

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR**

**COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE**

Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares

**AÇÃO DO LPSF/GQ-16 SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DO
PPAR-GAMA E CITOCINAS EM CÉLULAS HUMANAS
IRRADIADAS *IN VITRO***

DIOGO MANOEL ALVES DE QUEIROZ E SILVA

**Orientador: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral
(DEN/UFPE)**

**Co-orientadora: Prof. Dra. Mariana Brayner
Cavalcanti Freire Bezerra
(DEN/UFPE)**

Recife, PE

Janeiro, 2018

DIOGO MANOEL ALVES DE QUEIROZ E SILVA

**AÇÃO DO LPSF/GQ-16 SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DO
PPAR-GAMA E CITOCINAS EM CÉLULAS HUMANAS
IRRADIADAS *IN VITRO***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Dosimetria e Instrumentação Nuclear.

Orientador: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral

**Co-orientador: Profa. Dra. Mariana Brayner
Cavalcanti Freire Bezerra**

Recife, PE

Janeiro, 2018

S586a Silva, Diogo Manoel Alves de Queiroz e.

Ação do LPSF/GQ-16 sobre a expressão gênica do PPAR-gama e citocinas em células humanas irradiadas *in vitro*. / Diogo Manoel Alves de Queiroz e Silva. - Recife: O Autor, 2018.

88 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral.

Coorientadora: Profa. Dra. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2018.

Inclui referências bibliográficas e anexos.

1. Radioterapia. 2. Radioproteção. 3. Inflamação. 4. Tiazolidinediona. I. Amaral, Ademir de Jesus, orientador. II. Bezerra, Mariana Brayner Cavalcanti Freire, coorientadora. III. Título.

Ação do LPSF/GQ-16 Sobre a Expressão Gênica do PPAR-gama e Citocinas em Células Humanas Irradiadas In Vitro

Diogo Manoel Alves de Queiroz e Silva

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Dosimetria e Instrumentação Nuclear.

APROVADA EM: 31.01.2018

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Thiago de Salazar e Fernandes – DBR/UFPE

Prof. Dr. Wagner Luís Mendes de Oliveira – NUPIT/UFPE

Profa. Dra. Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes – DBR/UFPE

Visto e permitida a impressão

Coordenador(a) do PROTEN/DEN/UFPE

AGRADECIMENTOS

À Deus/ao universo.

À minha mãe, Maria da conceição e ao meu irmão Igor Queiroz pelo apoio de sempre em qualquer decisão e circunstância, principalmente na reta final desse percurso.

Também às minhas “tias-mães”, as Marias (Auxiliadora, Verônica e Socorro).

À minha namorada, meu amor e minha companheira Taciana pela paciência e apoio nos momentos difíceis.

Aos orientadores, o Dr. Ademir Amaral e a Dra. Mariana Brayner.

Ao Dr. Wagner Oliveira pelo auxílio na realização dos experimentos e pelo tratamento estatístico.

Ao Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco pela estrutura e apoio para a realização do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite e contribuírem com o trabalho.

Aos meus amigos Tarcísio Tomé, Cynthia Cardone e Paulo Correia pelo apoio durante esse processo e nos seus momentos finais.

“Um passo à frente e você não está mais no mesmo lugar”

Chico Science

“A vida é um milagre”

