
<i>Panax radix palva</i>	Raiz de ginseng branco.	Ativador de PPAR $\gamma$ .	CHUNG et al., 2001.
<i>Poria cocos</i> Wolf	Ácido dehidrotrametanólico.	Ativador de PPAR $\gamma$ .	SATO et al., 2002.
<i>Pseudolarix kaempferi</i>	Ácido pseudolárico B.	Ativador de PPAR $\alpha$ .	JARADA et al., 2003.
<i>Salacia oblonga</i>	Extrato da raiz.	Ativador de PPAR $\alpha$ .	HUANG et al., 2005
<i>Saururus chinensis</i>	Saurufurana (raiz).	Ativador de PPAR $\gamma$ .	HWANG et al., 2002.
Soja	Fitoestrógeno: genisteína.	Ativador de PPAR $\gamma$ .	DANG et al., 2003.
<i>Swietenia mahagony</i>	Extrato da semente.	Ativador de PPAR $\gamma$ .	LI et al., 2005.
Toranja	Flavanona: narenginina.	Ativador de PPAR $\gamma$ .	HARMON; HARP, 2000.
Uva	Terpenóides: farnesol, geranilgeraniol.	Ativador de PPAR $\alpha$ e PPAR $\gamma$ .	TAKAHASHI et al., 2002.
	Proantocianidinas de extrato de semente.	Ativador de PPAR $\gamma$ .	MA et al., 2007

**TABELA 3.** MODULADORES DA ATIVIDADE DOS PPARS IDENTIFICADOS A PARTIR DE ESPÉCIES VEGETAIS. THC: tetrahydrocannabinol. (Fonte: LEE, 2004; HUANG et al., 2005; LI et al., 2005; CHUANG et al., 2006; HUANG et al., 2006; LI et al., 2006; SHEN et al., 2006; MA et al., 2007).

Dentre as inúmeras patologias para as quais comumente várias pessoas recorrem ao uso de plantas medicinais está a diabetes. Informações etnobotânicas registram pelo mundo 1200 plantas utilizadas no controle de diabetes e suas

complicações. Esses números estimulam pesquisas científicas que gerem informações suficientes para validar o uso popular de diversas espécies com propriedade hipoglicemiante e revelar os mecanismos de ação responsáveis por esse efeito (NEGRI, 2005). Plantas medicinais que comprovadamente reduzam a glicose sanguínea têm grande potencial de interferirem com o metabolismo energético. Por essa razão, plantas usadas popularmente pela ação antidiabética vêm sendo utilizadas por grupos de pesquisa científica no rastreamento de espécies que atuem no metabolismo energético total com o objetivo de identificação de novas substâncias agonistas para os receptores PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ .

No Brasil, com a diversidade da flora, há um amplo campo de atuação na área de validação das propriedades farmacológicas atribuídas empiricamente às plantas medicinais, principalmente na seleção de ligantes para receptores nucleares, em que as pesquisas ainda são insipientes. Em torno de 200 espécies vegetais são utilizadas na medicina popular brasileira com o objetivo de diminuir a glicose sanguínea, tais como, *Tabebuia heptaphylla* (NETO; MORAIS, 2003), *Bahuinia forficata* (BARBOSA-FILHO et al, 2005), *Stevia Reubadiana* (BARBOSA-FILHO et al., 2005), *Chysobalanus icaco* (FONSECA-KRUEL; PEIXOTO, 2004), *Solanum lycocarpum* (MOTTA et al., 2002; NETO; MORAIS, 2003). Após a avaliação farmacológica da atividade hipoglicemiante de algumas plantas, já foram revelados diferentes mecanismos de ação responsáveis por esse efeito (NEGRI, 2005). Dentre os diversos mecanismos, a ativação de PPAR representa um deles, e as plantas antidiabéticas podem ser potenciais candidatas para fornecerem novas gerações de ligantes de PPAR.

### 1.3 *Tabebuia heptaphylla* (Vell) Toledo

Inúmeras espécies de plantas são utilizadas empiricamente com o objetivo de tratar diabete melito, e dentre elas, as espécies do gênero *Tabebuia* spp como a *Tabebuia heptaphylla* (Vell) Toledo (WARASHINA; NAGATANI; NORO, 2004). O gênero *Tabebuia* spp pertence à família Bignoneaceae, e suas espécies são nativas do Brasil, ocorrendo desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul, e nas Américas Central e em outros países da América do Sul. No Brasil são conhecidas popularmente por “pau-d’arco” ou “ipê”, acrescidos de características específicas relativas às diferentes árvores, tais como “ipê-roxo”, “ipê-amarelo”, “ipê-rosa”, “ipê-comum”, “pau-d’arco rosa”, entre outros nomes (LORENZI; MATOS, 2002).

O porte arbóreo da *Tabebuia heptaphylla* (Vell) Toledo atinge de 10 a 20 metros de altura, com tronco de 30 a 60 cm de diâmetro. Suas flores são róseo-arroxeadas e suas folhas são compostas, digitadas com 5 a 7 folíolos serrilhados, elípticos, quase glabros, com até 14 cm de comprimento por 6 cm de largura (CARVALHO, 1994; LORENZI; MATOS, 2002; BACKES; IRGANG, 2004).

Os ipês, de um modo geral, são muito floríferos, sendo cultivados com fins ornamentais para arborização urbana e paisagismo. Em função da durabilidade e da resistência de sua madeira, são utilizadas em construções de obras externas e em confecção de vigas e assoalhos (LORENZI; MATOS, 2002).

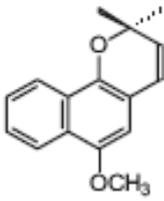
Por existirem inúmeras espécies diferentes que compartilham o mesmo nome popular, as referências etnobotânicas não permitem especificar aquelas responsáveis por determinadas ações fisiológicas observadas empiricamente, sendo, que, dentre os exemplares chamados popularmente de “ipê-roxo” pode haver diferenças na constituição química e nos efeitos biológicos. Diversos estudos fitoquímicos e biológicos já foram realizados com as espécies de *Tabebuia* spp, principalmente com a *Tabebuia avellanedae* Lorenz ex Griseb (sin.: *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC) (AWALE et al, 2005). Entretanto são poucos os trabalhos que registram análises fitoquímicas com a espécie identificada como *Tabebuia heptaphylla* (Vell) Toledo. Assim sendo, no presente estudo, as informações sobre composição química estão focadas nos

trabalhos realizados com a espécie *Tabebuia heptaphylla* (Vell) Toledo adequadamente identificada.

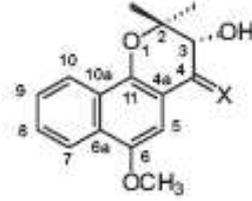
As informações etnobotânicas registram o uso da casca e das folhas de espécies de *Tabebuia spp* para diversos fins: antineoplásico, antifúngico, antibacteriano, antiinflamatório, entre outras ações. Na década de 70 houve ampla divulgação do uso de *Tabebuia spp*. no combate a diversos tipos de câncer. Sua atividade antitumoral é atribuída principalmente à naftoquinona lapachol, além de outras quinonas. Depois de constatada sua ação antitumoral *in vitro*, o lapachol foi testado clinicamente e apresentou baixa biodisponibilidade. A necessidade de uso de doses altas implicava em efeitos anticoagulantes em função da similaridade do lapachol com a vitamina K. Assim, o uso da casca de *Tabebuia spp*. como anticancerígeno não é considerado como validado cientificamente (SIMÕES et al., 2002).

O perfil fitoquímico apresentado por diversos estudos aponta as quinonas como principais constituintes ativos (PEREIRA et al., 2006). As quinonas são compostos orgânicos que podem ser considerados como produtos da oxidação de fenóis. Apresentam dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado com pelo menos duas duplas ligações C-C. As espécies vegetais contendo quinonas podem apresentar atividades biológica e farmacológica extremamente diversas, sendo a atividade laxante a responsável pela utilização terapêutica da maioria dos vegetais compostos por essas substâncias (SIMÕES et al., 2002).

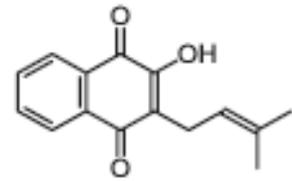
Em 2003, Schmeda-Hirschmanna e Papastergiou, e, em 2007, Garcez e colegas realizaram estudos fitoquímicos com a casca da *Tabebuia heptaphylla* (Vell) Toledo, tendo sido identificadas naftoquinonas, lignanas, triterpenos, iridóides, entre outros grupos de metabólitos vegetais (SCHMEDA-HIRSCHMANN; PAPASTERGIOU, 2003; GARCEZ et al., 2007). Seguem abaixo as substâncias isoladas por estes pesquisadores (**Figura 10**):



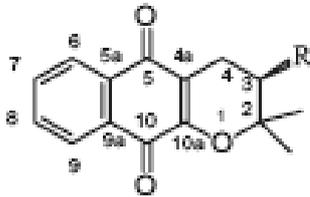
1. Lapachenol (Lapachona)



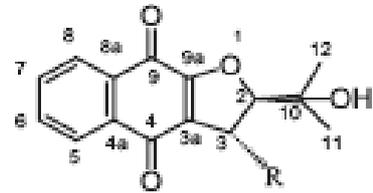
- 2. H<sub>2</sub> (X)
- 3. β OH, H (X)
- 4. O (X)



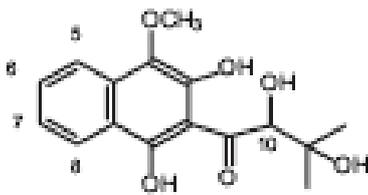
5. Lapachol



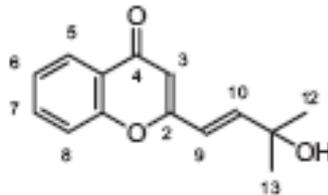
- R
- 6. H α-Lapachona
- 7. OH Rinacantina A



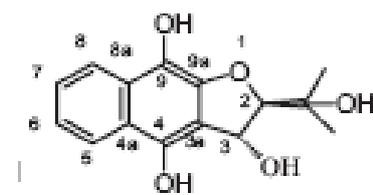
- R
- 8. H Estenocarpoae
- 9. OH Avicequinona A



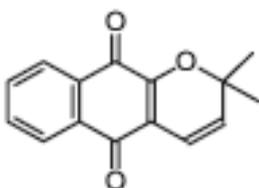
10



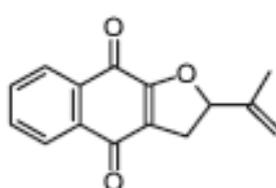
11



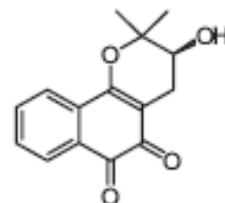
12



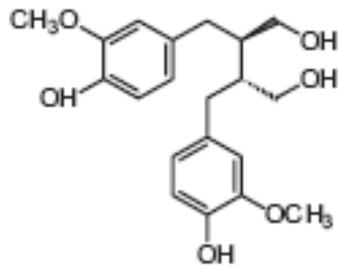
13. Dehidro-α-Lapachona



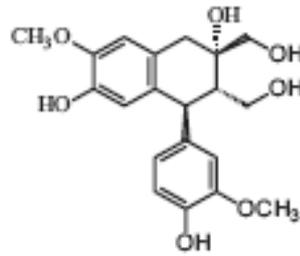
14. Dehidroiso-α-Lapachona



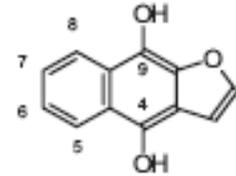
15. Estenocarpoquinona A



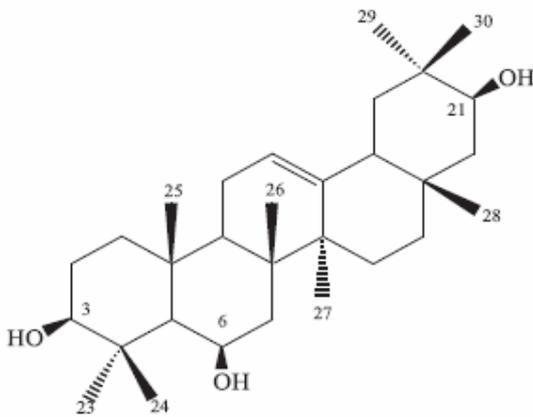
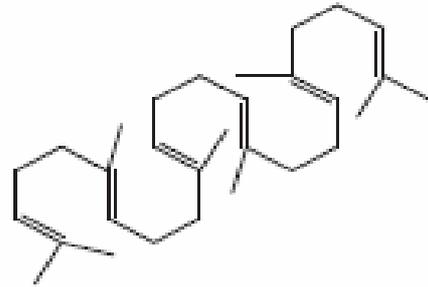
16. Secoisolariciresinol



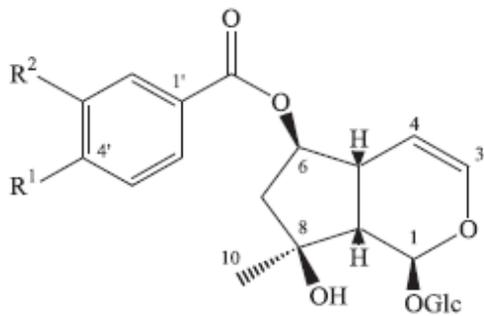
17. Ciclolivil



18

19. Triterpenóide 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,21 $\beta$ -triidroxioleano-12-eno

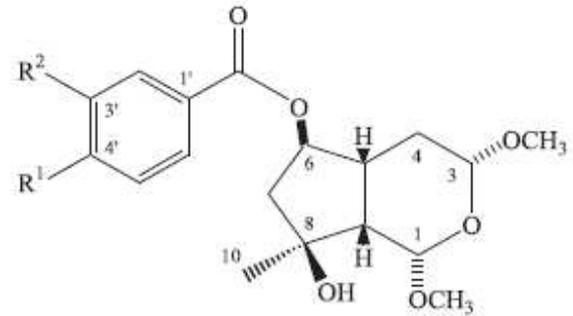
20. Esqualeno



**21.**  $R^1 = \text{OH}$ ,  $R^2 = \text{H}$  (iridóide 6-*O*-*p*-hidroxibenzoilajugol)

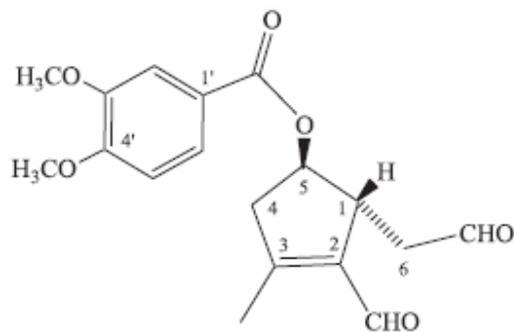
**22.**  $R^1 = \text{OCH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$  (iridóide 6-*O*-*p*-metoxibenzoilajugol)

