



Brasília, 2 de julho de 2021.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO GQ-16, UM NOVO LIGANTE AGONISTA DO RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO GAMA (PPAR γ), EM COMPARAÇÃO COM OUTRAS TIAZOLIDINEDIONAS EM PEIXE-ZEBRA (*danio rerio*)**”, SEI n.º 23106.052946/2021-10, sob responsabilidade do Professor Rolando André Rios Villacis, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, na 155ª reunião ordinária, realizada em 8/6/2021. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Danio rerio*, sendo 1944 machos e fêmeas, com procedência do Biotério de manutenção de peixes do Instituto de Ciências Biológicas - Departamento de Genética e Morfologia – da Universidade de Brasília. O presente certificado é válido pelo período de 2/8/2021 a 2/8/2022.

Dr. José Luiz Jivago de Paula Rôlo

Coordenador da CEUA – UnB





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

ALESSANDRA RODRIGUES SILVA ROSSI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO GQ-16, UM NOVO LIGANTE AGONISTA
DO RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO
GAMA (PPAR γ), EM COMPARAÇÃO COM OUTRAS TIAZOLIDINADIONAS
EM PEIXE-ZEBRA (*DANIO RERIO*)**

Brasília, 2022

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

ALESSANDRA RODRIGUES SILVA ROSSI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO GQ-16, UM NOVO LIGANTE AGONISTA
DO RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO
GAMA (PPAR γ), EM COMPARAÇÃO COM OUTRAS TIAZOLIDINADIONAS
EM PEIXE-ZEBRA (*DANIO RERIO*)**

ORIENTADOR: PROF. DR. FRANCISCO DE ASSIS ROCHA NEVES

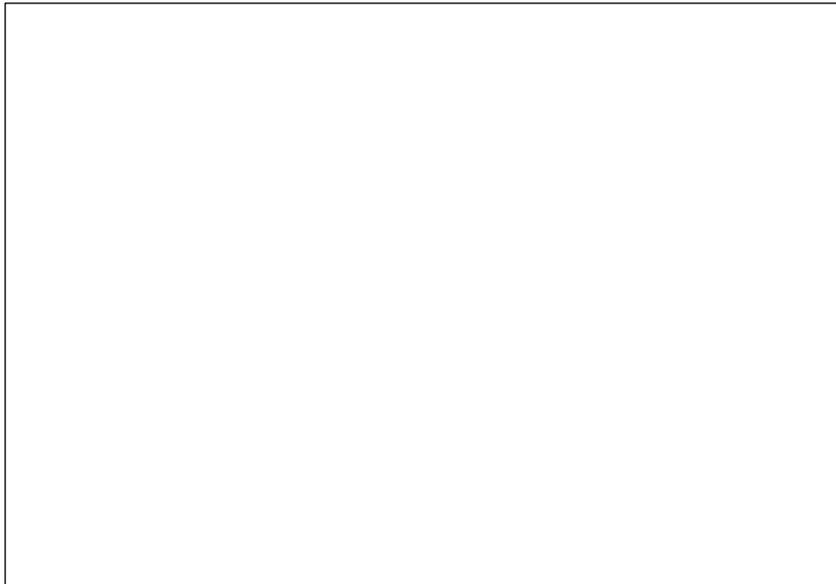
Tese apresentada como requisito para a obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Área de Concentração: Farmacologia, toxicologia e produtos naturais.

Linha de Pesquisa:

Brasília, 2022

FICHA CATALOGRÁFICA



ALESSANDRA RODRIGUES SILVA ROSSI

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO GQ-16, UM NOVO LIGANTE AGONISTA
DO RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO
GAMA (PPAR γ), EM COMPARAÇÃO COM OUTRAS TIAZOLIDINADIONAS
EM PEIXE-ZEBRA (*DANIO RERIO*)

Aprovado em ____/____/____

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

BANCA EXAMINADORA

Professor Doutor Francisco de Assis Rocha Neves
Presidente da banca
Universidade de Brasília

Professora Doutora Angélica Amorim Amato
Membro Titular
Universidade de Brasília

Professor Doutor Alexandre Góes Martini
Membro Titular (Externo ao Programa)

Doutora Cinthia Gabriel Meireles
Membro Titular (Externo ao Programa)

Professora Doutora Maria de Fátima Borin
Membro Suplente

Dedico este trabalho aos meus avôs Waldir Rodrigues e Anito Inácio da Silva, vítimas da COVID-19.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força espiritual para a realização deste trabalho.

A toda minha família pelo orgulho, encorajamento e apoio. Ao meu filho, pela paciência e compreensão pelas horas em que me ausentei durante o doutorado. À minha mãe, pela compreensão, ajuda e carinho especial ao longo desse percurso. Ao meu marido, Alessandro Rossi, por todo carinho, encorajamento e amor. À minha tia, Miriam Machado, pelo incentivo aos meus estudos. Ao Dr. André Bertran, pelo exemplo e motivação para ingressar nesse caminho acadêmico.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves, pelo grande apoio, orientação e incentivo ao meu desenvolvimento intelectual e profissional.

Ao Prof. Dr. Rolando André Rios Villacis pela parceria e orientação para a realização desse trabalho.

Aos colegas de trabalho e professores do laboratório Farmol e Gentox por todo apoio, dedicação e acolhimento,

À Escola Alvacir Vite Rossi por ter sido meu berço de estudos e, a todos os integrantes da Escola pela amizade, carinho e apoio.

Ao meu psicólogo Thiago Pigato por me acolher nos momentos difíceis de angústia e sofrimentos da vida.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Nada proporciona melhor capacidade de superação e resistência aos problemas e dificuldades em geral do que a consciência de ter uma missão a cumprir na vida.” Viktor Frankl.

RESUMO

O aumento do sedentarismo e da obesidade na sociedade vem evidenciando cada vez mais um importante problema de saúde pública, a Diabetes Mellitus tipo 2 (DM tipo 2). Apenas duas classes medicamentosas com ação sensibilizadora de insulina estão disponíveis, as biguanidas (metformina) e as tiazolidinadionas (TZD) ou glitazonas (pioglitazona). As TZDs exercem seus efeitos hipoglicemiantes ao se ligarem ao receptor ativado por proliferadores peroxissomais gama (PPAR γ), um receptor nuclear expresso em diferentes tecidos, no entanto esses medicamentos têm sido ligados a sérios efeitos adversos como insuficiência cardíaca congestiva e câncer de bexiga, reduzindo sua prescrição e uso. Nesse sentido, novos agonistas PPAR γ vem sendo desenvolvidos com o objetivos de se obter fármacos com atividades parciais, já que agonistas totais de PPAR γ acarretavam maiores efeitos adversos. Entretanto, os agonistas PPAR γ também podem ser utilizados para tratamento de outras condições, como por exemplo, para o tratamento da infertilidade na Síndrome dos Ovários Policísticos cuja a resistência a insulina está ligada a anovulação. Diante da escassez de estudos que analisem os efeitos tóxicos de agonistas PPAR γ em embriões de animais. Essa estudo teve por OBJETIVO: Analisar a toxicidade do GQ-16, em comparação com outras TZDs (rosiglitazona e pioglitazona), utilizando o peixe-zebra como modelo animal. MÉTODO: Realizou-se o teste de toxicidade aguda em embriões de peixe zebra (FET) com rosiglitazona, pioglitazona e GQ-16 em diferentes concentrações. Resultado: O GQ-16 e a pioglitazona apresentaram baixa toxicidade nos embriões de peixe-zebra ao contrário da rosiglitazona que levou a mortalidade de 100% dos embriões na maior concentração. Em concentrações mais baixas, a rosiglitazona apresentou alto índice de alterações no desenvolvimento embrionário principalmente edema pericárdio.

CONCLUSÃO: Os achados corroboram que o GQ-16, um agonista parcial PPAR γ , tem menor toxicidade que as outras tiazolidinadionas, porém mais estudos são necessários para elucidar potenciais benefícios e efeitos adversos desse novo ligante.

ABSTRACT

The increase in sedentary lifestyle and obesity in society has increasingly highlighted an important public health problem, Type 2 Diabetes Mellitus (Type 2 DM). Only two drug classes with insulin-sensitizing action are available, biguanides (metformin) and thiazolidinediones (TZD) or glitazones (pioglitazone). TZDs exert their hypoglycemic effects by binding to the peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), a nuclear receptor expressed in different tissues, however these drugs have been linked to serious adverse effects such as acquired congestive heart disease and bladder cancer.. In this sense, new PPAR γ agonists have been administered with the aim of obtaining drugs with partial activities, since total PPAR γ agonists caused greater adverse effects. However, PPAR γ agonist can be use for other conditions, such as the treatment of infertility in Polycystic Ovary Syndrome whose insulin resistance, wich is linked to anovulation. Given the literature gap of studies that analyze the toxic effects of PPAR γ agonists in animal embryos. This study had the OBJECTIVE: To analyze the toxicity of GQ-16, in comparison with other TZDs (rosiglitazone and pioglitazone), using zebrafish as an animal model. METHOD: Acute toxicity test in zebrafish embryos (FET) was performed with rosiglitazone, pioglitazone, and GQ-16 at different concentrations. Result: GQ-16 and pioglitazone showed low toxicity in zebrafish embryos unlike rosiglitazone which led to 100% mortality of embryos at the highest concentration. At lower concentrations, rosiglitazone showed a high rate of alterations in embryonic development, mainly pericardial edema. CONCLUSION: The findings support that GQ-16, a PPAR γ partial agonist, has less toxicity than other thiazolidinediones, but further studies are needed to elucidate potential effects and adverse effects of this new ligand.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fatores de risco do Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e as alterações patológicas que levam à perpetuação da disfunção da insulina....	26
Figura 2 – Complicações acarretadas pelo Diabetes Mellitus tipo 2..	30
Figura 3: Tratamento farmacológico da hiperglicemia de acordo com o local de ação e mecanismo.	31
Figura 4 - Estrutura geral de receptores nucleares	34
Figura 5 - Propriedades GQ-16.....	37
Figura 6 - Posição e orientação do GQ-16.....	37
Figura 7 – Estrutura química do GQ-16, troglitazona, pioglitazona e rosiglitazona.	38
Figura 8 – Peixe-zebra adulto	41
Figura 9: Fases do desenvolvimento embrionário do peixe-zebra.	42
Figura 10 – Representação da caixa utilizada para o cruzamento e coleta de embriões.	51
Figura 11 – (A) Peixe-zebra macho e (B) peixe-zebra fêmea..	51
Figura 12 - Esquema do procedimento de teste de toxicidade aguda em embrião de peixe-zebra	53
Figura 13 – Ilustração da distribuição de concentrações das TZD's utilizadas.....	55
Figura 14 - Letalidade e malformações.	57
Figura 15 – Porcentagem de mortalidade geral de embriões de peixe-zebra expostos a rosiglitazona em diferentes tempos.	66

Figura 16 – Concentração letal 50% (CL50) de embriões de peixe-zebra com rosiglitazona em 96h.	67
Figura 17 - – Porcentagem de alterações morfológicas em embriões de peixe-zebra expostos a rosiglitazona em diferentes tempos.	69
Figura 18 - Porcentagem de edema pericárdio em embriões de peixe-zebra com rosiglitazona em 48h, 72h e 96h.	71
Figura 19 - Porcentagem de deformação da cauda em embriões de peixe-zebra com rosiglitazona em 48h, 72h e 96h. As.	72
Figura 20 - Porcentagem de mortalidade geral de embriões de peixe-zebra expostos a pioglitazona em diferentes tempos.	74
Figura 21- – Porcentagem de alterações morfológicas em embriões de peixe-zebra expostos a pioglitazona em diferentes tempos.	76
Figura 22 - Porcentagem de edema pericárdio em embriões de peixe-zebra com pioglitazona em 48h, 72h e 96h..	78
Figura 23 - Porcentagem de mortalidade geral de embriões de peixe-zebra expostos ao GQ-16 em diferentes tempos.	79
Figura 24 - – Porcentagem de alterações morfológicas em embriões de peixe-zebra expostos ao GQ-16 em diferentes tempos.....	81
Figura 25 - Porcentagem de edema pericárdio em embriões de peixe-zebra com GQ-16 em 96h.	82
Figura 26 – Comparação da porcentagem de mortalidade entre os testes FET com exposição ao GQ-16 comparado a pioglitazona e a rosiglitazona em 96h nas concentrações de 25uM e 100uM.....	84
Figura 27 – Comparação da porcentagem de edema pericárdio em embriões de peixe-zebra expostos ao GQ-16, pioglitazona e rosiglitazona no período de 48h, 72h e 96h de experimento.	85
Figura 28 - Fotos ilustrativas das larvas de peixe-zebra expostas a rosiglitazona, pioglitazona e GQ-16 em 96h após a fertilização.	86

Figura 29 – Gráficos descrevem a eficiências dos primers utilizados. PPAR γ (93%), FABP4 (96%), GAPDH (102%).....	89
Figura 30 - Os gráficos descrevem as curvas melting para cada par de primer. FABP4, PPAR γ , GAPDH.	90
Figura 31 - Foto do gel de agarose 2% com os produtos amplificados pela PCR da validação dos primers.....	91
Figura 32 – Comparação da expressão relativa do PPAR γ em larvas de peixe-zebra expostos ao GQ-16 (25 e 100uM), pioglitazona (25uM e 100uM).	92
Figura 33 Comparação da expressão relativa do FABP4 em larvas de peixe-zebra expostos ao GQ-16 (25 e 100uM), pioglitazona (25uM e 100uM).	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Descrição dos primers seleccionados.	59
Quadro 2 – Quantificação das amostras de peixe-zebra	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF-1	-	função de ativação 1
AF-2	-	função de ativação 2
AGEs	-	produtos finais de glicação avançada
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AQP2	-	aquaporina 2
ATP	-	adenosina trifosfato
DBD	-	domínio de ligação ao DNA
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
EMA	-	European Medicines Agency
ENaC	-	canal de sódio epitelial
EPM	-	erro padrão da média
ERO	-	espécies reativas do oxigênio
EUA	-	Estados Unidos
FDA	-	Food and Drug Administration
FET	-	Teste de embriotoxicidade
H12	-	Hélice 12
H3	-	hélice 3
IAM	-	infarto agudo do miocárdio
IL-1	-	interleucina 1
IL-18	-	interleucina 18
IL-1 β	-	interleucina beta
IL-6	-	interleucina 6
I κ B α	-	inibidor de células B alfa
LBD	-	Domínio de Ligação ao Ligante
LPS	-	lipopolissacarídeo
miRNA	-	microRNA
NEFA	-	Ácidos graxos livres não esterificados
Nrf2	-	fator nuclear de transcrição NF E2
OECD	-	Organisation for Economic Cooperation and Development

PPAR γ	-	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomo gama
PKC	-	proteína quinase C
PPREs	-	Elementos responsivos específicos
RE	-	retículo edoplasmático
ROS	-	espécies reativas de oxigênio
RT-qPCR	-	reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa
RXR	-	receptor X-retinóide
TNF- α	-	fator de necrose tumoral alfa
Type2 DM	-	Type 2 Diabetes Mellitus
TZD	-	tiazolidinadionas
UFPE	-	Universidade Federal de Pernambuco
uM	-	Micromolar
VCAM-1	-	molécula de adesão celular vascular solúvel-1
VLCAD	-	acil-CoA desidrogenase

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	25
1.1.	DIABETES MELLITUS.....	25
1.2	TIAZOLIDINADIONAS	32
1.3	O MODELO EXPERIMENTAL COM PEIXE-ZEBRA (<i>Danio rerio</i>)	41
2.	OBJETIVOS	48
2.1	OBJETIVO GERAL.....	48
2.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
3.	MÉTODOS	49
3.1	PROTOCOLO DE PESQUISA.....	49
3.2	TESTE DE EMBRIOTOXICIDADE AGUDA EM PEIXES-ZEBRA (FET).	49
3.3	ENSAIOS DE ANÁLISES GENÔMICAS (RT-PCR).....	58
4.	RESULTADOS.....	64
4.1	Rosiglitazona teste FET.....	64
4.2	Pioglitazona teste FET	73
4.3	GQ-16 teste FET	77
4.4	Comparação GQ-16 com pioglitazona e rosiglitazona.	83
4.5	Resultados da análise de expressão gênica.....	86
5.0	DISCUSSÃO.....	94
6.0	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	103
7.0	CONCLUSÃO	105
8.0	REFERÊNCIAS	106
ANEXOS	114	

Avaliação da toxicidade do GQ-16, um novo ligante agonista do receptor ativado por proliferadores de peroxissomo gama (PPAR γ), em comparação com outras tiazolidinadionas em peixe-zebra (*Danio rerio*)

1. INTRODUÇÃO

1.1. DIABETES MELLITUS

O aumento do sedentarismo e da obesidade na sociedade vem evidenciando cada vez mais um importante problema de saúde pública mundial, o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2)(1). A prevalência de DM2 no mundo vem crescendo de maneira assombrosa. Em 2000, estimou-se que cerca de 171 milhões de pessoas eram portadoras, e a projeção para 2030 era de que a doença acometeria por volta de 366 milhões de indivíduos no mundo(2).

Surpreendentemente em 2017, os números apontaram a prevalência de 462 milhões portadores de DM2 com estimativa de aumento é de 7.079 por 100.000 habitantes até 2030(3), em 2021 os números alcançaram 537 milhões de pessoas no mundo(4). Assim sendo, o DM2 é reconhecido como um sério problema, já que acarreta considerável impacto na capacidade funcional, na qualidade de vida, na morbidade e por fim na mortalidade precoce(1, 4).

O diabetes é considerado um grupo de doenças metabólicas caracterizada pela hiperglicemia duradoura, que pode ser secundária à resistência às ações da insulina no fígado e nos tecidos, bem como a secreção insuficiente de insulina pelas células β pancreáticas ou ambos os mecanismos(5). Existem diferentes classificação do diabetes, sendo de suma importância sua caracterização para a escolha da terapia adequada, monitorização e rastreamento de comorbidades associadas. Dentre estas, destacam-se dois tipos de maior interesse, o tipo 1 e o tipo 2(5).

O Diabetes tipo 1 é principalmente caracterizado pela destruição de células β levando a insuficiência absoluta na produção de insulina, podendo ser idiopática ou mais comumente de causa imuno-mediada(6). Este tipo corresponde a cerca de 5-10% dos casos totais de portadores de diabetes(4).

O DM2 corresponde a cerca de 90-95% dos casos totais de diagnóstico de diabetes(4) e tem como característica a resistência à insulina em associação a deficiência de secreção de insulina(5). No entanto o espectro de manifestação desse tipo de diabetes é variável, podendo ter maior predomínio da resistência à insulina ou maior predomínio do defeito de secreção da insulina(7).

Esse mau funcionamento da ação da insulina e da secreção da insulina pode resultar em altos níveis de glicemia. No caso da disfunção celular (células β), a redução da secreção de insulina, acarreta a falta de capacidade de manter o nível de glicose normal, enquanto, a resistência à insulina contribui para o aumento da produção de glicose no fígado e reduz a sua captação no músculo, fígado e adipócitos(8).

Embora tradicionalmente se discuta esses dois mecanismos principais, sabe-se que há uma complexa rede de interações entre vias metabólicas em conjunto com fatores genéticos e ambientais para o desenvolvimento do DM2(7). Há os fatores não modificáveis como etnia, histórico familiar e predisposição genética, e, os fatores modificáveis como obesidade, dieta não saudável e sedentarismo (Figura 1)(8).

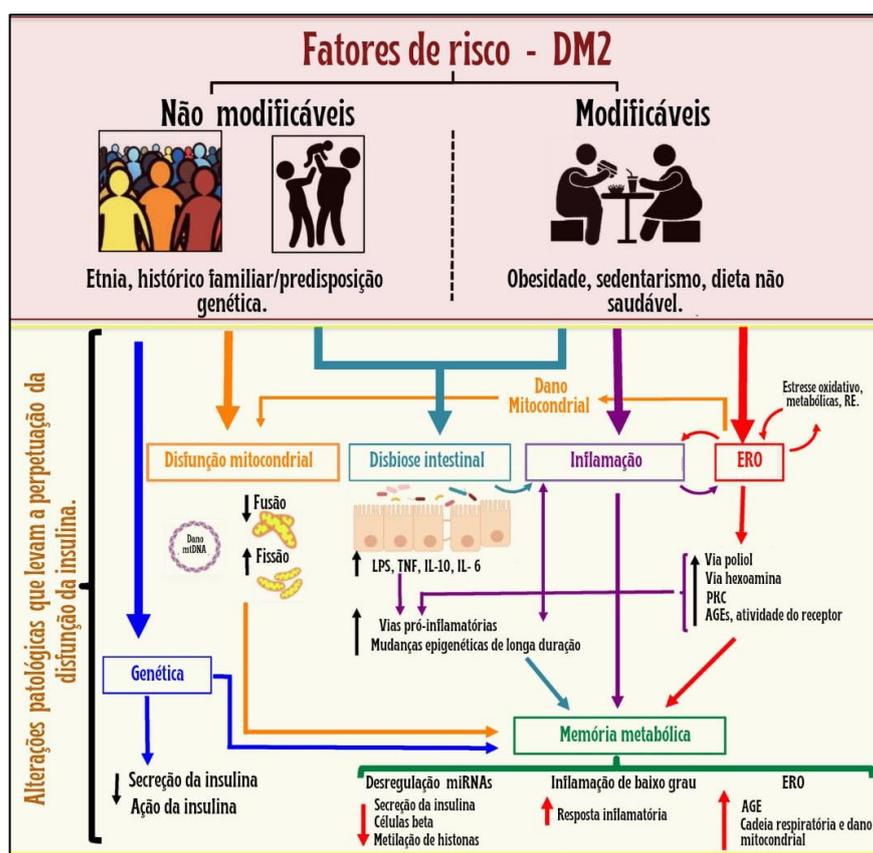


Figura 1 - Fatores de risco do Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e as alterações patológicas que levam à perpetuação da disfunção da insulina. Combinações complexas de fatores genéticos, metabólicos e ambientais que interagem entre si constituem tanto fatores de risco não modificáveis (etnia e história familiar/predisposição genética) quanto modificáveis (obesidade, baixa atividade física e dieta não saudável). Esses estados afetam a função celular resultando em uma complexa rede de alterações patológicas que influenciam mutuamente e levam à perpetuação da disfunção da insulina. ROS: espécies reativas de oxigênio; RE: retículo endoplasmático; AGEs: produtos finais de glicação avançada; PKC: proteína quinase C; LPS: lipopolissacarídeo; miRNA: microRNA. Fonte: Galicia-Garcia et al. 2020. Adaptado pela autora.

Ressalta-se que a maior parte dos pacientes portadores da DM2 também apresentam alguma desordem ponderal, seja sobrepeso ou obesidade(9). Apesar da influência genética contribuir como fator de risco de maneira significativa, diversos estudos clínicos vêm sugerindo que os casos de DM2 podem ser prevenidos ou até mesmo entrar em estado de remissão se ocorrer a mudança para hábitos saudáveis com dieta e exercícios(10).

A falta de atividade física e a ampliação dos comportamentos sedentários está ligado ao aumento de marcadores de inflamação sistêmica crônica de baixo grau(11). Essa inflamação (Figura 1) se refere a uma condição subclínica, na qual o processo inflamatório se perpetua na presença de injúrias, contribuindo para o desenvolvimento de doenças crônicas, além de ser um fator de risco independente para a mortalidade(12). A exemplo desses biomarcadores, pode ocorrer o aumento da interleucina 6 (IL-6), da proteína C reativa (PCR), do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e da IL-1. A IL-1 participa da resposta autoimune às células β no pâncreas, da inibição da função das células β e da ativação do fator de transcrição do fator de transcrição da cadeia leve kappa do fator nuclear de células B ativadas (NF- κ B), inibindo assim a função das células β e promovendo a apoptose(8).

Estudos vem sugerindo que a resolução dessa inflamação pode prevenir o DM2 na obesidade(13). Um estudo mostrou que a restrição calórica e a perda de peso mediada pelo exercício físico em camundongos obesos com DM2 estava associado a redução da expressão do inflamassomo Proteína 3 que Contém Domínio de Pirina da Família NLR (NLRP3), responsável pela produção de IL-1 β e IL-18, em tecido adiposo, bem como diminuição da inflamação e melhora da sensibilidade a insulina(14).

De fato, o exercício físico aumenta os níveis de citocinas anti-inflamatórias como o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra), o receptor solúvel de TNF (s-TNF-R) que são antagonistas de IL-1 e TNF- α (15), além da redução de IL-6, IL-18 e PCR pró inflamatórias(16).

Outro interessante modulador glicêmico liberado pelo exercício físico, é a irisina, um peptídeo hormonal que regula a tolerância a glicose, a qual encontra-se em níveis mais baixos em pacientes com diabetes tipo 2(17). Esse

peptídeo hormonal é secretado pelos músculos e adipócitos em respostas a atividade esportiva(17). Uma recente revisão sistemática com meta-análise analisou 24 estudos randomizados (921 participantes) com objetivo de avaliar os níveis de irisina em resposta a atividade física em indivíduos DM2. O resultado demonstrou que o exercício físico aumentou significativamente os níveis de irisina circulante ($p=0.005$), reduziu insulina ($p< 0.00001$) e glicose ($p < 0.00001$), além da resistência à insulina ($p< 0.00001$)(18).

O exercício físico também atua na síntese de antioxidantes (glutathione) e algumas enzimas, que a longo prazo reduzem os níveis de radicais livres. É importante ressaltar que a geração exacerbada de espécies reativas do oxigênio (ERO) proveniente principalmente da dieta desbalanceada rica em triglicerídeos, também mobiliza moléculas inflamatórias, o que de maneira sinérgica aumenta o estresse oxidativo (Figura 1). Esse ambiente pró-oxidante pode levar a disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático, ativação da NADPH oxidase e produção de superóxido (O_2^-)(8).

A alimentação também tem impacto na microbiota intestinal (Figura 1) o que pode contribuir para a patogênese do DM2(8). Recentemente houve um aumento do interesse das pesquisas em estudar os mecanismos e atribuições da microbiota intestinal em doenças crônicas, visto que participam da modulação do sistema imunológico, da resposta inflamatória e da síntese metabólica. A dieta hiperlipídica pode aumentar em até três vezes a produção de lipopolissacarídeos constituintes de bactérias Gram-negativas, que por conseguinte contribuem para a inflamação de baixo grau. Além disso, essa disbiose intestinal pode reduzir a síntese de ácidos graxos de cadeia curta que é responsável pela integridade da barreira intestinal, proliferação de células β pancreáticas e biossíntese de insulina. A alteração da flora intestinal também pode alterar a formação de aminoácidos ramificados e trimetilamina levando ao comprometimento da homeostase da glicose(8).

É interessante, ressaltar que mesmo diante da normalização da glicemia, seja pela mudança de estilo de vida ou pela terapia medicamentosa, a memória metabólica pode se perpetuar dando origem e/ou continuidade nas complicações do DM2(8). A memória metabólica envolve quatro mecanismos:

epigenética, estresse oxidativo, glicação não enzimática de proteínas e inflamação crônica. Destaca-se as evidências crescentes da regulação pós-transcricional mediada por microRNA's (miRNA) em diferentes aspectos, desde a diferenciação celular, sinalização mediada por citocinas e fatores de crescimento, metabolismo de glicose e síntese e secreção de insulina de células β (19) . Assim, a desregulação da expressão de miRNA (Figura 1) pode prejudicar diretamente a função das células β , levando ao desenvolvimento de DM2(20) .

Os sintomas mais comuns que sinalizam o estado hiperglicêmico, são poliúria (aumento do volume de produção de urina), polidipsia (sede excessiva), perda de peso, polifagia (aumento da fome), visão embaçada e aumento da susceptibilidade a infecções(5).

Consequências agudas graves estão relacionadas ao aparecimento de cetoacidose (quando o organismo realiza lipólise para obtenção de energia, gerando a partir da oxidação de ácidos graxos, acetil-CoA. Em excesso esse processo passa a gerar corpos cetônicos e acetona como produto). Outro importante risco à vida é a síndrome hiperosmolar não cetótica caracterizada por uma hiperglicemia grave, aumento acentuado da osmolalidade sérica, desidratação sem acúmulo significativo de cetoácidos(21).

A cronificação da hiperglicemia está associada a diversas complicações a longo prazo, afetando diferentes órgãos e tecidos nobres como, coração, rins, nervos, olhos e vasos sanguíneos. Esses danos causados pela hiperglicemia podem acarretar disfunções do órgão, podendo evoluir até a falha por completo.(5)

Em termo de complicações de longo prazo (Figura 2), a diabetes pode acarretar retinopatias e perda de visão; nefropatias levando a insuficiência renal, neuropatias, risco de úlceras, amputação de membros; disfunções autonômicas dos sistemas cardiovascular, gástrico, geniturinário e sexual(5).