Autor desconhecido

RESUMO

A radioterapia (RT) é uma estratégia para o tratamento de tumores malignos que utiliza algum tipo de radiação ionizante, onde a eficácia do tratamento radioterápico aumenta com a dose administrada ao tumor. Contudo, altas doses de radiação, inevitavelmente, acarretam em efeitos adversos, principais fatores limitantes deste tipo terapia. Cerca de 10% dos pacientes apresentam reações adversas exacerbadas à RT, manifestadas principalmente nos tecidos saudáveis podendo levar a uma diminuição na qualidade de vida e limitar o controle do tumor. Dentre os efeitos adversos radioinduzidos nos tecidos saudáveis, o processo inflamatório possui papel de destaque. As citocinas são moléculas endógenas intrinsecamente associadas ao processo inflamatório, as quais podem ser alvos terapêuticos na minimização dos efeitos adversos de origem inflamatória. Estes aspectos têm motivado ações em pesquisa e desenvolvimento visando o aprimoramento das intervenções farmacológicas anti-inflamatórias na estratégia radioterapêutica, com o objetivo de prevenir ou mitigar esses efeitos. Em relação às substâncias com propriedades anti-inflamatórias, os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) são importantes alvos terapêuticos de ação dessas substâncias. Os PPARs são fatores de transcrição da família de receptores nucleares e exibem distintas funções fisiológicas e farmacológicas dependendo dos seus genes-alvo e sua distribuição nos tecidos. São conhecidas três proteínas codificadas por genes distintos: PPAR-alfa, PPAR-beta e PPAR-gama. Em particular, o PPAR-gama, expresso em uma ampla variedade de tecidos, regula a expressão de diversos genes-alvo e uma multiplicidade de processos metabólicos. Além dos seus efeitos metabólicos tradicionalmente conhecidos, crescentes evidências sugerem a atividade do PPAR-gama na regulação da resposta inflamatória. Neste contexto, diversos ativadores sintéticos do PPAR-gama vêm sendo estudados, a exemplo das Tiazolidinedionas (TZDs) que são utilizadas na terapia do diabetes *mellitus* tipo 2. As TZDs têm apresentado atividade terapêutica em vários modelos animais de distúrbios inflamatórios, como artrite reumatoide, Parkinson e doenças inflamatórias intestinais. Dessa forma, esta pesquisa teve como objetivo avaliar os perfis de expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e do receptor nuclear PPAR-gama em células mononucleares do sangue periférico humanas irradiadas *in vitro* (2Gy) após o tratamento com LPSF/GQ-16, um derivado das TZDs. Para tanto, células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis foram cultivadas, nas condições irradiadas e não irradiadas, na presença e na ausência do LPSF/GQ-16 na concentração de 100 µM. Após a cultura celular, foram analisados os níveis de expressão gênica das citocinas TNF-alfa e IFN-gama e do PPAR-gama por RT-qPCR. Foi observada a inibição da expressão gênica das proteínas TNF-alfa e IFN-gama nas células irradiadas tratadas com o LPSF/GQ-16. Além disso, o LPSF/GQ-16 apresentou inibição mais significativa das citocinas nas células irradiadas em relação às células mantidas como controle (não irradiadas). Não foi observada alteração significativa da expressão gênica do PPAR-gama após tratamento com LPSF/GQ-16 bem como após a irradiação. Os resultados dessa pesquisa indicam o LPSF/GQ-16 como uma alternativa de fármaco imunomodulador com potencial atividade radioprotetora. No entanto, investigações adicionais são necessárias para melhor avaliar a ação do LPSF/GQ-16 na inibição de mediadores inflamatórios radioinduzidos e sobre a expressão do PPAR-gama no ambiente inflamatório radioinduzido.

Palavras-chave: Radioterapia. Radioproteção. Inflamação. Tiazolidinediona

ABSTRACT

Radiation therapy (RT) is a strategy for the treatment of malignant tumors that uses some ionizing radiation. The efficacy of radiotherapy increases with the dose administered to the tumor. However, high doses of radiation inevitably lead to adverse effects, major limiting factors of this type of therapy. About 10% of patients present exacerbated adverse reactions to RT, manifested mainly in healthy tissues, which can lead to a decrease in quality of life and limit tumor control. Among the radiation-induced adverse effects in healthy tissues, the inflammatory process has a prominent role. Cytokines are endogenous molecules intrinsically associated with the inflammatory process, which may be therapeutic targets in minimizing the adverse effects of inflammatory origin. These aspects have motivated actions in research and development aiming at the improvement of the anti-inflammatory pharmacological interventions in the radiotherapeutic strategy, with the aim of preventing or mitigating these effects. Regarding substances with anti-inflammatory properties, peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are important therapeutic targets for the action of these substances. PPARs are transcription factors of the nuclear receptor family and exhibit distinct physiological and pharmacological functions depending on their target genes and their distribution in tissues. Three proteins encoded by different genes are known: PPAR-alpha, PPAR-beta and PPAR-gamma. In particular, PPAR-gamma, expressed in a wide variety of tissues, regulates the expression of various target genes and a multiplicity of metabolic processes. In addition to its traditionally known metabolic effects, increasing evidence suggests the activity of PPAR-gamma in the regulation of inflammatory response. In this context, several synthetic PPAR-gamma activators have been developed, such as Thiazolidinediones (TZDs) that are used in the therapy of type 2 diabetes mellitus. TZDs have shown therapeutic activity in various animal models of inflammatory disorders, such as rheumatoid arthritis, Parkinson's and inflammatory bowel diseases. In this context, this research aimed to evaluate the gene expression profiles of proinflammatory cytokines in human peripheral blood mononuclear cells irradiated in vitro (2Gy) after treatment with LPSF / GQ-16, a derivative of the TZDs. Thus, peripheral blood mononuclear cells from healthy subjects were cultured under irradiated and non-irradiated conditions in the presence and absence of LPSF / GQ-16 at the concentration of 100 μ M. After cell culture, the levels of gene expression of cytokines TNF-alpha and IFN-gamma were analyzed by RT-qPCR. Inhibition of the gene expression of TNF-alpha and IFN-gamma proteins was observed in irradiated cells treated with LPSF / GQ-16. Moreover, LPSF / GQ-16 showed more significant inhibition of cytokines in irradiated cells, relative to cells maintained as control (non-irradiated). There was no significant change in the gene expression of PPAR-gamma after treatment with LPSF / GQ-16 as well as after irradiation. The results of this research indicate LPSF / GQ-16 as an alternative immunomodulatory drug with potential radioprotective activity. However, further investigations are required to better evaluate the action of LPSF / GQ-16 on the inhibition of radioinduced inflammatory mediators and on the expression of PPAR-gamma in the radioinduced inflammatory environment.