**23.**  $R^1 = R^2 = \text{OCH}_3$  (iridóide 6-*O*-3'', 4''-dimetoxibenzoilajugol)

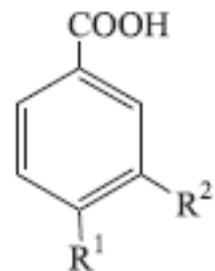


**24.**  $R^1 = \text{OH}$ ,  $R^2 = \text{H}$  (iridóide 8 $\alpha$ -metil-8 $\beta$ -hidróxi-6 $\beta$ -(4'-hidróxi)benzoilóxi-1 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dimetóxi-octaidro- ciclopenta [c]pirano)

**25.**  $R^1 = R^2 = \text{OCH}_3$  (iridóide 8 $\alpha$ -metil-8 $\beta$ -hidróxi-6 $\beta$ -(3',4'-dimetóxi)benzoilóxi-1 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dimetóxi-octaidro- ciclopenta[c]pirano)



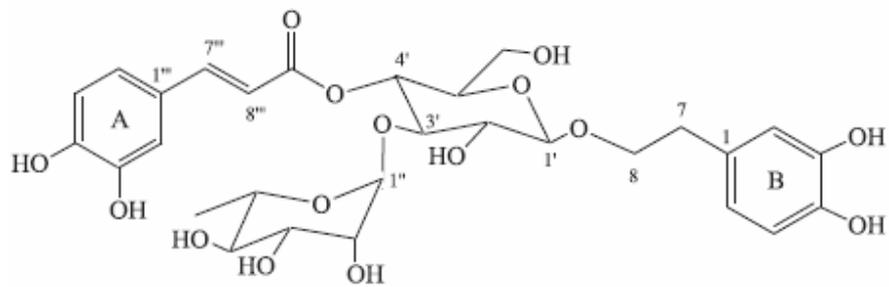
**26.** dialdeído ciclopentênico 2-formil-5-(3',4'-dimetoxibenzoilóxi) -3-metil-2-ciclopenteno-1-acetaldeído



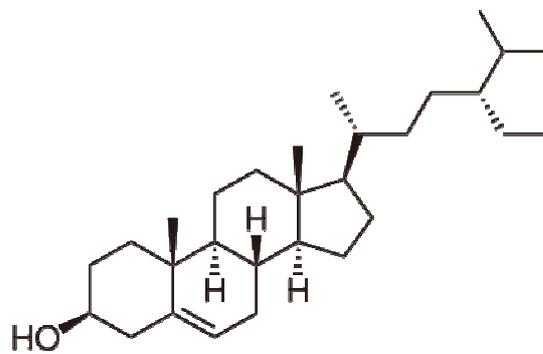
**27.**  $R^1 = \text{OH}$ ,  $R^2 = \text{H}$  (ácido *p*-hidroxibenzóico)

**28.**  $R^1 = \text{OCH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$  (ácido *p*-metoxibenzóico)

**29.**  $R^1 = R^2 = \text{OCH}_3$  (3,4-dimetoxibenzóico)

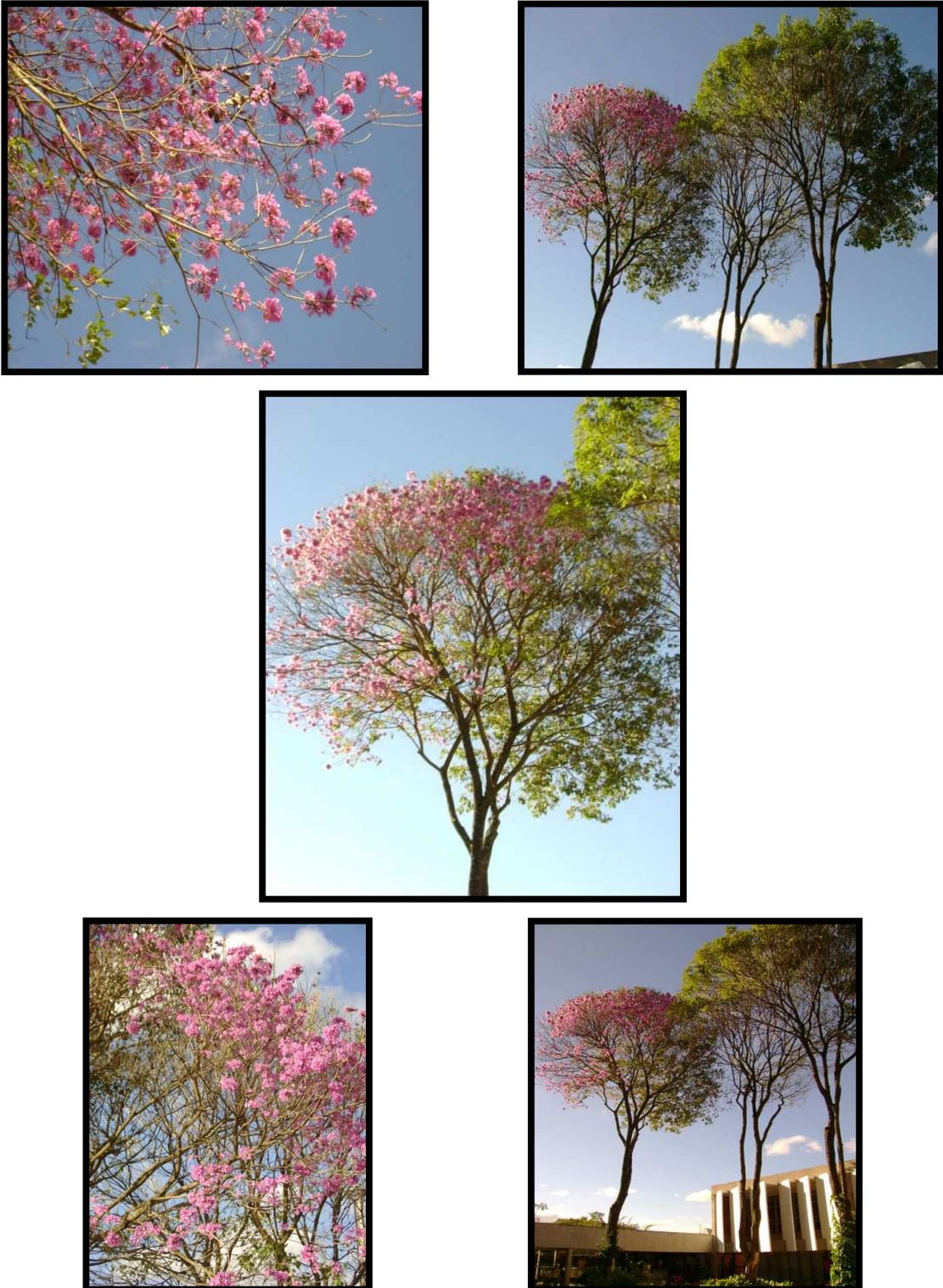


30. Verbascosídeo



31. Sitosterol

**FIGURA 10.** ESTRUTURA DE MOLÉCULAS ISOLADAS DA CASCA DE *Tabebuia heptaphylla*. Moléculas de 1 a 18 isoladas por Schmeda e Papastergiou, e de 19 a 31 por Garcez e colegas (SCHMEDA-HIRSCHMANNA; PAPASTERGIOU, 2003; GARCEZ et al., 2007).



**FIGURA 11.** FOTOS DE DOIS EXEMPLARES DA ESPÉCIE *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo LOCALIZADOS NO PÁTIO DA FACULDADE DE SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA (Fotos: Viviane Cássia Pereira).

Considerando (i) a alta incidência de desordens metabólicas atreladas a complicações cardiovasculares; (ii) o uso agonistas de PPARs no tratamento de destas alterações fisiológicas (dislipidemia e diabete), e (iii) evidências com base etnofarmacológicas da ação hipoglicemiante da planta *Tabebuia heptaphylla*, o presente trabalho se focou na análise do efeito de extratos de entrecasca de *Tabebuia heptaphylla* sobre os receptores PPARs.

## CAPÍTULO II - OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se a ação hipoglicemiante atribuída popularmente à planta *Tabebuia heptaphylla* pode decorrer da atividade transcricional mediada pelos receptores PPAR $\alpha$ , PPAR  $\beta/\delta$  e PPAR  $\gamma$ .

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar se o extrato da entrecasca de *Tabebuia heptaphylla* regula a atividade transcricional mediada por PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$  em células pró-monocíticas (U937).
  - Avaliar a ação de extratos com polaridades diferentes (aquoso, etanólico e hexânico).
- Testar a atividade de algumas substâncias previamente identificadas em extratos de *Tabebuia heptaphylla* sobre a atividade dos receptores PPAR $\alpha$ , PPAR  $\beta/\delta$  e PPAR  $\gamma$ .
- Investigar o efeito do extrato de *Tabebuia heptaphylla* sobre outros receptores nucleares.
- Avaliar a citotoxicidade do extrato de *Tabebuia heptaphylla* em células U937.

## CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 PREPARO DOS EXTRATOS

A entrecasca de *Tabebuia heptaphylla* (Vell) Toledo foi coletada em janeiro de 2007 no pátio do prédio da Faculdade de Saúde, localizado no Campus da Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal. A espécie foi identificada pela professora Carolyn Elinore Barnes Proença e uma exsicata foi depositada no herbário do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

Os extratos foram produzidos no Laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade de Brasília. A entrecasca foi secada à temperatura ambiente, sendo fragmentada em seguida. Para produção do extrato aquoso, 100 g do material vegetal fragmentado foram aquecidos por 5 minutos juntamente com água destilada a partir da ebulição, seguido de filtração em papel filtro e liofilização.

Os extratos etanólico (THE) e hexânico (THH) foram preparados pela maceração de 150 g e 836 g de material vegetal seco, respectivamente, por sete dias. A extração foi repetida três vezes para o extrato hexânico. Após a filtração com papel filtro, os solventes foram removidos sob pressão reduzida à temperatura de 39° C.

Os extratos foram mantidos à temperatura ambiente com umidade controlada em dessecador elétrico. Para os ensaios de transfecção, os extratos foram ressuspensos em dimetilsulfóxido:etanol (2:3) para a obtenção da concentração de 400 mg/mL. Para a concentração de 100 mg/mL, a concentração de 400 mg/mL foi diluída; as demais concentrações foram obtidas a partir da concentração de 400 mg/mL.

### 3.2 REAGENTES E PLASMÍDEOS

O lapachol foi gentilmente cedido por Eduardo Freire de Oliveira da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A mistura de sitosterol e estigmasterol foi cedida pela professora Dâmaris Silveira da

Faculdade de Ciências de Saúde da Universidade de Brasília. O bezafibrato e a rosiglitazona foram adquiridos comercialmente da Sigma®.

Para a realização dos experimentos foram utilizados os plasmídeos de expressão de receptores: pCMX-CTR $\alpha$ , pCMX-TR $\beta$ 1 pCMX-mPPAR $\alpha$ , pCMX-mPPAR $\gamma$ , pCMX-mPPAR $\delta$  e pCMX-RXR $\alpha$ , cedidos por Dr. John Baxter da Universidade da Califórnia, em São Francisco (UCSF), EUA; pSG5-GR pSG5-hER $\alpha$  e pSG5-hER $\beta$  cedidos por Dr. Peter J. Kushner da Universidade da Califórnia, em São Francisco (UCSF), EUA; pSG5-hPXR cedido por Dr. Steven A. Kliewer.

Os genes repórteres contêm os elementos responsivos dos receptores: de estrogênio (pUC-ERE-luc) cedidos por DR. Peter J. Kushner da Universidade da Califórnia, em São Francisco (UCSF), EUA; do PXR (DR-3-luc) cedido por Dr. Steven A. Kliewer; do GR (sequência do GRE a partir do vírus do tumor mamário de camundongos-MMTV) cedido por Dr. Keith R. Yamamoto da Universidade da Califórnia, em São Francisco (UCSF), EUA; dos TRs (pUC-F2-luc) e dos receptores PPAR (pUC-PPRE-luc) e RXR $\alpha$  (pUC-PPRE-luc) cedidos por Dr. John Baxter da Universidade da Califórnia, em São Francisco (UCSF), EUA.

### **3.3 CULTURA DE CÉLULAS**

As células U937, uma linhagem pró-monocítica humana, foram cultivadas em meio de cultura RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640, contendo 10% de soro fetal bovino, 2 nM de glutamina, 50 U/mL de penicilina e 50  $\mu$ g/mL de estreptomicina, e mantidas em garrafas Corning® de 75 cm<sup>2</sup> em incubadora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.4 ENSAIOS DE GENE REPÓRTER POR MEIO DE TRANSFEÇÃO TRANSIENTE**

O método de eletroporação foi utilizado para a transfecção. As células foram coletadas por centrifugação (4000 x g por 5 minutos) e ressuspendidas em solução PBS (0,5 mL / 10 x 10<sup>6</sup> células) contendo cálcio, dextrose e os plasmídeos de interesse. As células foram transferidas para cuvetas e eletroporadas usando um gerador de pulso Bio-Rad® nas condições de 300 mV e 950  $\mu$ F para as células U937. Após a

eletroporação, as células foram transferidas para o meio de cultura e distribuídas em placas Corning® de 12 poços. Em seguida procederam-se os tratamentos: veículo (1 µL de DMSO/etanol 2:3), controle positivo, concentrações crescentes de extrato (1 µL da concentração de 100 mg/mL para obter uma concentração final de 100 µg/mL; 1 µL da concentração de 400 mg/mL para obter uma concentração final de 400 µg/mL; 2 µL da concentração de 400 mg/mL para obter uma concentração final de 800 µg/mL; 3 µL da concentração de 400 mg/mL para obter uma concentração final de 1200 µg/mL; 4 µL da concentração de 400 mg/mL para obter uma concentração final de 1600 µg/mL; 5 µL da concentração de 400 mg/mL para obter uma concentração final de 2000 µg/mL), lapachol e sitosterol/estigmasterol. Todos os tratamentos foram balizados para um volume final de 5 µL com DMSO/etanol 2:3.