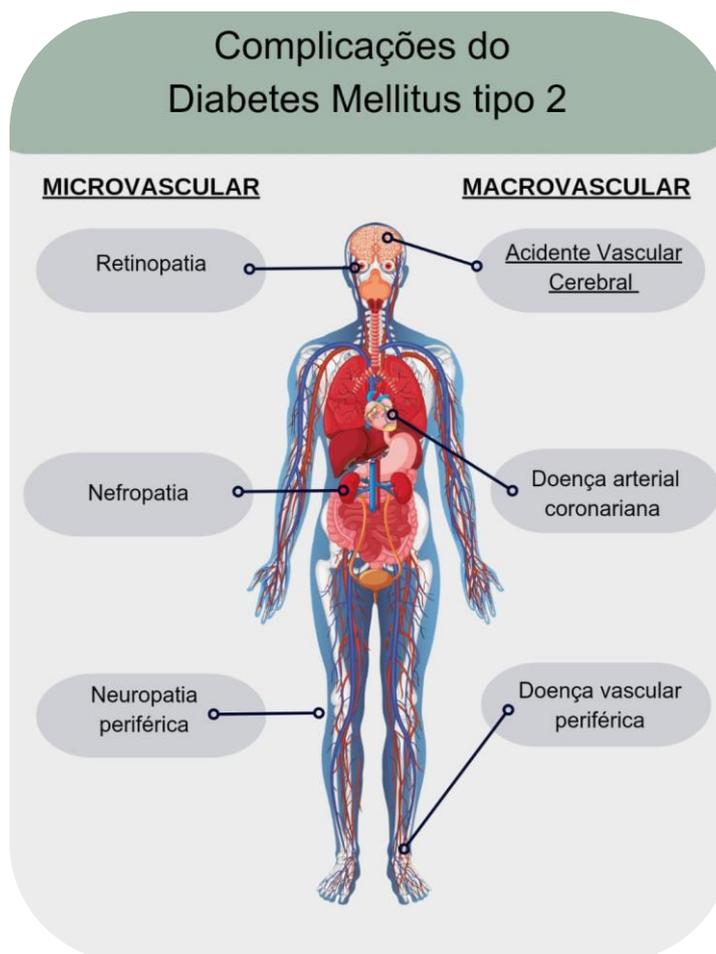


Figura 2 – Complicações acarretadas pelo Diabetes Mellitus tipo 2. Complicações microvasculares: retinopatia, nefropatia, neuropatia periférica. Complicações macrovasculares: Acidente vascular cerebral, Doença arterial coronariana, Doença vascular periférica. Fonte: Elaborado pela autora.

O tratamento do DM2 é imprescindível para evitar o aparecimento de complicações. As medidas não farmacológicas são de grande importância, no entanto muitas barreiras podem influenciar a sua adesão, visto que é muito difícil a mudança comportamental de hábitos já consolidados(22). Desse modo, as medidas farmacológicas têm um papel imprescindível no tratamento do DM2.

Existem diversos fármacos destinados ao tratamento do diabetes (Figura 3), entretanto, atualmente no mercado apenas duas classes medicamentosas com ação sensibilizadora de insulina estão disponíveis, as biguanidas (metformina) e as tiazolidinadionas – TZD ou glitazonas (pioglitazona).

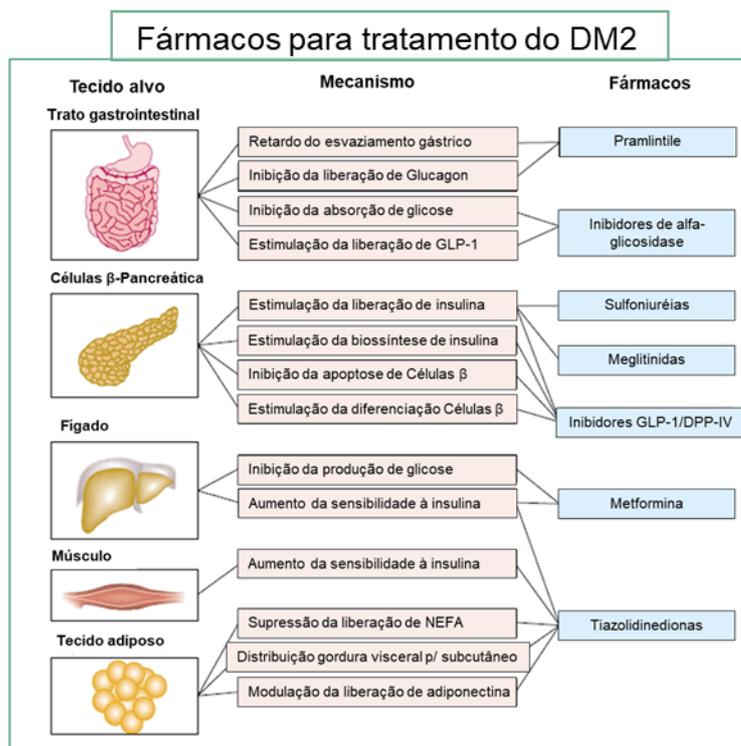


Figura 3: Tratamento farmacológico da hiperglicemia de acordo com o local de ação e mecanismo. GLP1=peptídeo 1 semelhante ao glucagon. DPP-IV=dipeptidil peptidase IV. Ácidos graxos livres não esterificados (NEFA) Stumvoll. et al, 2005. Adaptado pela autora.

A metformina é um dos medicamentos de primeira linha de tratamento do diabetes, no entanto vários estudos avaliando a adesão aos medicamentos para diabetes relataram que a metformina tem as menores taxas de adesão quando comparada com outros antidiabéticos orais(23), em parte, os efeitos adversos gastrointestinais contribuem para esse fenômeno(24, 25).

Como alternativa farmacológica sensibilizadora de insulina, as tiazolidinadionas (TZDs) podem ser indicadas como segunda ou terceira linha de tratamento do DM2. Entretanto, precauções devem ser tomadas levando em consideração os fatores de risco do paciente para desenvolvimento de efeitos adversos presentes nessa classe.

1.2 TIAZOLIDINADIONAS

As TZDs foram desenvolvidas por volta de 1980 no Japão(26) e introduzidas no mercado na década de 1990. A primeira glitazona foi a troglitazona, essa, no entanto, foi removida da comercialização em 1999 após ter sido associada a hepatotoxicidade(26, 27).

Contudo, essa toxicidade pode estar associada a outros alvos da troglitazona, como 3-oxo-5-beta-esteroide4-desidrogenase, colagenase neutrófilos, estromelisina-1 e acil-CoA desidrogenase de cadeias muito longas (VLCAD)(27), não estando associada a classe farmacológica(26).

A segunda glitazona a ser comercializada foi a rosiglitazona. Sua aprovação pela agência regulatória dos Estados Unidos, *Food and Drug Administration* (FDA), para o tratamento do DM2 se deu em 1999. Porém em 2007, houve a publicação de uma meta-análise que incluiu 42 estudos clínicos, cujo resultado conectava a rosiglitazona ao aumento de risco de infarto agudo do miocárdio (IAM) e morte por causas cardiovasculares(28).

Em 2010, a meta-análise foi atualizada com novos dados, e os resultados mostraram que não houve aumento de risco de morte por causas cardiovasculares no entanto o aumento de 28% de risco de desenvolvimento de IAM permaneceu(29).

Nesse mesmo ano, as agências regulatórias de medicamentos, FDA, *European Medicines Agency* (EMA), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) entre outras, retiraram a rosiglitazona da comercialização.

A pioglitazona é a única que restou no mercado brasileiro, entretanto, alguns estudos chamam a atenção sobre uma possível associação deste medicamento com o aumento de risco de desenvolver câncer de bexiga, por conta dessa repercussão, seu uso foi suspenso em outros países(30).

A agência sanitária francesa suspendeu o uso de pioglitazona em 2011, bem como na Índia, Alemanha e Japão(30), já no Brasil, seu uso não foi suspenso, porém a prescrição vem caindo em desuso.

No entanto a pioglitazona pode ser utilizada no tratamento da Síndrome de Ovários Polícísticos, sendo um dos fatores que também contribui para sua permanência no mercado. Essa síndrome é caracterizada por anovulação crônica e hiperandrogenismo, no qual o principal mecanismo envolvido é a resistência à insulina nos ovários podendo levar a infertilidade(31). Dessa forma, a pioglitazona pode ser indicada para mulheres com ovário policístico que desejam engravidar.

As TZDs exercem seus efeitos hipoglicemiantes ao se ligarem ao fator de transcrição do receptor ativado por Receptores dos Proliferadores Peroxissomais gama (PPAR γ), um receptor nuclear, expresso principalmente em tecidos adiposos e, em quantidades singelas, no estômago, intestino, bexiga, rim, baço, adrenal, fígado, pulmão, cérebro, coração e vasos sanguíneos(32).

Os receptores nucleares ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) são fatores de transcrição ativados por ligantes pertencentes a família de receptores nucleares hormonais, que regulam genes cruciais para diferenciação celular e uma variedade de processos metabólicos, como glicose e homeostase lipídica(33).

A família dos PPARs consiste em três diferentes isotipos: PPAR α , PPAR β / δ , e PPAR γ , sendo que esses três têm diferentes distribuição tecidual, atividade biológica e afinidade por ligantes(33).

A estrutura dos receptores nucleares é altamente conservada (Figura 4) e apresenta os seguintes domínios funcionais: A região amino-terminal contém um domínio de ativação independente do ligante, denominado função de ativação 1 (AF-1) (domínio- A/B), um domínio de ligação ao DNA (DBD – domínio C) apresenta dois segmentos estruturais conhecidos como “dedos de zinco, a qual sua estrutura tridimensional consiste de doze hélices alfa e quatro folhas beta pregueadas que delineiam um bolso (pocket) de ligação hidrofóbico, em forma de Y, a região de dobradiça (hinge – domínio D) (34).

A região carboxi-terminal ou Domínio de Ligação ao Ligante – LBD, localizado na hélice 12 (H12), que reconhece ligantes, essa região tem papel em diversas funções em sua maioria induzida por ligantes, como a função de

ativação 2 (AF-2), dimerização e interação com cofatores da transcrição(34). Além disso, alguns receptores nucleares apresentam o domínio F(35, 36).

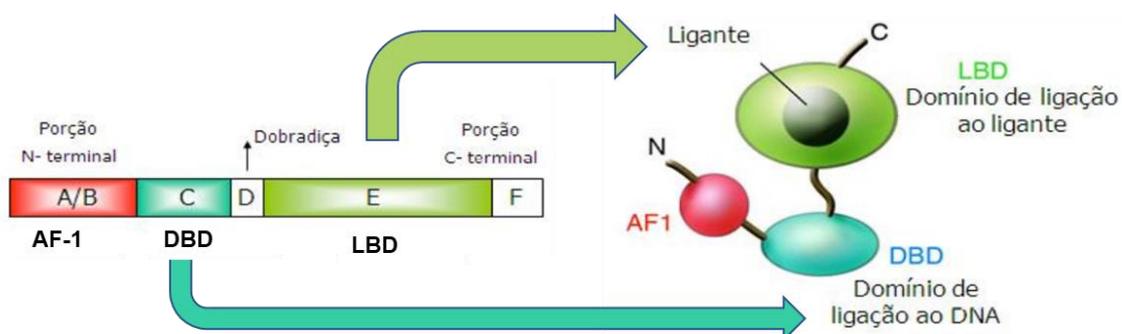


Figura 4 - Estrutura geral de receptores nucleares, indicando a região amino-terminal (domínio A/B, em que se encontra o domínio função de ativação 1 ou AF-1, implicado na transativação independente do ligante), domínio de ligação ao DNA (DBD, domínio C), região de dobradiça (hinge, domínio D), região carboxi-terminal ou domínio de ligação ao ligante (LBD, domínio E), e domínio F. As setas indicam a representação da estrutura das regiões amino (N) e carboxi-terminais (C), AF-1, DBD e LBD com ligante. Fonte: Glass, C.K et al, 2006. Adaptado pela autora.

Os PPARs podem regular a transcrição gênica por meio de três mecanismos: a repressão independente do ligante, a ativação transcricional e a transrepressão, sendo os dois últimos mecanismos dependentes de ligantes.

Para a atividade transcricional, os PPARs precisam heterodimerizar com o receptor X-retinóide (RXR) (37). Assim, após a ativação, os heterodímeros PPAR-RXR podem se ligar a sequências específicas de DNA chamadas elementos responsivos específicos (PPREs), que por sua vez estimulam a transcrição de genes-alvo(37, 38).

Enquanto não ocorre a ativação por ligante, o complexo PPAR-RXR fica ligado ao PPRES em conjunto com complexo de proteínas co-repressoras, assim impedindo a transcrição gênica(37). A ativação na presença de ligante ocasiona uma mudança conformacional, a H12 é estabilizada e fechada, permitindo que ocorra a dissociação dos co-repressores e a associação com

proteínas co-ativadoras o que recruta a maquinaria de transcrição para o promotor do gene-alvo, iniciando a transcrição do gene desejado(37).

Na Transrepressão dependente do ligante, os PPARs podem suprimir a expressão de genes por diferentes mecanismos, como por exemplo, ligando-se diretamente a outros fatores de transcrição(39).

O PPAR α é altamente expresso no músculo, coração, rim, fígado e intestino delgado e grosso, sendo um alvo de fármacos hipolipidêmicos, fibrato, implicados principalmente no catabolismo de ácidos graxos e sua oxidação. O PPAR β/δ é expresso no músculo esquelético, fígado, rim, tecido adiposo e intestino(38), e também participa da homeostase lipídica, regulação da oxidação de ácidos graxos, inflamação e equilíbrio do colesterol e glicose no sangue(38).

Atualmente o PPAR γ é um dos isotipos mais estudados visto seu papel no desenvolvimento de doenças como aterosclerose, obesidade, síndrome metabólica, dislipidemias, DM2 e câncer(33). O PPAR γ são fatores de transcrição induzíveis por ligantes envolvidos na regulação da expressão de genes, como: sensibilidade à glicose (IRS-1, IRS-2, GLUT-4 e PI3K), captação e mobilização de ácidos graxos (FAT/CD36, FABPs e LPL) e síntese de triglicerídeos (ACSL, GK e PEPCK). Além disso, o PPAR γ induz a expressão de proteínas mitocondriais, como CPT-1 e UCPs, que desempenham um papel importante na regulação do metabolismo mitocondrial(33).

O PPAR γ tem duas isoformas em camundongos e quatro diferentes isoformas em humanos. Os ácidos graxos insaturados e seus metabólitos são os principais moduladores naturais do PPAR γ e, quando ativado por esses ligantes naturais regula a adipogênese e a distribuição de gordura, os níveis de adipocinas como a adiponectina, que envolvem a sensibilidade à insulina e o metabolismo de lipídios e glicose(33).

Como já citado anteriormente, as TZDs são agonistas totais do receptor PPAR γ , tanto a rosiglitazona quanto a pioglitazona apresentam alta afinidade pelo receptor, embora ambas tenham como alvo a mesma isoforma de PPAR, dados demonstram respostas variáveis entre estes agonistas sobre os triglicerídeos(40). A pioglitazona apesar da alta seletividade pelo PPAR γ

também exerce atividade sobre o PPAR α , responsável por regular genes-alvo inflamatórios como, o fator nuclear do potencializador do gene do polipeptídeo leve kappa em inibidor de células B alfa (IkB α) e a molécula de adesão celular vascular solúvel-1 (VCAM-1)(40).

Uma vez que o uso de agonistas totais do PPAR γ no tratamento do DM2 tem sido associado a vários efeitos adversos negativos, o desenvolvimento de novos candidatos alternativos como ligantes do PPAR γ tem recebido muita atenção nos últimos anos.

Um potencial fármaco agonista parcial do PPAR γ , sintetizado pela Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, o GQ-16 (5-(5-bromo-2-metoxibenzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona)(41), é um candidato a exercer o efeito benéfico de sensibilização à insulina com menos efeitos adversos (41).

Em células de pró-monócitos humanos U-937 cotransfectadas com o vetor de expressão do PPAR γ (Figura 5A), demonstrou-se que a atividade máxima do GQ-16 no receptor foi de 50% quando comparada a atividade exercida pela rosiglitazona, indicando assim ser um agonista parcial do receptor PPAR γ (41).

Quando testado em camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica, surpreendentemente o GQ-16 foi capaz de exercer sua atividade no receptor sem promover ganho ponderal (Figura 5B) e retenção hídrica (Figura 5C) como é observado com a rosiglitazona(41).

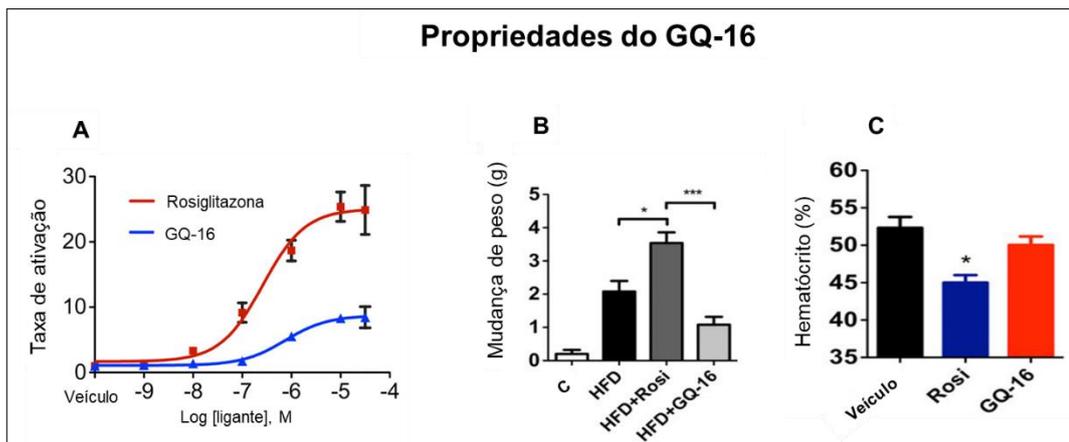


Figura 5 - Propriedades GQ-16. Para: A – Transativação do gene repórter baseado em PPAR γ com rosiglitazona (rosi) e GQ-16; B – Alteração de peso promovido em camundongos com dieta hiperlipídica (HFD) e tratamento com rosi ou GQ-16; C – Alteração no hematócrito de camundongos em tratamento com rosi e GQ-16. Fonte: Amato, A. A. et al. 2012.

Esses achados podem ser explicados pela maneira com que o GQ-16 se liga ao receptor PPAR γ (Figura 6). Enquanto a rosiglitazona se liga de forma perpendicular a hélice 3 (H3), e realiza contato direto com a Hélice 12 (H12) através de uma ligação de hidrogênio com o resíduo Tyr473, estabilizando esta hélice, o GQ-16 ocupa uma direção paralela à hélice 3, e não realiza contato direto com a H12(41).

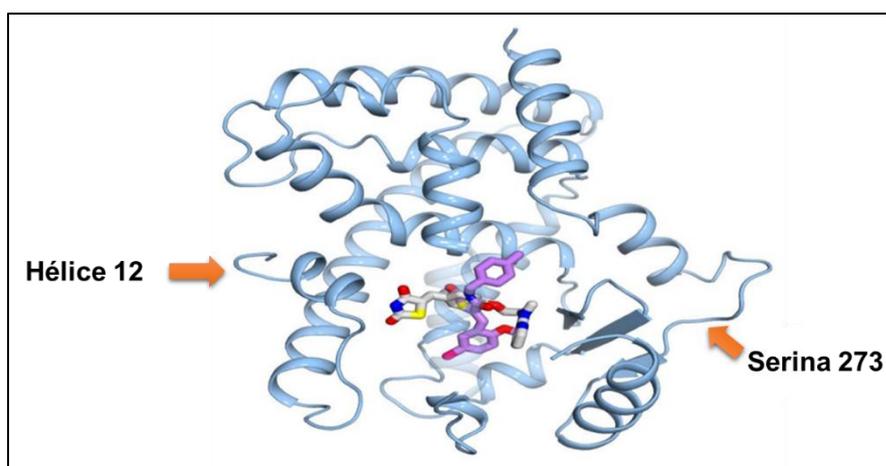


Figura 6 - Posição e orientação do GQ-16 (cor roxa) e rosiglitazona (nas cores branco, azul, amarelo e vermelho) na ligação à região LBD. A rosiglitazona se liga perpendicular à hélice 3, enquanto o GQ16 está paralelo. Fonte: Amato, A. A. et al. 2012.

Além disso, a ligação do GQ-16 ao LBD do PPAR γ é mais eficiente em estabilizar a H3, a porção inferior da curva formada pelas hélices H11 e H12, bem como as regiões do folheto beta pregueado em que se localizam a serina 273, sugerindo que essa propriedade protege a serina 273 da fosforilação (Figura 6) mediada pela Cdk5, exercendo sua eficácia(41).

Quando observamos a estrutura química do GQ-16(Figura 7) comparado as outras TZDs, percebemos na posição 5 o anel 5-bromo-2-metoxi-benzilideno e na posição 3, o anel 4- metil-benzil, sendo bem diferente das outras TZDs que apresentam na posição 5 um grupo benzila. Em comum, a estrutura química das TZDs (Figura 7) é composta por anéis heterocíclicos derivados do anel tiazolidínico composto por cinco membros com grupos carbonila nas posições 2 e 4. Esse anel é responsável pela atividade anti-hiperglicêmica, enquanto que o restante da molécula pode conter substituições variáveis as posições 2, 3 e 5, o que traz alteração na estrutura e nas propriedades da tiazolidinadionas(42).

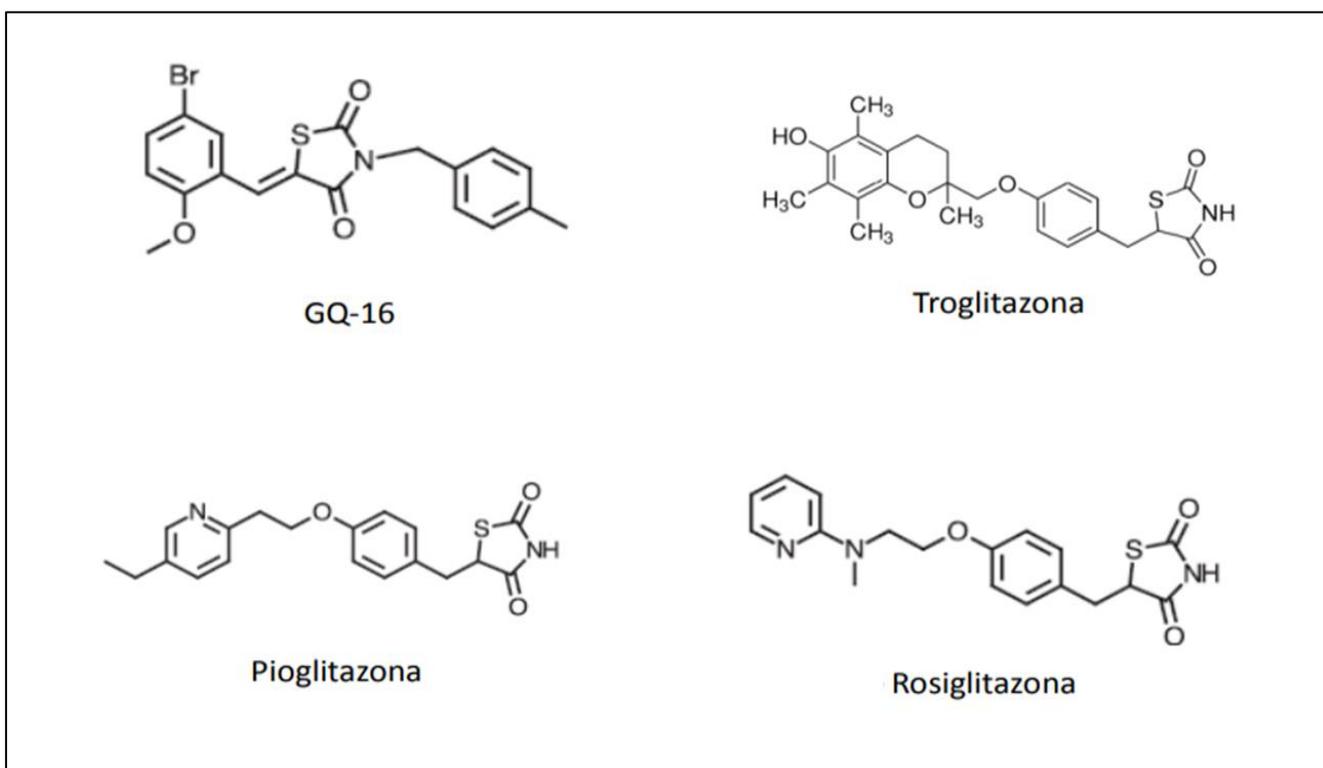


Figura 7 – Estrutura química do GQ-16, troglitazona, pioglitazona e rosiglitazona.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os estudos com GQ-16 até o presente momento foram realizados utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* com animais mamíferos (camundongos). Os modelos de estudo com animais mamíferos, são caros, trabalhosos, e, mais recentemente, têm reverberado grandes dilemas sociais e éticos(43). Esses fatos têm estimulado o desenvolvimento de métodos alternativos de pesquisa, como é o caso do modelo de peixe-zebra, tanto embriões quanto em peixes adultos(43). A utilização do peixe-zebra tem ganhado a atenção de pesquisadores por apresentar vantagens de custo, facilidade de manipulação, alta similaridade com vias metabólicas humanas, rápida reprodução e desenvolvimento. Em especial, esse modelo é bastante utilizado para avaliar a toxicidade de agentes agroquímicos em embriões, no entanto, mais recentemente seu uso para avaliação de toxicidade de compostos farmacêuticos aumentou bastante(44).

Uma das grandes relevâncias da realização de estudos de agonistas PPAR γ na embriogênese, é sua utilização para o tratamento de infertilidade em mulheres com síndrome dos ovários policísticos. Sabe-se a pioglitazona tem risco C durante a gravidez (risco C: não foram realizados estudos em animais e nem em mulheres grávidas; ou então, os estudos em animais revelaram risco, mas não existem estudos disponíveis realizados em mulheres grávidas), dessa forma, poucos estudos avaliaram o efeito da pioglitazona em embriões de animais.

Nesse contexto, a literatura é escassa na avaliação de toxicidade de agonistas dos receptores PPAR γ em embriões de mamíferos. Um estudo realizado por Chan, L. Y., e Lau, T. K. 2006, com rosiglitazona observou que não houve nenhum efeito significativo quanto a morfologia e desenvolvimento de embriões de rato em cultura *in vitro* mesmo em altas concentrações. No entanto os embriões foram expostos entre 9,5-11,5 dias de vida(45).

De encontro, mais recentemente, Moghadam F. et al. 2021, realizou um estudo com embriões de camundongos objetivando verificar se a rosiglitazona antagonizava os efeitos deletérios do lipopolissacarídeo (LPS) no desenvolvimento embrionário. O resultado mostrou que a rosiglitazona em

doses baixas apresentava efeito protetor, porém em altas doses exercia efeitos de atraso no desenvolvimento desses embriões(46).

Em relação a pioglitazona, em baixas concentrações foi observado em alguns estudos efeitos positivos, como melhora da maturação de oócitos suínos e melhora no desenvolvimento desses embriões principalmente por aumentar o metabolismo lipídico e a defesa antioxidante nos oócitos (47).

Camundongos expostos ao peróxido de hidrogênio durante o período embrionário apresentam importante diminuição do seu desenvolvimento. Contudo, se esses animais for adicionado o uso de pioglitazona ocorrerá recuperação do desenvolvimento do embrião, diminuindo também significativamente os níveis de espécies reativas do oxigênio, principalmente por aumentar a expressão de fator nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2)(48).

Outro estudo, com embriões de rato mostrou que a pioglitazona não afetou adversamente o desenvolvimento de embriões murinos cultivados, mas a ciglitazona diminuiu significativamente a produção de do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)(49)

Dados de embriotoxicologia foram encontrados apenas nas informações prestadas pelo próprio fabricante indicando os seguintes achados: pioglitazona não foi teratogênica em ratos para doses orais até 80 mg ou em coelhos recebendo até 160 mg/kg durante a organogênese (aproximadamente 17 e 40 vezes a dose oral máxima em mg/m² recomendada para humanos, respectivamente). Parto demorado e embriotoxicidade foram observados em ratos em doses orais > 40 mg/kg/dia (aproximadamente 10 vezes a dose oral máxima em mg/m² recomendada para humanos). Nenhuma toxicidade funcional ou comportamental foi observada na prole de ratos. Embriotoxicidade foi observada em coelhos para uma dose oral de 160 mg/kg (aproximadamente 40 vezes a dose oral máxima em mg/m² recomendada para humanos). Atraso de desenvolvimento pós-natal atribuído ao decréscimo de peso corporal foi observado na prole de ratos para doses orais > 10 mg/kg durante os períodos de final da gestação e lactação (aproximadamente 2 vezes a dose oral máxima em mg/m² recomendada para humanos (50).