Keywords: Radiotherapy. Radioprotection. Inflammation. Thiazolidinedione

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Efeito direto e indireto da radiação ionizante	16
Figura 2 – Vias moleculares envolvidas na resposta celular radioinduzida	24
Figura 3 – Classificação dos agentes farmacológicos radioprotetores	25
Figura 4 – Distribuição e função dos PPARs nos tecidos	32
Figura 5 – Estrutura primária representando os domínios funcionais dos receptores nucleares	33
Figura 6 – Mecanismo de ação do PPAR-gama	36
Figura 7 – Mecanismo de transrepressão pelo PPAR-gama	37
Figura 8 – Mecanismos de inibição da expressão de genes pró-inflamatórios dependentes de PPAR-gama	39
Figura 9 – Estrutura química das TZDs	43
Figura 10 – Estrutura química do LPSF/GQ-16	47
Figura 11 – Setup de irradiação das amostras	50
Figura 12 – Variação dos níveis de citocinas em amostras não irradiadas e irradiadas (2 Gy), tratadas e não tratadas com PMA-IONO e tratadas com MP, RSG e LPSF/GQ-16	57
Figura 13 – Variação dos níveis de TNF-alfa e IFN-gama em amostras não irradiadas e irradiadas (2 Gy), tratadas com MP, RSG e LPSF/GQ-16	60
Figura 14 – Perfil individual da expressão do TNF-alfa e IFN-gama em amostras tratadas com o LPSF/GQ-16	61
Figura 15 – Variação dos níveis de TNF-alfa, IFN-gama e PPAR-gama em amostras não irradiadas e irradiadas tratadas com o LPSF/GQ-16	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF-1	Função de Ativação 1
AF-2	Função de Ativação 2
AP	Proteína Ativadora
bFGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COX-1	Ciclooxigenase – 1
COX-2	Ciclooxigenase – 2
DBD	DNA Binding Domain
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
GERAR	Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
GWAS	Genome-wide association study
HREs	Elementos responsivos ao hormônio
IL	Interleucina
IMIP	Instituto de Medicina Integral Prf. Fernando Figueira
INF	Intérferon
iNOS	Óxido Nítrico-Sintase Induzida
ICRP	Comissão Internacional de Proteção Radiológica
LAMBDA	Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada
LBD	Ligand Binding Domain
LINAT	Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas
LPSF	Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos
LPSF/GQ-16	(5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona)
MMP	Metaloproteinase de matriz
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Sal de Tetrazolium
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
PBMC	Células Mononucleares do sangue Periférico
PMA	Miristato-Acetato de Forbol
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PPRE	Peroxisome Proliferator Respond Element
RAS	Renin-angiotensin system
RI	Radiação Ionizante
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Reactive Oxygen Species
RS	Rosiglitazona
RT	Radioterapia
RT-qPCR	Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction
RXR	Receptor do Ácido X Retinóico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio

SFB	Soro Fetal Bovino
SNPs	Polimorfismo de nucleotídeo único
STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição
T.A	Temperatura ambiente
TGF	Fator de transformação do crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
TZD	Tiazolidinedionas
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Radioterapia.....	15
2.1.1 Radiossensibilidade individual	17
2.2 Resposta inflamatória radioinduzida	20
2.3 Intervenções farmacológicas na radioterapia	24
2.3.1 A resposta anti-inflamatória na estratégia radioterapêutica	28
2.4 Receptores ativados por proliferadores de peroxissomas.....	30
2.4.1 PPAR-gama	34
2.5 TZDs	42
2.6 LPSE/GQ-16.....	46
3 MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1 Recrutamento dos indivíduos	49
3.2 Compostos químicos	49
3.3 Coleta e irradiação do material biológico.....	50
3.4 Obtenção das células mononucleares.....	51
3.4.1 Ajuste da concentração celular	52
3.5 Cultura celular	52
3.6 Extração do RNA total.....	53
3.6.1 Lise e homogeneização.....	53
3.6.2 Purificação do RNA total	53
3.6.3 Síntese de cDNA	54
3.6.4 Avaliação da expressão gênica	55
3.7 Análise estatística	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1 Expressão das citocinas TNF-alfa e IFN-gama em amostras não irradiadas e irradiadas, tratadas e não tratadas com os estímulos PMA-Ionicina e tratadas com os compostos MP, RSG e LPSE/GQ-16.....	56

4.2	Expressão das citocinas TNF-alfa e IFN-gama em amostras não irradiadas e irradiadas, tratadas com MP, RSG e LPSF/GQ-16	60
4.3	Perfil individual de expressão de citocinas em amostras tratadas com o LPSF/GQ-16.....	61
4.4	Ação do LPSF/GQ-16 sobre a expressão do TNF-alfa, IFN-gama e do PPAR-gama em amostras não irradiadas e irradiadas	63
5	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	79
	ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	80
	ANEXO C – QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS.....	83
	ANEXO D – CRITÉRIOS DO ESTUDO.....	84
	ANEXO E – TERMO DE CONSENTIMENTO DO SUJEITO DE PESQUISA.....	85
	ANEXO F – CROMATOGRAMAS DO LPSF/GQ-16.....	87