Após 24 horas, as células eram coletadas por centrifugação (10.000 rpm, por 2 minutos) e lisadas em tampão de lise 1X (Promega®). Para a determinação da atividade da luciferase, foram adicionados 10 µL de luciferina (*Luciferase Assay System* – Promega®) à 10 µL de lisado celular. A emissão de luz gerada pela reação enzimática entre luciferina (substrato para a enzima luciferase) e luciferase foi quantificada por um luminômetro (Turner®), e o resultado expresso em unidades relativas de luz. A taxa de ativação dos receptores nucleares testados (ou seja, quantas vezes foram ativados por um determinado ligante) foi calculada pela divisão dos valores das amostras tratadas com o hormônio, pelas amostras tratadas com o veículo. Os ensaios foram realizados no mínimo três vezes e em triplicata.

A cultura dessas células e a transfecção foi feita segundo o protocolo já estabelecido por Ribeiro et al. (RIBEIRO et al.; 2001).

### **3.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR COM AZUL DE TRYPAN**

O Azul de Trypan foi o corante utilizado para avaliar a viabilidade das células. As células U937 foram distribuídas em placas de 6 poços Corning® na quantidade de  $2 \times 10^5$  células/poço. Em seguida foram incubadas com veículo (DMSO:Etanol 2:3) e concentrações crescentes do extrato THH (400, 800, 1200, 1600 µg/mL). Após 24 horas

de incubação, as células foram ressuspensas em 250  $\mu$ L de solução de azul de Trypan (0,2% em PBS). 10  $\mu$ L das células ressuspensas foram colocadas na câmara de Neubauer para contagem em microscópio. A taxa de mortalidade celular foi obtida pela porcentagem de células não viáveis (coradas de azul) considerando a quantidade total de células (viáveis e não viáveis) como sendo 100%.

### **3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

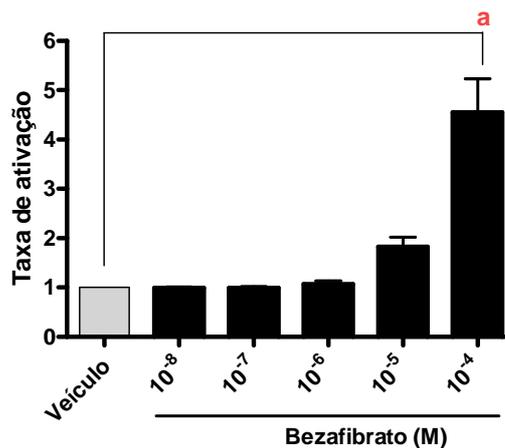
Os resultados apresentados nesse trabalho representam a média dos experimentos  $\pm$  erro padrão de pelo menos três ensaios em triplicata. Os dados foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas, utilizando o Programa GraphPad PRISM 4.0. Um  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## CAPÍTULO IV - RESULTADOS

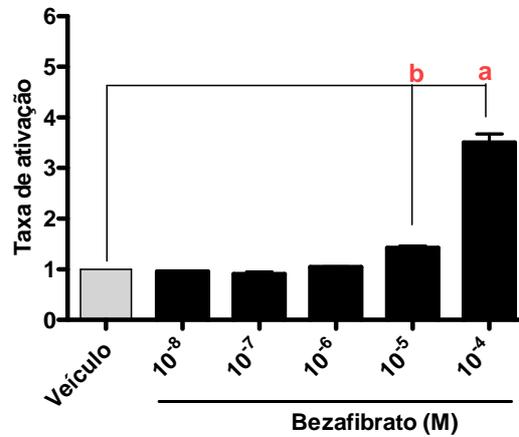
### 4.1 DETERMINAÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS PARA OS ENSAIOS DE GENE-REPÓRTER

Para atingir o objetivo proposto de avaliar se a ação hipoglicemiante atribuída popularmente à *Tabebuia heptaphylla* poderia ser decorrente de ativação transcricional sobre os receptores PPARs, o método selecionado foi ensaio de gene repórter. Esse método é comumente utilizado para avaliação de atividade transcricional em receptores nucleares.

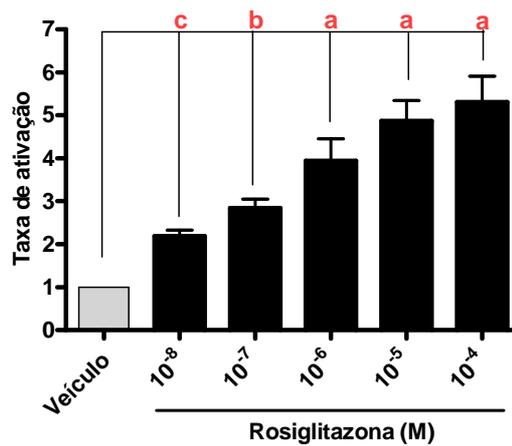
Após a purificação dos plasmídeos que expressam os receptores PPARs e do plasmídeo contendo o elemento responsivo (PPRE) e o gene repórter (luciferase), foram realizados os primeiros experimentos para avaliar a funcionalidade dos receptores e determinar as concentrações adequadas dos controles positivos a serem utilizadas nos experimentos seguintes. Como controle positivo foram selecionados os agonistas sintéticos conhecidos de PPARs, bezafibrato para PPAR $\alpha$  e PPAR $\beta/\delta$ , e rosiglitazona para PPAR  $\gamma$ , nas concentrações finais de  $10^{-4}$  M do ligante bezafibrato para os receptores PPAR $\alpha$  e  $\beta/\delta$  (**Gráfico 1a e 1b**, respectivamente) e  $10^{-5}$  M do ligante rosiglitazona para o receptor PPAR $\gamma$  (**Gráfico 1c**).



(a)



(b)



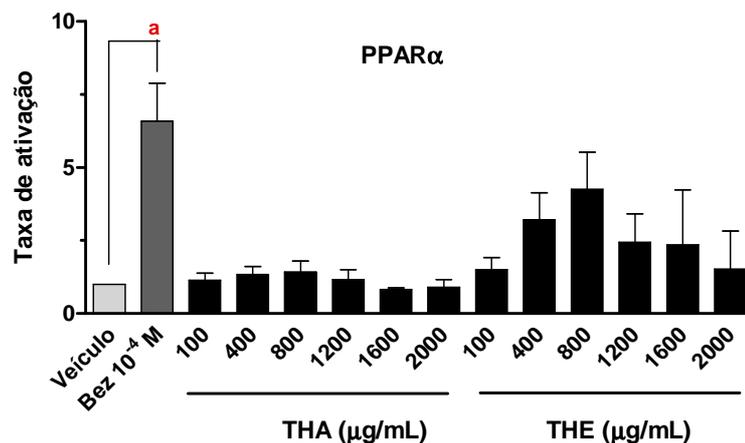
(d)

**GRÁFICO 1.** ATIVAÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS BEZAFIBRATO SOBRE PPAR $\alpha$  E PPAR $\beta/\delta$  E ROSIGLITAZONA SOBRE PPAR $\gamma$ . (a) Ativação do controle positivo bezafibrato sobre PPAR $\alpha$ . (b) Ativação do controle positivo bezafibrato sobre PPAR $\beta/\delta$ . (c) Ativação do controle positivo rosiglitazona sobre PPAR $\gamma$ . As células U937 foram co-transfectadas com 3  $\mu\text{g}$  do plasmídeo repórter PPRE-tk-luc e 1,5  $\mu\text{g}$  do plasmídeo de expressão para PPAR e tratadas com concentrações crescentes de cada ligante relativo ao receptor. A atividade luciferease foi mensurada após 24 horas de incubação. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos diferentes. (n=3 experimentos em triplicata para cada receptor; a:  $p < 0,001$ ; b:  $p < 0,01$ ; c:  $p < 0,05$ ).

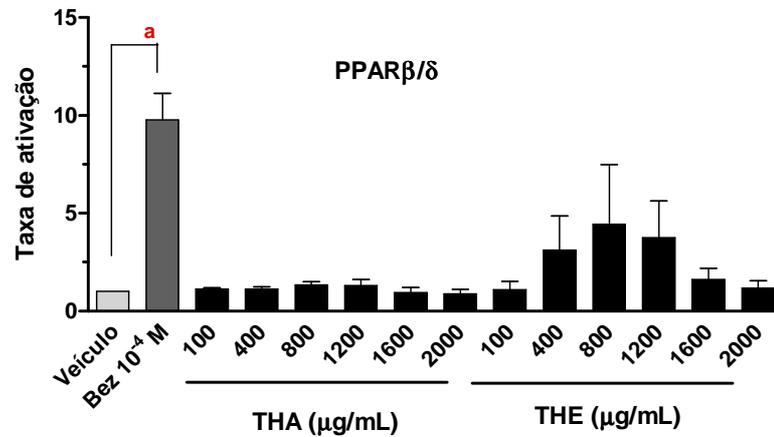
#### 4.2 EFEITO DOS EXTRATOS AQUOSO E ETANÓLICO DE *Tabebuia heptaphylla* SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL MEDIADA PELOS RECEPTORES PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$ E PPAR $\gamma$

Confirmada a adequabilidade do ensaio e definidas as concentrações dos controles positivos, o próximo passo foi testar os extratos de *Tabebuia heptaphylla* aquoso (THA), etanólico (THE) e hexânico (THH) quanto à ativação sobre os receptores PPARs. Para isso, foram realizados ensaios de gene repórter através da co-transfecção de células U937 com os plasmídeos de expressão dos receptores PPAR  $\alpha$  ou  $\beta/\delta$  ou  $\gamma$ , juntamente com o plasmídeo do gene-repórter PPRE-tk-luc. Após a eletroporação, cada triplicata de células recebeu um tipo de tratamento, de acordo com a seguinte ordem: veículo (DMSO:Etanol), controle positivo e concentrações crescentes dos extratos.

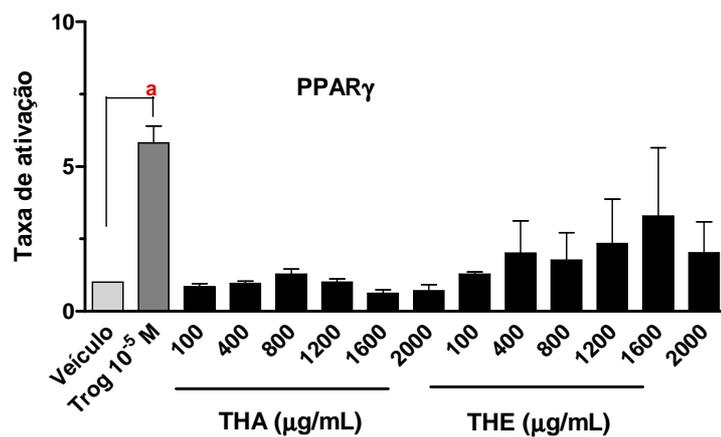
O extrato THA não demonstrou atividade alguma sobre os três PPARs, e o extrato THE, apesar de apresentar discreta ativação nos três receptores testados, essa ação não foi considerada estatisticamente significativa em relação ao veículo realizado com DMSO/Etanol, conforme pode ser visto no **Gráfico 2**.



(a)



(b)



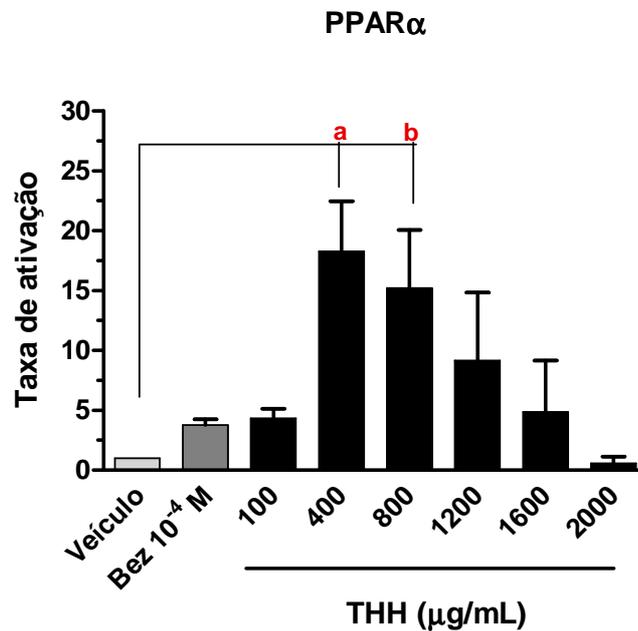
(c)

**GRÁFICO 2.** AÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSO E ETANÓLICO DE *Tabebuia heptaphylla* SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL MEDIADA PELOS RECEPTORES PPARs. As células U937 foram co-transfectadas com 3 µg do plasmídeo repórter PPRE-tk-luc e 1,5 µg do plasmídeo de expressão para PPAR  $\alpha$ , PPAR  $\beta/\delta$  e PPAR  $\gamma$ . Em seguida cada triplicata de células recebeu um tipo de tratamento, de acordo com a seguinte ordem: veículo (DMSO/Etanol), controle positivo e concentrações crescentes de extratos. A atividade luciferase foi mensurada após 24 horas de incubação. (a) Ação dos extratos THA e THE sobre o PPAR $\alpha$ . (b) Ação dos extratos THA e THE sobre o PPAR $\beta/\delta$ . (c) Ação dos extratos THA e THE sobre o PPAR $\gamma$ . Os valores no eixo x representam a atividade de luciferase, sendo que 1 é o valor definido para a atividade de luciferase em células tratadas com veículo. Bez: bezafibrato; THA: Extrato aquoso de *Tabebuia heptaphylla*; THE: Extrato etanólico de *Tabebuia heptaphylla*; Trog: troglitazona. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão (n=3 experimentos em triplicata para cada receptor; a: p < 0,05).