Diante disso, tendo em vista que os modelos de embriogênese com mamíferos são árduos, e um novo modelo animal, utilizando embriões de peixe-zebra tem sido utilizado para triagens toxicológicas, é importante considerá-lo para testagem de novos agonistas PPARy.

1.3 O MODELO EXPERIMENTAL COM PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)

O peixe-zebra (*Danio rerio*) foi usado pela primeira vez para pesquisa na década de 1960, no entanto, somente vinte anos depois quando George Streisinger demonstrou a facilidade e o alto rendimento das manipulações genéticas no peixe-zebra ganhou maior atenção(51).

Esse peixe é vertebrado (Figura 8) sendo uma espécie de água doce nativa do sul da Ásia(44). Também está amplamente distribuída na Índia, Bangladesh e planície do Nepal. Pertence a Cyprinidae que inclui o danios e farpas. Os adultos são dimórficos, e a diferenciação entre machos e fêmeas se dá por características sutis como: as fêmeas são ligeiramente maiores, mais prateadas e com barriga arredondada, enquanto os machos são mais dinâmicos, coloridos e mais magros(52).



Figura 8 – Peixe-zebra adulto(53).

O tamanho pequeno desses peixes (cerca de 3 cm), permite que muitos animais possam ser acondicionados em espaços pequenos. Não sendo necessários grandes alojamentos como ocorre para acomodar animais mamíferos. Os requisitos para manutenção desses animais são relativamente simples, dependentes de uma instalação de sistema aquático automatizado(51).

Um casal de peixe-zebra pode colocar aproximadamente 200 ovos (embriões)(52). Os embriões em desenvolvimento inicial são transparentes e

se desenvolvem externamente, facilitando observações de movimentos celulares, desenvolvimento de órgãos e função do órgão, o que é atraente para a pesquisa, já que é possível realizar os testes nos primeiros estágios de vida desses animais.

Resumidamente o desenvolvimento embriológico desses animais se dá da seguinte forma (Figura 9): Após a fertilização, o embrião do peixe-zebra passa por uma série de clivagens rápidas. Na temperatura de 28,5°C (temperatura padrão para a manutenção do peixe-zebra), a primeira clivagem ocorre 45 minutos após a sua fertilização. Subsequentemente oito clivagens ocorrem em intervalos regulares de 20-30 minutos(52).

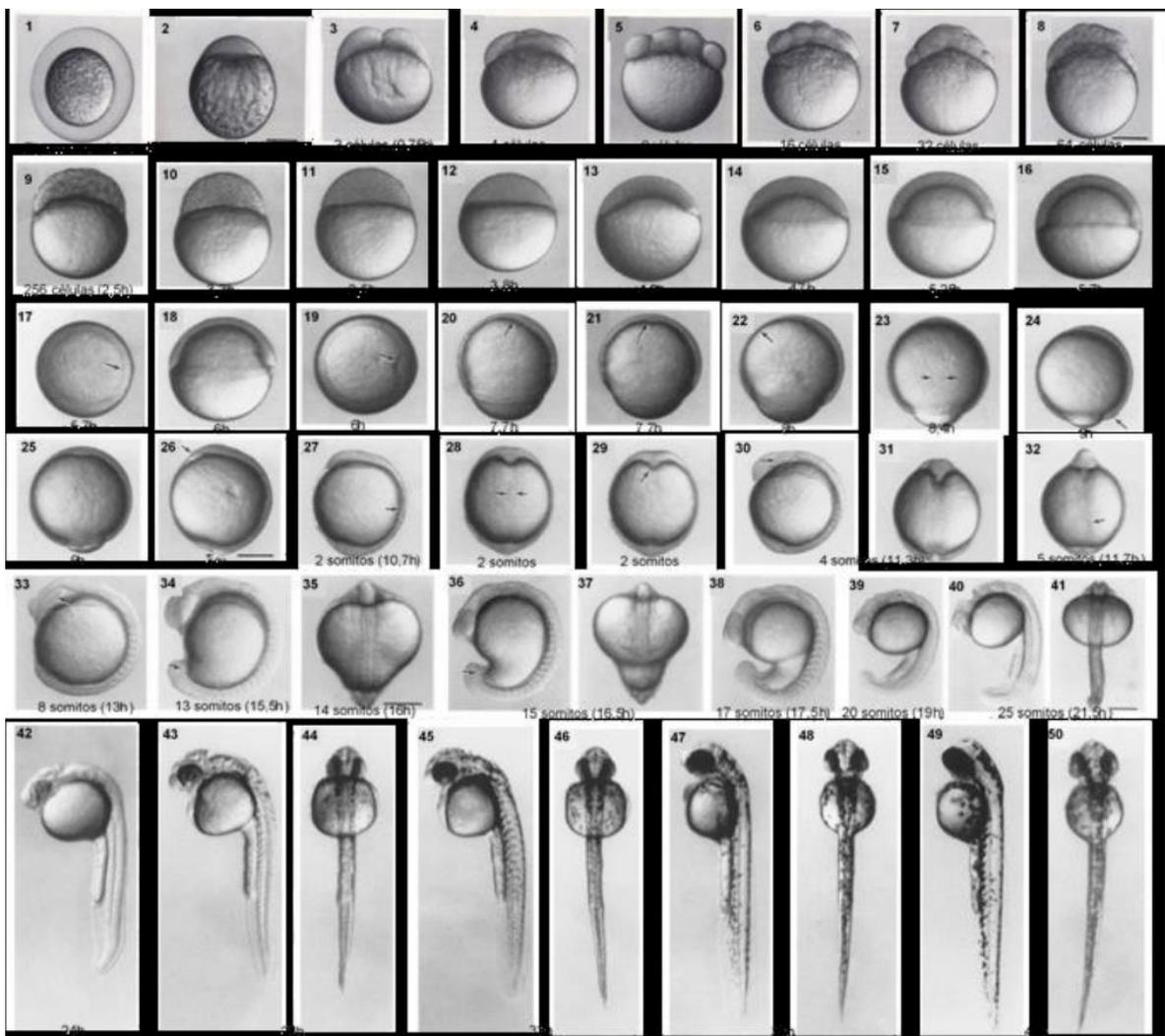


Figura 9: Fases do desenvolvimento embrionário do peixe-zebra. Fase de zigoto (1,2); Embriões durante a fase de clivagem (3-8); Período de blástula (9-14); Gastrulação (15-26); Neurulação (27-41); Período de farínge (42-50). Adaptado de Kimmel *et al*, 1995.

Após a nona clivagem, o ciclo celular começa a se alongar e as divisões celulares tornam-se assíncronas. Isso marca o início da transição da blástula média por volta de 3 horas pós-fertilização (hpf), nesse período começa a ativação de transcrição zigótica. Todos os processos que ocorrem até este ponto são regulados por fatores maternos depositados no ovo(52).

A gastrulação, o processo pelo qual as três camadas germinativas (endoderma, mesoderma e ectoderma) ocupam suas posições finais no embrião, começa após cerca de 5,5 hpf e está completo a 10 hpf(52).

Durante o período entre 10 e 24 hpf, os órgãos internos começam a se formar e marcos morfológicos que visualizam as estruturas adultas tornam-se detectáveis, assim, adquirem uma aparência de “peixe” após apenas 24h de desenvolvimento. Nos dias consecutivos, o embrião continua a crescer e os órgãos internos completam seu desenvolvimento. Os embriões eclodem de seus córios entre o terceiro e quarto dia, a partir daí já começam a se alimentar. Além disso, as vias neuronais e endócrinas responsáveis pela regulação da homeostase também são desenvolvidos no início da vida(54).

É observável que na última década tem crescido a utilização do peixe-zebra, como um excelente modelo para estudar doenças humanas, essas vantagens como desenvolvimento rápido e curto período de vida, contribuem bastante para os estudos. A investigação de eventos genéticos raros e, experimentos que requerem um alto número experimental, são facilmente atingidos, vislumbrando a abundante geração de ovos nos cruzamentos desses peixes.(54).

Além do mais, informações sobre o genoma estão amplamente disponíveis. O peixe-zebra é um modelo promissor para a pesquisa de distúrbios metabólicos, uma vez que as vias do metabolismo são conservadas entre mamíferos e o peixe-zebra, ou seja, possui os órgãos essenciais para a compreensão da obesidade e do metabolismo lipídico, incluindo os do trato digestivo, tecido adiposo branco, fígado e músculos esqueléticos, apresenta vias bioquímicas conservadas, incluindo aquelas envolvidas na homeostase energética (55), controle do apetite(54), glicose(56), triglicerídeos e metabolismo do colesterol, bem como função e regulação dos adipócitos(57).

O peixe-zebra possui um único gene ortólogo (PPAR γ), no cromossomo 11, que exibe 67% de semelhança geral com o gene PPAR γ humano, codificador da proteína PPAR γ , sendo que os domínios LBD (domínio de ligação ao ligante) e DBD (domínio de ligação ao DNA) do PPAR γ mostram uma conservação especialmente elevada em comparação com os humanos (80,5 e 94,3% dos aminoácidos são idênticos em LBD e DBD, respectivamente)(58)

Essas características tornaram o peixe-zebra um modelo viável para comorbidades relacionadas à obesidade envolvendo alterações metabólicas, como diabetes, síndrome metabólica, hiperglicemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, esteatose hepática, acidente vascular cerebral e doenças cardíacas(54).

De modo versátil, o peixe-zebra vem sendo incorporado em diversas áreas, desde ecotoxicologia (na qual já se encontra consolidado) ao uso como método de triagem pré-clínica de potenciais fármacos.

Na ecotoxicologia, por exemplo, para além da pesquisa, o modelo já é utilizado para a avaliação de qualidade da água. Em 2007, a Alemanha introduziu o teste com embriões de peixe-zebra como um ensaio padronizado ISO (ISO15088:2007) para avaliação da qualidade da água e determinação da toxicidade aguda de resíduos na água, substituindo o teste de qualidade da água com peixes adultos(59).

Já em relação ao uso do modelo como triagem pré-clínica, seu uso é relativamente recente. O peixe-zebra oferece, além das vantagens das características morfológicas facilmente visualizáveis, a vantagem de ser realizada em um organismo vertebrado com fisiologia e metabolismo conservados em relação aos mamíferos, em contraste com outros testes, como cultura de embriões e culturas de células embrionárias(60).

Em comparação, os estudos com embriões de camundongos são dispendiosos, e exigem multiplicidade de técnicas associadas para sua realização, a exemplo, é necessário induzir no camundongo fêmea uma superovulação com indução hormonal previamente ao acasalamento. Após esse procedimento, os camundongos fêmeas são sacrificados para que haja a

remoção dos óvulos fecundados, além disso é necessário, um grande número de embriões para a realização dos testes(46).

Embora os estudos em células cultivadas sejam uma via muito importante e produtiva para obter a compreensão dos mecanismos tóxicos, os sistemas in vitro são limitados pela disponibilidade de linhagens celulares apropriadas, além do mais as condições in vitro nem sempre refletem o ambiente de interações dentro de um organismo completo.

Assim, as vantagens de utilizar um animal inteiro como foco para triagem pré-clínica é extremamente interessante para a descoberta de fármacos e estudos toxicológicos, nas quais as complexidades das interações célula-célula e sinalização endócrina são desafiadoras, logo, a abordagem com o organismo por completo pode fornecer um cenário mais abrangente(60).

Nesse contexto, é digno de nota, que já existe um protocolo validado para testagem de toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra (OECD nº236(61)), utilizado para identificar toxicidade de substâncias nanopartículas, monitoramento ambiental, como pesticidas, etanol e produtos farmacêuticos. Além disso, está sendo visado como um potencial substituto de estudos embrionários com animais mamíferos para fins regulatórios de produtos farmacêuticos(62).

O modelo de peixe-zebra apresenta um desempenho que pode ser comparável aos modelos com mamíferos em ensaios de toxicidade de desenvolvimento(63). Em revisão realizado por Sipes et al. 2011, a concordância entre modelos de peixes-zebra e mamíferos na avaliação de produtos químicos para toxicidade no desenvolvimento embrionário é de 55% a 100%(64-66). Essa concordância percentual sugere que o modelo do peixe-zebra está possivelmente no mesmo nível de modelos com mamíferos, apoiando a sua utilidade para a pesquisa de toxicologia(60).

Outros autores se propuseram a testar fármacos com toxicidade já conhecida em seres humanos(67). Um estudo com a varfarina em embriões de peixe-zebra, identificou pela primeira vez o mesmo padrão de efeitos adversos na embriopatia humana induzida por varfarina, como deformidade no esqueleto, hemorragias e morte(68).

A cardiotoxicidade é uma área de pesquisa do peixe-zebra, que atrai muita atenção, sendo um campo altamente relevante de avaliação de toxicidade, já que os candidatos a medicamentos frequentemente apresentam efeitos cardíacos adversos que só são descobertos tardiamente.

Uma das causas líderes de retirada de medicamentos do mercado são os efeitos adversos cardiovasculares (62). Essa remoção do mercado é extremamente onerosa, visto que atualmente o custo para se comercializar um medicamento novo gira em torno de um bilhão de dólares por medicamento(69). Dos fármacos que atingem a fase 1 de pesquisa clínica, cerca de 10% evoluem para a aprovação pelo FDA nos EUA(70). Diante disso, lançar mão de modelos capazes de prever toxicidade com custo inferior é extremamente vantajoso na triagem dos potenciais fármacos, visto que poderá impactar numa melhor seleção para as subseqüentes fases de teste.

Zakaria et. al 2018, realizou uma extensa revisão sobre fármacos com atividade cardiotóxica utilizados na terapêutica(71). Medicamentos como a aspirina, cloridrato de clomipramina, ciclofosfamida, nimodipina, quinidina, terfenadina, verapamil, 5-fluoracil, entre outros, administrados por imersão ou microinjeção no saco vitelino, descrevendo achados no peixe-zebra como edema pericárdio, distúrbios circulatórios entre outros parâmetros(71) similares a efeitos adversos em seres humanos.

Como já mencionado anteriormente, os estudos sobre agonistas dos receptores PPAR γ e toxicidade são escassos na literatura, e o mesmo se reflete quanto a testagem desses agonistas em embriões de peixe-zebra. Um estudo com fosfato de trifênila, um potente agonista PPAR γ , reportou edema pericárdio nos embriões expostos(72). Outro estudo, que utilizou pioglitazona como controle de um agonista parcial de PPAR γ também encontrou anormalidades no desenvolvimento embrionário, como edema pericárdio(73). Não foi encontrado nenhum estudo que utilizou a rosiglitazona para o teste agudo de toxicidade em embriões, sendo esta amplamente utilizada para estudos de adipogênese em peixes-adultos em concentrações baixas(74, 75).

A maioria dos ensaios usando peixe-zebra depende até agora de parâmetros morfológicos, o que fornece pouca discriminação entre substâncias

testadas. A análise de expressão gênica aplicada para toxicogenômica é uma estratégia para analisar efeitos moleculares que nem sempre ficam evidentes em análises morfológicas.

A exemplo disso, um estudo realizou a análise de expressão gênica com uso da técnica de microarranjo e observou que diversos produtos químicos alteraram a expressão gênica sem demonstrar qualquer alteração morfológica em embriões de peixe-zebra expostos previamente(76). A técnica de microarranjo possibilita a avaliação simultânea da expressão de milhares de genes, desse modo, estudos com essa técnica aplicados ao peixe-zebra renderam perfis toxicogenômicos robustos(76) .

Há poucos estudos na literatura com pioglitazona no desenvolvimento embrionário. Efeitos tóxicos potenciais no estágio inicial da embriogênese foram pouco avaliados, sendo um dado importante.

Como já citado anteriormente estudos com embriões mamíferos são complexos e difíceis de manusear o que pode explicar a pouca quantidade de estudos disponíveis. Esses estudos foram realizados em culturas de embriões extraídos, uma das vantagens da realização nos embriões de peixe-zebra que tem seu desenvolvimento extracorpóreo sendo então seu ambiente natural de desenvolvimento.

Além disso, novas TZD podem futuramente serem candidatas ao tratamento da infertilidade pela síndrome de ovários policísticos, sendo assim a avaliação do perfil toxicológico em modelos de embriões de peixe-zebra é valioso para conduzir pesquisas mais aprofundadas e garantir uma maior segurança para a sua utilização.

Diante do exposto, considerando que as TZDs podem trazer benefício terapêutico em algumas gestantes, que os estudos de embriotoxicologia da rosiglitazona e pioglitazona em roedores ainda são escassos e, praticamente inexistentes em animais como o peixe zebra, que até o momento não existem estudo dos efeitos tóxicos do GQ-16, é de grande relevância compará-lo com efeitos embriotóxicos da pioglitazona e rosiglitazona por meio do teste de toxicidade aguda em peixes-zebra (FET).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo foi analisar a toxicidade do GQ-16, um agonista parcial de PPAR γ em comparação com rosiglitazona e pioglitazona, agonistas totais de PPAR γ , utilizando embriões de peixe-zebra como modelo animal.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar o teste de embriotoxicidade (FET) em peixes zebra com o GQ-16, em comparação com rosiglitazona e pioglitazona.

Avaliar os critérios de letalidade e alterações morfológicas no desenvolvimento embrionário conforme o protocolo da OECD nº 236.

3. MÉTODOS

3.1 PROTOCOLO DE PESQUISA.

O presente projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília – UnB, na 155ª reunião ordinária, realizada em 08/06/2021, sob o protocolo SEI nº 23106.052946/2021-10 (Anexo 1), seguindo os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

3.2 TESTE DE EMBRIOTOXICIDADE AGUDA EM PEIXES-ZEBRA (FET).

O teste de embriotoxicidade destina-se a determinar a toxicidade aguda de substâncias químicas nos estágios de desenvolvimento embrionário do peixe-zebra. Para isso a OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*) desenvolveu o protocolo nº 236(61), sendo um protocolo validado, considerado padrão ouro com o objetivo de padronizar os testes realizados nos embriões de peixe-zebra, aplicados com sucesso para uma ampla gama de substâncias com diferentes modos de ação, solubilidade, volatilidade e hidrofobicidade.

Dessa forma, foi utilizado este protocolo como base e conforme a necessidade, adaptações para a realização dos experimentos foram executadas. O princípio do teste consiste em expor pelo período máximo de 96h, embriões recém fecundados, com substâncias de interesse em diferentes concentrações de modo que a cada 24h sejam realizadas avaliações quanto aos critérios de letalidade. No final do período de exposição, a toxicidade aguda

é determinada com base nos resultados podendo ser calculada a concentração letal de 50% (CL50).

3.2.1 Materiais e reagentes do FET.

Os embriões de peixe-zebra foram concedidos do cultivo aquático do laboratório de Genética Toxicológica (G-Tox/UnB, Brasília).

O GQ-16 foi cedido pela prof. Angélica Amato (Oriundo do Prof. Ivan da Rocha Pitta, Universidade Federal de Pernambuco, com a síntese do GQ-16, previamente descrita(77). A pioglitazona e a Rosiglitazona foram obtidas da Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI).

3.2.2 Sistema aquático e reprodução de peixes-zebra.

O sistema aquático de cultivo do Laboratório de Genética Toxicológica (G-Tox/UnB, Brasília) é um sistema recirculante de água, abastecido com água filtrada por carvão ativado e aerada para eliminação de cloro. As características físicas e químicas do sistema são mantidas em: pH 7,2 - 7,6; dureza 6,7° dH; temperatura de 26 ± 1 °C; condutividade 468 μ S.

A sala do cultivo possui um dispositivo de fotoperíodo regulado para passar 12 h de luz e 12 h de escuro. Os peixes são alimentados de duas a três vezes ao dia com a ração comercial (SERAVipan©; Tetramin©) e alimentação viva (náuplios de *Artemia salina*).

A reprodução dos peixes é realizada sempre no dia antecedente à coleta de embriões para realização de testes. Os cruzamentos foram realizados com peixes de idade aproximadamente de seis meses, em caixas de reprodução acrílica (Figura 10), que consistem em duas partes que se separam, sendo a

inferior a caixa comum e a superior em formato decrescente de profundidade com brechas tipo peneira para permitir a passagem dos embriões.



Figura 10 – Representação da caixa utilizada para o cruzamento e coleta de embriões. Fonte: <https://www.tecniplast.it/uk/product/171-sloping-breeding-tank.html>

A seleção de peixes fêmeas e machos ocorreu na proporção de 2 fêmeas para 6 machos, totalizando 8 animais por caixa de cruzamento. A identificação do sexo dos peixes foi realizada com auxílio da responsável técnica do laboratório, visto que esses peixes são muito similares. A diferenciação entre machos e fêmeas se dá principalmente pelo tamanho do ventre, sendo as fêmeas mais robustas que os machos (Figura 11).

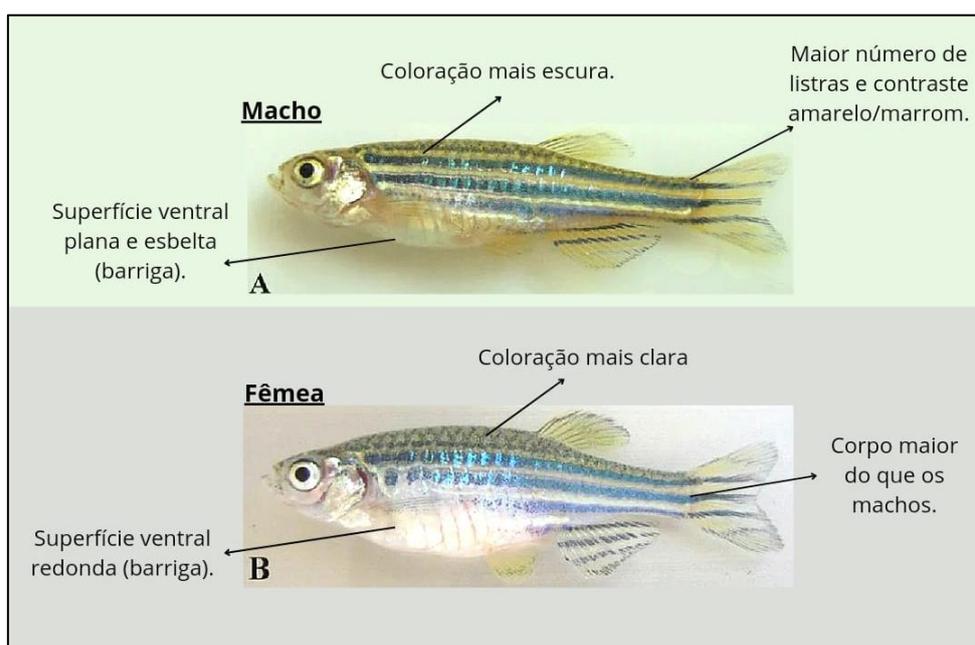


Figura 11 – (A) Peixe-zebra macho e (B) peixe-zebra fêmea. Características do peixe-zebra macho: coloração corporal mais escura do que as fêmeas, maior número de listras de contraste amarelo/marrom, barriga plana e esbelta na superfície ventral, coloração amarela

escura na parte inferior das barbatanas. Características do peixe-zebra fêmea: coloração corporal mais clara que os machos, corpo maior que os machos, em média barriga redonda na superfície ventral. Fonte: Avdesh, A. Et al. 2012. Adaptado pela autora.

No dia seguinte ao cruzamento, as luzes são acesas e os peixes devolvidos ao sistema aquático em tanques identificados com etiqueta sinalizando que passaram pelo processo de reprodução afim de evitar que novamente sejam selecionados na mesma semana visto que o procedimento pode gerar estresse nos peixes. Por conseguinte, os embriões são removidos das caixas acrílicas com auxílio de uma peneira e lavado por três vezes com água proveniente do sistema de cultivo e acondicionados em placa de Petri grande para a realização da seleção dos embriões.

3.2.3 Seleção de embriões.

A seleção dos embriões consiste em separar aqueles que são considerados aptos para o teste, ou seja, estão fecundados e no mesmo estágio de desenvolvimento, dos que não foram fecundados ou estão coagulados (mortos) para serem descartados.

Os embriões de peixe-zebra são translúcidos o que facilita a sua visualização. O tamanho varia de 0,7-1 mm de diâmetro, são visíveis a olho nu, no entanto é necessário a utilização de uma lupa para enxergar o seu interior.

Assim, como o auxílio da lupa, os embriões em estágio de blástula (3-3,5 horas após a fertilização) foram separados gentilmente com a pipeta Pasteur em vidros de relógio a fim de garantir a sincronização do desenvolvimento no início da exposição com a quantidade suficiente para a realização de cada procedimento proposto. A figura 12 resume o esquema da seleção dos embriões para a realização do teste agudo de embriotoxicidade.

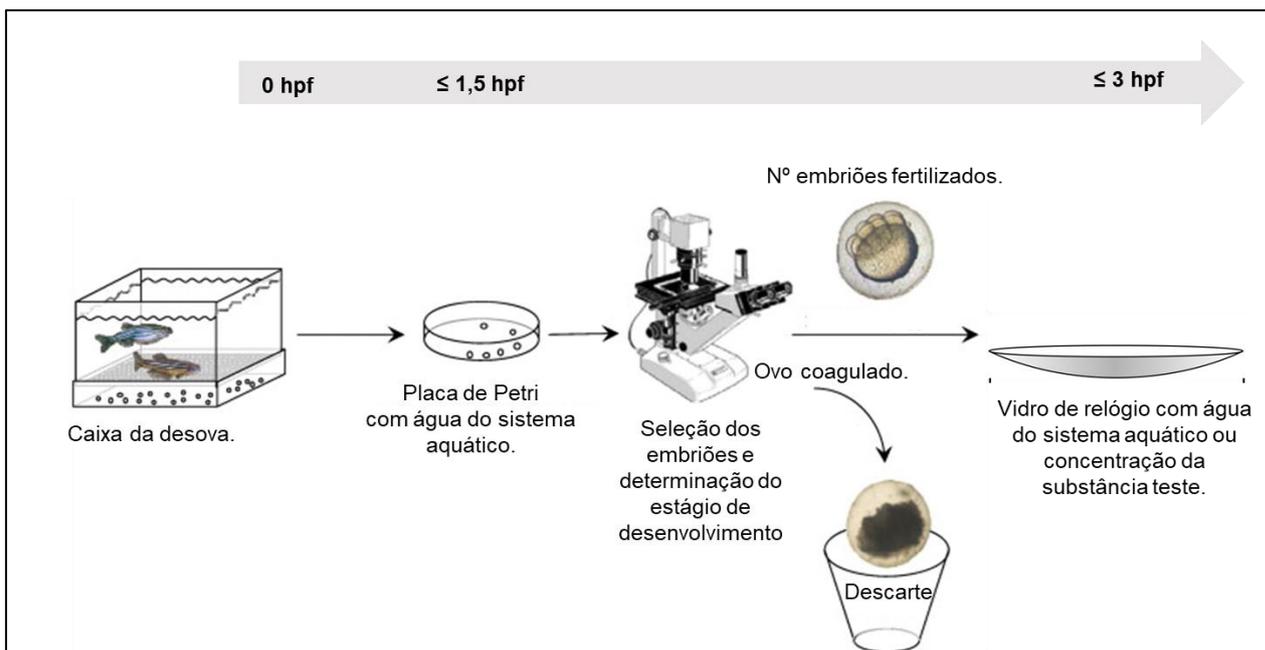


Figura 12 - Esquema do procedimento de teste de toxicidade aguda em embrião de peixe-zebra (da esquerda para a direita): produção de ovos, coleta dos ovos, pré-exposição imediatamente após fertilização em vasos de vidro, seleção de ovos fertilizados com microscópio invertido ou binocular e distribuição de ovos fertilizados em placas de 24 poços preparadas com o respectivas concentrações de teste/controles, n = número de ovos necessários por concentração de teste/controle (aqui 20), hpf = horas pós-fertilização. Fonte: OECD 236(19). Adaptado pela autora.

3.2.4 Exposição às TZDs e distribuição em placas de 96 poços.

Para realização dos experimentos, previamente as TZDs (GQ-16, pioglitazona e rosiglitazona) foram pesadas e aliquotadas, sendo que a diluição só ocorria no exato momento da exposição.

Para facilitar a solubilização, o DMSO era pré-aquecido em banho-maria à 37 °C constituindo a solução mãe. Logo em seguida, era pipetada em tubos falcon com água do sistema para obtenção das concentrações: 1,562 µM; 3,125 µM; 6,25 µM; 12,5µM; 25 µM; 50 µM e 100 µM.

A concentração final de DMSO foi de 1%, tendo em vista a dificuldade de solubilização das TZDs apenas em água já que possuem perfil hidrofóbico. Para garantir a concentração e solubilidade, os embriões foram transferidos para novas placas com solução preparada no dia a cada 24h.