1 INTRODUÇÃO

A radioterapia (RT) é uma estratégia terapêutica que utiliza algum tipo de radiação ionizante para o tratamento de tumores malignos, com o mínimo de danos ao tecido saudável adjacente. A eficácia do tratamento radioterápico aumenta com a dose administrada ao tumor, contudo, altas doses de radiação, inevitavelmente, acarretam efeitos adversos, sendo esses os principais fatores limitantes da terapia (BOURGIER et al., 2012; MANGONI et al., 2015). Cerca de 10% dos pacientes apresentam reações adversas exacerbadas à RT, manifestadas principalmente nos tecidos sadios (DE SOUZA SILVA; CAVALCANTI; CARNEIRO, 2014). Este fato demonstra a importância do desenvolvimento de novas drogas que minimizem estas reações nestes pacientes, classificados como radiosensíveis.

A radiosensibilidade individual pode ser descrita como uma característica intrínseca, a qual é associada aos efeitos adversos da radiação ionizante sobre o corpo humano (TWARDELLA; CHANG-CLAUDE, 2002). Estudos indicam que o desenvolvimento e a progressão dos efeitos adversos associados à RT é um processo dinâmico e progressivo, envolvendo uma resposta do tipo inflamatória (KIM; JENROW; BROWN, 2014). Neste sentido, o processo inflamatório tem papel importante nos efeitos adversos radioinduzidos em órgãos como cérebro, pulmões e intestino, fornecendo elementos para aplicação de intervenções farmacológicas anti-inflamatórias afim de mitigar esses danos (SCHAUE et al., 2015).

Os radioprotetores são agentes necessários para proteger o sistema biológico exposto à radiação, seja à exposição natural ou através de acidente radioativo, e proteger as células sadias da lesão radioinduzida em pacientes submetidos à terapia com radiações (KAMRAN et al., 2016). Diversos agentes radioprotetores direcionados para a proteção dos tecidos sadios de pacientes submetidos a terapias com radiações têm sido desenvolvidos. Dentre esses agentes, a amifostina foi a que apresentou maior eficácia, tendo sido clinicamente aprovada para pacientes submetidos à RT. No entanto, devido a seus efeitos colaterais (náusea, vômito e hipotensão), não é rotineiramente utilizada na clínica (KAMRAN et al., 2016).

Atualmente, são escassos agentes radioprotetores eficazes, apontando para a necessidade do desenvolvimento de novas moléculas com uma melhor eficácia terapêutica.

Em relação às substâncias com propriedades anti-inflamatórias, o receptor ativado por proliferadores de peroxissomas gama (PPAR-gama), um fator de transcrição da família de receptores nucleares, é um importante alvo terapêutico de ação dessas substâncias (AHMADIAN et al., 2013). Vários ativadores sintéticos do PPAR-gama foram desenvolvidos,

incluindo as Tiazolidinedionas (TZDs), as quais são utilizadas na terapia da diabetes *mellitus* tipo 2 devido a sua capacidade de promover uma maior sensibilidade à insulina nos tecidos (MANGONI et al., 2015). Além dos efeitos metabólicos, as TZDs tal como a Rosiglitazona (RS) têm apresentado atividade terapêutica para várias doenças inflamatórias e autoimunes (MANGONI et al., 2015).

Pesquisas indicam uma redução da expressão basal do receptor nuclear PPAR-gama após estresse celular, como em caso de infecção, sugerindo essa redução como um mecanismo que contribui para o desencadeamento de uma resposta inflamatória exacerbada. Um estudo observou uma redução nos níveis do PPAR-gama após a indução de pancreatite em ratos, sendo esses níveis reestabelecidos quando da administração da TZD troglitazona, acompanhados também da redução da severidade da pancreatite, correlacionando os níveis do PPAR-gama com a redução na severidade da pancreatite e dos sinais pró-inflamatórios (LINARD; GREMY; BENDERITTER, 2007).

Considerando o potencial terapêutico anti-inflamatório das TZDs, relatadas também como drogas com atividade radioprotetora, resolvemos investigar a possibilidade de aplicação de novas drogas radioprotetoras, que minimizem os danos radioinduzidos em tecidos normais. O Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) da Universidade Federal de Pernambuco, sintetizou um derivado das TZDs, o LPSF/GQ-16. O LPSF/GQ-16 apresentou as propriedades antidiabéticas das TZDs. A droga também mostrou potencial terapêutico para o tratamento de desordens inflamatórias e metabólicas (ALAN R COLLINS et al., 2012; AMATO et al., 2012).

Este estudo teve como objetivo geral avaliar a ação do LPSF/GQ-16 sobre a expressão do PPAR-gama e citocinas pró-inflamatórias em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) irradiadas *in vitro*. A hipótese do trabalho é que a ação do LPSF/GQ-16 tenha a capacidade de reprimir a inflamação no microambiente inflamatório radioinduzido, sendo assim uma droga possível candidata à radioprotetora. Também foi avaliado se o LPSF/GQ-16 regulou positivamente a expressão do PPAR-gama, podendo assim influenciar na inibição das citocinas pró-inflamatórias.