### 4.3 O EXTRATO HEXÂNICO DE *Tabebuia heptaphylla* AUMENTA A TRANSCRIÇÃO DO GENE REPÓRTER

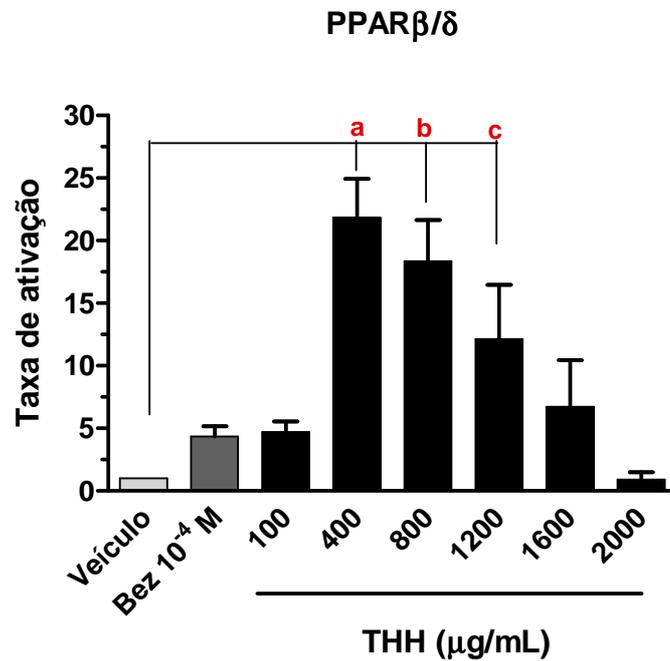
Nos ensaios de transfecção para avaliar o efeito do extrato hexânico de *Tabebuia heptaphylla* (THH) sobre a atividade transcricional dos PPARs, observou-se, que o THH foi capaz de ativar a transcrição sobre os três PPARs, conforme pode ser visto no **Gráfico 3, 4 e 5**.

No primeiro receptor avaliado, PPAR $\alpha$ , o controle positivo com bezafibrato na concentração de  $10^{-5}$ M apresentou uma ativação em torno de 3,75 vezes ( $\pm 0,50$ ), enquanto o THH, na menor concentração testada (100  $\mu$ g/mL) já demonstrou ativação similar. Na concentração de 400  $\mu$ g/mL e 800  $\mu$ g/mL, foram observadas ativações bem superiores à do bezafibrato, sendo de 18,29 ( $\pm 4,18$ ) e 15,25 ( $\pm 4,84$ ), respectivamente. Os desvios-padrão elevados não comprometem os valores obtidos, pois, a ativação mínima de 14,1 obtida com 400  $\mu$ g/mL de THH representa mais de três vezes aquela apresentada pelo bezafibrato. A maior ativação foi obtida com 400  $\mu$ g/mL, sendo que as concentrações superiores apresentaram redução gradual na atividade transcricional (**Gráfico 3**).



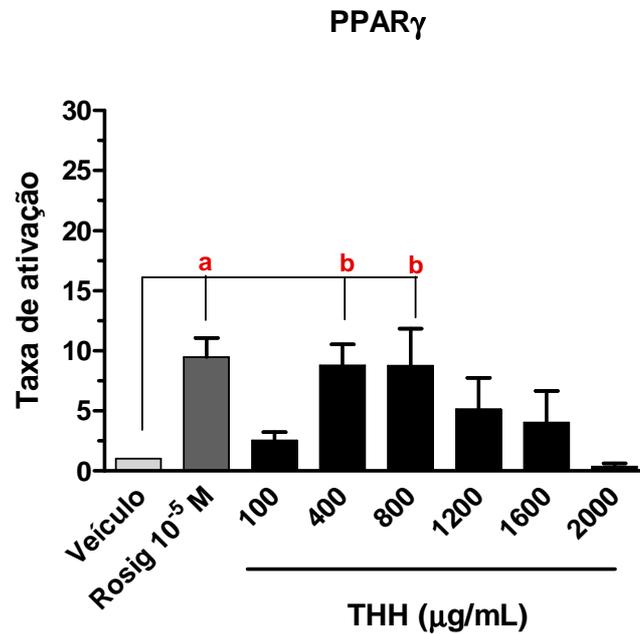
**GRÁFICO 3.** AÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Tabebuia heptaphylla* SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL MEDIADA PELO RECEPTOR PPAR $\alpha$ . As células U937 foram co-transfectadas com 3  $\mu$ g do plasmídeo repórter PPRE-tk-luc e 1,5  $\mu$ g do plasmídeo de expressão para PPAR $\alpha$ . Em seguida cada triplicata de células recebeu um tipo de tratamento, de acordo com a seguinte ordem: veículo (DMSO:Etanol), controle positivo (bezafibrato) e concentrações crescentes do extrato THH. A atividade luciferease foi mensurada após 24 horas de incubação. Os valores no eixo x representam a atividade de luciferase, sendo que 1 é o valor definido para a atividade de luciferase em células tratadas com veículo. Bez: bezafibrato; THH: Extrato hexânico de *Tabebuia heptaphylla*. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão (n=8 experimentos em triplicata; a: p < 0,001; b: p < 0,01).

Em relação ao PPAR $\beta/\delta$ , também foi observado um aumento na atividade transcricional, com ativação máxima de 21,85 ( $\pm$ 3,08) na concentração de 400  $\mu$ g/mL de THH, o que representa mais de três vezes aquela obtida pelo bezafibrato (4,37 $\pm$ 0,79), seguida de um decréscimo nas concentrações superiores (800  $\mu$ g/mL a 2000  $\mu$ g/mL) (**Gráfico 4**).



**Gráfico 4.** AÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Tabebuia heptaphylla* SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL MEDIADA PELO RECEPTOR PPAR $\beta/\delta$ . As células U937 foram co-transfectadas com 3  $\mu\text{g}$  do plasmídeo repórter PPRE-tk-luc e 1,5  $\mu\text{g}$  do plasmídeo de expressão para PPAR $\beta/\delta$ . Em seguida cada triplicata de células recebeu um tipo de tratamento, de acordo com a seguinte ordem: veículo (DMSO/Etanol), controle positivo (bezafibrato) e concentrações crescentes do extrato THH. A atividade luciferease foi mensurada após 24 horas de incubação. Os valores no eixo x representam a atividade de luciferase, sendo que 1 é o valor definido para a atividade de luciferase em células tratadas com veículo. Bez: bezafibrato; THH: Extrato hexânico de *Tabebuia heptaphylla*. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão (n=8 experimentos em triplicata; a, b:  $p < 0,001$ ; c:  $p < 0,01$ ).

Nas transfecções com o receptor PPAR  $\gamma$  o pico de ativação apresentado foi de 8,79 ( $\pm 1,76$ ) na concentração de 400  $\mu\text{g/mL}$ . Tal resultado foi ligeiramente inferior à ativação promovida pela rosiglitazona, 9,47 ( $\pm 1,59$ ), porém estatisticamente diferente do veículo (**Gráfico 5**).

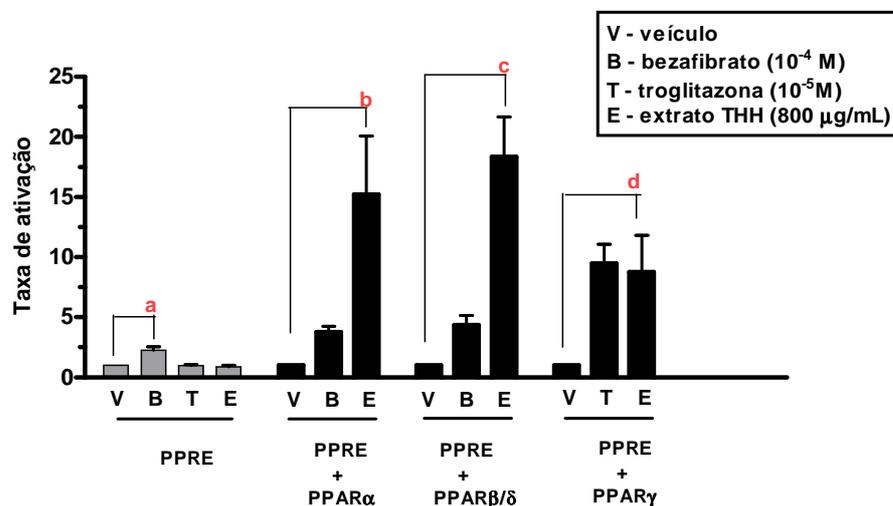


**GRÁFICO 5.** AÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Tabebuia heptaphylla* SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL MEDIADA PELO RECEPTOR PPAR $\gamma$ . As células U937 foram co-transfectadas com 3  $\mu$ g do plasmídeo repórter PPRE-tk-luc e 1,5  $\mu$ g do plasmídeo de expressão para PPAR $\gamma$ . Em seguida cada triplicata de células recebeu um tipo de tratamento, de acordo com a seguinte ordem: veículo (DMSO/Etanol), controle positivo (rosiglitazona) e concentrações crescentes do extrato THH. A atividade luciferease foi mensurada após 24 horas de incubação. Os valores no eixo x representam a atividade de luciferase, sendo que 1 é o valor definido para a atividade de luciferase em células tratadas com veículo. Trog: troglitazona; THH: Extrato hexânico de *Tabebuia heptaphylla*. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão (n=8 experimentos em triplicata; a, b, c: P < 0,01 vs veículo).

#### 4.4 O EXTRATO HEXÂNICO DE *Tabebuia heptaphylla* INTERAGE DIRETAMENTE COM OS RECEPTORES PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$ E PPAR $\gamma$ PARA PROMOVER A ATIVAÇÃO TRANSCRICIONAL DO GENE REPÓRTER

A próxima questão levantada foi quanto à interação direta do extrato THH com os receptores PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ . As hipóteses suscitadas foram de que a ativação transcricional demonstrada pelo extrato THH poderia ser mediada por diferentes mecanismos de interação: i) com os receptores PPARs; ii) com o elemento responsivo PPRE; e iii) com o parceiro heterodimérico RXR. Para investigar a segunda hipótese, foram realizadas transfecções de células U937 com o plasmídeo PPRE-tk-luc na presença e na ausência de cada PPAR.

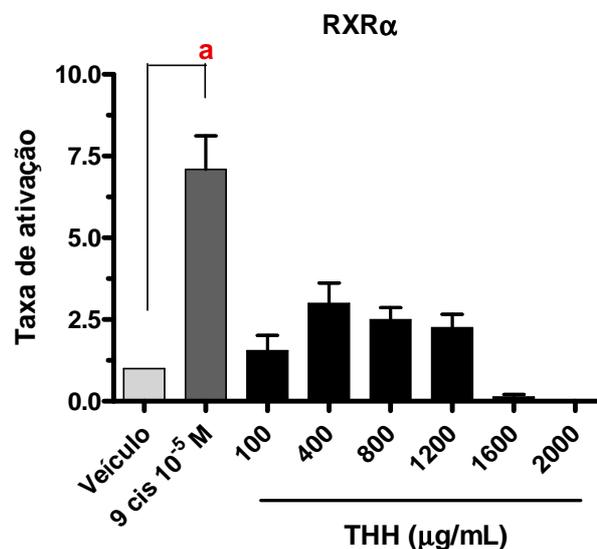
Como pode ser visto no **Gráfico 6**, na ausência do receptor, o bezafibrato promoveu ativação transcricional do elemento responsivo em torno de 2,5 vezes. Por outro lado, o extrato THH não apresentou nenhum efeito no elemento responsivo, assim como a troglitazona.



**GRÁFICO 6.** ATIVIDADE DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Tabebuia heptaphylla* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DOS RECEPTORES PPARs. As células U937 foram co-transfectadas com 3  $\mu$ g do plasmídeo repórter PPRE-tk-luc e 1,5  $\mu$ g do plasmídeo de expressão para PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ . Em seguida cada triplicata de células recebeu um tipo de tratamento, de acordo com a seguinte ordem: veículo (DMSO/Etanol), controle positivo (bezafibrato  $10^{-4}$  M para PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e rosiglitazona  $10^{-5}$  M para PPAR $\gamma$ ) e extrato THH na concentração final de 800  $\mu$ g/mL. A atividade luciferease foi mensurada após 24 horas em incubação. Os valores no eixo x representam a atividade de luciferease, sendo que 1 é o valor definido para a atividade de luciferease em células tratadas com veículo. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão (n=3 experimentos em triplicata; a: p , 0,05; b, d: p < 0,01; c: p < 0,001).

Descartada a possibilidade de interação direta com o elemento responsivo, o próximo passo foi avaliar a ligação do extrato THH ao receptor RXR. Foram então realizados ensaios de gene-repórter através da co-transfecção de células U937 com os plasmídeos de expressão do receptor RXR e o plasmídeo do gene-repórter PPRE-tk-luc. Após a eletroporação, cada triplicata de células recebeu um tipo de tratamento de acordo com a seguinte ordem: veículo (DMSO/Etanol), controle positivo (ácido 9-cis-retinóico) e concentrações crescentes dos extratos.

Conforme os dados apresentados no **Gráfico 7**, o ácido 9-cis-retinóico foi capaz de ativar  $7,01 \pm 1,02$  vezes a transcrição, o que representou uma diferença estatisticamente significativa em relação ao veículo. O extrato THH aumentou a atividade transcricional mediada pelo receptor RXR, com a taxa de 2,98 vezes na concentração final de 400  $\mu\text{g/mL}$ , entretanto essa ação não foi considerada estatisticamente diferente do veículo.

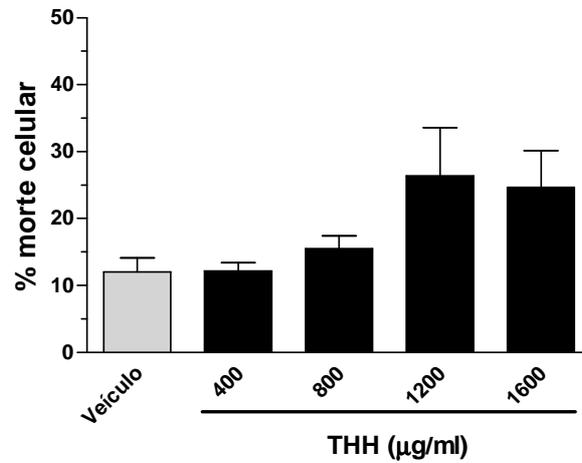


**GRÁFICO 7.** AÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Tabebuia heptaphylla* SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL MEDIADA PELO RECEPTOR RXR $\alpha$ . As células U937 foram co-transfectadas com 3  $\mu\text{g}$  do plasmídeo repórter PPRE-tk-luc e 1,5 $\mu\text{g}$  do plasmídeo de expressão para RXR $\alpha$ . Em seguida cada triplicata de células recebeu um tipo de tratamento, de acordo com a seguinte ordem: veículo (DMSO/Etanol), controle positivo (ácido-9-cis-retinóico) e concentrações crescentes do extrato THH. A atividade luciferease foi mensurada após 24 horas de incubação. Os valores no eixo x representam a atividade de luciferase, sendo que 1 é o valor definido para a atividade de luciferase em células tratadas com veículo. THH: Extrato hexânico de *Tabebuia heptaphylla*; 9-cis: Ácido-9-cis-retinóico. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão (n=4 experimentos em triplicata; a: p < 0,001).