Logo após a seleção dos embriões viáveis, esses foram separados em vidros de relógio com a quantidade necessária para o preenchimento dos

grupos nas placas. Para que não houvesse diferença de tempo de exposição, visto que o procedimento de pipetagem das placas é moroso, os ovos foram expostos no próprio vidro de relógio, antes da sua distribuição nos poços. Com essa finalidade, realiza-se a remoção de água rapidamente com a substituição de prontidão por um pouco da solução preparada conforme as concentrações selecionadas.

Os poços foram pipetados com 200 μ L de solução conforme a distribuição (Figura 13). Os embriões foram distribuídos em placas de 96 poços da seguinte maneira (Figura 13):

- 20 embriões para cada concentração de teste;
- 20 embriões para o controle do solvente;
- 20 embriões para o controle negativo (diluição na água);
- 12 embriões para o controle interno da placa (6 por placa).

Esse procedimento foi realizado em triplicata, assim sendo, o número total utilizado foi de 60 embriões para cada concentração (sendo sete concentrações acrescido de um grupo solvente e um grupo controle negativo) e 36 embriões para controle interno, totalizando 576 ovos para cada TZD.

O controle interno da placa faz parte do protocolo da OECD nº 236, é composto por poços cheios de água do sistema com embriões, nas placas a serem utilizadas.

O objetivo desse controle é identificar uma potencial fonte de contaminação das placas por resíduos provenientes da própria fabricação do material ou, outro tipo de contaminação gerada pelo próprio pesquisador durante o procedimento ocasionando algum efeito na placa a ser analisada. Esse efeito pode influenciar o resultado do teste, por isso é imprescindível descartar o teste caso haja mortalidade do controle interno da placa.

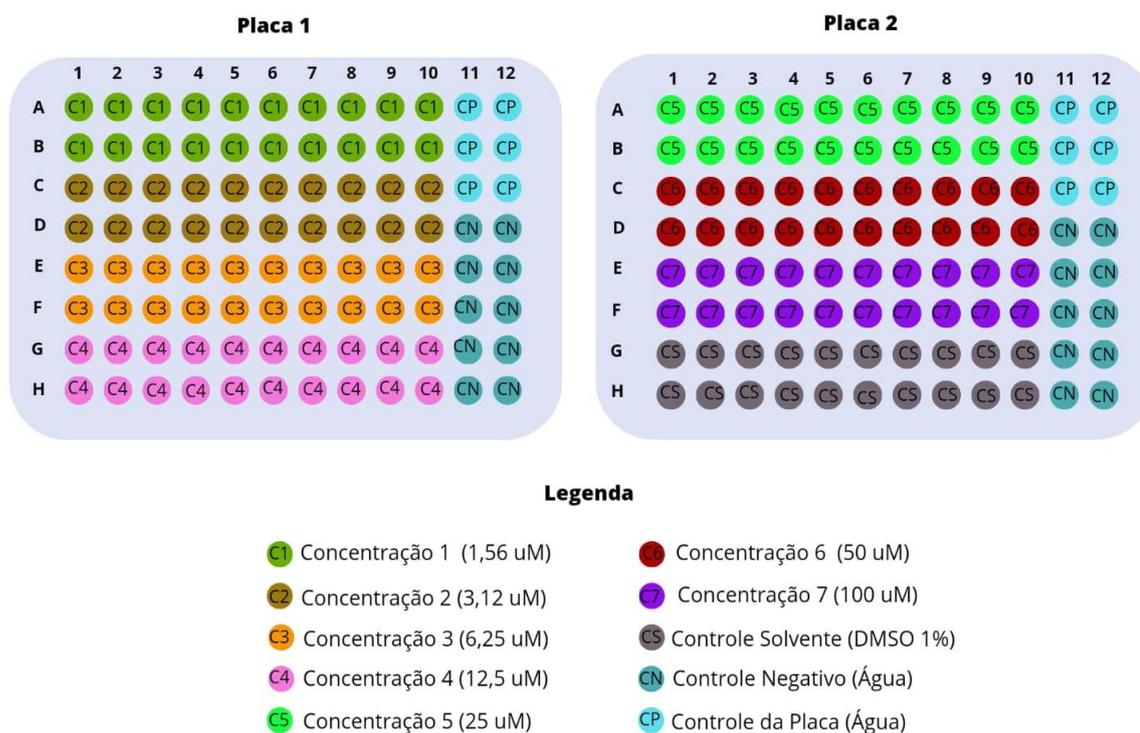


Figura 13 – Ilustração da distribuição de concentrações das TZD's utilizadas. C1 (1,56uM), C2 (3,12 uM), C3 (6,25 uM), C4 (12,5 uM), C5 (25uM), C6 (50uM), C7 (100uM), CS (controle solvente - DMSO 1%), CN (controle negativo - água), CP (controle da placa – água). Fonte: Elaborado pela autora.

3.2.5 Critérios de validação do FET.

Os testes eram considerados válidos se correspondesse aos seguintes critérios abaixo, presentes na OECD nº 236(61):

- a) A taxa geral de fertilização de todos os ovos coletados deveria ser $\geq 70\%$ no lote testado.
- b) A temperatura da água deveria ser mantida em 26 ± 1 °C nas câmaras de germinação com fotoperíodo durante o teste.
- c) A sobrevivência dos embriões no controle negativo (diluição-água) deveria ser $\geq 90\%$ até o final das 96 horas de exposição.
- d) A taxa de eclosão no controle negativo deveria ser $\geq 80\%$ no final de 96 horas de exposição.

Caso não houvesse o seguimento dos critérios acima o experimento era descartado e realizava-se um novo cruzamento para a realização de um novo experimento.

3.2.6 Critérios de avaliação de letalidade e anormalidades do desenvolvimento embrionário.

As avaliações dos embriões/larvas foram realizadas a cada 24h até que se completasse as 96h finais, utilizando um microscópio invertido da marca Zeiss e realizando o registro das observações em planilha padronizada pelo laboratório G-Tox/UnB.

Cada placa foi posicionada adequadamente no microscópio para a visualização de um embrião por vez em cada poço. Assim, um a um, os embriões eram avaliados quanto a morte (letalidade) e alterações no seu desenvolvimento embrionário.

Para a avaliação da letalidade utilizou-se os critérios propostos pela OECD nº 236(61) (Figura 14), observando a cada 24h um dos seguintes critérios: coagulação; falta da formação de somitos; ausência de separação entre o pedúnculo caudal e o saco vitelino; ausência de batimentos cardíacos.

Já para as anormalidades do desenvolvimento embrionário (Figura 14), observou-se as seguintes alterações: pigmentação, formação do otólito, edema pericárdio, edema de saco vitelino, diminuição do fluxo sanguíneo, ausência de formação do Intestino, deformidade da curvatura da cauda, nanismo, postura anormal, microfthalmia, perda do equilíbrio, ausência de inflação de bexiga natatória, atraso generalizado no desenvolvimento.

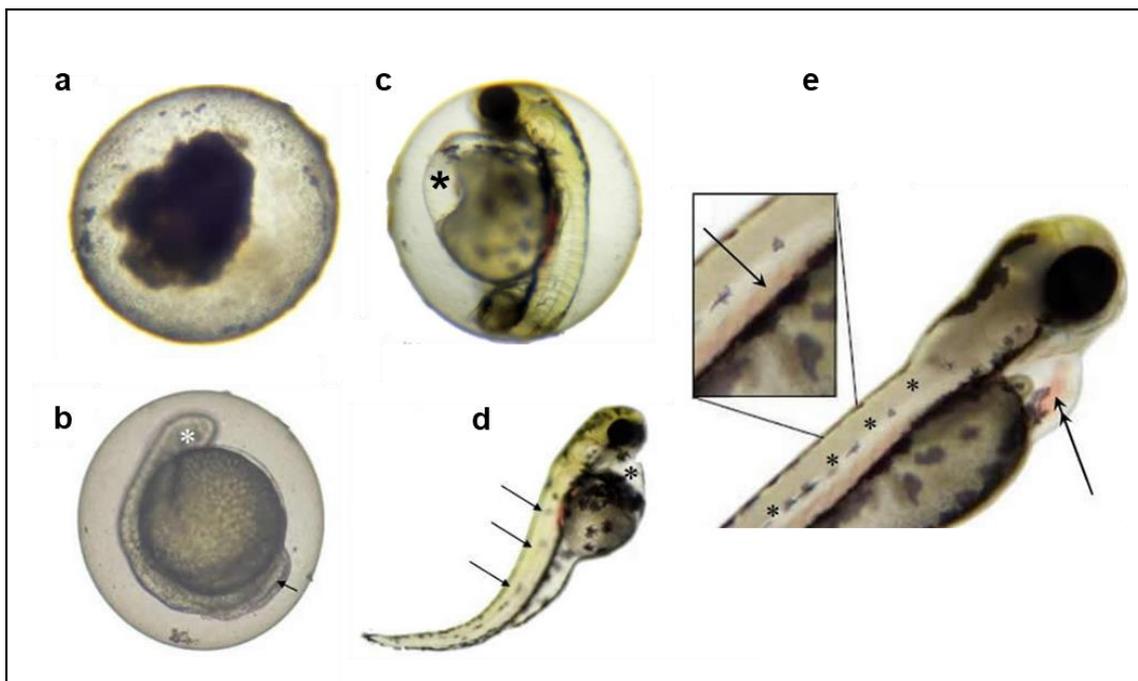


Figura 14 - Letalidade e malformações: (a) coagulação de ovos fertilizados, (b) ausência de separação entre o pedúnculo caudal e o saco vitelino, *ausência de olhos, (c) edema de saco vitelino (d) a falta de formação de somito, *edema pericárdio, (e) Ausência de batimentos cardíacos, escoliose da coluna. Fonte: OECD 236. Adaptado pela autora.

3.2.7 Eutanásia e armazenamento das amostras.

Para a realização da eutanásia das larvas de peixes sobreviventes, optou-se pelo método de resfriamento rápido já que o uso de fármacos anestésicos poderia introduzir vieses no experimento, assim, após as 96 h de exposição aos fármacos, as larvas foram acondicionadas em eppendorf, formando grupos/pool de 10 larvas, sendo imergidas em banho de gelo-água, 0 - 4°C por aproximadamente 10 minutos.

Logo após, houve a remoção da água seguido da realização do congelamento rápido em nitrogênio líquido. Adiante as amostras foram armazenadas em freezer -80°C para os experimentos genômicos.

Os embriões/larvas que morreram antes do final do teste FET foram acondicionados em saco branco, identificados com a etiqueta de carcaças e descartados de acordo com o "Manual de orientação para descarte de resíduos biológicos dentro da Universidade de Brasília".

Os procedimentos seguiram as normas para experimentação estabelecidas na Lei Arouca (nº 11.794, de 8 de outubro de 2008).

3.2.8 Análise do resultado do teste FET

Para cálculo da letalidade - CL50 realizou-se uma regressão não linear com as médias das três placas do experimento, bem como seu erro padrão da média (EPM).

Os gráficos que apresentam a porcentagem de mortalidade nos embriões de peixe-zebra, consideram o número total de eventos divididos pelo número total de embriões por grupo (60 por grupo) multiplicados por 100. Dessa forma, não apresentam barra de erro padrão da média.

Os gráficos que apresentam a porcentagem de alterações morfológicas nos embriões de peixe-zebra, consideram o número total de eventos divididos pelo número total de embriões vivos em cada grupo multiplicados por 100. Logo, não apresentam barra de erro padrão da média.

A análise estatística para alterações morfológicas mais frequentes (edema pericárdio e deformidade da cauda), bem como a comparação entre o GQ-16, pioglitazona e rosiglitazona foram realizadas utilizando a análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste para múltiplas comparações (Tukey) considerando o valor de $p \leq 0,05$ como estatisticamente significativo.

3.3 ENSAIOS DE ANÁLISES GENÔMICAS (RT-PCR)

O ensaio de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) foi realizado para confirmar se houve ação farmacológica dos agonistas do PPAR γ avaliando o aumento da expressão gênica do PPAR γ e também do gene FABP4 (proteína de ligação a ácidos graxos tipo 4), o qual pode aumentar com o uso de tiazolidinadionas.

3.3.1 Materiais e reagentes para análises genômicas - RT-qPCR

O material genético utilizado foi proveniente das larvas sobreviventes do teste FET das concentrações 25uM e 100uM. A extração do RNA total foi realizada com o reagente TRIzol® com o Kit PureLink RNA Mini Kit ambion by life technologies nº 12183018A Invitrogen™ de acordo com as instruções do fabricante. A concentração dos RNA's foi mensurada em NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). Para a transcrição reversa utilizou-se o kit SuperScript III (Invitrogen Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Os primers para os genes alvos foram retirados de artigos da literatura e sintetizados pela Integrated DNA Technologies (IDT, USA) (Tabela 1).

Quadro 1 – Descrição dos primers selecionados. Código ZFIN, código NM, gene alvo, sequência forward e reverse. Fonte: Elaborado pela autora.

GENE Código ZFIN	NM	Gene alvo	Oligo sequência forward	Oligo sequência reverse
ZDB-GENE-040912-132	NM_001004682.1	FABP4	TCAGAGCACCTTCAAACCA	ACAAGTTTGCCGTTCTCGAT
ZDB-GENE-030115-1	NM_001115114	GAPDH	CGACTCCACCCATGGAAAGT	TAATGTTGGCTGGGTCCCTC
ZDB-GENE-990415-213	NM_131467.1	PPAR γ	TACGAGAACAACCCAACA	GTATCTGCTGTGCTCTGTA

As reações de PCR foram realizadas em triplicata no termociclador automático StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando o reagente Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) para detecção dos produtos amplificados.

3.3.2 Extração de RNA total.

A extração do RNA total das larvas foi realizada com o reagente TRIzol® (Invitrogen) com o Kit PureLink RNA Mini Kit ambion by life technologies nº 12183018A Invitrogen™, seguindo as recomendações do fabricante. Previamente ao processo, os eppendorf com as amostras eram imersos no nitrogênio líquido e então maceradas com auxílio de um *pellet pestle*.

Após a adição do trizol, acrescia-se clorofórmio e centrifugava-se por alguns minutos. Ocorria então a separação de fases, na qual a parte aquosa (fase superior – contém RNA) era transferida para um novo tubo identificado. Acrescentava-se etanol 70% para então ser transferido para as colunas de extração, centrifugado e lavado com os tampões do kit conforme manual.

Após o término do processo, O RNA foi eluído com 30uL de água RNase free, centrifugado novamente e estocado no freezer -80 °C.

3.3.3 Quantificação e pureza do RNA total

A quantificação e o grau de pureza das amostras de RNA total foram determinados por espectrofotometria, utilizando-se o aparelho NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA).

As amostras foram pipetadas no volume de 1 µL de RNA total e transferido para o espectrofotômetro. A quantificação foi realizada no comprimento de onda de 260 nm e expressa em µg/µL. O grau de contaminação por proteínas foi verificado por meio da razão entre os comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. Razões entre 1,8 e 2,0 foram consideradas adequadas.

3.3.3 Transcrição reversa e amplificação por PCR.

A primeira etapa consistiu na transformação de 1 µg de RNA total em cDNA (DNA complementar) utilizando iniciadores randômicos (random primers) e a transcriptase reversa SuperScript III (Invitrogen Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Após os devidos cálculos de volume a ser pipetado, foi preparado as reações seguindo as recomendações do fabricante.

Os cDNAs obtidos foram estocados a -20°C até as análises serem realizadas. O gene Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como endógenos para normalizar a expressão dos genes alvo.

As reações de PCR foram realizadas em triplicata no termociclador automático StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando o reagente Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) para detecção dos produtos amplificados.

3.3.4 VALIDAÇÃO DOS PRIMERS.

3.3.4.1 Curva de eficiência relativa dos primers.

Utilizou-se a curva padrão, ou seja, curva de diluição seriada para determinar se as reações de amplificação dos genes alvos e do controle apresentavam a mesma eficiência.

Partindo de uma amostra contendo 10 ng/uL de RNA, se diluiu sequencialmente (fator de diluição 5). A amplificação foi realizada em duplicata e os valores de CT (cycle threshold) obtidos para cada amostra. O RNA para os controles positivos foi extraído de larvas com cinco dias de vida (GAPDH, PPAR γ) e da cabeça de fêmea adulta de peixe-zebra (FABP4). A curva standard foi gerada pelo programa StepOne software v.2.3.

3.3.4.2 Curva de dissociação dos primers

As curvas de dissociação dos produtos amplificados, também chamadas de curvas melting, são geradas pelo programa StepOne software v.2.3. e possuem a finalidade de avaliar se houve formação de dímeros ou produtos não-específicos que poderiam gerar interferências no processo de PCR.

As condições para a geração das curvas melt ocorrem após a ciclagem de amplificação, aumentando se a temperatura para 95°C por 15 segundos, na sequência diminuindo para 60 °C por um minuto e novamente subindo para 95°C por 15 segundos. À medida que a temperatura aumenta, a fluorescência decresce, no ponto máximo da curva (T_m – temperatura de melting) a PCR apresenta 50% em fita dupla e 50% em fita simples, sendo esta específica para

cada sequência de cDNA amplificada, assim, uma amostra sem impurezas, apresentará um único pico para o par de primers utilizado.

3.3.4.3 Análise dos produtos de PCR por meio do Gel de agarose

Os produtos amplificados pela PCR (10ng) de validação dos primers foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, e examinado sob luz ultravioleta, a fim de se avaliar as bandas correspondentes.

As bandas esperadas foram consultadas no primer blast no site <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. As bandas deveriam apresentar os seguintes tamanhos: 117 para FABP4; 166 para PPAR γ ; 110 para GAPDH.. A comparação foi realizada com marcador 1kb Plus DNA Ladder (*Life Technologies*[®]).

3.3.4.4 Quantificação relativa por qRT-PCR

Após o processo de validação das eficiências dos primers, as amostras foram preparadas para a quantificação, utilizando 10ng de RNA inicial para cada uma.

Os valores dos Ct obtidos para todas as amostras foram normalizados em função do controle endógeno (GAPDH) por meio da subtração do Ct do alvo pelo Ct do controle (Δ Ct).

A quantificação relativa da expressão do FABP4 e PPAR γ foi feita utilizando-se o método de Livak. Por este método, a expressão relativa do gene se dá pelo valor obtido pela fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ amostras - ΔCt calibrador.

3.3.4.5 Análise estatística

A análise estatística utilizada foi a análise de variância não paramétrica, utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnett para comparar os valores de expressão relativa entre o controle com as amostras. O teste de normalidade (distribuição) realizado foi o Shapiro-Wilk.

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) e foram considerados significantes os valores de $p \leq 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad, versão 7.0 para Windows.

4. RESULTADOS

4.1 Rosiglitazona teste FET

O resultado geral do FET com rosiglitazona é apresentado nas figuras 15 (a qual a apresenta a mortalidade) e 16 (a qual a apresenta a CL50) e 17 (a qual apresenta as alterações morfológicas).

Primeiramente, analisaremos a mortalidade dos embriões de peixe-zebra durante os períodos de 24h, 48h, 72h e 96h, nas concentrações de 1,56 uM, 3,125 uM, 6,25 uM, 12,5 uM, 25uM, 50uM e 100uM.

Logo em seguida, visualizaremos as alterações morfológicas que os embriões/larvas sobreviventes sofreram ao longo do tempo nas concentrações supracitadas.

Diante disso, se observarmos a mortalidade (Figura 15) no período de 24h. É notável que na maior concentração (100uM) apenas 20% dos embriões haviam sobrevivido e 80% estavam coagulados (mortos).

Na segunda maior concentração (50uM), 28% haviam coagulado e logo 72% dos embriões haviam sobrevivido.

Já a mortalidade nas demais concentrações de 1,56 uM, 3,125 uM, 6,25 uM, 12,5 uM e 25uM, foi respectivamente de 7%, 2%, 5%, 5%,5%. No controle com água a mortalidade foi de 5% e não houve mortalidade no controle com DMSO 1%.

Quando analisamos o período de 48h do experimento, observamos que na maior concentração de 100 uM, a mortalidade aumentou, comparado ao dia anterior (80%), mostrando que 90% dos embriões foram a óbito, restando apenas 10% de embriões vivos.

Já na concentração de 50uM, vemos que a mortalidade também aumentou quando comparada ao dia anterior (28%). Dessa forma, 43% dos embriões morreram e 57% permaneciam vivos.

Nas demais concentrações de teste, a mortalidade visualizada nesse período de 48h não aumentou, mantendo-se os valores do período de 24h. No controle com água houve aumento de 5 para 7% de mortalidade.

Dando sequência a análise de mortalidade no período de 72h, na maior concentração (100uM), 97% dos embriões haviam morrido, restando apenas 3% de embriões vivos, uma observação não apresentada na figura é que esses embriões não haviam eclodido do córion como larvas (período normal de eclosão entre 48-72h).

Na concentração de 50 uM, 57% dos embriões morreram, sobrevivendo 43%. Da mesma forma, quanto a eclosão, 15% ainda permaneciam embriões dentro do córion.

Nas demais concentrações, houve um aumento de morte na concentração de 25 uM de 5% para 10% comparado com o dia anterior. Nessa concentração, 23% ainda eram embriões não eclodidos.

Enquanto, nas demais concentrações os números de morte se mantiveram iguais aos dias anteriores. Em relação a eclosão, havia a seguinte porcentagem ainda como embriões: 3% no controle água, 2% no DMSO, 2% em 1,56 uM e 2% em 3,125 uM.

Ao final do experimento, completando-se 96h, observa-se que na maior concentração de 100 uM, houve a mortalidade máxima, ou seja, 100% dos embriões de peixe-zebra morreram.

Em 50 uM, a mortalidade também aumentou quando comparado ao dia anterior, sendo que 78% dos embriões/larvas morreram, e apenas 22% continuavam vivos. Todos os sobreviventes já estavam em seu estado larval, ou seja, já haviam eclodidos de seus córions.

Quando observamos a concentração de 25 uM, percebemos que a mortalidade também aumentou em relação ao dia anterior (10%), resultando em 17% de morte ao final. Uma observação é que 2% desses óbitos foram de larvas já eclodidas. Dos sobreviventes, 8% permaneciam como embriões (não eclodidos) e o restante estava em seu estado larval.

Contemplando as demais concentrações, percebemos que houve um singelo aumento de morte nas concentrações de 6,25 uM de 5% para 7% (2% eram larvas) em relação ao dia anterior, e na concentração de 1,56 uM de 5% para 8% de morte dos embriões. Nas concentrações de 3,125 uM e 12,5 uM , bem como no controle com água, a mortalidade não aumentou em relação ao dia anterior.

Porcentagem de mortalidade de embriões de peixe-zebra com rosiglitazona em diferentes tempos.

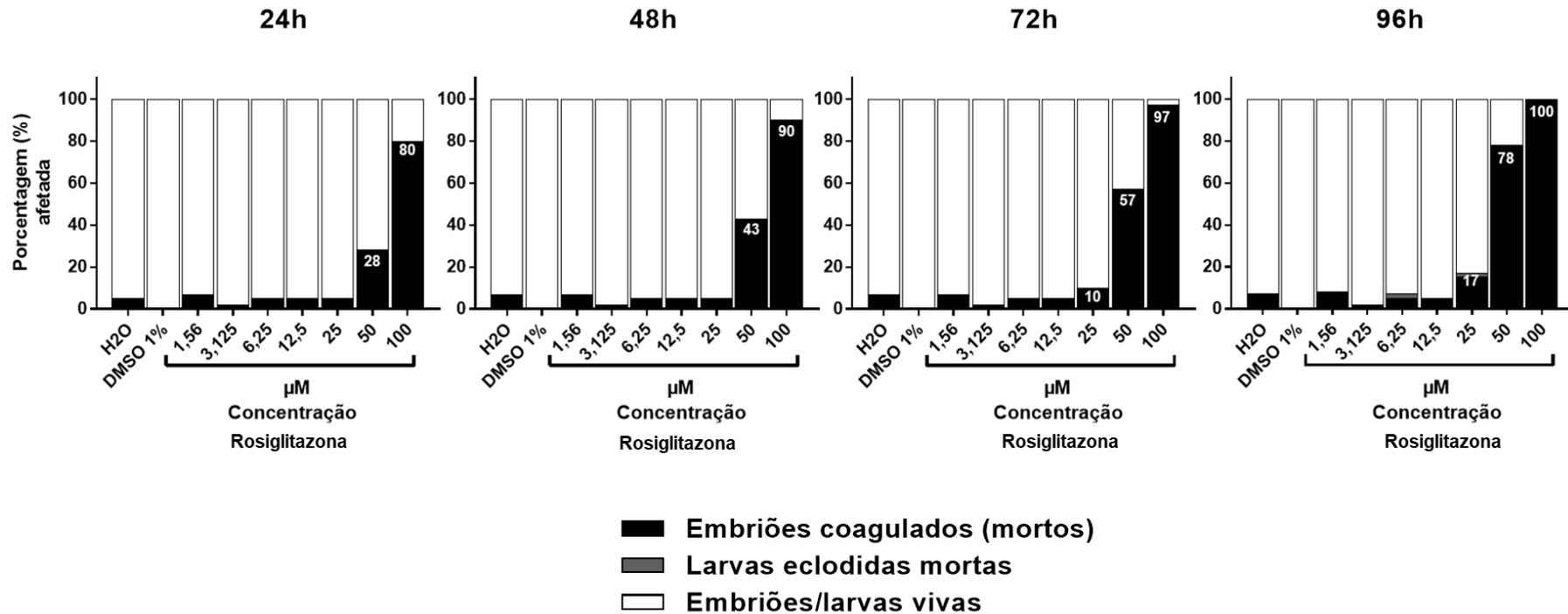


Figura 15 – Porcentagem de mortalidade geral de embriões de peixe-zebra expostos a rosiglitazona em diferentes tempos. Os gráficos mostram as seguintes concentrações: 100 uM, 50uM, 25uM, 12,5 uM, 6,25 uM, 3,125uM e 1,56uM; controle DMSO 1%, água; nos períodos de 24h, 48h, 72h e 96h. A cor da barra mostra os embriões coagulados (Embriões mortos) na cor preta, branca embriões/larvas eclodidas vivas, cinza escuro – larvas eclodidas mortas; o número na cor branca representa a porcentagem total de morte na concentração correspondente. Análise realizada considerando o número de morte pelo número total de embriões (n=60 por grupo). Fonte: Elaborado pela autora.

A partir desses dados de mortalidade, foi possível calcular a concentração letal na qual ocorre 50% de morte com a rosiglitazona nos embriões de peixe-zebra. Para essa análise, considera-se o final do experimento, ou seja, as 96h completas, assim a concentração letal 50% é de 36,98 μM (Figura 16).

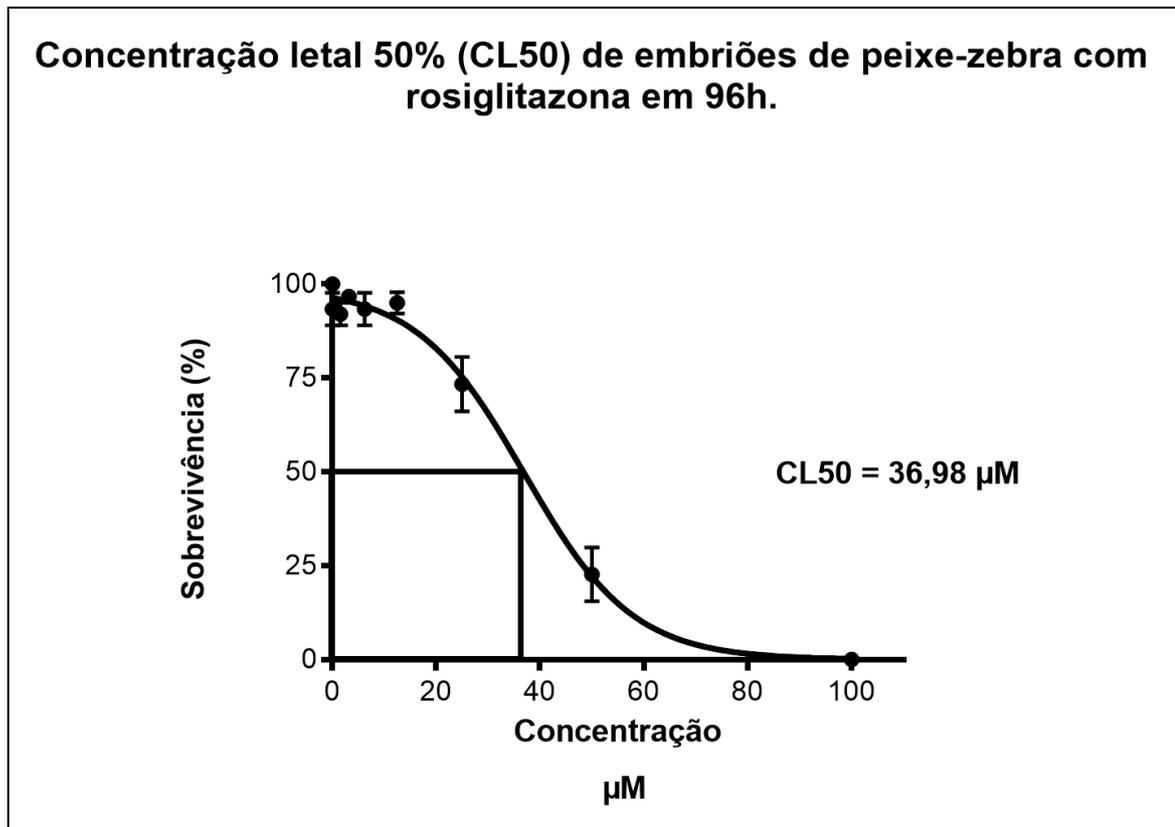


Figura 16 – Concentração letal 50% (CL50) de embriões de peixe-zebra com rosiglitazona em 96h. No eixo y do gráfico representa a porcentagem de sobrevivência dos embriões versus no eixo x a respectiva concentração em μM . A análise se deu por regressão não linear, com a média das triplicatas de peixe-zebra, os quais são representados pelos pontos na curva, bem como está expresso o erro padrão da média (EPM). Os pontos os quais o EPM é baixo não são visualizáveis na figura. A CL50 calculada é igual a 36,98 μM .