Como objetivos específicos, esse trabalho pretende:

- Avaliar a ação do LPSF/GQ-16 sobre a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa e IFN-gama em PBMCs irradiadas e não irradiadas *in vitro*;
- Avaliar a ação do LPSF/GQ-16 sobre a expressão gênica do PPAR-gama em PBMCs irradiadas e não irradiadas *in vitro*.

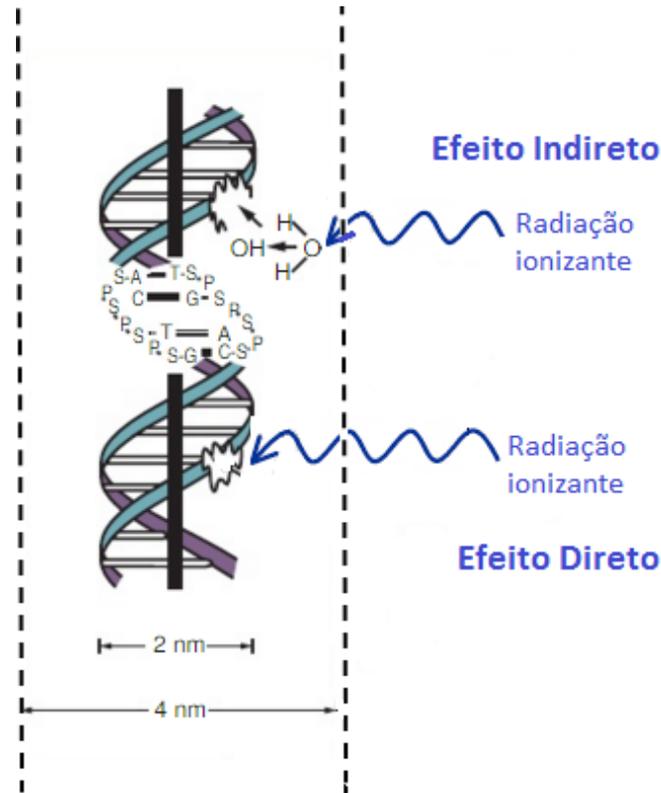
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Radioterapia

A radioterapia (RT) é uma das mais importantes modalidades não-cirúrgicas no tratamento do câncer. Dentre os milhões de pacientes diagnosticados com algum tipo de câncer no mundo, mais de 50% necessitam de RT (DI MAGGIO et al., 2015). O objetivo principal da RT é erradicar e/ou minimizar tumores malignos por meio da irradiação de tecidos tumorais utilizando uma dose suficiente de radiação ionizante (RI) com danos mínimos aos tecidos normais adjacentes (DE SOUZA SILVA; CAVALCANTI; CARNEIRO, 2014).

A RI é um agente físico capaz de induzir alterações moleculares ao interagir com um tecido biológico. Os efeitos biológicos das RIs considerados mais importantes são aqueles resultam de danos causados à molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico), considerada um alvo crítico para as células (HALL; GIACCIA, 2012). Os efeitos da RI sobre o DNA podem ser classificados em diretos e indiretos, ilustrados na Figura 1. O efeito direto ocorre quando a RI interage diretamente com esta biomolécula provocando uma ionização ou excitação causando uma série de mudanças biológicas. No efeito indireto, a radiação interage com outros átomos ou moléculas presentes na célula (particularmente a água), produzindo radicais livres capazes de se difundir o suficiente para atingir e danificar esta molécula alvo. Este último é o processo dominante, representando 60% dos danos celulares radioinduzidos visto que 80% da célula é composto por água, aumentando a probabilidade de interação das radiações ionizantes com essa molécula. Dessa forma, direta ou indiretamente, a RI pode induzir uma grande variedade de lesões ao DNA, as quais estão associadas com a morte celular, carcinogênese e mutações (BARCELLOS-HOFF; PARK; WRIGHT, 2005; HALL; GIACCIA, 2012).

Figura 1– Efeito direto e indireto da radiação ionizante.



Fonte: Adaptada de (HALL; GIACCIA, 2012).

Após os fenômenos radioquímicos e moleculares, as células promovem mecanismos enzimáticos de reparo em resposta aos danos biológicos. As células desenvolveram vias especializadas para detectar, responder e reparar diferentes tipos de danos. Além disso, diferentes vias de reparo aos danos são utilizadas dependendo do estágio do ciclo celular (HALL; GIACCIA, 2012).

O procedimento de RT é baseado no conceito de que a capacidade de reparo das células aos danos radioinduzidos é maior nas células saudáveis do que nas células tumorais, sendo estas mais suscetíveis à RI (HUBENAK et al., 2014).