#### 4.5 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Tabebuia heptaphylla* SOBRE AS CÉLULAS U937

De acordo com as observações de perda gradual na capacidade de ativação transcricional pelo extrato, nas concentrações superiores à 400 µg/mL, foi realizado teste de viabilidade celular para avaliação de possíveis efeitos tóxicos produzidos pelo extrato THH sobre as células U937. As células U937 foram incubadas com veículo (DMSO:Etanol) e concentrações crescentes do extrato THH (400, 800, 1200, 1600 µg/mL). Após 24 horas, as células foram ressuspensas em solução de corante azul de Trypan. O aumento na permeabilidade da membrana plasmática é efeito típico de citotoxicidade. Caso as células sofram essa alteração, o corante é internalizado, corando essas células de azul. Aquelas que mantêm a membrana plasmática íntegra não são coradas. Assim, as células não coradas são consideradas viáveis, e as azuis não viáveis. A taxa de mortalidade celular foi obtida considerando a porcentagem de células não viáveis (coradas de azul) em relação à quantidade total de células (viáveis e não viáveis) (**Gráfico 8**).

Conforme se pode observar pelo **Gráfico 8**, as concentrações 400 µg/mL e 800 µg/mL apresentaram porcentagens de morte celular de 12,18% ( $\pm 1,23\%$ ) e 15,5% ( $\pm 1,94\%$ ) respectivamente, valores muito próximos aquele apresentado pelo veículo (12%  $\pm 2,08\%$ ). Apesar das concentrações 1200 µg/mL e 1600 µg/mL terem provocado uma porcentagem maior de morte celular, 26,42% ( $\pm 7,17\%$ ) e 24,65% ( $\pm 5,50\%$ ) respectivamente, quando comparadas ao veículo, essas taxas não foram consideradas estatisticamente diferentes.



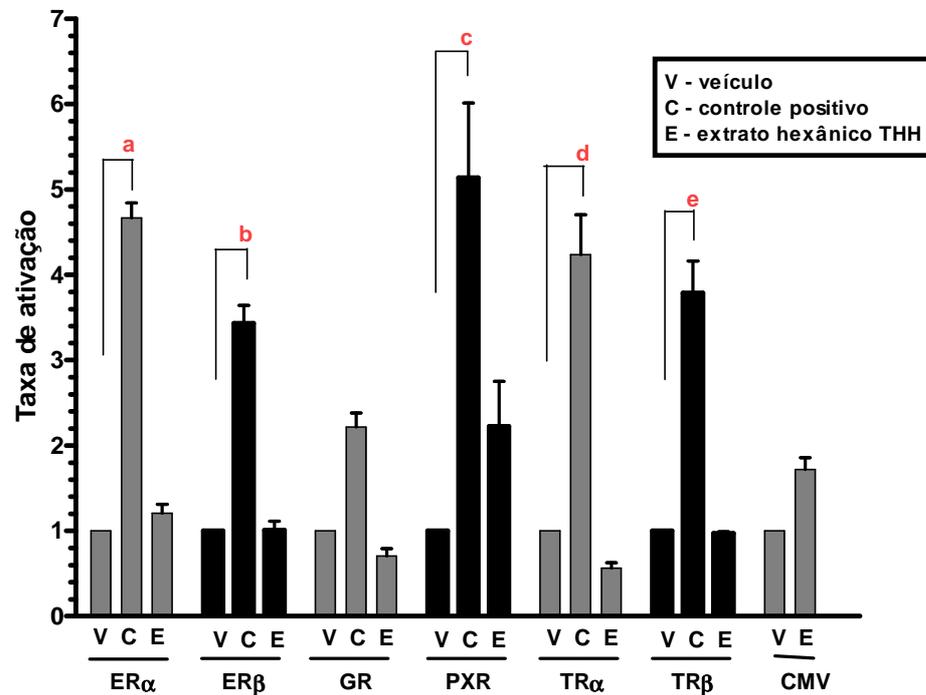
**GRÁFICO 8.** AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE CELULAR DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Tabebuia HEPTAPHYLLA* SOBRE CÉLULAS U937. Cada triplicata de células U937 recebeu um tipo de tratamento veículo (DMSO/Etanol) e extrato THH (400, 800, 1200, 1600 µg/mL) Após 24 horas de incubação, as células foram ressuspendidas em 250 µL de solução de azul de Trypan (0,2% em PBS). 10 µL das células ressuspendidas foram aplicados na câmara de Neubauer para contagem em microscópio. A taxa de mortalidade celular foi obtida pela porcentagem de células não viáveis (coradas de azul) considerando a quantidade total de células (viáveis e não viáveis) como sendo 100%. THH: Extrato hexânico de *Tabebuia heptaphylla*. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão (n=3 experimentos em triplicata;  $p < 0,05$ ).

#### 4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Tabebuia heptaphylla* SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL MEDIADA POR OUTROS RECEPTORES NUCLEARES (ER $\alpha$ , ER $\beta$ , GR, PXR, TR $\alpha$ , TR $\beta$ E CMV)

Dando continuidade à avaliação da especificidade da interação do extrato hexânico de *Tabebuia heptaphylla* pelos receptores PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ , ensaios subseqüentes foram realizados com a utilização de outros receptores nucleares. Os ensaios de gene repórter em células U937 utilizaram os mesmos parâmetros daqueles realizados com os receptores PPARs. A concentração de 800  $\mu\text{g/mL}$  do extrato THH foi selecionada baseada no ensaio de citotoxicidade, visto que foi a maior concentração que não promoveu efeito tóxico neste tipo de avaliação. Esta concentração, assim como a de 400  $\mu\text{g/mL}$  de THH, também apresentou forte incremento na atividade transcricional mediada pelos PPARs.

Para os receptores nucleares ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PXR, TR $\alpha$  e TR $\beta$ , todos os controles positivos demonstraram ativação transcricional estatisticamente diferente do veículo. No caso do receptor GR, a dexametasona ativou em torno de 2 vezes a transcrição do gene repórter, embora essa ação não tenha sido considerada significativa estatisticamente (**Gráfico 9**).

Ao contrário dos resultados obtidos nos experimentos de co-transfecção dos plasmídeos para expressão de PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$  com o plasmídeo repórter PPRE-tk-luc, sobre os receptores nucleares ER $\alpha$ , ER $\beta$ , GR, TR $\alpha$  e TR $\beta$  não foi observado aumento na atividade transcricional com o tratamento com THH. As atividades do plasmídeo repórter luciferase conduzido pelo promotor do citomegalovírus (CMV-luc) e do PXR, foram estimuladas pelo extrato THH, embora não de forma estatisticamente significativa. O promotor do citomegalovírus apresenta uma ativação constitutiva independente de ligante. Dessa forma, um decréscimo na ativação pode representar um efeito tóxico, e um aumento em sua atividade pode indicar ação inespecífica (**Gráfico 9**).

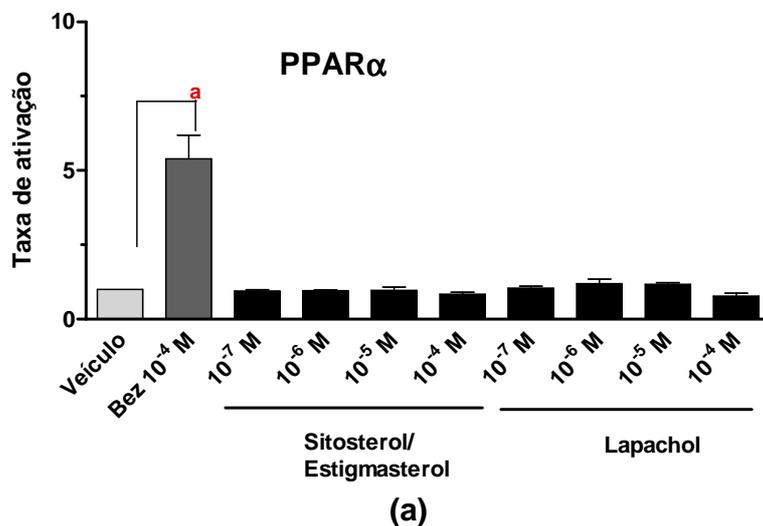


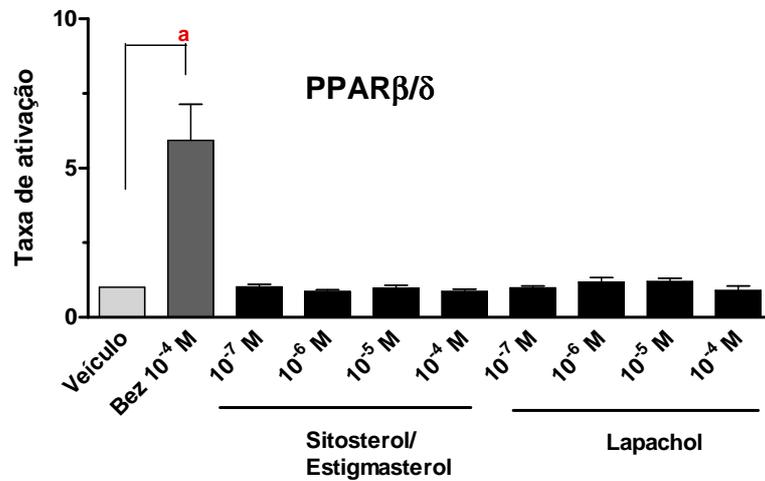
**GRÁFICO 9.** EFEITO DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Tabebuia heptaphylla* SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL MEDIADA POR DIFERENTES RECEPTORES NUCLEARES. As células U937 foram co-transfectadas com o plasmídeo de expressão do receptor e o plasmídeo repórter nas seguintes quantidades: 2  $\mu\text{g}$  dos plasmídeos para expressão ER $\alpha$  e ER $\beta$ , 3  $\mu\text{g}$  do plasmídeo repórter ERE-tk-luc; 2  $\mu\text{g}$  do plasmídeo para expressão de GR, 3  $\mu\text{g}$  do plasmídeo repórter MMTV-tk-luc; 1,5  $\mu\text{g}$  do plasmídeo para expressão de PXR, 3  $\mu\text{g}$  do plasmídeo repórter DR3-tk-luc; 1  $\mu\text{g}$  do plasmídeo para expressão de TR $\alpha$  e TR $\beta$ , 4  $\mu\text{g}$  do plasmídeo repórter TRE-tk-luc. Em seguida cada triplicata de células recebeu um tipo de tratamento, de acordo com a seguinte ordem: veículo (DMSO:Etanol), controle positivo e extrato THH na concentração final de 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Os controles positivos utilizados foram: estradiol  $10^{-5}$  M (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ), dexametasona  $10^{-7}$  M (GR), rifampicina  $10^{-6}$  M (PXR), T3  $10^{-6}$  M (TR $\alpha$  e TR $\beta$ ). A atividade luciferease foi mensurada após 24 horas de incubação. Os valores no eixo x representam a atividade de luciferase, sendo que 1 é o valor definido para a atividade de luciferase em células tratadas com veículo. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão (n=3 experimentos em triplicata; a, b, c, d, e: p < 0,001).

#### 4.7 EFEITO DE SUBSTÂNCIAS PRESENTES NA CASCA DE *Tabebuia heptaphylla* SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DOS RECEPTORES PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$ E PPAR $\gamma$

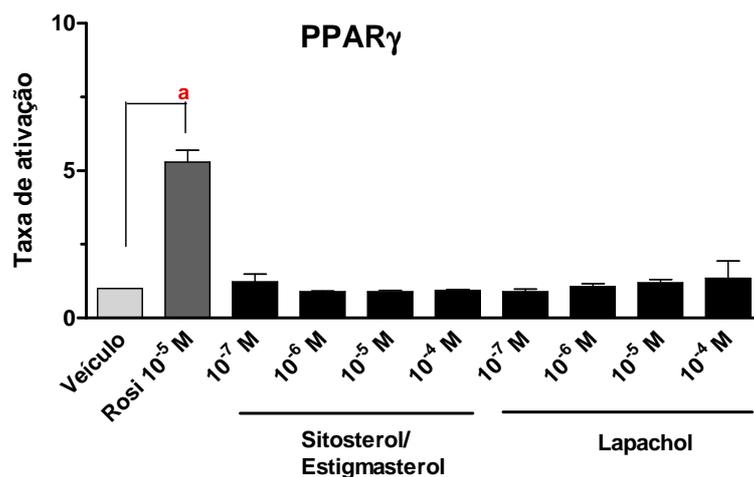
Os resultados gerados nos ensaios anteriores sugerem interação entre o extrato hexânico de *Tabebuia heptaphylla* com os receptores PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ , indicando uma interação direta com forte promoção da ativação transcricional no elemento responsivo PPRE. Assim sendo, esses dados fornecem indícios da presença de substância(s) agonista(s) no extrato THH sobre os receptores PPARs.

Lapachol e a mistura de sitosterol e estigmasterol são substâncias já identificadas em extratos de casca de *Tabebuia heptaphylla*. Em função disso, estes compostos foram utilizados em ensaios de gene-repórter com os receptores PPAR $\alpha$ , PPAR  $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$  de acordo com a metodologia já descrita. Conforme pode ser visto no **Gráfico 10**, não foi observada nenhuma alteração no efeito transcricional mediado pelos receptores PPARs promovida pelo lapachol e pela mistura de sitosterol e estigmasterol.