Dando seguimento a análise do FET com rosiglitazona, iremos observar a figura 17, a qual demonstra os resultados das alterações morfológicas nas diferentes concentrações ao longo do tempo. No período de 24h, observamos que na maior concentração de 100 μM (o total corresponde aos 20% de embriões vivos correspondentes a barra branca na figura 15), 93% dos embriões apresentavam atraso do desenvolvimento embrionário, ou seja, não estavam se desenvolvendo no mesmo tempo que o controle, além disso, 7% não mostravam qualquer anormalidade.

Quanto as alterações morfológicas nos sobreviventes de 50uM, 50% dos embriões apresentavam atraso no desenvolvimento embrionário, e 3% apresentavam edema pericárdio. Nas concentrações de 12,5uM e 3,125uM, houve 2 e 3% respectivamente de edema pericárdio.

Quando passamos para 48h, nota-se que na concentração de 100 uM, é notável que 100% dos embriões vivos apresentavam edema pericárdio severo, e 17% também apresentavam uma diminuição no fluxo sanguíneo.

Analisando esses embriões vivos na figura 16 quanto as alterações morfológicas, é visível que 67% apresentavam edema pericárdio, 22% tinham deformação da cauda, e o restante não apresentavam alterações.

No entanto, quando observamos as alterações morfológicas nas demais concentrações, chama a atenção a porcentagem de acometimento de edema pericárdio em todas as concentrações, indicando os seguintes valores para as concentrações de 1,56 uM, 3,125 uM, 6,25 uM, 12,5 uM e 25uM, 7%, 10%, 37%, 41%, 45%. Não houve edema pericárdio nos embriões controle. Na concentração de 3,125 uM e 25 uM, houve 2% e 3% de deformação da cauda.

Após 72h, na maior concentração (100uM), 100% dos embriões sobreviventes apresentavam edema pericárdio. Já na concentração de 50uM, 52% apresentavam edema pericárdio e 8% tinham deformação da cauda. Na concentração de 25uM, 41% apresentavam edema pericárdio, 8% de deformação da cauda e 3% de edema de saco vitelino.

Nas demais concentrações de 1,56 uM, 3,125 uM, 6,25 uM, 12,5 uM, a porcentagem de edema pericárdio foi respectivamente 2%, 7%, 9% e 16%. Quanto a deformidade da cauda foram respectivamente 2%, 2%, 2%, 2%, 8% e 8%.

Por fim, em 96h observamos que em 100uM não há barra na figura visto que não havia sobreviventes, na concentração de 50uM nenhum embrião sobrevivente apresentava alterações morfológicas (visto que houve mortalidade expressiva entre 72h e 96h, somente 22% estavam vivos). Em 25uM, 44% apresentavam edema pericárdio e 17% deformação da cauda. Nas demais concentrações de 1,56 uM, 3,125 uM, 6,25 uM, 12,5 uM, a porcentagem de edema pericárdio foi respectivamente 2%, 5%, 8% e 12%, bem como deformação da cauda foi de 0%, 2%, 2%, 3% e 17% respectivamente.

Porcentagem de alterações morfológicas em embriões de peixe-zebra com rosigitazona em diferentes tempos.

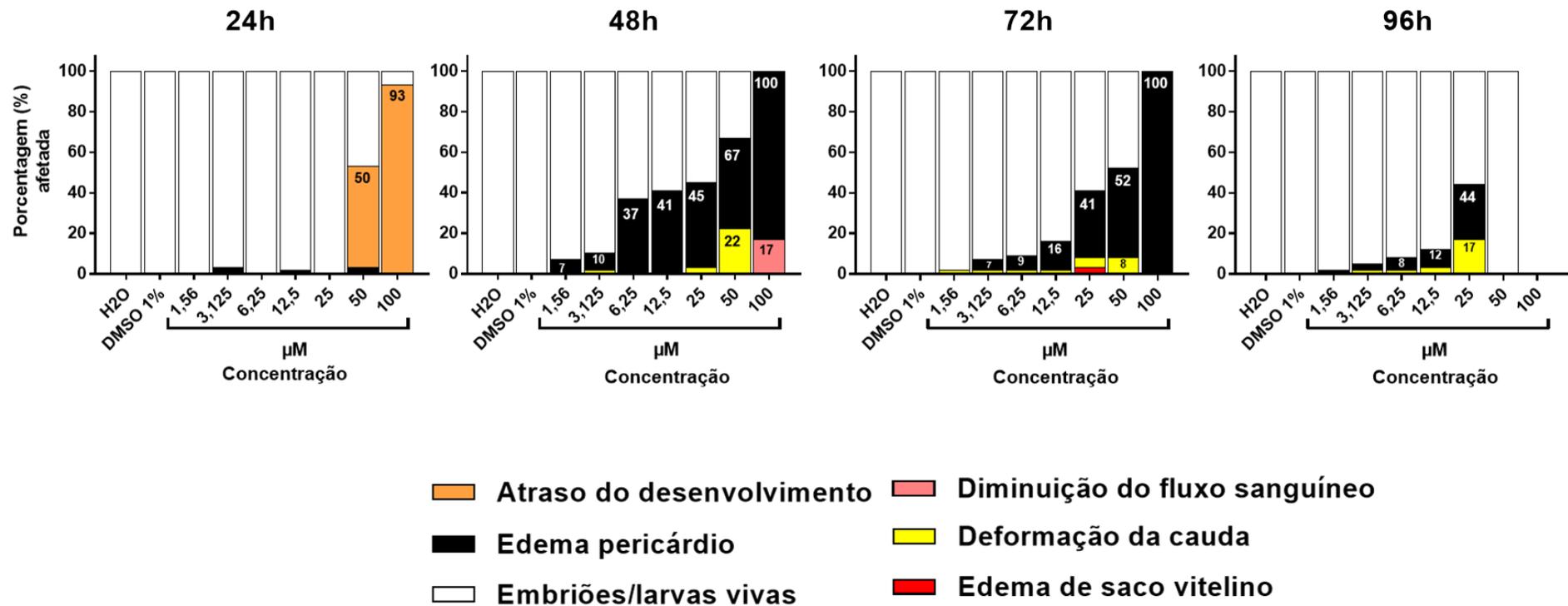


Figura 17 - – Porcentagem de alterações morfológicas em embriões de peixe-zebra expostos a rosigitazona em diferentes tempos. Os gráficos mostram as seguintes concentrações: 100 uM, 50uM,25uM, 12,5 uM, 6,25 uM, 3,125uM e 1,56uM; controle DMSO 1%, água; nos períodos de 24h, 48h, 72h e 96h. A cor da barra mostra edema pericárdio na cor preta, branca embriões/larvas eclodidas vivas, em laranja o atraso do desenvolvimento embrionário; em amarelo deformação da cauda e em vermelho edema de saco vitelino (2%) o número dentro da barra representa a porcentagem do evento na concentração correspondente. Análise realizada considerando o número do evento pelo número total de embriões vivos no período/concentração correspondente. As 96h a barra de 100uM desaparece pois todos os embriões morreram
Fonte: Elaborado pela autora.

Para aprofundar melhor a análise sobre o edema pericárdio, foi realizado a análise estatística entre as amostras dos embriões de peixe-zebra nas diferentes concentrações ao longo dos períodos de 48h, 72h e 96h (Figura 18).

Nas primeiras 24h não houve porcentagem expressiva de edema pericárdio, por esse motivo não foi incluído esse período na figura 18.

Analisando os gráficos da figura 18 é nítido que ocorre uma maior incidência de edema pericárdio nas 48h nas diversas concentrações, em especial na concentração de 50uM, porém não houve diferença estatística entre as concentrações testadas.

Em 72h também não houve diferença estatística entre as concentrações de rosiglitazona, e observa-se uma queda de incidência de edema pericárdio nas concentrações.

Porém é digno de nota que nas menores concentrações a mortalidade se manteve estável, porém nas concentrações de 12,5 e 6,25uM houve a queda de edema pericárdio comparado ao dia anterior.

Entre 72h e 96h, observamos que ao final de 96h, as concentrações de 50 e 100uM desaparecem pois houve mortalidade máxima nesta última, e nos embriões sobreviventes de 50uM não foi observado alterações.

O acometimento dos embriões de peixe-zebra com edema pericárdio na concentração de 25uM foi significativamente maior quando comparado as outras concentrações e os controles.

Quando analisamos as porcentagens de deformidade da cauda dos embriões de peixe-zebra (Figura 19), podemos observar que houve uma maior incidência em 48h na concentração de 50uM, porém houve queda em 72h, visto a mortalidade das larvas.

Não houve diferença estatística em nenhum dos períodos analisados considerando as diferentes concentrações de rosiglitazona.

Porcetagem de edema pericárdio em embriões de peixe-zebra com rosiglitazona em diferentes tempos.

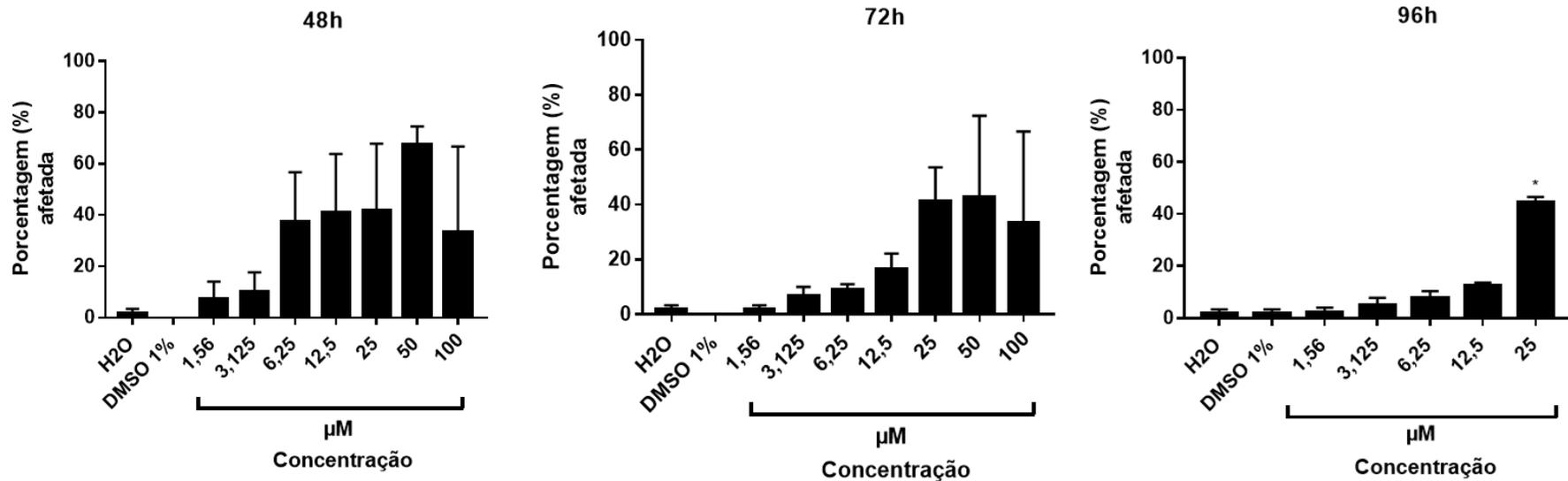


Figura 18 - Porcetagem de edema pericárdio em embriões de peixe-zebra com rosiglitazona em 48h, 72h e 96h. As barras dos gráficos representam a porcentagem das médias com EPM. As 96h na concentração de 25µM houve um aumento estatisticamente significativo em relação aos controles e as demais concentrações. Análise estatística realizada com ANOVA com pós-teste de múltiplas comparações Tukey, o asterisco (*) representa valor de $p \leq 0,05$, indicando a significância estatística.

Porcetagem de deformidade da cauda de embriões de peixe-zebra com rosiglitazona em diferentes tempos.

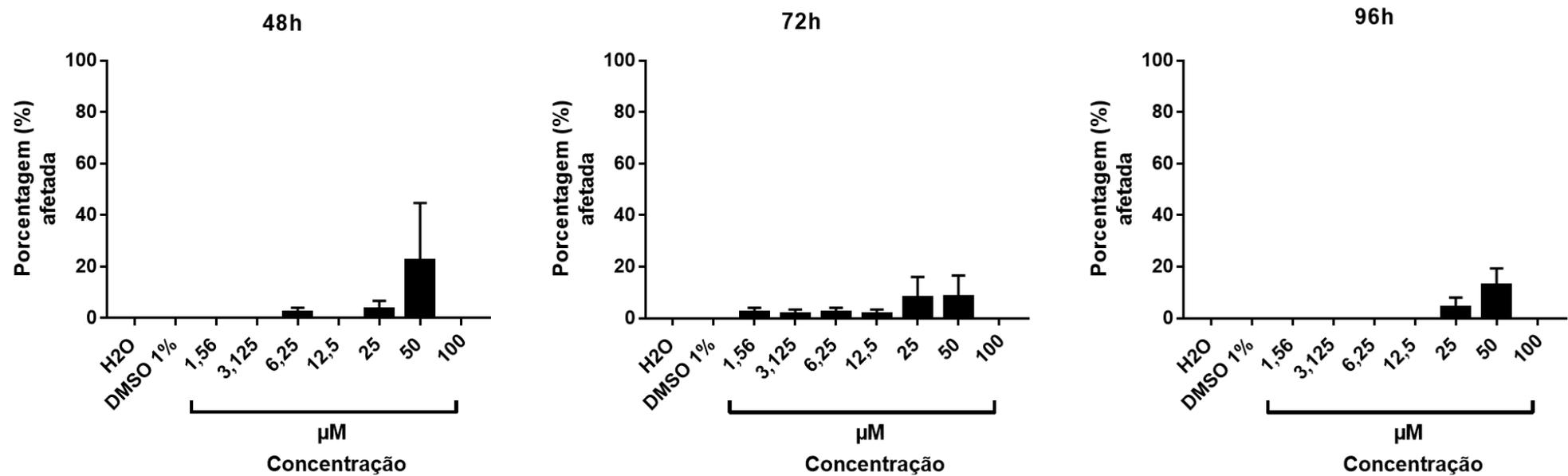


Figura 19 - Porcetagem de deformação da cauda em embriões de peixe-zebra com rosiglitazona em 48h, 72h e 96h. As barras dos gráficos representam a porcentagem das médias com EPM. Análise estatística realizada com ANOVA com pós-teste de múltiplas comparações Tukey. Não houve significância estatística em nenhum dos períodos apresentados.

4.2 Pioglitazona teste FET

O resultado geral do FET com pioglitazona é apresentado nas figuras 20 (a qual a apresenta a mortalidade) e 21 (a qual apresenta as alterações morfológicas).

Da mesma forma como anteriormente, primeiro analisaremos a mortalidade dos embriões de peixe-zebra durante os períodos de 24h, 48h, 72h e 96h, nas concentrações de 1,56 uM, 3,125 uM, 6,25 uM, 12,5 uM, 25uM, 50uM e 100uM.

E em seguida, será apresentado as alterações morfológicas que os embriões/larvas sobreviventes sofreram ao longo do tempo nas concentrações supracitadas.

Observando o período de 24h do experimento com pioglitazona. É possível observar que maior parte dos embriões estavam vivos ao longo das concentrações. A mortalidade nas concentrações de 1,56 uM, 3,125 uM, 6,25 uM, 12,5 uM, 25uM, 50uM e 100uM foi respectivamente de 2%, 0%, 0%, 8%, 3%, 0% e 2%, nos controles a mortalidade foi igualmente de 2%.

Já no período de 48h houve singelo aumento de mortalidade nas concentrações de 1,56 uM, 3,125uM, e 25uM, respectivamente de 7%, 2% e 7% (anterior 2%, 0%, 3%).

Analisando o que ocorreu em 72h, houve aumento da mortalidade nas concentrações a partir das concentrações 3,125 uM. Parte da mortalidade ocorrida nesse período eram de larvas, ou seja, embriões que já haviam eclodido. A porcentagem de embriões mortos foi de 7%, 4%, 3%, 10%, 12%, 2% e 7% para as respectivas concentrações 1,56 uM, 3,125 uM, 6,25 uM, 12,5 uM, 25uM, 50uM e 100uM.

Ao final de 96h, a mortalidade aumentou, na maior concentração (100uM) foi de 7% para 10%, na segunda maior concentração foi de 2% para 15%, em 25uM foi de 12% para 17% em 12,5uM de 10% para 14%. Não foi possível realizar o cálculo da CL50 para pioglitazona já que não houve letalidade alta.

Porcentagem de mortalidade de embriões de peixe-zebra com pioglitazona em diferentes tempos.

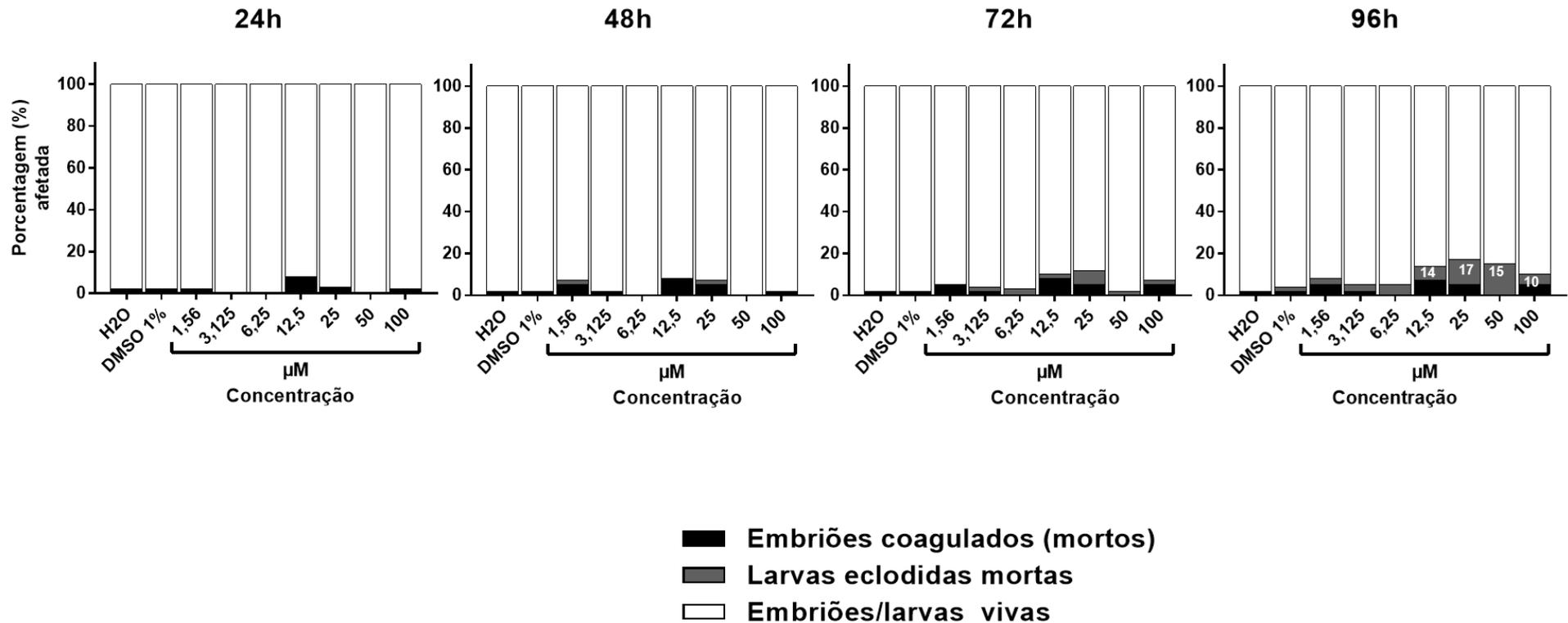


Figura 20 - Porcentagem de mortalidade geral de embriões de peixe-zebra expostos a pioglitazona em diferentes tempos. Os gráficos mostram as seguintes concentrações: 100 uM, 50uM, 25uM, 12,5 uM, 6,25 uM, 3,125uM e 1,56uM; controle DMSO 1%, água; nos períodos de 24h, 48h, 72h e 96h. A cor da barra mostra os embriões coagulados (Embriões mortos) na cor preta, branca embriões/larvas eclodidas vivas, cinza escuro – larvas eclodidas mortas; o número na cor branca representa a porcentagem total de morte na concentração correspondente. Análise realizada considerando o número de morte pelo número total de embriões (n=60 por grupo). Fonte: Elaborado pela autora.

Dando seguimento a análise do FET com pioglitazona, iremos observar a figura 21, a qual demonstra os resultados das alterações morfológicas nas diferentes concentrações ao longo do tempo.

No período de 24h, observamos que nas concentrações de 1,56 uM, 3,125 uM, 6,25 uM, 25uM, 50uM houve o aparecimento de edema pericárdio nas seguintes porcentagens 4%, 8%, 5%, 2% e 2% respectivamente.

De modo interessante no período de 48h a incidência de edema pericárdio aumentou em todas as concentrações quando comparado ao dia anterior. As porcentagens de edema pericárdio nas concentrações 1,56 uM, 3,125 uM, 6,25 uM, 12,5 uM, 25uM, 50uM e 100uM são: 20%, 16%, 13%, 25%, 5%, 7% e 33%.

Porém quando visualizamos o gráfico de 72h é perceptível que há uma redução da ocorrência de edema pericárdio nas concentrações sugerindo que há recuperação de alguns embriões, visto que há baixa mortalidade no período entre 48h e 72h.

Os percentis associados nas concentrações de 1,56 uM, 3,125 uM, 6,25 uM, 25uM, e 50uM são 4%, 8%, 5%, 2% e 2% respectivamente para a ocorrência de edema pericárdio.

Além disso, houve a o aparecimento de 2% de edema de saco vitelino na concentração de 50uM no período de 72h.

Ao final das 96h, avaliando a porcentagem do aparecimento do edema de saco vitelino houve uma porcentagem de 2% nas concentrações de 1,56 uM, 12,5 uM e 50uM.

Já para o edema pericárdio os valores percentuais são de 2%, 2%,4%, 8%, 2%, 4%, e 6% nas concentrações 1,56 uM, 3,125 uM, 6,25 uM, 12,5 uM, 25uM, 50uM e 100uM.

Porcentagem de alterações morfológicas em embriões de peixe-zebra com pioglitazona em diferentes tempos.

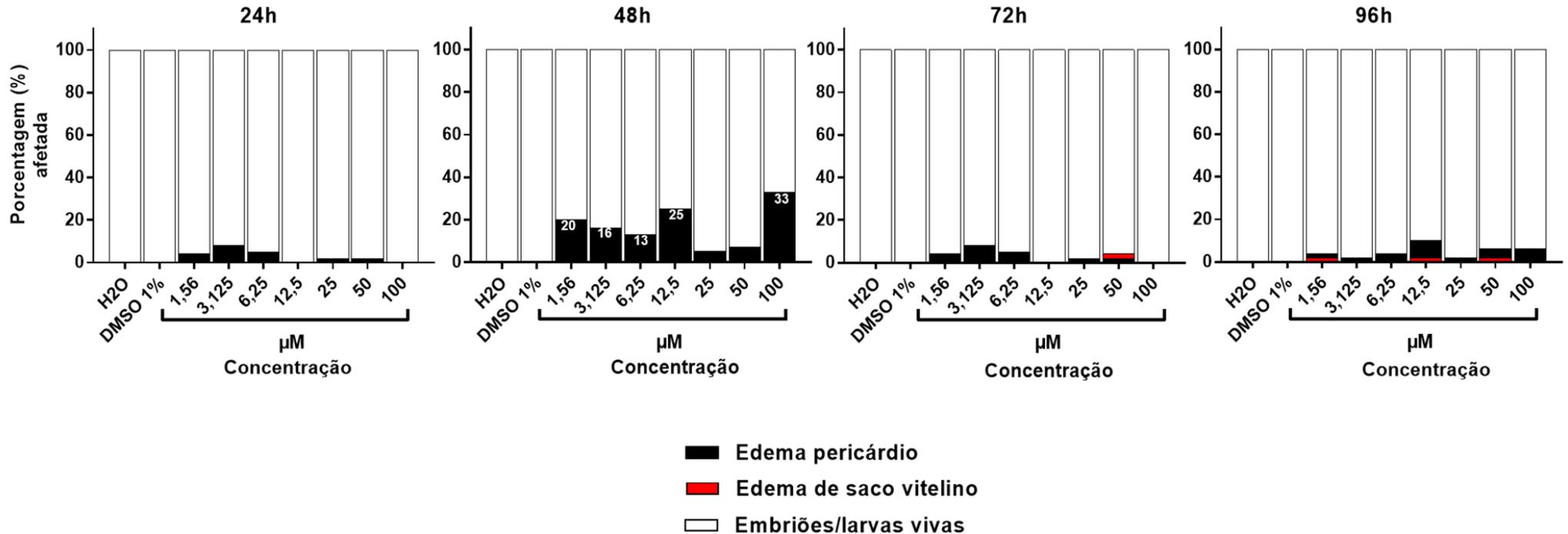


Figura 21- – Porcentagem de alterações morfológicas em embriões de peixe-zebra expostos a pioglitazona em diferentes tempos. Os gráficos mostram as seguintes concentrações: 100 uM, 50uM, 25uM, 12,5 uM, 6,25 uM, 3,125uM e 1,56uM; controle DMSO 1%, água; nos períodos de 24h, 48h, 72h e 96h. A cor da barra mostra edema pericárdio na cor preta, branca embriões/larvas eclodidas vivas, e em vermelho edema de saco vitelino (2%) o número dentro da barra representa a porcentagem do evento na concentração correspondente. Análise realizada considerando o número do evento pelo número total de embriões vivos no período/concentração correspondente. Fonte: Elaborado pela autora.

Nesse contexto, para analisar melhor o edema pericárdio foi realizado a análise estatística entre as amostras dos embriões de peixe-zebra nas diferentes concentrações ao longo dos períodos de 48h, 72h e 96h (Figura 22).

De modo similar a rosiglitazona, com a exposição a pioglitazona nas primeiras 24h não houve porcentagem expressiva de edema pericárdio, por esse motivo não foi incluído esse período na figura 22.

É notável que no período de 48h, houve um aumento expressivo da ocorrência de edema pericárdio em todas as concentrações de pioglitazona. Ao realizar a análise estatística, o resultado mostrou que houve diferença significativa apenas na concentração de 25uM em relação aos controles do teste.

Tanto no período de 72h quanto em 96h, houve uma queda da frequência de edema pericárdio em comparação com o período de 48h. Entre as concentrações nesses dois períodos não houve qualquer diferença estatisticamente significativa.

4.3 GQ-16 teste FET

O resultado geral do FET com GQ-16 é apresentado nas figuras 23 (a qual apresenta a mortalidade) e 24 (a qual apresenta as alterações morfológicas).

Seguindo a mesma lógica, primeiro analisaremos a mortalidade dos embriões de peixe-zebra durante os períodos de 24h, 48h, 72h e 96h, nas concentrações de 1,56 uM, 3,125 uM, 6,25 uM, 12,5 uM, 25uM, 50uM e 100uM.

E em seguida, será apresentada as alterações morfológicas que os embriões/larvas sobreviventes sofreram ao longo do tempo nas concentrações supracitadas.

Quando observamos o período de 24h e 48h do experimento com GQ-16 na figura 23, vemos que não houve embriões coagulados, ou seja, mortos, nesse período em nenhuma das concentrações testadas do GQ-16.

Percentual de edema pericárdio com pioglitazona em diferentes tempos.