As novas técnicas radioterápicas (e.g. a RT guiada por imagem, RT conformacional e RT de intensidade modulada), têm como objetivo a redução da radiotoxicidade nos tecidos normais. Essas técnicas permitem uma melhor distribuição da dose de radiação no tecido tumoral e uma redução da exposição do volume de tecido sadio à radiação, reduzindo assim o risco de radiotoxicidade. Tais modalidades têm apresentado uma melhora na eficiência terapêutica, no entanto, apesar dos esforços com o uso da tecnologia, cerca de 10% dos pacientes submetidos à RT desenvolvem algum efeito adverso grave, manifestado principalmente nos tecidos sadios (DE SOUZA SILVA; CAVALCANTI; CARNEIRO, 2014).

Os efeitos adversos radioinduzidos variam entre indivíduos e possuem graus de severidade distintos. Estudos indicam uma base genética para o alto grau de variabilidade desses efeitos entre indivíduos, sugerindo que variantes genéticas comuns determinam a resposta individual às radiações ionizantes (KERNS; OSTRER; ROSENSTEIN, 2014).

Existem diversos fatores que podem influenciar o grau de toxicidade resultantes de um tratamento com radiações, tais como: físicos (dose, taxa e fracionamento da dose), fatores químicos (teor hídrico e oxigenação do tecido) e biológicos (idade, tabagismo e coexistência de doenças como diabetes e hipertensão), os quais são utilizados atualmente como parâmetros no planejamento dosimétrico na RT. No entanto, cerca de 80% da variação das reações adversas entre os pacientes não pode ser explicada por tais fatores, estando provavelmente relacionada com as características genéticas dos indivíduos e, conseqüentemente, pode determinar a sua radiosensibilidade celular (BARNETT et al., 2009; DE SOUZA SILVA; CAVALCANTI; CARNEIRO, 2014).

2.1.1 Radiossensibilidade individual

O conceito de radiossensibilidade pode ser descrito como uma característica intrínseca, associada com um aumento dos efeitos biológicos resultantes da ação das RIs sobre o corpo humano (TWARDELLA; CHANG-CLAUDE, 2002).

O primeiro relato sobre a sensibilidade excessiva à radiação, publicado em 1975, foi evidenciado em um paciente portador da síndrome genética Ataxia Telangiectasia, o qual apresentou graves reações ao ser submetido à RT. Estudos com cultura de fibroblastos do indivíduo portador da síndrome mostraram que essas células eram aproximadamente três vezes mais sensíveis à radiação comparadas àquelas de indivíduos saudáveis (BARNETT et al., 2009).

Nos anos seguintes, pesquisas demonstraram que pacientes portadores de outras doenças congênitas (e.g. anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, Xeroderma pigmentoso e síndrome de Cockayne), também apresentaram efeitos adversos exacerbados após a radioterapia. Posteriormente, verificou-se que essas síndromes são associadas a mutações de genes envolvidos nas vias de detecção e reparo de danos ao DNA. Nesse cenário, diversos estudos foram publicados na década de 1980 evidenciando a radiossensibilidade celular *in vitro* de pacientes que apresentavam reações adversas extremas à radioterapia, sustentando a hipótese de que a toxicidade dos tecidos normais após a terapia com radiações está associada com a radiossensibilidade celular. Dessa forma, até o final da década de 1990, a sensibilidade de um

indivíduo às radiações ionizantes foi considerada uma característica hereditária (BARNETT et al., 2009; DE SOUZA SILVA; CAVALCANTI; CARNEIRO, 2014).

No entanto, indivíduos não portadores de síndromes genéticas, apresentam graves reações após irradiação. Estima-se que cerca de 10% da população apresenta elevada sensibilidade às RIs (ANDREASSEN; ALSNER; OVERGAARD, 2002; SEVERIN et al., 2006).

Um crescente interesse das pesquisas reside no desenvolvimento de um ensaio clínico para prever a probabilidade de um indivíduo desenvolver efeitos adversos exacerbados após exposição às RIs baseado em estudos que sugerem que variantes genéticas comuns estão associadas a esses efeitos. Para tanto, é necessário se identificar os determinantes genéticos que explicam as propriedades mensuráveis da toxicidade da radiação (BARNETT et al., 2009).

No campo da radiogenômica a principal abordagem utilizada com o objetivo de identificar preditores genéticos dos efeitos adversos da radioterapia é o estudo de associação ampla do genoma, ou GWAS (Genome-wide association study). O GWAS são estudos de associação de milhares de polimorfismos de base única (SNPs – Single-nucleotides polymorphisms) e um fenótipo de interesse (os efeitos adversos radioinduzidos no caso da radiogenômica). Esses estudos têm sido bem-sucedidos na identificação de novas variantes genéticas que explicam o risco de desenvolvimento de algumas doenças comuns. No campo de pesquisa em radiogenômica, o objetivo final é o desenvolvimento de um teste clinicamente útil capaz de prever a probabilidade de um paciente com câncer desenvolver efeitos adversos graves resultantes do tratamento com RT padrão, possibilitando uma personalização e otimização da terapia com a modificação do protocolo radioterápico ou ainda, se for o caso, a decisão de optar por outras modalidades de tratamento, ajudando também na elucidação das vias moleculares responsáveis pelo desenvolvimento da toxicidade dos tecidos normais radioinduzida (BARNETT et al., 2009; KERNS; OSTRER; ROSENSTEIN, 2014).