(b)



(c)

**GRÁFICO 10. AÇÃO DO SITOSTEROL/ESTIGMASTEROL E LAPACHOL SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRIPCIONAL MEDIADA PELOS RECEPTORES PPARS.** As células U937 foram co-transfectadas com 3  $\mu\text{g}$  do plasmídeo repórter PPRE-tk-luc e 1,5 $\mu\text{g}$  do plasmídeo de expressão para PPAR  $\alpha$ , PPAR  $\beta/\delta$  e PPAR  $\gamma$ . Em seguida cada triplicata de células recebeu um tipo de tratamento, de acordo com a seguinte ordem: veículo (DMSO/Etanol), controle positivo e concentrações crescentes de extratos. A atividade luciferease foi mensurada após 24 horas de incubação. (a) Ação de sitosterol/estigmasterol e lapachol sobre o PPAR $\alpha$ . (b) de sitosterol/estigmasterol e lapachol sobre o PPAR $\beta/\delta$ . (c) Ação de sitosterol/estigmasterol e lapachol sobre o PPAR $\gamma$ . Os valores no eixo x representam a atividade de luciferease, sendo que 1 é o valor definido para a atividade de luciferease em células tratadas com veículo. Bez: bezafibrato; Trog: troglitazona. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão (n=3 experimentos em triplicata; a:  $p < 0,001$ ).

## CAPÍTULO V - DISCUSSÃO

A prevalência da obesidade, considerada como uma das principais condições para o desencadeamento dos distúrbios metabólicos relacionados à SM, já alcançou proporções epidêmicas, sendo hoje considerada uma das doenças com maior impacto sobre a saúde pública nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (GURI; HONTECILLAS; BASSAGANYA-RIERA, 2006).

Pacientes com SM normalmente necessitam de associação de medicamentos com o objetivo de tratar cada componente individual da síndrome (hipoglicemiantes, insulina, estatinas, fibratos, antihipertensivos, aspirina, etc.). Frequentemente, além dos efeitos benéficos na correção das alterações fisiológicas, estes medicamentos também promovem efeitos indesejados, como, por exemplo, o ganho de peso induzido pela insulina (GURNELL, 2007). Em função disto, é grande a demanda por um único medicamento que seja capaz de corrigir os distúrbios metabólicos de modo eficiente e que apresente efeitos colaterais mínimos.

Recentemente a indústria farmacêutica tem se interessado especialmente pelos ligantes de PPARs, tanto por agonistas mais seletivos para um PPAR específico, quanto por duplo-agonistas e pan-agonistas, vislumbrando-os como futuros agentes terapêuticos no combate aos componentes da SM. Ainda que teoricamente, o uso de ligantes de PPAR combinados representa uma estratégia lógica de correção do metabolismo energético de um modo geral e do status inflamatório, sem promover o ganho de peso exibido pelos agonistas de PPAR $\gamma$ .

Nos últimos anos, em torno de vinte e nove substâncias duplo-agonistas e pan-agonistas entraram em avaliações pré-clínicas e clínicas, sendo que dez destes estudos foram interrompidos devido à ocorrência de efeitos indesejados, tais como câncer urotelial, ganho de peso, edema, hepatotoxicidade e eventos cardiovasculares (BALAKUMAR et al., 2007). Os fibratos e as TZDs, assim como outros ligantes sintéticos em desenvolvimento, têm igualmente apresentado efeitos tóxicos importantes, incluindo as complicações cardiovasculares.

Em conjunto, o avanço no conhecimento dos efeitos benéficos e das ações tóxicas dos agonistas de PPARs em estudo têm fortalecido a relevância clínica desses

receptores, além de contribuir para o interesse em pesquisas com foco em novos ligantes com propriedades mais seletivas e menos tóxicas, tanto de origem sintética quanto natural (BROWN; PLUTZKY, 2007).

Diversas espécies vegetais são empregadas há milênios pela medicina popular em todo mundo no tratamento de diversas patologias. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, três quartos da população mundial utilizam recursos da medicina tradicional para suprimir suas necessidades primárias de assistência à saúde, sendo que os principais empregados são as plantas medicinais ou seus componentes ativos (HUANG et al.; 2005). Com base nos conhecimentos etnofarmacológicos, a prospecção de recursos vegetais representa uma importante estratégia para a realização de *screening* de extratos para o desenvolvimento farmacêutico de novos ligantes de PPARs.

Relatos etnobotânicos citam o uso de espécies do gênero *Tabebuia* spp no tratamento de diabetes melito (NETO; MORAIS, 2003; WARASHINA; NAGATANI; NORO, 2006). Com base nessa informação, um representante desse gênero, *Tabebuia heptaphylla*, foi selecionado visando avaliar seu efeito sobre a atividade transcricional mediada pelos receptores PPARs. Para atingir tal objetivo, foram realizados ensaios de co-transfecção de células U937 com o plasmídeo de expressão para os receptores PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$  e com o gene repórter PPRE-tk-luc, seguidos de tratamento com os extratos aquoso, etanólico e hexânico de *Tabebuia heptaphylla*.

Ao contrário do esperado, o extrato aquoso de *Tabebuia heptaphylla* (THA) com natureza hidrofílica, semelhante ao chá da casca e entrecasca (forma utilizada popularmente), não demonstrou atividade alguma sobre os três PPARs. A ação do extrato etanólico de *Tabebuia heptaphylla* (THE), apesar de apresentar ativação nos três receptores testados, não foi considerada estatisticamente significativa frente ao veículo. Uma vez que se comprove cientificamente o efeito hipoglicemiante dos extratos THA e THE, provavelmente essa ação deva decorrer de outro mecanismo que não seja via ativação direta dos receptores PPARs.

Através de ensaios nas mesmas condições supracitadas, o extrato hexânico de *Tabebuia heptaphylla* (THH) foi capaz de ativar a transcrição nos três PPARs. Na concentração de 400  $\mu\text{g/mL}$  e 800  $\mu\text{g/mL}$ , foram observadas ativações do receptor

PPAR $\alpha$  bem superiores à do controle positivo 3,75 ( $\pm$  0,50), sendo de 18,29 ( $\pm$ 4,18) e 15,22 ( $\pm$ 4,84), respectivamente. A ativação mínima de 14 vezes obtida com 400  $\mu$ g/mL de THH representa quase quatro vezes aquela apresentada pelo bezafibrato. Em relação ao PPAR $\beta/\delta$ , também se observou um aumento na atividade transcricional, com ativação máxima de 21,85 ( $\pm$ 3,08) na concentração de 400  $\mu$ g/mL de THH, o que representa mais de três vezes aquela obtida pelo bezafibrato (4,37 $\pm$ 0,79). No receptor PPAR $\gamma$ , o pico de ativação foi de 8,79 ( $\pm$  1,76) na concentração de 400  $\mu$ g/mL. Tal resultado foi ligeiramente inferior à ativação promovida pela rosiglitazona, 9,47 ( $\pm$  1,59). Assim, a maior ativação nos três PPARs foi obtida com 400  $\mu$ g/mL, sendo que as concentrações superiores apresentaram redução gradual na ativação transcricional.

O aumento da atividade transcricional dos receptores PPARs promovido pelo extrato THH não demonstrou ser resultado de interação direta com o elemento responsivo PPRE ou com o receptor RXR $\alpha$ . A possibilidade dos resultados observados serem decorrentes da ativação do receptor RXR $\alpha$  foi descartada, pois o extrato THH aumentou a atividade transcricional mediada por esse receptor em torno de 3 vezes na concentração final de 400  $\mu$ g/mL, sendo essa ação não considerada estatisticamente diferente do veículo. Além disso, as taxas de ativações obtidas para os receptores PPARs, foram bem superiores àquelas obtidas para o receptor RXR $\alpha$ , resultados esses que sugerem que o extrato THH aumenta a ativação transcricional por algum tipo de interação direta com os receptores PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ .

No ensaio de citotoxicidade, foi observado que, embora as concentrações 1200  $\mu$ g/mL e 1600  $\mu$ g/mL tenham provocado uma porcentagem maior de morte celular, 26,42% e 24,65% respectivamente, quando comparadas ao veículo, essas taxas não foram consideradas estatisticamente diferentes. Apesar desse resultado indicar que o extrato THH não apresenta alto risco para células, existem outros mecanismos de toxicidade celular que podem não ser detectados por este método, tais como diminuição no metabolismo celular e comprometimento na transcrição de genes. Assim sendo, são necessários outros testes de citotoxicidade para complementar a avaliação dos efeitos tóxicos do extrato de THH em células.

A especificidade da interação do extrato hexânico de *Tabebuia heptaphylla* pelos receptores PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$  foi demonstrada por ensaios com outros receptores nucleares. A concentração de 800  $\mu\text{g/mL}$  do extrato THH foi selecionada baseada no ensaio de citotoxicidade, visto que foi a maior concentração que não promoveu efeito tóxico neste tipo de avaliação. Para os receptores nucleares ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PXR, TR $\alpha$  e TR $\beta$ , todos os controles positivos demonstraram ativação transcricional estatisticamente diferente do veículo, com exceção do receptor GR.

Ao contrário dos resultados obtidos nos experimentos de co-transfecção dos plasmídeos para expressão de PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$  com o plasmídeo repórter PPRE-tk-luc, não foi observada ativação estatisticamente significativa sobre ER $\alpha$ , ER $\beta$ , GR, TR $\alpha$  e TR $\beta$ , CMV-luc e PXR. O promotor do citomegalovírus apresenta uma ativação constitutiva independente de ligante. Dessa forma, um decréscimo na ativação desse receptor pode representar um efeito tóxico, e um aumento em sua atividade pode indicar ação inespecífica. Tais dados reforçam a hipótese de que alguma(s) substância(s) presente no extrato THH está(ão) interagindo de forma direta e específica com os receptores PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ .

Foram testadas as substâncias isoladas em outros trabalhos provenientes de extratos de *Tabebuia heptaphylla*, lapachol e mistura de sitosterol e estigmasterol. O lapachol é uma das moléculas mais pesquisadas no gênero *Tabebuia* sp. A propriedade anticancerígena dessa substância foi a mais estudada, não tendo sido descrita ainda nenhuma ação sobre o metabolismo energético. Com base nessa informação e nos resultados mostrados, provavelmente o lapachol não é o responsável pela ativação da sinalização dos receptores PPARs.

As substâncias  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol pertencem ao grupo dos fitosteróis, que são compostos esteroidais provenientes de plantas. Normalmente são encontrados em alimentos. Uma dieta rica em  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol tem sido relacionada ao efeito hipocolesterolêmico. O mecanismo dessa ação, possivelmente procede da semelhança estrutural com o colesterol, o que favorece uma competição na absorção intestinal (MARTINS et al., 2004; VANSTONE et al., 2002). Os resultados obtidos no

presente trabalho indicam que essas substâncias também não aumentam a atividade transcricional via PPARs.

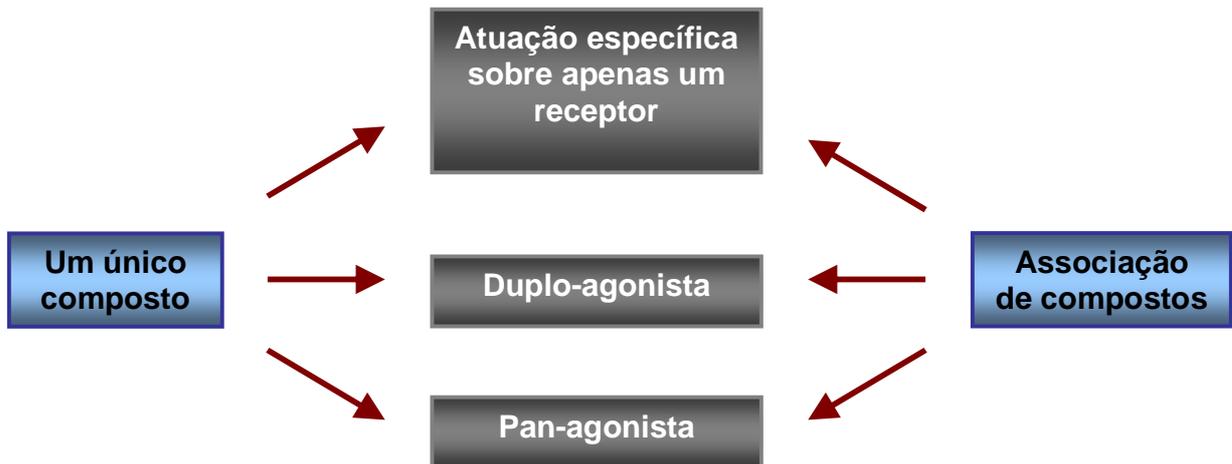
O secoisolariciresinol é outro composto igualmente encontrado na *Tabebuia heptaphylla*. Em estudos de modelos animais com diabetes induzida, essa substância exibiu ação hipoglicemiante, podendo em razão disto ser considerada um potencial candidato para ação agonista em PPARs (PRASAD et al., 2000; BANSKOTA et al., 2006). Além disso, em ensaios de *Docking*, o secoisolariciresinol demonstrou importantes interações com o receptor PPAR $\beta/\delta$  (resultados não mostrados). Entretanto essa substância não foi avaliada com relação à ativação dos PPARs .

Uma questão importante refere-se às respostas esperadas para os agonistas de PPARs; frequentemente elas estão relacionadas às ações desencadeadas pelo isotipo específico de PPAR ativado. Entretanto, a variabilidade de efeitos obtidos em estudos *in vivo* e *in vitro* por ligantes sintéticos diferentes argumenta contra a suposição acima (BROWN; PLUTZKY, 2007). Ligantes de PPAR podem levar a um recrutamento diferencial de proteínas correguladoras em cada tecido, que por sua vez promovem a diversidade de funções do receptor e do padrão de expressão de genes-alvo. Assim, o uso clínico de agonistas desses receptores envolve a compreensão da interface entre as respostas biológicas e clínicas apresentadas em cada tecido e sistemicamente de inúmeras vias que integram o metabolismo energético, a inflamação e a função vascular (PERAZA et al., 2006).

Comprovadamente a indução da sinalização via PPAR promove melhora na dislipidemia e na sensibilidade à insulina. Porém, até o momento, não se têm disponível no mercado medicamentos que ativem PPARs de modo seletivo para cada isotipo, ou do tipo duplo ou pan-agonistas. Assim sendo, a descoberta e caracterização de tais compostos pode ser um importante passo para aplicações clínicas de moduladores de PPARs em diversas patologias clinicamente relevantes, tais como a síndrome metabólica.