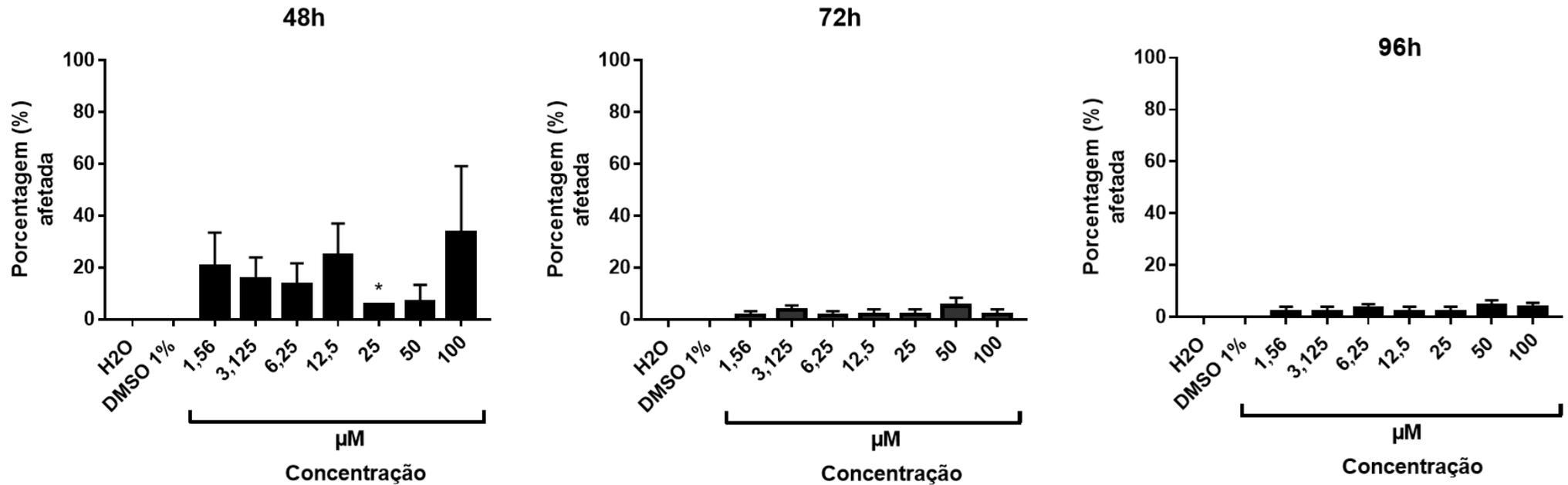


Figura 22 - Percentagem de edema pericárdio em embriões de peixe-zebra com pioglitazona em 48h, 72h e 96h. As barras dos gráficos representam a porcentagem das médias com EPM. Análise estatística realizada com ANOVA com pós-teste de múltiplas comparações Tukey. o asterisco (*) representa valor de $p \leq 0,05$, indicando a significância estatística.

Porcentagem de mortalidade de embriões de peixe-zebra com GQ-16 em diferentes tempos.

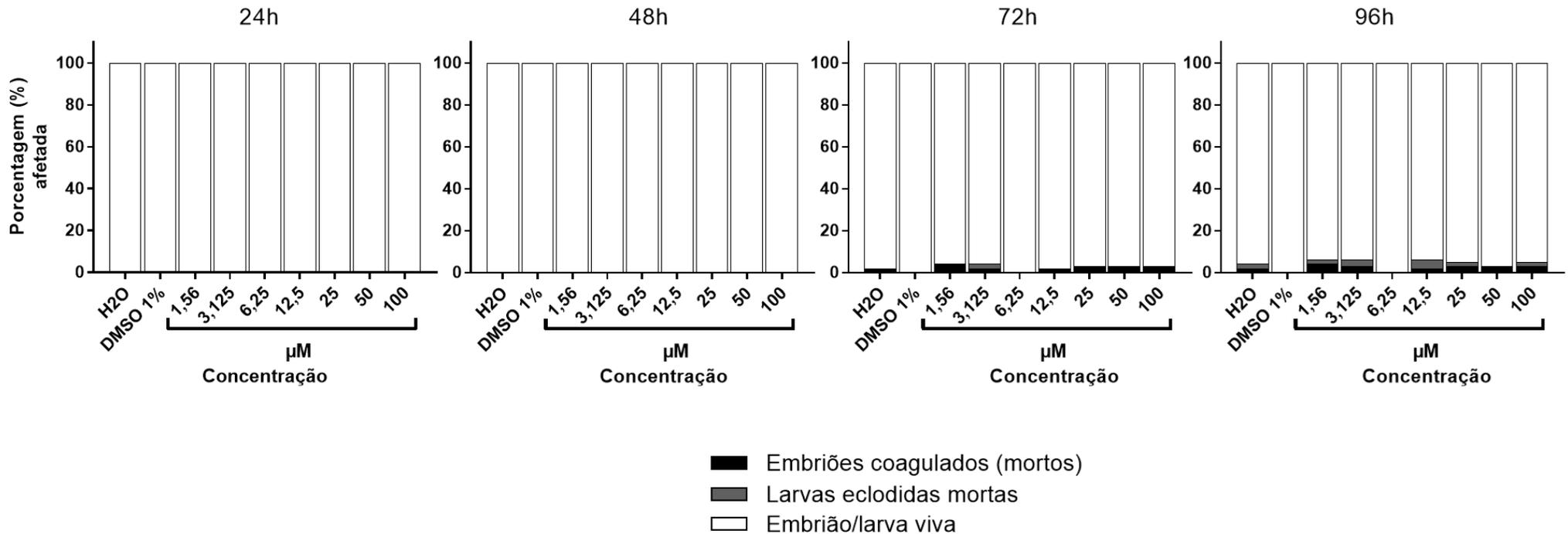


Figura 23 - Porcentagem de mortalidade geral de embriões de peixe-zebra expostos ao GQ-16 em diferentes tempos. Os gráficos mostram as seguintes concentrações: 100 uM, 50uM, 25uM, 12,5 uM, 6,25 uM, 3,125uM e 1,56uM; controle DMSO 1%, água; nos períodos de 24h, 48h, 72h e 96h. A cor da barra mostra os embriões coagulados (Embriões mortos) na cor preta, branca embriões/larvas eclodidas vivas, cinza escuro – larvas eclodidas mortas; o número na cor branca representa a porcentagem total de morte na concentração correspondente. Análise realizada considerando o número de morte pelo número total de embriões (n=60 por grupo). Fonte: Elaborado pela autora.

No período de 72h do FET com GQ-16, houve uma discreta mortalidade nas concentrações de 1,56 uM, 3,125 uM, 12,5 uM, 25uM, 50uM e 100uM, sendo elas: 4%, 2%, 2%, 3%, 3%, 3% e nos controles houve 2% na água. Não ocorreu morte na concentração de 6,25 uM e no DMSO 1%.

Por fim, completado as 96 h de experimento, não houve mortalidade na concentração de 6,25 uM e no DMSO 1% como havia sido observado no dia anterior.

Já nas demais concentrações houve um aumento da mortalidade para 1,56 uM, 3,125 uM, 12,5 uM, 25uM, 100uM sendo os valores de 6%, 6%, 6%, 2%, 4%. Houve 3% no controle água e a mortalidade manteve-se estável na concentração de 50uM. Devido à baixa letalidade não pode ser calculado a CL50 para o GQ-16.

Quanto as alterações morfológicas, podemos observar na figura 24, que nos períodos de 24h, 48h e 72h não houve qualquer alteração morfológica nos embriões de peixe zebra expostos ao GQ-16, ou seja, todos apresentavam desenvolvimento normal durante esses períodos.

No último dia do teste, as 96h (Figura 24), observou-se a incidência de um leve edema pericárdio em todas as concentrações. Os valores correspondentes são: 4%, 5%,9%, 12%, 7%, 9%, 9% para as concentrações de 1,56 uM, 3,125 uM, 6,25 uM, 12,5 uM, 25uM, 50uM e 100uM.

Observando a próxima figura 25, podemos visualizar melhor a frequência do edema pericárdio, sendo maior na concentração de 12,5uM com 12%, no entanto, apesar desse valor se considerável, na análise estatística evidenciou diferença em relação aos controles.

Porcentagem de alterações morfológicas em embriões de peixe-zebra com GQ-16 em diferentes tempos.

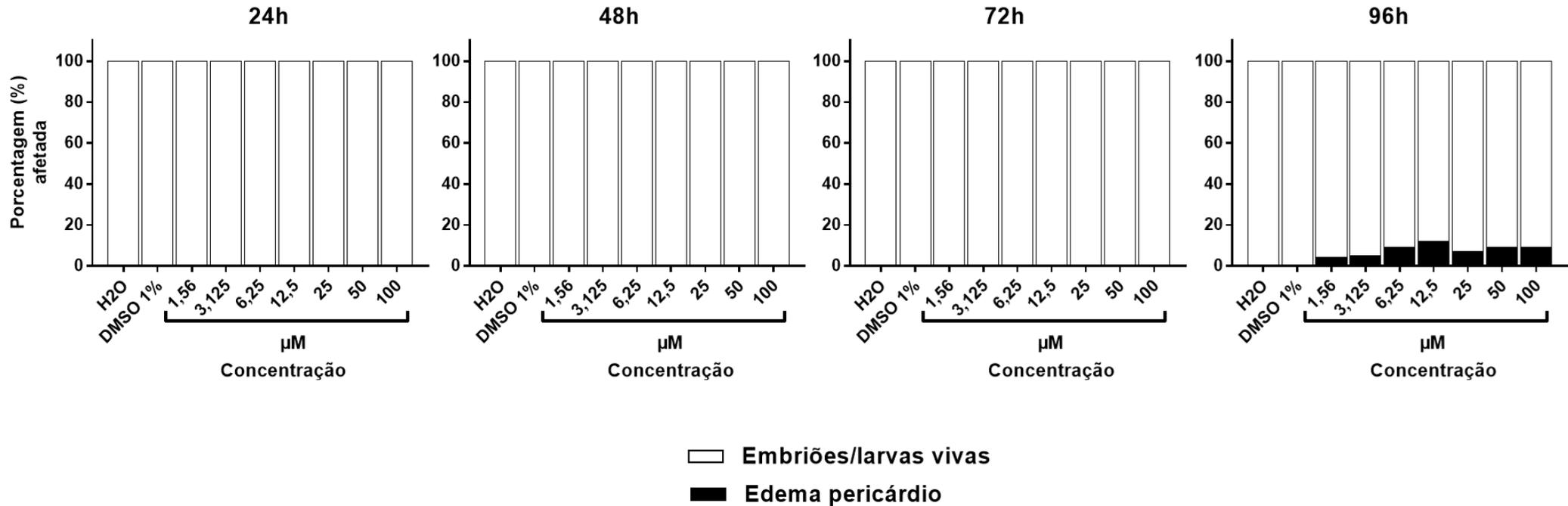


Figura 24 -- Porcentagem de alterações morfológicas em embriões de peixe-zebra expostos ao GQ-16 em diferentes tempos. Os gráficos mostram as seguintes concentrações: 100 μM, 50μM, 25μM, 12,5 μM, 6,25 μM, 3,125μM e 1,56μM; controle DMSO 1%, água; nos períodos de 24h, 48h, 72h e 96h. A cor da barra mostra edema pericárdio na cor preta, branca embriões/larvas eclodidas vivas. O número dentro da barra representa a porcentagem do evento na concentração correspondente. Análise realizada considerando o número do evento pelo número total de embriões vivos no período/concentração correspondente. Fonte: Elaborado pela autora.

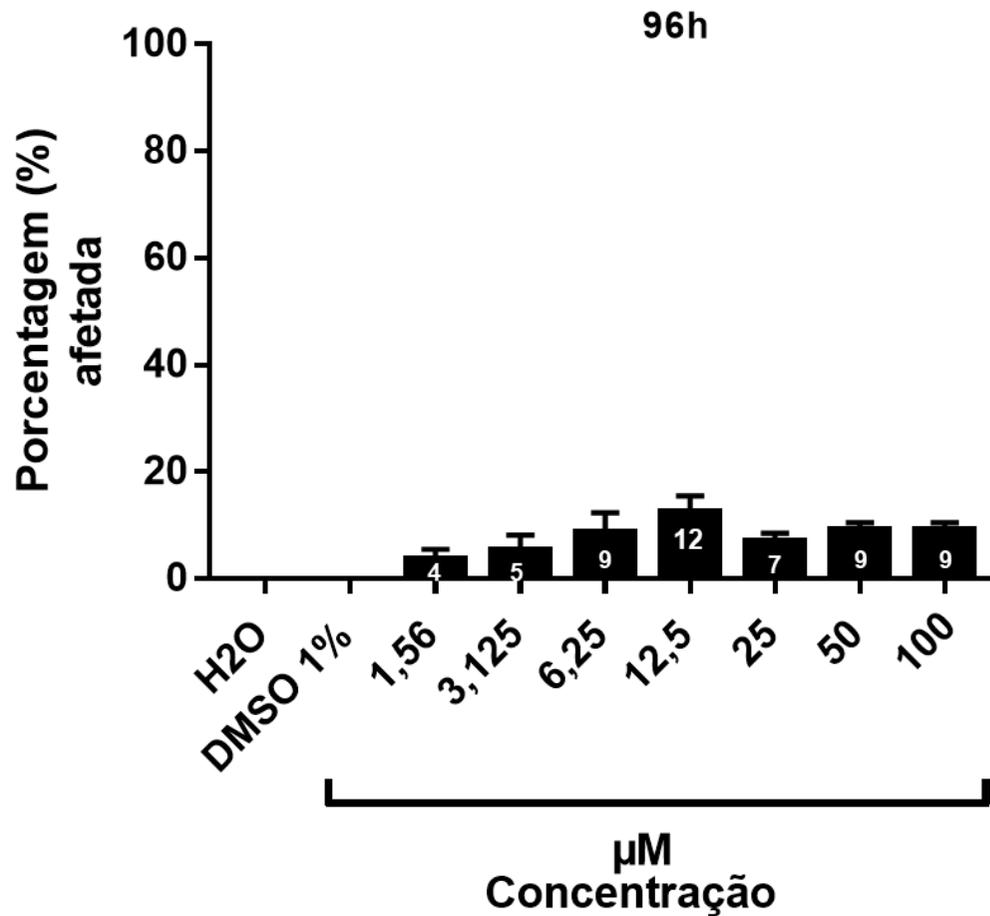


Figura 25 - Porcentagem de edema pericárdio em embriões de peixe-zebra com GQ-16 em 96h. As barras dos gráficos representam a porcentagem das médias com EPM, em branco os valores de porcentagem exatos para cada concentração. Análise estatística realizada com ANOVA com pós-teste de múltiplas comparações Tukey. Não houve significância estatística em nenhuma das concentrações apresentadas D

4.4 Comparação GQ-16 com pioglitazona e rosiglitazona.

Considerando os achados dos três testes de embriotoxicidade com GQ-16, pioglitazona e rosiglitazona, percebemos que o padrão de mortalidade foi diferente entre esses compostos. Selecionando as seguintes concentrações de 25uM e 100 uM, dessa forma podemos visualizar na figura 26 como se deu a mortalidade dos embriões dos peixes-zebra. Comparando do maior para o menor (Figura 26), na concentração de 100uM a rosiglitazona foi capaz de levar todos os embriões a óbito, enquanto na pioglitazona na mesma concentração houve 10% de mortalidade, já no GQ-16 o valor foi menor, com apenas 5% de mortalidade.

Interessantemente, na concentração de 25uM a porcentagem de mortalidade geral com a rosiglitazona e com a pioglitazona foi igual (17%). No entanto é observável que a rosiglitazona apresentou uma mortalidade mais precoce (embriões coagulados) enquanto a pioglitazona foi predominantemente de larvas já eclodidas. Nessa mesma concentração, quando comparamos com GQ-16, podemos observar que o GQ-16 apresentou mortalidade de 5%, ou seja, menor que pioglitazona e rosiglitazona.

Em relação a alterações morfológicas, o aparecimento de edema pericárdio foi em comum aos três compostos. Na figura 27, aprofundando com análise estatística, a pioglitazona 25uM foi estatisticamente diferente do GQ-16 (25 e 100uM). Em 72h, houve aumento da porcentagem de edema pericárdio com rosiglitazona 25uM e diminuição na concentração de 25uM de pioglitazona.

Já em 96h, ao final da análise do experimento, a rosiglitazona apresentou maior porcentagem de edema pericárdio na concentração de 25uM, sendo estatisticamente significativa em relação ao GQ-16, pioglitazona e controles. A figura 28 ilustra larvas de peixe-zebra com as principais alterações de edema pericárdio quando expostos aos três compostos, sendo visível o proeminente edema com rosiglitazona.

Comparação da porcentagem de mortalidade entre GQ-16, pioglitazona e rosiglitazona em 96h

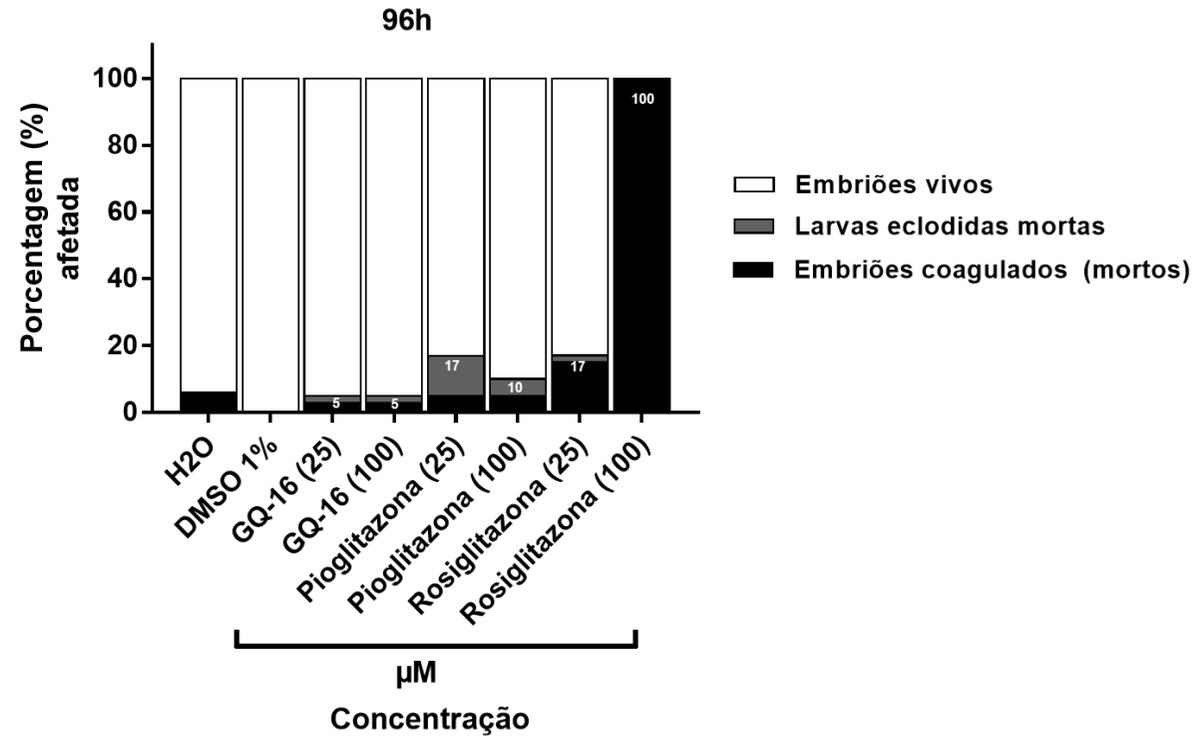


Figura 26 – Comparação da porcentagem de mortalidade entre os testes FET com exposição ao GQ-16 comparado a pioglitazona e a rosiglitazona em 96h nas concentrações de 25 μ M e 100 μ M. A cor da barra mostra os embriões coagulados (Embriões mortos) na cor preta, branca embriões/larvas eclodidas vivas, cinza escuro – larvas eclodidas mortas; o número na cor branca representa a porcentagem total de morte na concentração correspondente. Análise realizada considerando o número de morte pelo número total de embriões (n=60 por grupo). Fonte: Elaborado pela autora.

Comparação da porcentagem de edema pericárdio em embriões de peixe-zebra com GQ-16, pioglitazona e rosigitazona em diferentes tempos.

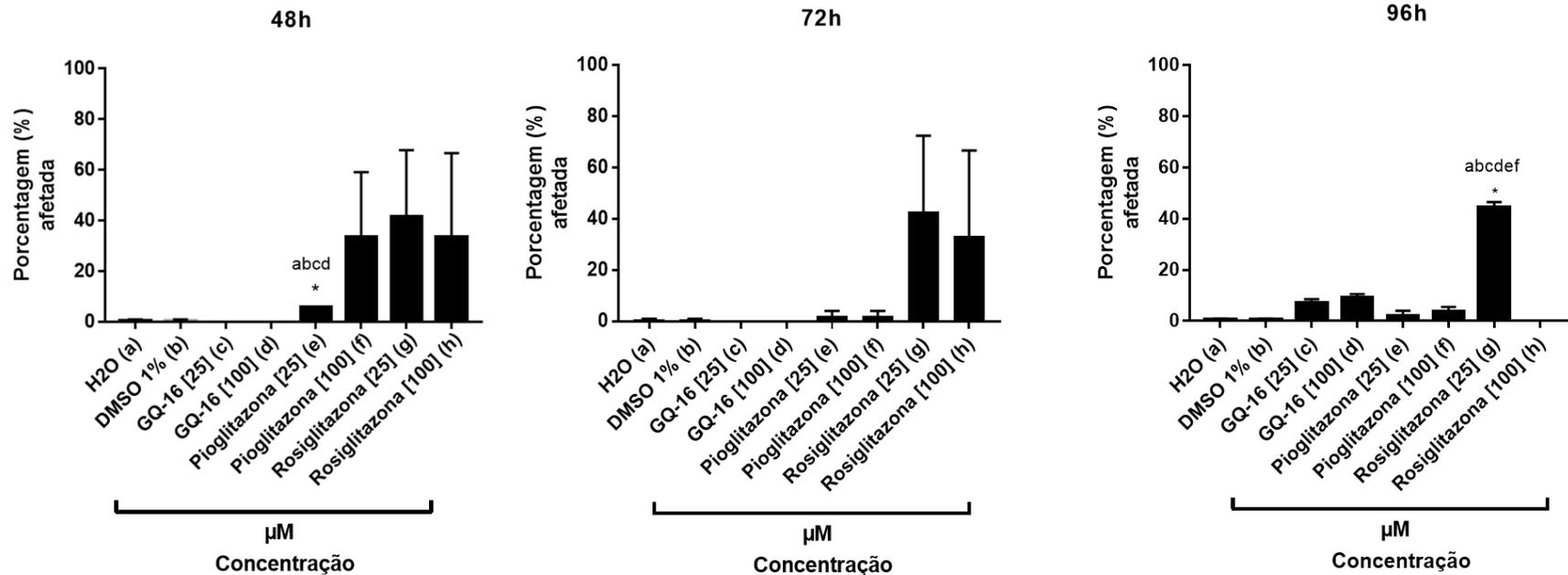


Figura 27 – Comparação da porcentagem de edema pericárdio em embriões de peixe-zebra expostos ao GQ-16, pioglitazona e rosigitazona no período de 48h, 72h e 96h de experimento. comparando GQ-16 (c;d), pioglitazona (e;f) e rosigitazona (g,H) nas concentrações de 100uM e 25uM. Para o controle DMSO 1%(b), água (a) provenientes foi considerado a média dos FETs com rosigitazona, GQ-16 e pioglitazona. As barras indicam a média ± erro padrão da média. O (*) indica $p < 0.05$. Análise estatística realizada com ANOVA com teste tukey para múltiplas comparações. As letras (a-g) indicam em relação a quais contrações houve significância estatística.

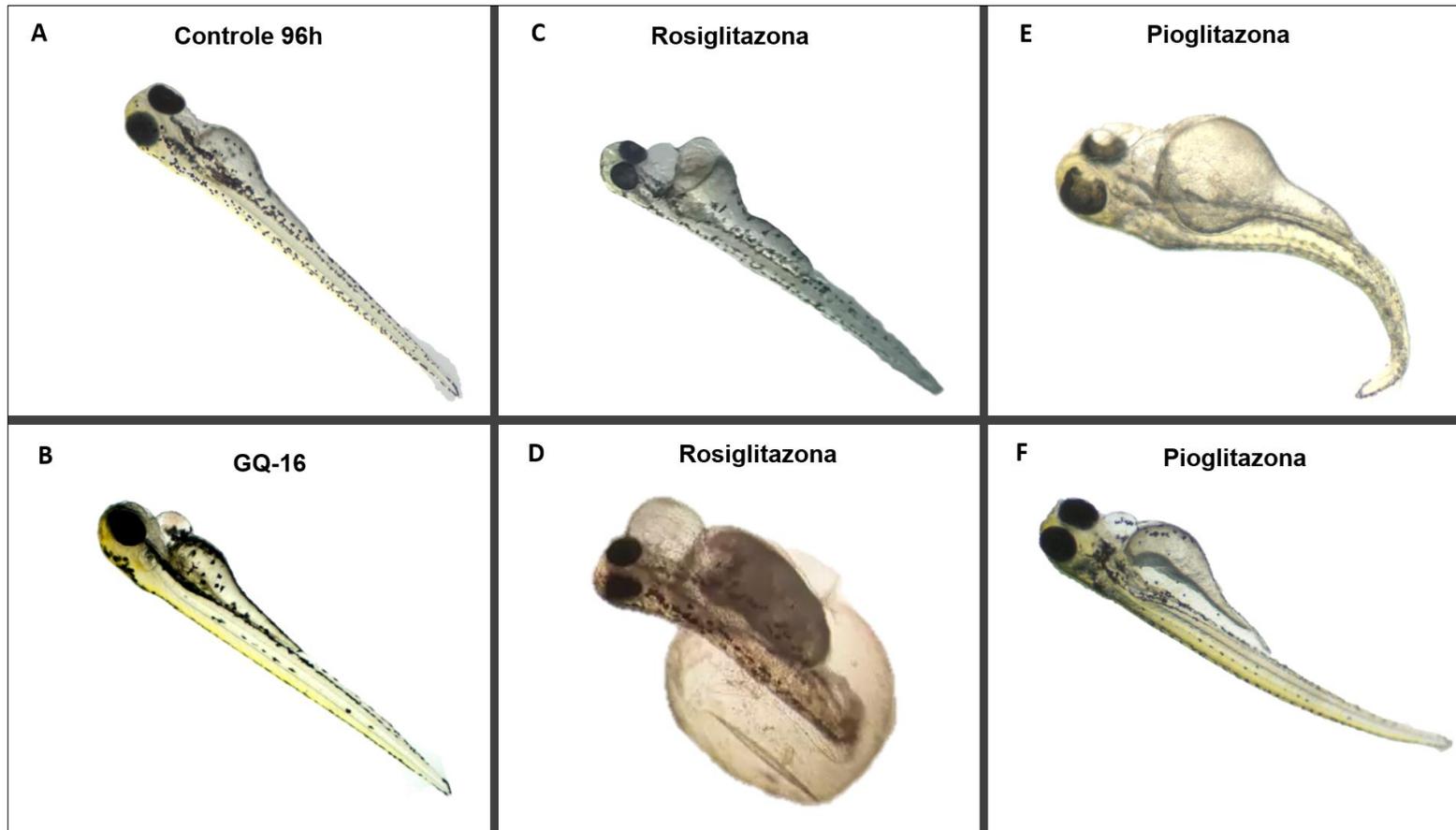


Figura 28 - Fotos ilustrativas das larvas de peixe-zebra expostas a rosiglitazona, pioglitazona e GQ-16 em 96h após a fertilização. (A) Larva de peixe zebra do controle sem alterações morfológicas. (B) Larva de peixe-zebra exposta ao GQ-16 apresentando leve edema pericárdio. (C e D) Larvas de peixe-zebra expostas a rosiglitazona ambas apresentando proeminente edema pericárdio; C- Edema de saco vitelino; D- deformidade da cauda. (E e F) Larvas expostas a pioglitazona ambas apresentando moderado edema pericárdio. E- Deformidade da cauda; F- Bexiga natatória não inflada.

4.5 Resultados da análise de expressão gênica

4.5.1 Quantificação do RNA

Os resultados da quantificação do RNA pelo nanodrop estão descritos na tabela 2 abaixo.

Os valores indicam a quantidade de RNA por uL, bem como suas relações de pureza 260/280. Todas as amostras apresentaram níveis aceitáveis para a realização da RT-PCR.

Quadro 2 – Quantificação das amostras de peixe-zebra no nanodrop. Amostra, quantidade em ng/uL. Relação 260/280 e 260/230. Quantidade em ug/uL nas amostras.