Estudos indicam que a RI tem um significativo efeito na modulação do sistema imunológico através da ativação de uma cascata de citocinas. A literatura científica relata que a patogênese dos danos radioinduzidos *in vivo* tem uma clara base genética, tal como polimorfismos nos genes de citocinas, os quais contribuem para uma considerável variabilidade interindividual tanto para a eficácia da RT quanto para os efeitos adversos ao tratamento (DI MAGGIO et al., 2015). Muitos estudos têm sido publicados relatando as tentativas de descobrir os mecanismos envolvidos na radiosensibilidade celular individual, principalmente investigando SNPs em genes candidatos. No entanto, nenhum perfil genético geral ou polimorfismos associados à radiosensibilidade foi identificado (SKIÖLD, 2014).

Em relação às pesquisas, estudos de caso-controle foram realizados, nos quais SNPs de genes candidatos foram genotipados em pacientes que apresentaram ou não reações adversas à radioterapia, onde diversos marcadores genéticos foram investigados. Os genes mais frequentemente investigados são os genes envolvidos nas complexas vias moleculares de resposta aos danos radioinduzidos, como as vias de detecção e reparo dos danos ao DNA, vias envolvidas na progressão do ciclo celular e na apoptose e as vias envolvidas nas respostas inflamatória e ao estresse oxidativo (GUO et al., 2015). Quanto aos genes envolvidos na detecção e reparo dos danos ao DNA, são estudados os XRCC1 (X-Ray Repair Cross Complementing 1), XRCC2, XRCC3, XRCC4 e XRCC5, sendo o XRCC1 mais frequentemente investigado nas pesquisas. Tem sido relatado que a disfunção nesses genes está associada à toxicidade dos tecidos normais radioinduzida (ALSBEIH et al., 2013, 2014; CHEUK et al., 2014; MANGONI et al., 2011; YIN et al., 2011, 2011, 2012). Polimorfismos na proteína ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), a qual está envolvida na detecção dos danos ao DNA, está relacionada ao desenvolvimento de pneumonite radioinduzida em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas após a radioterapia (XIONG et al., 2013; YANG et al., 2011; ZHANG et al., 2010). Quanto aos genes relacionados à apoptose, polimorfismos do gene TP53 têm sido investigados como possíveis causas de sensibilidade dos tecidos sadios à radiação em diversos tipos de cânceres (GUO et al., 2015). Um estudo relatou a associação entre o polimorfismo do gene TXNRD₂, importante na defesa contra o dano oxidativo, com a fibrose subcutânea radioinduzida em 92 pacientes com câncer de mama (EDVARDESEN et al., 2013). O TGF-beta 1 (Transforming Growth Factor Beta 1) é uma citocina envolvida na inflamação, proliferação celular e fibrose. Os SNPs do gene TGF-beta estão entre os mais examinados na radiobiologia do tecido normal. Diversas pesquisas têm observado uma associação entre SNPs do gene TGF-beta e efeitos adversos radioinduzidos, incluindo eritema, fibrose, disfunção erétil e pneumonite. Embora muitos estudos exploratórios e poucos confirmatórios aleguem a associação de SNPs do TGF-beta e a probabilidade de desenvolvimento de efeitos adversos à radioterapia, notavelmente poucos estudos com tamanho de amostra relativamente grande não encontraram associação (PETERS et al., 2008; RAABE et al., 2012; TERRAZZINO et al., 2012; YUAN et al., 2009).

Talbot e colaboradores (2012) publicaram resultados promissores entre a toxicidade geral da radiação e polimorfismos no gene do TNF-alfa (Tumor Necrosis Factor-alpha) em um estudo com pacientes com câncer de mama. A variação genética no gene do TNF-alfa afetou vários parâmetros clínicos, incluindo o endurecimento das mamas, telangiectasia e toxicidade

geral. Esse estudo é o primeiro relatório bem-replicado de um preditor genético para reações adversas à RT (TALBOT et al., 2012).

Polimorfismos em diversos genes têm sido associados à radiosensibilidade, no entanto, nenhum dos SNPs identificados podem em geral explicar a sensibilidade à radiação. Uma conclusão geral desses estudos é que a radiosensibilidade individual é geralmente multifatorial em sua origem e que vários biomarcadores/bioensaios são necessários para obter a previsibilidade necessária para a implementação na clínica. São poucos os estudos que examinam a associação entre SNPs e as reações teciduais adversas em pacientes radiosensíveis, como o RAPPER (Radiogenomics: Assessment of Polymorphisms for Predicting the Effects of Radiotherapy), um projeto componente do projeto GENEPI (Genetic pathways for the prediction of the effects of ionising radiation), o Gene-PARE (Genetic Predictors of adverse radiotherapy effects) e o Radiogenomic Consortium (BARNETT et al., 2010; BURNET et al., 2013; HO et al., 2006; WEST; ROSENSTEIN, 2010). Barnet (2009) e Hirst (2010) sugeriram que grandes estudos colaborativos são necessários para avaliar o número de pessoas necessárias para se obter resultados estatisticamente significativos em estudos de associação ampla do genoma (BARNETT et al., 2009; HIRST; ROBSON, 2010).