Os resultados apresentados acenam para possibilidades promissoras de desenvolvimento de novos ligantes, visto que, o extrato THH pode conter moléculas que se enquadram tanto no grupo de moduladores seletivos, quanto no grupo de duplo

ou pan-agonistas. Como base nestas possibilidades surgem as seguintes hipóteses: (i) um único composto pode atuar especificamente em um receptor (PPAR $\alpha$  ou PPAR $\beta/\delta$  ou PPAR $\gamma$ ), pode atuar como duplo-agonista (PPAR $\alpha$ /PPAR $\beta/\delta$ , PPAR $\alpha$ /PPAR $\gamma$ , PPAR $\beta/\delta$ , PPAR $\gamma$ ) ou ainda como pan-agonista (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ ); (ii) um grupo de compostos pode atuar especificamente em um receptor (PPAR $\alpha$  ou PPAR $\beta/\delta$  ou PPAR $\gamma$ ), pode atuar como duplo-agonista (PPAR $\alpha$ /PPAR $\beta/\delta$ , PPAR $\alpha$ /PPAR $\gamma$ , PPAR $\beta/\delta$ , PPAR $\gamma$ ); ou ainda como pan-agonista (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ ) (**Figura 12**).



**Figura 12.** HIPÓTESES DE ATUAÇÃO DOS POSSÍVEIS LIGANTES DOS RECEPTORES PPARS PRESENTES NA CASCA DE *Tabebuia heptaphylla*.

Como conclusão, o fracionamento bio-monitorado do extrato da entrecasca de *Tabebuia heptaphylla* pode determinar novas ações para moléculas já conhecidas, bem como identificar moléculas inéditas com ações potenciais sobre os três receptores PPARs, abrindo novas perspectivas para o combate de desordens fisiológicas, como por exemplo, aquelas características da síndrome metabólica.

## SUMÁRIO

- ✦ Os estudos em células pró-monocíticas (U937) demonstraram que o extrato hexânico de *Tabebuia heptaphylla* foi capaz de aumentar a atividade transcricional mediada pelos receptores PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ .
- ✦ O extrato hexânico de *Tabebuia heptaphylla* não alterou a atividade transcricional dos receptores ER $\alpha$ , ER $\beta$ , GR, TR $\alpha$  e TR $\beta$ .
- ✦ O extrato hexânico de *Tabebuia heptaphylla* induziu discretamente a transcrição via PXR, RXR $\alpha$  e CMV, embora essa ação não tenha sido estatisticamente significativa.
- ✦ O extrato hexânico de *Tabebuia heptaphylla* não comprometeu a viabilidade celular.
- ✦ O lapachol e a mistura de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol não demonstraram atividade agonista sobre receptores PPARs.
- ✦ O extrato aquoso de *Tabebuia heptaphylla* não promoveu alteração sobre a atividade transcricional dos PPARs.
- ✦ O extrato etanólico de *Tabebuia heptaphylla* promoveu indução sobre a atividade transcricional dos PPARs, embora não estatisticamente significativa.

## CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Comprovadamente a indução da sinalização via PPAR promove melhora na dislipidemia e na sensibilidade à insulina. Porém, até o momento, não se têm disponível no mercado medicamentos eficazes e seguros que ativem PPARs de modo seletivo para cada isotipo, ou do tipo duplo ou pan-agonistas. Assim sendo, a descoberta e caracterização de tais compostos pode representar um importante passo para aplicações terapêuticas de moduladores de PPARs em diversas patologias clinicamente relevantes, tais como a síndrome metabólica.

No presente trabalho foi demonstrado que o extrato hexânico de *Tabebuia heptaphylla* foi capaz de aumentar a atividade transcricional mediada pelos receptores PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$  em células pró-monocíticas (U937). O extrato THH induziu discretamente a atividade do RXR $\alpha$ , parceiro heterodimérico dos PPARs. Além disso, na presença apenas do elemento responsivo PPRE (ou seja, na ausência do receptor) o extrato THH não alterou a atividade transcricional. Estes resultados sugerem que o efeito observado do extrato THH sobre o PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$  decorre de algum tipo de interação direta e intensa com estes receptores. Esta interação parece ainda ser específica para os PPARs, haja visto que o THH não ativou de forma estatisticamente significativa nenhum dos outros receptores nucleares testados (ER $\alpha$ , ER $\beta$ , GR, PXR TR $\alpha$  e TR $\beta$ ). Estes resultados fortemente indicam a presença de substâncias na *Tabebuia heptaphylla* que apresentem indução de atividade transcricional via PPARs.

Os ligantes de PPAR apresentam natureza lipofílica, e talvez por isso, os extratos aquoso e etanólico de *Tabebuia heptaphylla* não tenham apresentado indução estatisticamente significativa sobre a atividade transcricional dos PPARs.

Não foram encontradas referências sobre a comprovação da atividade hipoglicemiante em modelos animais com diabetes induzida ou de benefícios em outras desordens metabólicas para extratos de *Tabebuia heptaphylla*. Entretanto, a ação modulatória observada sobre os PPARs sugere que o extrato THH possa exercer funções regulatórias em mecanismos fisiológicos importantes ligados ao metabolismo energético. Ainda que o extrato hexânico de *Tabebuia heptaphylla* não tenha

comprometido a viabilidade celular no teste utilizado, não há segurança alguma na indicação de uso deste extrato para controle de distúrbios metabólicos, não só pela falta de correlação com estudos *in vivo*, como também por não haverem estudos de administração oral com esse tipo de extração, limitando assim a segurança de uso.

As substâncias isoladas com ação sobre os PPARs a partir do fracionamento do extrato hexânico e etanólico poderiam ter o estudo de suas atividades complementado com outros ensaios, tais como: GST pull down (avaliação do recrutamento de coativadores), diferenciação de adipócitos, ensaio de afinidade de ligação pelo receptor e determinação da estrutura cristalográfica do LBD dos PPARs ligado às substâncias isoladas.

A partir da comprovação da modulação da atividade sobre os receptores PPARs e do aprofundamento do estudo das interações com os receptores, também poderiam ser realizados experimentos com animais para avaliação dos parâmetros metabólicos na presença da substância isolada, e futuramente testes clínicos em humanos para avaliação de eficácia e segurança destes compostos.

Desta forma, as informações geradas no presente trabalho são extremamente válidas como base prospectiva para estudos que possibilitem o isolamento dos compostos que exercem efeitos metabólicos desejados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, ampliando as possibilidades de intervenções terapêuticas sobre as alterações fisiológicas que contribuem para o risco de doenças cardiovasculares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMA, R.S.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol Metab**, v. 11, n. 8, p. 327-332, outubro 2000.

ALI, A. A.; WEINSTEIN, S. A. S.; PERFITT, A. M.; MANOLAGAS, S. C.; JILKA, R. L. Rosiglitazone causes bone loss in mice by supressing osteoblast differentiation and bone formation. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1226-1235, 2005.

ANDRADE, P. M. M.; RIBEIRO, B. G.; CARMO, G. T.; Papel dos lipídios no metabolismo durante o esforço. **MN – Metabólica**, v.8, n.2, p.80-88, abril 2006.

AWALE, S.;KAWAKAMI, T.; TEZUKA, Y.; UEDA, J-A.; TANAKA, K.; KADOTA, S. Nitric Oxide (NO) Production Inhibitory Constituents of *Tabebuia avellanedae* from Brazil. **Chem Pharm Bull**, v. 53, n. 6, p. 710-713, 2005.

BACKES, P.; IRGANG, B. **Mata Atlântica: as árvores e a paisagem**. Porto Alegre: Paisagem do Sul, 2004.

BALAKUMAR, P.; ROSE, M.; GANTI, S. S.; KRISHAN, P.; SINGH, M. PPAR dual agonists: Are they opening Pandora's Box? **Pharmacological Research**, v. 56, n. 2, p. 91-98, março 2007.

BANSKOTA, A. H.; NGUYEN, N. T.; TEZUKA, Y.; NOBUKAWA, T.; KADOTA, S. Hypoglycemic effects of the wood of *Taxus yunnanensis* on streptozotocin-induced diabetic rats and its active components. **Phytomedicine**, v. 13, p. 109-114, janeiro 2006.

BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, T. H. C.; ALENCAR, A. A.; BATISTA, L. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; GUEDES, D. N.; FALCÃO, H. S.; MOURA, M. D.; DINIZ, M. F. F. M.; MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 392-413, 2005.

BARISH, G. D.; EVANS, R. M. PPARs and LXRs: atherosclerosis goes nuclear. **TRENDS in Endocrinology and Metabolism**, v. 15, n. 4, p. 159-166, maio 2004.

BERBEROGLU, Z.; GURSOY, A.; BAYRAKTAR, N.; YAZICI, A. C.; TUTUNCU, N. B.; DEMIRAG, N. G. Rosiglitazone decreases serum bone-specific alkaline phosphatase activity in postmenopausal diabetic women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 9, p. 3523-3530, junho 2007.

BERGER, J.; MOLLER, D. E. The mechanisms of action of PPARs. **Annu Rev Med**, v. 53, p. 409-435, fevereiro 2002.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1996.

BOOKOUT, A. L.; JEONG, Y.; DOWNES, M.; YU, R. T.; EVANS, R. M.; MANGELSDORF, D. J. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. **Cell**, v. 126, n. 4, 789-799, agosto 2006.

BREWER, H. B. High-density lipoproteins: a new potential therapeutic target for the prevention of cardiovascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, p. 387-391, 2004.

BROWN, J. F.; PLUTZKY, J. Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets. **Circulation**, v. 115, p. 518-533, janeiro 2007.

BROWN, N. J.; AGIRBASLI, M.; VAUGHAN, D. E. Comparative effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor antagonism on plasma fibrinolytic balance in humans. **Hypertension**, United States, v. 34, n. 2, p. 285-290, agosto 1999.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de sinalização da insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CARVALHO, M. H. C.; COLAÇO, A. L.; FORTES, Z. B. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 2, p. 304-312, 2006.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: Embrapa-CNPQ; Brasília, D.F.: Embrapa-SPI, 1994.

CHAWLA, A.; REPA, J. J.; EVANS, R. M.; MANGELSDORF, D. J. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the x-files. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1866-1870, novembro 2001.

CHINETTI, G.; GBAGUIDI, F. G.; GRIGLIO, S.; MALLAT, Z.; ANTONUCCI, M.; POULAIN, P.; CHAPMAN, J.; FRUCHART, J-C.; TEDGUI, A.; NAJIB-FRUCHART.; STAELS, B. CLA-1/SR-BI Is Expressed in Atherosclerotic Lesion Macrophages and Regulated by Activators of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. **Circulation**, v. 101, n. 20, p. 2411-2417, maio 2000.

CHINETTI, G.; LESTAVEL, S.; BOCHER, V.; REMALEY, A. T.; NEVE, B.; TORRA, I. P.; TEISSIER, E.; MINNICH, A.; JAYE, M.; DUVERGER, N.; BREWER, H. B.; FRUCHART, J-C.; CLAVEY, V.; STAELS, B.  $\alpha$  and  $\gamma$  activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway **Nature Medicine**, v. 7, n. 1. p. 53-58, Janeiro 2001.

CHUANG, C-Y.; HSU, C.; CHAO, C-Y.; WEIN, Y-S.; KUO, Y-H.; HUANG, C-J. Fractionation and identification of 9c, 11t, 13t-conjugated linolenic acid as an activator of PPAR $\alpha$  in bitter melon (*Momordica charantia* L.). **Journal of Biomedical Science**, v. 13, n. 6, p. 763-772, novembro 2006.

COHEN, R. N. Nuclear receptor corepressor and PPAR $\gamma$ . **Nuclear Receptor Signaling**, v. 4, p. 1-4, fevereiro 2006.

COSTA, J. V.; DUARTE, J. S. Tecido adiposo e adipocinas. **Acta Med Port**, v. 19, n. 3, p. 251-256, 2006.

CUZZOCREA, S. Peroxisome proliferator-activated receptors and acute lung injury. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 6, p. 263-270, Janeiro 2006.

DELERIVE, P.; BOSSCHER, K.; BERGHE, W. V.; FRUCHART, J.; HAEGEMAN, G.; STAELS, B. DNA Binding-Independent Induction of I $\kappa$ B $\alpha$  Gene Transcription by PPAR $\alpha$ . **Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 5, p. 1029-1039, maio 2002.

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**, v. 68, n. 5, p. 879-887, março 1992.

DUBUQUOY, L.; ROUSSEAUX, C.; THURU, X.; PEYRIN-BIROULET, L.; ROMANO, O.; CHAVATTE, P.; CHAMAILLARD, M.; DESREUMAUX, P. PPAR $\gamma$  as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. **Gut**, v. 55, p. 1341-1349, 2006.

EVANS, R. M.; BARISH, G. D.; WANG, Y. PPARs and the complex journey to obesity. **Nature Medicine**, v. 10, n. 4, p. 1-7, abril 2004.

FEIGE, J. N.; GELMAN, L.; MICHALIK, L.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. From molecular action to physiological outputs: Peroxisome proliferator-activated receptors

are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. **Progress in Lipid Research**, Switzerland, v. 45, n. 2, p. 120-159, março 2006.

FIÉVET, C.; FRUCHART, J.; STAELS, B. PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  dual agonists for the treatment of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 6, p. 606-614, dezembro 2006.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 2, p. 216-229, abril 2006.

FONSECA-KRUEL, V. S.; PEIXOTO, A. L. Etnobotânica na reserva extrativista marinha de Arraial do Cabo, RJ, Brasil. **Acta bot bras**, v. 18, n. 1, p. 177-190, 2004.

GAMPE JR, R. T.; MONTANA, V. G.; LAMBERT, M. H.; MILLER, A. B.; BLEDSOE, R. K.; MILBURN, M. V.; KLIEWER, S. A.; WILLSON, T. M.; XU, H. E. Asymmetry in the PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  Crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. **Molecular Cell**, v. 5, n. 5, p. 545–555, março 2000.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MAHMOUD, T. S.; FIGUEIREDO, P. O. Novos constituintes químicos das cascas do caule de *Tabebuia heptaphylla*. **Quim. Nova**, v. 30, n. 8, p. 1887-1891, 2007.

GUAN, Y. Peroxisome proliferators-activated receptor family and its relationship to renal complications of the metabolic syndrome. **Journal oh American Society of Nephrology**, v. 15, n. 11, p. 1-25, novembro 2004.