Amostra	ng/ μ L	260/280	ug/ μ L
cabeça diluída	933,6	2,1	0,93
DMSO - 1	187,7	2,04	0,19
DMSO - 2	144,5	2,05	0,14
DMSO - 3	164,5	2,04	0,16
DMSO - 4	405,9	2,07	0,41
DMSO - 5	162,3	2,05	0,16
DMSO - 6	236,5	2,06	0,24
DMSO - 7	149,8	2,02	0,15
DMSO- 8	243,9	2,07	0,24
GQ16 100 - 1	153,7	2,04	0,15
GQ16 100 - 2	195,8	2,06	0,2
GQ16 100 - 3	247,3	2,05	0,25
GQ16 100 - 4	134,2	2,01	0,13
GQ16 100 - 5	132,8	1,96	0,13
GQ16 100 - 6	145,3	2	0,15
GQ16 100 - 7	116,8	1,94	0,12
GQ16 100 - 8	171,6	2,01	0,17
GQ16 25 - 1	252,4	2,03	0,25
GQ16 25 - 2	265,8	2,08	0,27
GQ16 25 - 3	213,4	2,05	0,21
GQ16 25 - 4	151,5	2,03	0,15
GQ16 25 - 5	198,1	2,05	0,2
GQ16 25 - 6	131,5	2,03	0,13
GQ16 25 - 7	61,8	1,95	0,06
GQ16 25 - 8	186,8	2,05	0,19
H2O - 1	187,1	2,05	0,19
H2O - 2	142,1	2,03	0,14
H2O - 3	162	2,04	0,16
H2O - 4	212,3	2,04	0,21

H2O - 5	101,9	2,01	0,1
H2O - 6	178,9	2,02	0,18
H2O - 7	168,3	2,05	0,17
H2O - 8	96,6	1,98	0,1
Larvas 5dpf	383,8	2,11	0,38
Pio 100 - 1	235,6	2,09	0,24
Pio 100 - 2	235,4	2,07	0,24
Pio 100 - 3	104,4	2,05	0,1
Pio 100 - 4	141,8	2,07	0,14
Pio 100 - 5	103,9	2,02	0,1
Pio 100 - 6	109,6	2,04	0,11
Pio 100 - 7	139,9	2,07	0,14
Pio 100 - 8	117,2	2,06	0,12
Pio 25 - 1	183,3	2,02	0,18
Pio 25 - 2	276,9	2,06	0,28
Pio 25 - 3	112,9	2,04	0,11
Pio 25 - 4	68,6	2,01	0,07
Pio 25 - 5	90,7	2	0,09
Pio 25 - 6	176,1	2,07	0,18
Pio 25 - 7	94	2,02	0,09
Pio 25 - 8	166,2	2,03	0,17
Rosi 25 - 1	71,7	1,97	0,07
Rosi 25 - 2	112,8	1,99	0,11
Rosi 25 - 3	150,5	2,02	0,15
Rosi 25 - 4	176,3	2,05	0,18
Rosi 25 - 5	138,8	2,07	0,14
Rosi 25 - 6	130,1	2,07	0,13
Rosi 25 - 7	126,8	2,08	0,13
Rosi 25 - 8	107,7	2,06	0,11

Fonte: Elaborado pela própria autora.

4.5.2 Análise da eficiência dos primers

A análise de eficiência dos primers foi avaliada a partir das curvas de diluição (Figura 29 e 30), já que para utilizar o método de Livak, as eficiências de amplificação do gene alvo e endógeno devem ser equivalentes. Dessa forma a eficiência calculada deve estar entre os valores de 90%-110%.

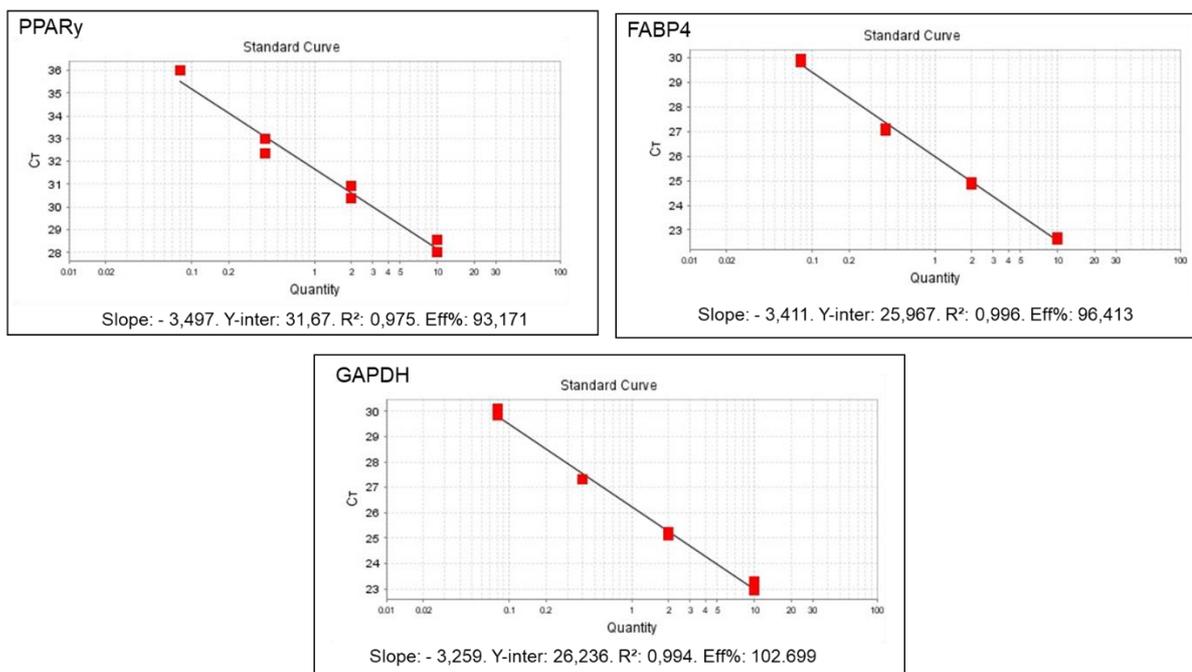


Figura 29 – Gráficos descrevem a eficiência dos primers utilizados. PPAR γ (93%), FABP4 (96%), GAPDH (102%). Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.3 Análise da especificidade dos primers

Para avaliar a especificidade de cada par de primer, utilizamos a curva de melting (curva de dissociação de do produto de amplificação), já que o sistema via SYBR® Green para detecção liga o fluoróforo a qualquer fita dupla de DNA. Assim, a presença de um único pico na curva melting indica que há apenas um fragmento de DNA, caso contrário aparecerá o dímero de primer.

O resultado das curvas melting para cada primer é apresentado na figura 30 abaixo. Todas as curvas foram consideradas de acordo para a realização do experimento.

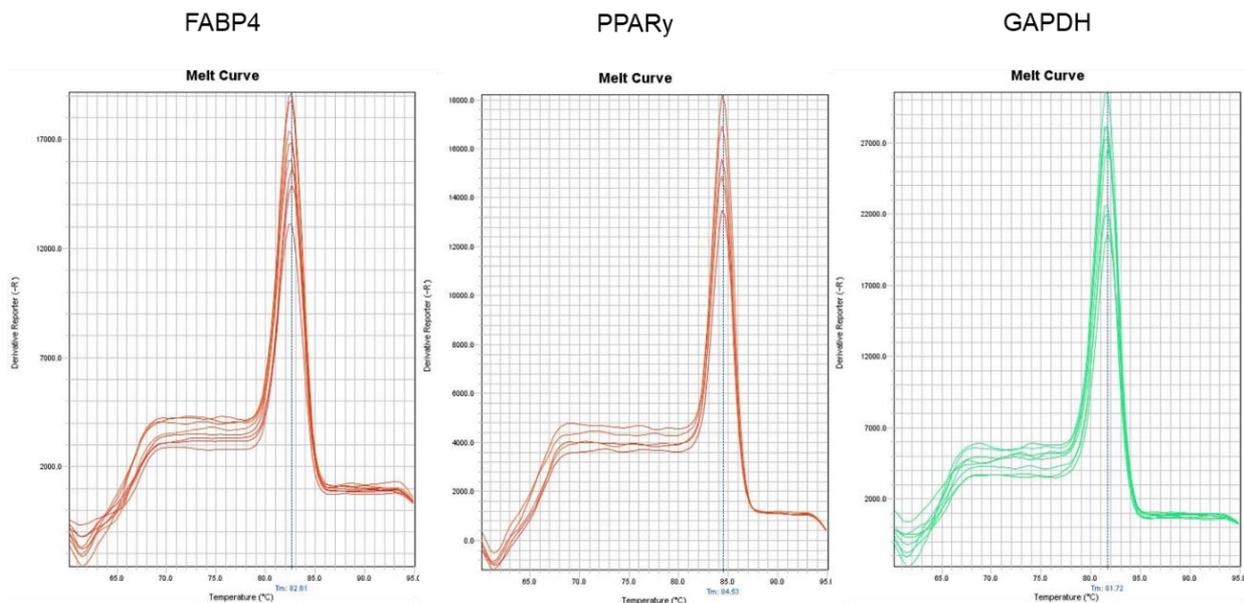


Figura 30 - Os gráficos descrevem as curvas melting para cada par de primer. FABP4, PPAR γ , GAPDH.

4.5.4 Análise dos produtos de PCR por meio do Gel de agarose

Resultado da eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, e examinado sob luz ultravioleta, mostrou as bandas esperadas teriam os seguintes tamanhos: 117 para FABP4; 166 para PPAR γ ; 110 para GAPDH, sem nenhuma outra banda que pudesse sugerir outro produto amplificado. (Figura 31)

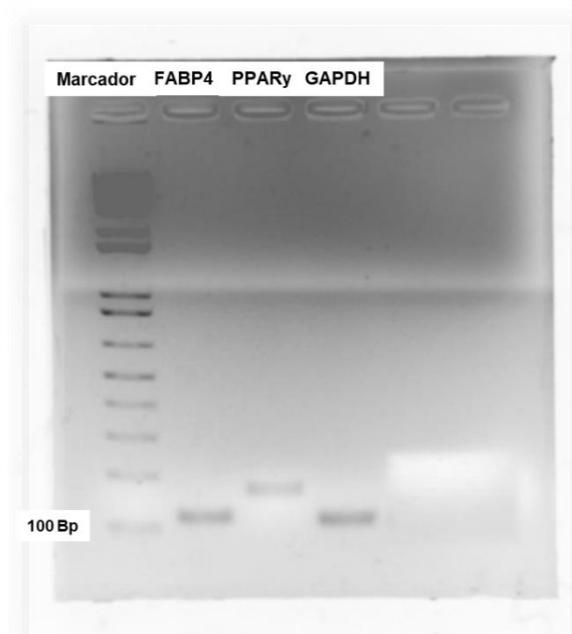


Figura 31 - Foto do gel de agarose 2% com os produtos amplificados pela PCR da validação dos primers. bandas esperadas teriam os seguintes tamanhos: 117 para FABP4; 166 para PPAR γ ; 110 para GAPDH., Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.5 Quantificação relativa por qRT-PCR

A análise de expressão gênica por RT-PCR revelou que a expressão de PPAR γ (Figura 32) foi significativamente maior em larvas de peixe-zebra expostas a pioglitazona na concentração de 25 μ M ($p=0,01$) e para rosiglitazona na mesma concentração (25 μ M) $p= 0,001$.

No entanto, quando observamos o GQ-16 nas concentrações de 25 μ M e 100 μ M, bem com pioglitazona 100 μ M, não houve significância estatística.

De modo interessante, quando observamos o resultado da RT-PCR para o FABP4 (Figura 33) vemos que o resultado demonstrou que houve aumento significativo para as larvas de peixe-zebra expostas ao GQ-16 na concentração de 25 μ M ($p= 0.04$), pioglitazona 25 μ M ($p=0.05$) e rosiglitazona 25 μ M($p=0.01$).

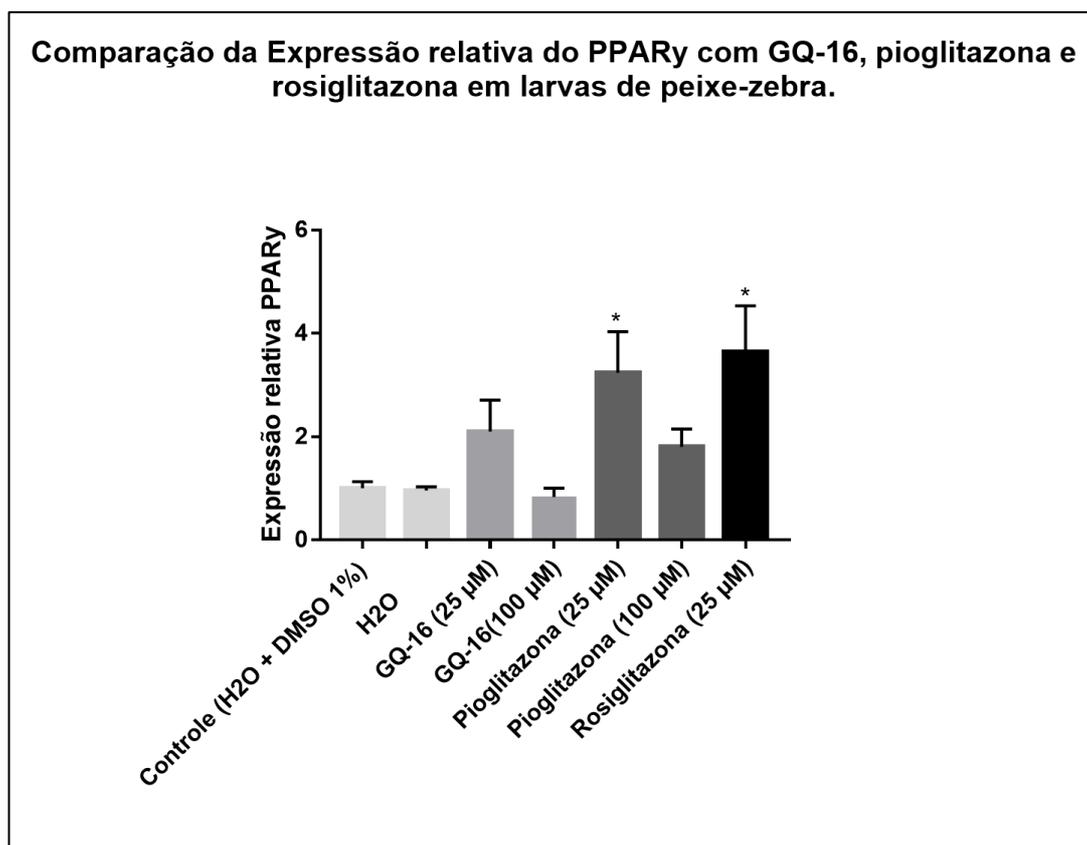


Figura 32 – Comparação da expressão relativa do PPAR γ em larvas de peixe-zebra expostas ao GQ-16 (25 e 100 μ M), pioglitazona (25 μ M e 100 μ M). As barras representam a média \pm EPM. Em preto está rosigitazona 25 μ M, em cinza escuro pioglitazona (25 e 100 μ M), em cinza tonalidade média o GQ-16 (25 e 100 μ M) e mais claro os controles. O asterisco (*) representa a significância estatística de $p \leq 0,05$ em relação ao controle DMSO1%. Análise de variância Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de múltiplas comparações de Dunnet.

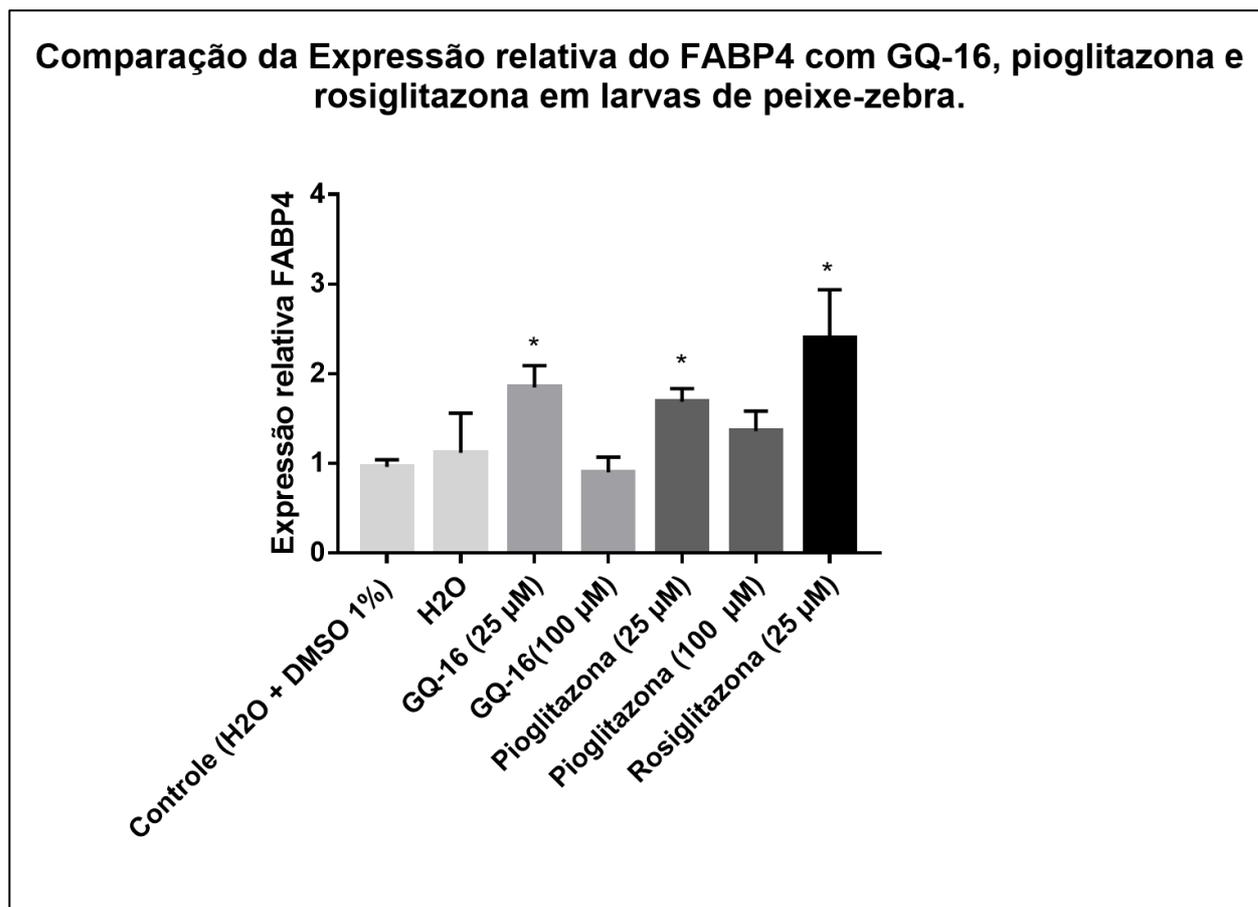


Figura 33 Comparação da expressão relativa do FABP4 em larvas de peixe-zebra expostas ao GQ-16 (25 e 100uM), pioglitazona (25uM e 100uM). As barras representam a média \pm EPM. Em preto está rosiglitazona 25uM, em cinza escuro pioglitazona (25 e 100uM), em cinza tonalidade média o GQ-16 (25 e 100uM) e mais claro os controles. O asterisco (*) representa a significância estatística de $p \leq 0,05$ em relação ao controle DMSO1%. Análise de variância Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de múltiplas comparações de Dunnett..

5.0 DISCUSSÃO

O modelo experimental com peixe zebra surgiu como uma excelente alternativa ao uso do modelo tradicional com animais mamíferos, visto que apresenta grandes similaridades fisiológicas e de vias metabólicas, incluindo os seres humanos(78). Inúmeras vantagens podem ser descritas para a realização de testes de triagem de fármacos no modelo de peixe-zebra, como a facilidade de manipulação, condições simples de reprodução, rápido desenvolvimento, baixo custo e a transparência durante o desenvolvimento (78-80).

É interessante, lembrar que o peixe-zebra apresenta um único gene ortólogo PPAR γ que exibe 67% de semelhança geral com o dos humanos, em como os sítios de ligação LBD e o DBD mostram uma conservação especialmente alta comparado com o dos seres humanos, cerca de 80,5% e 94,3% dos aminoácidos são idênticos no LBD e DBD, respectivamente(58).

Um estudo realizou a construção de uma linhagem transgênica de peixe-zebra expressando o LBD-PPAR γ humano fundido a Gal4 DBD(81). Foi observado que houve atividade transcricional aumentada após o tratamento com TZDs (rosiglitazona, pioglitazona e troglitazona)(81), sugerindo assim que ligantes dependentes de co-ativadores do PPAR γ são conservados e funcionais no peixe-zebra(58).

Trabalhos recentes mostraram que o tratamento de peixe-zebra com rosiglitazona aumenta a adiposidade, sugerindo que o papel do PPAR γ na estimulação da adipogênese do peixe-zebra também pode ser conservado em comparação com mamíferos(58).

Nesse trabalho, chama a atenção a toxicidade da rosiglitazona expressivamente alta, chegando a máxima mortalidade com a concentração de 100uM (Figura 15). Uma curiosidade é que para fins de comparação, não foi encontrado nenhum estudo com teste FET com exposição a rosiglitazona em embriões de peixe-zebra na literatura,

sendo este um dado novo. A rosiglitazona é bastante utilizada para estudos de adipogênese, porém em concentrações entre 1 μ M e 20 μ M em larvas juvenis (acima de 30 dias) ou peixes adultos(74).

Um estudo com embriões de camundongos visou estudar o efeito da rosiglitazona no desenvolvimento de embriões de camundongos tratados com lipopolissacarídeo (LPS), já que o LPS pode reduzir a competência de desenvolvimento pré e pós-implantação dos embriões via ativação de fatores inflamatórios(46).

A hipótese era que a rosiglitazona por possuir atividade anti-inflamatória, poderia antagonizar esses efeitos deletérios. Assim, para definir a concentração teste do potencial efeito protetor, selecionaram as seguintes concentrações 10, 25, 50 e 75 μ M de rosiglitazona, e realizaram a exposição dos embriões de camundongo(46).

Foi observado que nas concentrações maiores (50 e 75 μ M) a rosiglitazona por si só, reduziu significativamente as taxas de compactação, formação do blastocitos e reduziu a qualidade dos blastocistos, porém nas menores concentrações (10 e 25 μ M), a rosiglitazona não induziu efeitos deletérios, e, ao ser utilizada em conjunto com o LPS, a rosiglitazona antagonizou os efeitos tóxicos do LPS(46).

Essa descrição em embriões de camundongos nas maiores concentrações com rosiglitazona corrobora com o atraso de desenvolvimento dos embriões de peixe-zebra nas primeiras 24h (Figura 17).

Quando analisamos as alterações morfológicas ocorridas com a exposição a rosiglitazona (Figura 17) é nítido que em 48h que o edema pericárdio é concentração-dependente.

Um dos eventos adversos que levou retirada da rosiglitazona da comercialização é o aumento do risco de infarto agudo do miocárdio e aumento de risco de morte por causas cardiovasculares(28). Apesar dos

mecanismos não serem totalmente esclarecidos, uma possível explicação é o aumento dos lipídios séricos, entretanto outros efeitos adversos da rosiglitazona estão associados a outros desfechos cardiovasculares(28).

Um deles é promoção de retenção hídrica levando ao aparecimento de edemas(82). Estudos clínicos apontaram o aumento do risco de desenvolver insuficiência cardíaca congestiva com o uso da rosiglitazona, já que a sobrecarga de volume induzida pela retenção hídrica aumenta a demanda energética do miocárdio disparando um mecanismo compensatório para aumentar a função contrátil, restaurando a produção de adenosina trifosfato (ATP) e respiração mitocondrial via hipertrofia cardíaca(82).

O mecanismo proposto para desenvolvimento desta retenção hídrica está relacionado ao aumento na expressão na membrana de aquaporina 2 (AQP2) e da subunidade α do canal de sódio epitelial (α ENaC)(83). Curiosamente, apesar do peixe zebra apresentar diversas aquaporinas semelhantes aos seres humanos, não apresenta gene ortólogo de AQP2(84) e não possui genes para ENaC(57).

O aumento da ocorrência de edema pericárdio com a concentração de rosiglitazona 25uM foi estatisticamente significativo comparado a concentrações menores (Figura 18), sendo sugestivo que esse edema pode estar diretamente relacionado a toxicidade da rosiglitazona ligado a atividade aumentada na expressão de PPAR γ .

No período de 48h (Figura 17), há o aumento da incidência de edema pericárdio em todas as concentrações. No peixe-zebra, os transcritos de PPAR γ maternos estão presentes dentro das primeira 6 horas pós fertilização e novos transcritos zigóticos começam por volta das 48 horas pós fertilização(85), isso pode justificar o motivo de nas primeiras 24h quase nenhum edema pericárdio foi observado.

Um estudo realizado com embriões de peixe zebra se propôs a avaliar se o PPAR γ regula a gastrulação embrionária e o padrão

dorsoventral durante a embriogênese, para isso, realizaram a exposição com ciglitazona e o knockdown do PPAR γ com morfolino específico para PPAR γ (86). Os resultados apontaram que o bloqueio do PPAR γ nas primeira 48h resultou em um leve defeito dorsoventral, no entanto em 72h e 96h, ocasionou um edema pericárdio severo, defeitos da alça cardíaca e atrofia do coração(86).

Outro estudo com fosfato de trifenila, um potente agonista PPAR γ , avaliou que a interrupção da sinalização induzida pelo fosfato de trifenila alterava a sua cardiotoxicidade(72). Os embriões que foram expostos a esse composto desenvolveram um proeminente edema pericárdio, o que corrobora como os achados do FET com rosiglitazona.

Nesse mesmo estudo, os efeitos cardiotoxícos nos embriões de peixe zebra foram amenizados quando expostos a ciglitazona previamente ao tratamento com fosfato de trifenila(72). Evidências sugerem que a ciglitazona apresenta efeitos cardioprotetores como a redução de dano no miocárdico e da infiltração de neutrófilo(87).

A pioglitazona também tem sido associada a efeitos benéficos cardioprotetores, ao contrário da rosiglitazona(88). Os mecanismos envolvidos podem depender tanto de propriedades anti remodeladoras (propriedades protetoras do endotélio, moduladoras da inflamação, antiproliferativas e antifibróticas) e/ou metabólicas (metabolismo do tecido adiposo, aumento do colesterol HDL) e neuro-hormonais (renina-angiotensina-aldosterona sistema nervoso simpático e adiponectina) modulação do sistema cardiovascular(88).

Dados de estudos experimentais e clínicos sugerem efeitos benéficos no sistema vascular, incluindo o retardo na progressão de aterosclerose(89). Outras evidências indicam que apesar da retenção hídrica estar associada a internação hospitalar por insuficiência cardíaca congestiva, essa não aumentou o risco de óbito(90). Além disso, foi observado que clinicamente ocorre a redução do risco de infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral isquêmico(88) e

mais recentemente, tem sido associada a redução de risco de desenvolvimento demência(88) e doença de Parkinson nos idosos(91).

Correspondente a esses resultados e achados da pioglitazona na literatura, o presente resultado do FET com pioglitazona (Figura 21) mostrou um menor acometimento de larvas com edema pericárdio (e em menor grau) ao final das 96h de experimento.

Interessante que no período de 48h houve uma maior porcentagem de edema pericárdio nas diferentes concentrações, já nos próximos períodos esse efeito é reduzido. Isso mostra que houve recuperação das larvas acometidas, tratando-se de um efeito transitório e não um efeito subletal permanente.

A recuperação de parâmetros de subletalidade é descrita na literatura de peixes-zebra(92), em especial, pode ocorrer a recuperação de edemas de pericárdio, desde que não seja secundário ao acometimento das estrutura do coração, edema de saco vitelino, entre outras observações em menor potencial como recuperação de malformações da cauda(92).

Além disso, é descrito que os peixe-zebra têm alto potencial de regeneração para diversos tecidos. O peixe adulto é capaz de regenerar diferentes órgãos, incluindo as nadadeiras, a medula espinhal, a retina, o coração, o telencéfalo e o rim(93). Os mecanismos que controlam a regeneração parecem ser específicos de cada órgão(93).

A observação sobre a mortalidade na concentração de 25uM de pioglitazona e rosiglitazona serem iguais a 17% demonstra que o efeito letal foi semelhante na mesma concentração, mas foi diferente na maior concentração de 100uM.

Uma hipótese que poderia explicar é que a rosiglitazona é facilmente diluída nessa concentração, enquanto a pioglitazona e o GQ-16 não. Foi observado que o aparecimento de alguns cristais de pioglitazona e GQ-16 nas maiores concentrações após 24h do

experimento. No momento da diluição, não havia nenhuma visualização de cristais, sendo assim, uma estratégia utilizada para contornar uma possível perda de ação das substâncias foi a renovação dos compostos a cada 24h durante os quatro dias de análise utilizar a concentração de DMSO para 1% (diferente do preconizado pelo protocolo OECD nº 236 DMSO 0,01%(61)).

De encontro a essa observação de precipitação na água, o estudo realizado com outro agonista parcial de PPAR γ , o MDCCCL1636, utilizou a pioglitazona como comparador em teste em embriotoxicidade com peixe-zebra, porém em nenhum momento reportou a mesma observação quanto a precipitação(73).

Além disso, utilizaram as concentrações de 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M, 750 μ M e 1000 μ M com DMSO à 0,1% sendo a CL50 calculada de 390,226 μ M(73). O cálculo da CL50 não foi possível já que não houve mortalidade máxima com a pioglitazona, além do que é muito curioso que Liu et. al 2015, conseguiu diluir a pioglitazona na concentração de 1000 μ M.

A mortalidade na concentração de 50 μ M foi próxima dos 15%, semelhante ao resultado aqui apresentado. Quanto a deformidades morfológicas do desenvolvimento embrionário observaram um total de 20% de acometimento geral, edema pericárdio e deformidades axiais foram descritas a partir da concentração de 50 μ M, porém não distinguiram as porcentagens.(73)

Comparado ao GQ-16 a pioglitazona (Figura 26) teve maior toxicidade quanto a letalidade em ambas as concentrações. Em relação ao acometimento com edema pericárdio (Figura 27), no período de 96h o GQ-16 teve maior porcentagem que a pioglitazona nas concentrações de 25 e 100 μ M (7 e 9% versus 2 e 4%), no entanto não houve diferença estatística entre os dois compostos nessas concentrações.

Estudos prévios demonstraram que o GQ-16 é um ligante PPAR γ com potencial de exercer benefícios terapêuticos de redução a

resistência à insulina sem promover efeitos adversos como retenção hídrica e ganho ponderal(41).

O resultado do FET com exposição ao GQ-16 mostrou menor mortalidade dos embriões, bem como menor incidência de edema pericárdio quando comparado a rosiglitazona (Figura 26).

Interessante observar que, em camundongos com deleção do receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL-/-) submetidos à dieta hipercalórica e hiperlipídica (western diet) a administração de rosiglitazona e GQ-16 estimulam a expressão de inúmeros fatores antioxidantes como o fator nuclear de transcrição NF E2 (Nrf2) e atenuam aterosclerose. Contudo, em animais LDL-/-) transplantados com medula óssea deficiente em Nrf2, a administração de rosiglitazona induziu a uma alta mortalidade desses animais por hipertrofia e insuficiência cardíaca associada à distúrbios na condução elétrica do coração.

Ao contrário, GQ-19 (um análogo do GQ-16) não aumentou a mortalidade desses animais (dados não publicados do grupo). Esses resultados sugerem que em animais submetidos à estresse genético, com deficiência de mecanismos antioxidante, rosiglitazona tem efeitos cardiotoxicos graves.

A elucidação de mecanismos para ocorrência de efeitos adversos associados com esses compostos é imprescindível, visto que até o momento as retiradas de comercialização se fundamentaram em eventos característicos do fármaco e não associado a classe medicamentosa das TZD como um todo. Essa observação é suma importância para evitar o abandono pela busca de novos fármacos agonistas de PPAR γ por viés de concepção.

Recentemente, um estudo sugeriu que o efeito tóxico cardíaco da rosiglitazona está associado em parte ao bloqueio do canal de potássio Kv1.5 (94). A alteração da função desse canal está associada a um potencial de ação prolongado em miócitos atriais podendo levar a

arritmias e fibrilação em humanos. O gene *Kcna5* que codifica esse canal é conservado em peixes-zebras, podendo ser um pista para novos experimentos que possam elucidar os motivos das diferença de mortalidade e alterações encontradas quando comparado a rosiglitazona com pioglitazona e GQ-16.

Diante disso, os resultados com a rosiglitazona e o GQ-16 em modelo de peixe zebra se assemelham aos resultados experimentais em camundongos quanto a mortalidade e alterações cardíacas. Diante disso, visamos avaliar por meio da técnica de microarranjo, vias oxidativas em especial, a fim de verificar se os mesmos achados serão corroborados.

Esse dado será inovador, visto que literatura ainda carece de dados experimentais sobre efeitos cardiovasculares especificamente do GQ-16. Nesse sentido, mais estudos necessitam elaborar efeitos e mecanismos para avaliar potencial deste agonista parcial em não exercer efeitos cardiotóxicos e até mesmo exibirem potencialmente efeitos cardioprotetores.

Na avaliação de expressão gênica, utilizamos as maiores concentrações nas quais houve um número de sobreviventes suficientes para a realização da RT-PCR. Observamos quanto ao aumento da expressão de PPAR γ (Figura 32), que houve um aumento da expressão mRNA nos grupos tratados com rosiglitazona, pioglitazona e GQ-16 na concentração de 25 μ M (Figura 32). Tanto a rosiglitazona quanto a pioglitazona foram estatisticamente significativas, no entanto, o GQ-16 não alcançou a diferença estatística em relação ao controle.

Já a expressão relativa do FABP4 (Figura 33) foi significativamente aumentada pelo GQ-16, pioglitazona e rosiglitazona na concentração de 25 μ M.

O FABP4 pertence a superfamília de proteínas de ligação a ácidos graxos, com função de se ligar e transportar ácidos graxos pelo

citoplasma(95). Estudos in vitro(95), bem como estudos com pacientes diabéticos(96), mostraram que o FABP4 é regulado por ácidos graxos, PPAR γ e insulina. Os dados da literatura indicam que os agonistas do receptor PPAR γ , aumentam a expressão de FABP4(95).

O FABP4 presente no peixe-zebra possui uma semelhança de 51-53% com o ortólogo de mamíferos(97). Durante a embriogênese está presente na região proximal da retina, no cristalino e no diencéfalo dorsal, na fissura coróide e no sistema vascular cerebral(97).

O GQ-16 é um agonista parcial do receptor PPAR γ e apesar de não ter obtido significância estatística nessa análise de PCR em embriões de peixe-zebra, o aumento da transcrição de FABP4 sugere que pode ter ocorrido a ativação do PPAR γ , visto que o FABP4 é regulado pelo PPAR γ .

Outro ponto interessante a ser citado, é que nas concentrações de 100 μ M de pioglitazona e GQ-16 não houve aumento maior que nas concentrações de 25 μ M (Figura 32). Isso poderia ser explicado por duas hipóteses, ou as substâncias não alcançaram seu efeito devido à falta de solubilidade, ou houve tamanha expressão do receptor PPAR γ que a maquinaria celular satura reduzindo os níveis de expressão.

Considerando os presentes achados, os resultados sugerem que houve a ação farmacológica correspondente aos fármacos utilizados, mimetizando efeitos similares quando comparados a experimentos com mamíferos.

Em comparação o GQ-16 é menos tóxico que a pioglitazona e a rosiglitazona. Apesar dos resultados apresentados serem baseados principalmente na observação morfológica dos embriões expostos aos compostos, esses resultados nunca foram descritos, sendo assim, constituem uma contribuição para nortear mais experimentos com GQ-16, especialmente para estudar efeitos cardiovasculares em comparação com outras TZDs.

Além disso, o trabalho contribui na trajetória da consolidação do modelo de peixe-zebra para pré-triagem de potenciais fármacos no geral e também de agonistas do PPAR γ , visto que a rosiglitazona exibiu efeitos tóxicos semelhantes aos descritos em mamíferos.

6.0 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Algumas limitações do presente estudo realizado são dignas de nota. Primeiramente houve dificuldade de solubilizar maiores concentrações que 100 μ M da pioglitazona e do GQ-16. A concentração de DMSO à 1% utilizada foi maior do que a recomendada pela OECD nº 236 (DMSO 0,01%). Essa adaptação foi necessária para a realização do estudo visto que os compostos têm baixa solubilidade em meios aquosos. Apesar de que não foram observadas mortalidade e/ou alterações morfológicas nos embriões expostos no controle com DMSO 1%, isso não descarta alterações bioquímicas/moleculares que podem estar ocorrendo na sua presença, entretanto na literatura outros estudos de embriotoxicidade em peixe-zebra também adotaram maiores concentrações do solvente(92, 98).

Na maior concentração utilizada (100 μ M), tanto para pioglitazona quanto para GQ-16, foi observado após 24h o aparecimento de cristais no meio. Adotando-se a estratégia de troca a cada 24h de todas as concentrações para que todos os embriões fossem expostos as mesmas condições. Não foi possível desenvolver um sistema de *Flow-through*, com fluxo contínuo dos compostos visto que não havia quantidade suficiente para realização desse tipo de aparato e nem financiamento para custear a compra da quantidade necessária.

Nesse mesmo sentido, foi adotado para a realização do teste em placas de 96 poços ao invés de 24 poços sugerido pela OECD nº 236, já que seria necessário maior quantidade dos compostos para o volume exigido. A OECD nº 236 recomenda os poços maiores para que,

considerando a evaporação, o volume garante sempre a quantidade ótima de oxigênio no meio, não sendo uma problemática nesse experimento, visto que foi realizado a troca das concentrações a cada 24h. Apesar disso, a evaporação pode ter contribuído para o aparecimento de cristais nas maiores concentrações.

Outra limitação, é que os testes com pioglitazona, rosiglitazona e GQ-16 não foram realizados no mesmo dia, por falta de embriões suficientes e pela morosidade da seleção, distribuição dos embriões e renovação do meio. Apesar das condições de todos os testes terem sido mantidas de modo equivalente, as desovas dos embriões são de diferentes pares selecionados em dias diferentes.

Além do mais, estava previsto no protocolo dessa pesquisa a realização do teste de microarranjo para avaliação global da expressão gênica dos embriões de peixe-zebra expostos. Infelizmente o resultado desse experimento (não apresentado) não foi validado, visto que houve falta de hibridação das sondas nos chip's. Uma hipótese é o comprometimento da qualidade dos reagentes devido a condições não ideais de armazenamento.

Desse modo, é possível sugerir novas perspectivas experimentais. A técnica de RNA seq poderia ser empregada a fim de avaliar a expressão gênica e encontrar novos genes envolvidos na toxicidade embrionária no peixe-zebra com a rosiglitazona, pioglitazona e GQ-16. Além, disso elucidar novos mecanismos que possam explicar as diferenças de toxicidade observadas entre a rosiglitazona e pioglitazona.

Interessante ressaltar que esses resultados em conjunto poderiam fomentar mais o debate de que certos efeitos possivelmente são característicos do fármaco e não da classe farmacológica da TZD's, reavivando a necessidade de novos fármacos dessa classe para o tratamento da resistência à insulina, ovários policísticos e outras condições.

7.0 CONCLUSÃO

Nesse trabalho, utilizando o modelo do peixe-zebra para o estudo de agonistas do PPAR γ foi observado que o GQ-16 quando comparado a pioglitazona e em especial a rosiglitazona, apresentou menor toxicidade na letalidade, e menor acometimento de edema pericárdio no desenvolvimento embrionário do peixe-zebra.

Novos experimentos são necessários para confirmar ou não os achados descritos, bem como experimentos moleculares são imprescindíveis para avaliar a participação de vias moleculares e elucidar possíveis mecanismos envolvidos.

8.0 REFERÊNCIAS

1. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37(Supplement 1):S81-S90.
2. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27(5):1047-53.
3. Khan MAB, Hashim MJ, King JK, Govender RD, Mustafa H, Al Kaabi J. Epidemiology of Type 2 Diabetes - Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *J Epidemiol Glob Health*. 2020;10(1):107-11.
4. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*. 2022;183:109119.
5. American Diabetes A. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care*. 2021;44(Suppl 1):S15-S33.
6. Zhu Y, Qian L, Liu Q, Zou J, Zhou Y, Yang T, et al. Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibody Detection by Electrochemiluminescence Assay Identifies Latent Autoimmune Diabetes in Adults with Poor Islet Function. *Diabetes Metab J*. 2020;44(2):260-6.
7. Ahmad E, Lim S, Lamptey R, Webb DR, Davies MJ. Type 2 diabetes. *Lancet*. 2022;400(10365):1803-20.
8. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17).
9. Daousi C, Casson IF, Gill GV, MacFarlane IA, Wilding JP, Pinkney JH. Prevalence of obesity in type 2 diabetes in secondary care: association with cardiovascular risk factors. *Postgrad Med J*. 2006;82(966):280-4.
10. Battista F, Ermolao A, van Baak MA, Beaulieu K, Blundell JE, Busetto L, et al. Effect of exercise on cardiometabolic health of adults with overweight or obesity: Focus on blood pressure, insulin resistance, and intrahepatic fat-A systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2021;22 Suppl 4(Suppl 4):e13269.
11. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;105(2):141-50.
12. Bonaccio M, Di Castelnuovo A, Pounis G, De Curtis A, Costanzo S, Persichillo M, et al. A score of low-grade inflammation and risk of mortality: prospective findings from the Moli-sani study. *Haematologica*. 2016;101(11):1434-41.

13. Iqbal Z, Fachim HA, Gibson JM, Baricevic-Jones I, Campbell AE, Geary B, et al. Changes in the Proteome Profile of People Achieving Remission of Type 2 Diabetes after Bariatric Surgery. *J Clin Med*. 2021;10(16).
14. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med*. 2011;17(2):179-88.
15. Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol*. 1999;515 (Pt 1)(Pt 1):287-91.
16. Hejazi K, Mohammad Rahimi GR, Rosenkranz SK. Effects of Exercise Training on Inflammatory and Cardiometabolic Risk Biomarkers in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Biol Res Nurs*. 2022:10998004221132841.
17. Park KH, Zaichenko L, Brinkoetter M, Thakkar B, Sahin-Efe A, Joung KE, et al. Circulating irisin in relation to insulin resistance and the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(12):4899-907.
18. Mohammad Rahimi GR, Hejazi K, Hofmeister M. The effect of exercise interventions on Irisin level: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *EXCLI J*. 2022;21:524-39.
19. LaPierre MP, Stoffel M. MicroRNAs as stress regulators in pancreatic beta cells and diabetes. *Molecular metabolism*. 2017;6(9):1010-23.
20. Esguerra JLS, Nagao M, Ofori JK, Wendt A, Eliasson L. MicroRNAs in islet hormone secretion. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2018;20 Suppl 2:11-9.
21. Levine SN, Sanson TH. Treatment of hyperglycaemic hyperosmolar non-ketotic syndrome. *Drugs*. 1989;38(3):462-72.
22. Hackett RA, Moore C, Steptoe A, Lassale C. Health behaviour changes after type 2 diabetes diagnosis: Findings from the English Longitudinal Study of Ageing. *Scientific Reports*. 2018;8(1):16938.
23. Syafhan NF, Donnelly R, Harper R, Harding J, Mulligan C, Hogg A, et al. Adherence to metformin in adults with type 2 diabetes: a combined method approach. *Journal of Pharmaceutical Policy and Practice*. 2022;15(1):61.
24. Christofides EA. Practical Insights Into Improving Adherence to Metformin Therapy in Patients With Type 2 Diabetes. *Clinical Diabetes*. 2019;37(3):234-41.
25. Florez H, Luo J, Castillo-Florez S, Mitsi G, Hanna J, Tamariz L, et al. Impact of metformin-induced gastrointestinal symptoms on quality of life and adherence in patients with type 2 diabetes. *Postgraduate medicine*. 2010;122(2):112-20.
26. Floyd JS, Barbehenn E, Lurie P, Wolfe SM. Case series of liver failure associated with rosiglitazone and pioglitazone. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2009;18(12):1238-43.

27. Kores K, Konc J, Bren U. Mechanistic Insights into Side Effects of Troglitazone and Rosiglitazone Using a Novel Inverse Molecular Docking Protocol. *Pharmaceutics*. 2021;13(3).
28. Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*. 2007;356(24):2457-71.
29. Nissen SE, Wolski K. Rosiglitazone Revisited: An Updated Meta-analysis of Risk for Myocardial Infarction and Cardiovascular Mortality. *Archives of Internal Medicine*. 2010;170(14):1191-201.
30. Filipova E, Uzunova K, Kalinov K, Vekov T. Pioglitazone and the Risk of Bladder Cancer: A Meta-Analysis. *Diabetes Ther*. 2017;8(4):705-26.
31. Iuorno MJ, Nestler JE. Insulin-lowering drugs in polycystic ovary syndrome. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*. 2001;28(1):153-64.
32. Cariou B, Charbonnel B, Staels B. Thiazolidinediones and PPARgamma agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23(5):205-15.
33. Guo J, Wu J, He Q, Zhang M, Li H, Liu Y. The Potential Role of PPARs in the Fetal Origins of Adult Disease. *Cells*. 2022;11(21):3474.
34. Sonoda J, Pei L, Evans RM. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS letters*. 2008;582(1):2-9.
35. Rosen ED, Spiegelman BM. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem*. 2001;276(41):37731-4.
36. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 2006;58(4):726-41.
37. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med*. 2004;351(11):1106-18.
38. Decara J, Rivera P, López-Gamero AJ, Serrano A, Pavón FJ, Baixeras E, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Experimental Targeting for the Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11.
39. Miyachi H. Structural Biology-Based Exploration of Subtype-Selective Agonists for Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Int J Mol Sci*. 2021;22(17).
40. Orasanu G, Ziouzenkova O, Devchand PR, Nehra V, Hamdy O, Horton ES, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone represses inflammation in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner in vitro and in vivo in mice. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(10):869-81.
41. Amato AA, Rajagopalan S, Lin JZ, Carvalho BM, Figueira AC, Lu J, et al. GQ-16, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligand, promotes insulin sensitization without weight gain. *J Biol Chem*. 2012;287(33):28169-79.
42. Naim MJ, Alam MJ, Ahmad S, Nawaz F, Shrivastava N, Sahu M, et al. Therapeutic journey of 2,4-thiazolidinediones as a versatile scaffold: An insight into

structure activity relationship. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;129:218-50.

43. Freires IA, Sardi JC, de Castro RD, Rosalen PL. Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? *Pharmaceutical research*. 2017;34(4):681-6.

44. Caballero MV, Candiracci M. Zebrafish as screening model for detecting toxicity and drugs efficacy. *Journal of Unexplored Medical Data*. 2018;3:4.

45. Chan LY, Lau TK. Effect of rosiglitazone on embryonic growth and morphology: a study using a whole rat embryo culture model. *Fertility and sterility*. 2006;86(2):490-2.

46. Moghadam F, Hajian M, Rouhollahi Varnosfaderani S, Jafarpour F, Nasr Esfahani MH. Effect of rosiglitazone on developmental competence of mouse embryos treated with lipopolysaccharide. *Theriogenology*. 2021;161:57-64.

47. Jeong SG, Lee SE, Kim WJ, Park YG, Yoon JW, Park CO, et al. Pioglitazone improves porcine oocyte maturation and subsequent parthenogenetic embryo development in vitro by increasing lipid metabolism. *Molecular reproduction and development*. 2019;86(9):1245-54.

48. Lijie X, Ullah O, Haixing L, Ali I, Li Z, Fang N-Z. Pioglitazone Mediated Reduction in Oxidative Stress and Alteration in Level of PPAR γ , NRF2 and Antioxidant Enzyme Genes in Mouse Preimplantation Embryo during Maternal to Zygotic Transition. *Pakistan Journal of Zoology*. 2019;51.

49. Shah DK, Menon KM, Cabrera LM, Vahratian A, Kavoussi SK, Lebovic DI. Thiazolidinediones decrease vascular endothelial growth factor (VEGF) production by human luteinized granulosa cells in vitro. *Fertility and sterility*. 2010;93(6):2042-7.

50. PRODUCT MONOGRAPH ACTOS®: Takeda Canada Inc.; 2018 [Available from: https://www.takeda.com/4ab371/siteassets/en-ca/home/what-we-do/our-medicines/product-monographs/actos/actos-pm-18jan2018-clean_en.pdf].

51. Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*. 1981;291(5813):293-6.

52. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 1995;203(3):253-310.

53. : Mayo Clinic.

54. Gut P, Reischauer S, Stainier DYR, Arnaout R. Little Fish, Big Data: Zebrafish as a Model for Cardiovascular and Metabolic Disease. *Physiological Reviews*. 2017;97(3):889-938.

55. den Broeder MJ, Moester MJB, Kamstra JH, Cenijn PH, Davidoiu V, Kamminga LM, et al. Altered Adipogenesis in Zebrafish Larvae Following High Fat Diet and Chemical Exposure Is Visualised by Stimulated Raman Scattering Microscopy. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4).

56. Elo B, Villano CM, Govorko D, White LA. Larval zebrafish as a model for glucose metabolism: expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase as a marker for exposure to anti-diabetic compounds. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2007;38(4):433-40.
57. Hwang PP, Chou MY. Zebrafish as an animal model to study ion homeostasis. *Pflugers Arch*. 2013;465(9):1233-47.
58. Wafer R, Tandon P, Minchin JEN. The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARG) in Adipogenesis: Applying Knowledge from the Fish Aquaculture Industry to Biomedical Research. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:102.
59. EURL ECVAM Recommendation on the Zebrafish Embryo Acute Toxicity Test Method (ZFET) for Acute Aquatic Toxicity Testing 2014 [
60. Horzmann KA, School of Health Sciences PUWLI, Freeman JL, School of Health Sciences PUWLI. Making Waves: New Developments in Toxicology With the Zebrafish. *Toxicological Sciences*. 2018;163(1):5-12.
61. OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test 2013.
62. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use Detection of Toxicity to Reproduction for Human Pharmaceuticals S5 [R3] 2017 [Available from: <https://www.fda.gov/media/108894/download>].
63. Sipes NS, Padilla S, Knudsen TB. Zebrafish: as an integrative model for twenty-first century toxicity testing. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews*. 2011;93(3):256-67.
64. Brannen KC, Panzica-Kelly JM, Danberry TL, Augustine-Rauch KA. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. *Birth defects research Part B, Developmental and reproductive toxicology*. 2010;89(1):66-77.
65. Padilla S, Hunter DL, Padnos B, Frady S, MacPhail RC. Assessing locomotor activity in larval zebrafish: Influence of extrinsic and intrinsic variables. *Neurotoxicology and teratology*. 2011;33(6):624-30.
66. Selderslaghs IW, Van Rompay AR, De Coen W, Witters HE. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reproductive toxicology (Elmsford, NY)*. 2009;28(3):308-20.
67. Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Current Opinion in Pharmacology*. 2004;4(5):504-12.
68. Granadeiro L, Dirks RP, Ortiz-Delgado JB, Gavaia PJ, Sarasquete C, Laizé V, et al. Warfarin-exposed zebrafish embryos resembles human warfarin embryopathy in a dose and developmental-time dependent manner - From molecular mechanisms to environmental concerns. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2019;181:559-71.
69. Blomme EAG, Will Y. Toxicology Strategies for Drug Discovery: Present and Future. *Chemical Research in Toxicology*. 2016;29(4):473-504.

70. Hay M, Thomas DW, Craighead JL, Economides C, Rosenthal J. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nature Biotechnology*. 2014;32(1):40-51.
71. Zakaria ZZ, Benslimane FM, Nasrallah GK, Shurbaji S, Younes NN, Mraiche F, et al. Using Zebrafish for Investigating the Molecular Mechanisms of Drug-Induced Cardiotoxicity. *BioMed Research International*. 2018;2018:1642684.
72. Mitchell CA, Dasgupta S, Zhang S, Stapleton HM, Volz DC. Disruption of Nuclear Receptor Signaling Alters Triphenyl Phosphate-Induced Cardiotoxicity in Zebrafish Embryos. *Toxicol Sci*. 2018;163(1):307-18.
73. Liu HJ, Zhang CY, Song F, Xiao T, Meng J, Zhang Q, et al. A Novel Partial Agonist of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma with Excellent Effect on Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2015;353(3):573-81.
74. Tingaud-Sequeira A, Ouadah N, Babin PJ. Zebrafish obesogenic test: a tool for screening molecules that target adiposity. *Journal of lipid research*. 2011;52(9):1765-72.
75. Zang L, Maddison LA, Chen W. Zebrafish as a Model for Obesity and Diabetes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2018;6.
76. Yang L, Kemadjou JR, Zinsmeister C, Bauer M, Legradi J, Müller F, et al. Transcriptional profiling reveals barcode-like toxicogenomic responses in the zebrafish embryo. *Genome Biology*. 2007;8(10):R227.
77. Mourao RH, Silva TG, Soares AL, Vieira ES, Santos JN, Lima MC, et al. Synthesis and biological activity of novel acridinylidene and benzylidene thiazolidinediones. *Eur J Med Chem*. 2005;40(11):1129-33.
78. Di Paolo C, Seiler T-B, Keiter S, Hu M, Muz M, Brack W, et al. The value of zebrafish as an integrative model in effect-directed analysis - a review. *Environmental Sciences Europe*. 2015;27(1):8.
79. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013;496(7446):498-503.
80. Tiso N, Moro E, Argenton F. Zebrafish pancreas development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2009;312(1):24-30.
81. Tiefenbach J, Moll PR, Nelson MR, Hu C, Baev L, Kislinger T, et al. A live zebrafish-based screening system for human nuclear receptor ligand and cofactor discovery. *PLoS One*. 2010;5(3):e9797.
82. He H, Tao H, Xiong H, Duan SZ, McGowan FX, Jr., Mortensen RM, et al. Rosiglitazone causes cardiotoxicity via peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent mitochondrial oxidative stress in mouse hearts. *Toxicol Sci*. 2014;138(2):468-81.

83. Xu J, Pan M, Wang X, Xu L, Li L, Xu C. Fluid Retention Caused by Rosiglitazone Is Related to Increases in AQP2 and alphaENaC Membrane Expression. *PPAR Res.* 2017;2017:8130968.
84. Tingaud-Sequeira A, Calusinska M, Finn RN, Chauvigne F, Lozano J, Cerda J. The zebrafish genome encodes the largest vertebrate repertoire of functional aquaporins with dual paralogy and substrate specificities similar to mammals. *BMC Evol Biol.* 2010;10:38.
85. White RJ, Collins JE, Sealy IM, Wali N, Dooley CM, Digby Z, et al. A high-resolution mRNA expression time course of embryonic development in zebrafish. *Elife.* 2017;6.
86. Cheng V, Dasgupta S, Reddam A, Volz DC. Ciglitazone-a human PPARgamma agonist-disrupts dorsoventral patterning in zebrafish. *PeerJ.* 2019;7:e8054.
87. Zingarelli B, Hake PW, Mangeshkar P, O'Connor M, Burroughs TJ, Piraino G, et al. Diverse cardioprotective signaling mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands, 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and ciglitazone, in reperfusion injury: role of nuclear factor-kappaB, heat shock factor 1, and Akt. *Shock.* 2007;28(5):554-63.
88. Nesti L, Trico D, Mengozzi A, Natali A. Rethinking pioglitazone as a cardioprotective agent: a new perspective on an overlooked drug. *Cardiovasc Diabetol.* 2021;20(1):109.
89. Mizoguchi M, Tahara N, Tahara A, Nitta Y, Kodama N, Oba T, et al. Pioglitazone attenuates atherosclerotic plaque inflammation in patients with impaired glucose tolerance or diabetes a prospective, randomized, comparator-controlled study using serial FDG PET/CT imaging study of carotid artery and ascending aorta. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2011;4(10):1110-8.
90. Lago RM, Singh PP, Nesto RW. Congestive heart failure and cardiovascular death in patients with prediabetes and type 2 diabetes given thiazolidinediones: a meta-analysis of randomised clinical trials. *Lancet.* 2007;370(9593):1129-36.
91. Chen L, Tao Y, Li J, Kang M. Pioglitazone use is associated with reduced risk of Parkinson's disease in patients with diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Neurosci.* 2022;106:154-8.
92. von Hellfeld R, Brotzmann K, Baumann L, Strecker R, Braunbeck T. Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Sciences Europe.* 2020;32(1):122.
93. Beffagna G. Zebrafish as a Smart Model to Understand Regeneration After Heart Injury: How Fish Could Help Humans. *Frontiers in cardiovascular medicine.* 2019;6:107.
94. Lee HM, Hahn SJ, Choi BH. The antidiabetic drug rosiglitazone blocks Kv1.5 potassium channels in an open state. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology.* 2022;26(2):135-44.

95. Goto K, Iso T, Hanaoka H, Yamaguchi A, Suga T, Hattori A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in capillary endothelia promotes fatty acid uptake by heart during long-term fasting. *J Am Heart Assoc.* 2013;2(1):e004861.
96. Cabre A, Lazaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimon F, Plana N, et al. Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis.* 2007;195(1):e150-8.
97. Liu RZ, Saxena V, Sharma MK, Thisse C, Thisse B, Denovan-Wright EM, et al. The fabp4 gene of zebrafish (*Danio rerio*)--genomic homology with the mammalian FABP4 and divergence from the zebrafish fabp3 in developmental expression. *The FEBS journal.* 2007;274(6):1621-33.
98. Hoyberghs J, Bars C, Ayuso M, Van Ginneken C, Foubert K, Van Cruchten S. DMSO Concentrations up to 1% are Safe to be Used in the Zebrafish Embryo Developmental Toxicity Assay. *Frontiers in toxicology.* 2021;3:804033.

ANEXOS