GURI, A. J.; HONTECILLAS, R.; BASSAGANYA-RIERA, J. Peroxisome proliferator-activated receptors: Bridging metabolic syndrome with molecular nutrition. **Clinical Nutrition**, v. 25, n. 6, p. 871-885, dezembro 2006.

GURNELL, M. 'Striking the right balance' in targeting PPAR $\gamma$  in the metabolic syndrome: novel Insights from human genetic studies. **PPAR Research**, v. 2007:83593, 2007.

HERMSDORFF, H. H. M.; MONTEIRO, J. B. R. Gordura Visceral, Subcutânea ou Intramuscular: Onde Está o Problema? **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 48, n. 6, p. 803-801, dezembro 2004.

HUANG, T. H-W; LI, Y.; RAZMOVSKI-NAUMOVSKI, V.; TRAN, V. H.; LI, G. Q.; DUKE, C. C.; ROUFOGALIS, B. D. Gypenoside XLIX isolated from *Gynostemma pentaphyllum* inhibits nuclear factor-kappaB activation via a PPAR-alpha-dependent pathway. **Journal of Biomedical Science**, v. 13, n. 4, p. 535-548, julho 2006.

HUANG, T. H-W.; PENG, G.; KOTA, B. P.; LI, G. Q.; YAMAHARA, J.; ROUFOGALIS, B. D.; LI, Y. Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: Activation of PPAR $\gamma$  and identification of an active component. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 207, m. 2, p. 160-169, setembro 2005.

HUMMASTI, S.; TONTONNOZ, P. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor N-Terminal Domain Controls Isotype-Selective Gene Expression and Adipogenesis. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 6, p. 1261-1275, março 2006.

ISSEMANN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, v. 347, p. 645-650, 1990 [resumo].

KASUGA, J.; YAMASAKI, D.; ARAYA, Y.; NAKAGAWA, A.; MAKISHIMA, M.; DOI, T.; HASHIMOTO, Y.; MIYACHI, H. Design, synthesis, and evaluation of a novel series of  $\alpha$ -substituted phenylpropanoic acid derivatives as human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha/\delta$  dual agonists for the treatment of metabolic syndrome. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 24, p. 8405-8414, dezembro 2006.

KOTA, B. P.; HUANG, T. H-W.; ROUFOGALIS, B. D. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacological Research**, v. 51, p. 85-94, julho 2005.

LACLAUSTRA, M.; CORELLA, D.; ORDOVAS, J. M. Metabolic syndrome pathophysiology: The role of adipose tissue. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Disease**, v. 17, n. 2, p. 125-139, fevereiro 2007.

LAM, T. K. T.; CARPENTIER, A.; LEWIS, G. F.; WERVE, G.; FANTUS, G.; GIACCA, A. Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 284, p. E863- E873, maio 2003.

LEE, K. Transactivation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  by green tea extracts. **J. Vet. Sci**, v. 5, n. 4, p. 325-330, 2004.

LEE, S. S-T.; PINEAU, T.; DRAGO, J.; LEE, E J.; OWENS, J. W.; KROETZ, D. L.; FERNANDEZ-SALGUERO, P. M.; WESTPHAL, H.; GONZALEZ, F. J. Targeted Disruption of the  $\alpha$  Isoform of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gene in Mice Results in Abolishment of the Pleiotropic Effects of Peroxisome Proliferators. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 6, p. 3012-3022, junho 1995.

LI, D-D.; CHEN, J-H.; CHEN, Q.; LI, G-W.; CHEN, J.; YUE, J-M.; CHEN, M-L.; WANG, X-P.; SHEN, J-H.; SHEN, X.; JIANG, H-L. *Swietenia mahagony* extract shows agonistic activity to PPAR $\gamma$  and gives ameliorative effects on diabetic *db/db* mice. **Acta Pharmacologia Sinica**, 26, n. 2, p. 220-222, fevereiro 2005.

LI, R. W.; LIN, G. D.; LEACH, D. N.; WATERMAN, P. G.; MYERS, S. P. Inhibition of COXs and 5-LOX and activation of PPARs by Australian *Clematis* species (Ranunculaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 1-2, p. 138-143, março 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

MA, L.; GAO, H-G; LI, B-Y.; MA, Y-B.; YOU, B-A.; ZHANG, F-L. Grape Seed Proanthocyanidin Extracts Inhibit Vascular Cell Adhesion Molecule Expression Induced by Advanced Glycation EndProducts Through Activation of Peroxisome Proliferators-Activated Receptor  $\gamma$ . **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 49, p. 293-298, 2007.

MARTINS, S. L. C.; SILVA, H. F.; NOVAES, M. R. C. G.; ITO, M. K. Efeitos terapêuticos dos fitosteróis e fitostanóis na colesterolemia. **ALAN**, v. 54, n. 3, p. 257-263, 2004.

MICHALIK, L.; AUWERX, J.; BERGER, J. P.; CHATTERJEE, V. K.; GLASS, C. K.; GONZALES, F. J.; GRIMALDI, P. A.; KADOWAKI, T.; LAZAR, M. A.; O'RAHILLY, S.; PALMER, C. N. A.; PLUTZKY, J.; REDDY, J. K.; SPIEGELMAN, B. M.; STAELS, B.; WAHLI, W. International Union of pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 4, p. 726-741, dezembro 2006.

MOTTA, S.; GUERRA, M. O.; PETERS, V. M.; REIS, J. E. P. Administração de polvilho de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) a ratas lactando: desenvolvimento físico das crias. **Revista Lecta**, v. 20, n. 1, p. 53-60, 2002.

MURPHY, G. J.; HOLDER, J. C. PPAR $\gamma$  agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. **TIPS**, v. 21, n. 12, p. 469-474, dezembro 2000.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 121-142, 2005.

NETO, G. G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Bot Bras**, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.

NISSEN, S.E.; WOLSKI, K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. **N Engl J Med**, v. 356, n. 24, p. 2457-2471, junho 2007.

NOLTE, R. T.; WISELY, G. B.; WESTIN, S.; COBB, J. E.; KUROKAWA, M. H.; ROSENFELD, M. G.; WILLSON, T. M.; GLASS, C. K.; MILBURN, M. V. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferators-activated receptor- $\gamma$ . **Nature**, v. 395, n. 6698, p. 137-143, setembro 1998 [resumo].

PERAZA, M. A.; BURDICK, A. D.; MARIN, H. E.; GONZALES, F. J.; PETERS, J. M. The Toxicology of Ligands for Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR). **Toxicological Sciences**, v. 90, n. 2, p. 269-295, abril 2006.

PEREIRA, E. M.; MACHADO, T. B.; LEAL, I. C. R.; JESUS, D. M.; DAMASO, C. R. A.; PINTO, A. V.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; KUSTER, R. M.; SANTOS, K. R. *N.Tabebuia avellanadae* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, n. 5, p. 1-7, março 2006.

PINAIRE, J. A.; REIFEL-MILLER, A. Therapeutic Potential of Retinoid X Receptor Modulators for the Treatment of the Metabolic Syndrome. **PPAR Research**, v. 2007:94156, 2007.

PRASAD, K.; SUBRAHMANYAM, V.; MANTHA, V.; ALISTER, D. M.; WESTCOTT, N. D. Protective effect of secoisolariciresinol diglucoside against streptozotocin-induced diabetes and its mechanism. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 206, n. 1-2, p. 141-150, março 2000.

RIBEIRO, R. C. J.; FENG, W.; WAGENR, R. L.; COSTA, C. H.; PEREIRA, A. C.; APRILETTI, J. W.; FLETTERICK, R. J.; BAXTER, J. D. Definition of the Surface in the Thyroid Hormone Receptor Ligand Binding Domain for Association as Homodimers and Heterodimers with Retinoid X Receptor. **J Biol Chem**, v. 276, n. 18, p. 14987-14995, maio 2001.

RICOTE, M.; GLASS, C. K. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, p. 926-935, março 2007.

RIZZO, S.; FIORUCCI, S. PPARs and other nuclear receptors in inflammation. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 4, p. 421-427, março 2006.

ROSEN, E. D.; HSU, C.; WANG, X.; SAKAI, S.; FREEMAN, M. W.; GONZALES, F. J.; SPIEGELMAN, B. M. C/EBP $\alpha$  induces adipogenesis through PPAR $\gamma$ : a unified pathway. **Genes & Development**, v. 16, n.1, p. 22-26, Janeiro 2002.

ROSENSON, R. S. Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors on Lipoprotein Metabolism and Glucose Control in Type 2 Diabetes Mellitus. **Am J Cardiol**, v. 99, n. 4, p. 96B–104B, fevereiro 2007.

SÁNCHEZ-MUÑOZ, F.; GARCÍA-MACEDO, R.; ALARCÓN-AGUILAR, F.; CRUZA, M. Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. **Gac Méd Méx**, v. 141, n. 6, p. 505-512, 2005.

SCHMEDA-HIRSCHMANNA, G.; PAPASTERGIOU, F. Naphthoquinone Derivatives and Lignans from the Paraguayan Crude Drug “Tayĩ Pyta” (*Tabebuia heptaphylla*, Bignoniaceae). **Z. Naturforsch**, v. 58c, n. 7-8, p. 495-501, julho/agosto 2003.

SHARMA, A. M.; STAELS, B. Review: Peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$  and adipose tissue – understanding obesity-related changes in regulation of lipid and

glucose metabolism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 2, p. 386-395, fevereiro 2007.

SHEARER, B. G.; BILLIN, A. N. The next generation of PPAR drugs: Do we have the tools to find them? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, n. 8, p. 1082-1093, agosto 2007.

SHEN,P.; LIU, M. H.; NG, T. Y.; CHAN, Y. H.; YONG, E . L. Differential Effects of Isoflavones, from *Astragalus Membranaceus* and *Pueraria Thomsonii*, on the Activation of PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , and Adipocyte Differentiation In Vitro. **JN The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 4, p. 899-905, abril 2006.

SIMÕES, M. O. et al [org]. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2002.

SONODA, J.; PEI, L.; EVANS, R. M. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. **FEBS Lett**, v. 582, n.1, p. 2-9, janeiro 2008.

STAELS, B.; DALLONGEVILLE, J.; AUWERX, J.;SCHOONJANS, K.; LEITERSDORF, E. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. **Circulation**, v. 98, n. 19, p. 2088-2093, novembro 1998.

STIENSTRA, R.; DUVAL, C.; MÜLLER, M.; KERSTEN, S. PPARs, obesity, and inflammation. **PPAR Research**, v. 2007:95974, 2007.

STRAUS, D. S.; GLASS, C. K. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. **Trends in Immunology**, v. 28, n.12, p. 551-558, novembro 2007.

TAN, N. S.; MICHALIK, L.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Multiple expression control mechanisms of peroxisome proliferators-activated receptors and their target genes.

**Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 93, n. 2-5, p. 99-105, fevereiro 2005.

TENENBAUM, A.; MOTRO, M.; FISMAN, E. Z. Dual and pan-peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) co-agonism: the bezafibrate lessons. **Cardiovascular Diabetology**, v. 4, n. 14, p. 1-5, setembro 2005.

TONTONOZ, P.; HU, E.; GRAVES, R. A.; BUDAVARI, A. I.; SPIEGELMAN, B. M. mPPAR $\gamma$ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. **Genes & Development**, v. 8, p. 1224-1234, 1994.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular. **Vascular Pharmacology**, v. 45, n.1, p 19-28, julho 2006.

UPPENBERG, J.; SVENSSON, C.; JAKI, M.; BERTILSSON, G.; JENDEBERG, L.; BERKENSTAM, A. Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPAR $\gamma$ . **J. Biol. Chem**, v. 273, n. 47, p. 31108-31112, 1998.

VAMECQ, J.; LATRUFFE, N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. **The Lancet**, v. 354, n. 9173, p. 141-148, julho 1999.

VANSTONE, C. A.; RAEINI-SARJAZ, M.; PARSONS, W. E.; JONES, P. J. H. Unesterified plant sterols and stanols lower LDL-cholesterol concentrations equivalently in hypercholesterolemic persons. **Am J Clin Nutr**, v. 76, n. 6, p. 1272-1278, dezembro 2002.

VERGÈS, B. Clinical interest of PPARs ligands: Particular benefit in type 2 diabetes and metabolic syndrome. **Diabetes Metab**, v. 30, n. 1, p. 7-12, fevereiro 2004.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W.; trad. Arthur Germano Fett Neto [et al.] **Fundamentos da bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2000.

WANG, N.; VERNA, L.; CHEN, N.; CHEN, J.; LI, H.; FORMAN, B. M.; STEMERMAN, M. B. Constitutive Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor Suppresses Pro-inflammatory Adhesion Molecules in Human Vascular Endothelial Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 37, p. 34176-34181, setembro 2002.

WARASHINA, T.; NAGATANI, Y.; NORO, T. Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 13, p. 2003-2011, julho 2004.

WILLSON, T. M.; KLIEWER, S. A. PXR, CAR and drug metabolism. **Drug Discovery**, v. 1, p. 259-266, abril 2002.

XU, H. E.; LAMBERT, M. H.; MONTANA, V. G.; PARKS, D. J.; BLANCHARD, S. G.; BROWN, P. J.; STERNBACH, D. D.; LEHMANN, J. M.; WISELY, G. B.; WILSON, T. M.; KLIEWER, S. A.; MILBURN, M. V. Molecular Recognition of Fatty Acids by Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. **Molecular Cell**, v. 3, n. 3, p. 397-403, março 1999.

XU, H. E.; LAMBERT, M. H.; MONTANA, V. G.; PLUNKET, K. D.; MOORE, L. B.; COLLINS, J. L.; OPLINGER, J. A.; KLIEWER, S. A.; GAMPE JR, R. T.; McKEE, D. D.; MOORE, J. T.; WILLSON, T. M. Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferators activated receptors. **PNAS**, v. 98, n. 24, p. 13919-13924, novembro 2001.

YU, C.; MARKAN, K.; TEMPLE, K. A.; DEPLEWSKI, D.; BRADY, M. J.; COHEN, R. N. The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$  transcriptional activity and repress 3T2-L1 adipogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 14, p. 13600-13605, abril 2005.

YU, S.; REDDY, J. K. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, n. 8, p. 936-951, agosto 2007.