O estudo da resposta às radiações ionizantes de células e tecidos tem levado a um melhor entendimento da toxicidade da radiação. Pesquisas em radiobiologia sugerem que a lesão do tecido normal é um processo dinâmico e progressivo. A interação da radiação com a célula resulta em danos ao DNA e mudanças no microambiente através de quimiocinas, citocinas inflamatórias, citocinas fibróticas, alteração nas interações celulares, influxo de células inflamatórias e indução dos processos de reparo e restaurativo do DNA. Portanto, os genes envolvidos na sinalização e reconhecimento do dano ao DNA, apoptose, proliferação e processos inflamatórios podem ter um importante papel no desenvolvimento dos danos ao tecido normal (BARNETT et al., 2009).

2.2 Resposta inflamatória radioinduzida

O processo de inflamação envolve as principais células do sistema imunológico, dentre elas os monócitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, células-T e células-B. Este processo é controlado por uma série de mediadores e reguladores extracelulares, acompanhados por mecanismos de controle de sinalização intracelular. Os mediadores inflamatórios incluem quimiocinas, fatores de crescimento, eicosanoides e enzimas, os quais em conjunto estabelecem

um microambiente inflamatório. Os mecanismos intracelulares desencadeiam e desmontam um complexo conjunto de vias de sinalização na medida em que as células passam de um estado inativo para realizar determinadas funções no sítio da inflamação (TURNER et al., 2014).

No estágio inicial da inflamação, ocorre a migração de neutrófilos para a região lesada sendo este estágio regulado por moléculas produzidas por macrófagos e mastócitos. Uma rede de sinalização (envolvendo fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas) atrai linfócitos, leucócitos e outras células inflamatórias para o local da inflamação, contribuindo para a degradação do tecido lesado, resultando em um efeito benéfico do processo pelo reforço e manutenção da defesa do organismo contra a infecção. Esse estágio inicial de uma resposta inflamatória é denominado de reação inflamatória aguda (COUSSENS; WERB, 2002; NATHAN, 2002).

Há ainda mecanismos que previnem a extensão da inflamação, envolvendo tanto moléculas anti quanto pró-inflamatórias durante todo o curso do processo. A resolução da inflamação necessita de um processo rápido e programado de depuração das células inflamatórias. Esse processo é realizado por macrófagos, células dendríticas e fagócitos por indução de apoptose e conduzindo a fagocitose (LU, 2006).

No entanto, quando desregulado, o processo inflamatório evolui para um quadro de inflamação crônica. Nesta, há uma persistente migração de linfócitos, células plasmáticas e macrófagos para o sítio da inflamação, produzindo uma grande quantidade de mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio que podem causar danos à molécula de DNA. Portanto, há uma manutenção da resposta inflamatória em um mecanismo de retroalimentação positiva, com a constante ativação de macrófagos, podendo causar danos contínuos à região afetada. Esses danos comprometem os tecidos ou órgãos, podendo levar à perda da função e ao desenvolvimento de neoplasias malignas (COUSSENS; WERB, 2002; MACARTHUR; HOLD; EL-OMAR, 2004; PHILIP; ROWLEY; SCHREIBER, 2004).

No procedimento de RT, o risco do desenvolvimento de lesões nos tecidos normais após o tratamento é considerado um fator limitante do tratamento. Complicações nos tecidos saudáveis como: necrose, lesão vascular, danos ao sistema nervoso e no sistema gastrointestinal são relatados durante a RT, afetando diretamente a qualidade de vida do paciente e a eficácia terapêutica (IAEA, 2010).

Até pouco tempo, as lesões radioinduzidas eram atribuídas unicamente à redução no número de células parenquimatosas e vasculares, devido à morte celular provocada pela ação genotóxica da radiação durante a RT e, nesse contexto, consideradas inevitáveis, progressivas e intratáveis (MOULDER, 2003). Com os recentes avanços em biologia molecular, houve uma

mudança de paradigma na caracterização das lesões radioinduzidas nos tecidos sadios. Contrapondo a clássica hipótese da morte da célula alvo, os crescentes dados sugerem um processo dinâmico e progressivo para o desenvolvimento e progressão das lesões, de caráter agudo ou crônico, com participação ativa das células parenquimatosas e vasculares na resposta aos danos (MOULDER, 2003; STONE; MCBRIDE; COLEMAN, 2002; ZHAO; ROBBINS, 2009).

Os estudos indicam o papel da inflamação e do estresse oxidativo nos danos radioinduzidos aos tecidos normais. Após a irradiação, fatores de transcrição e vias de transdução de sinais são ativadas induzindo os processos de reparo aos danos, mudança nos níveis de expressão de citocinas, influxo de células inflamatórias e o desenvolvimento das complicações pós-irradiação (DENT et al., 2003; SCHMIDT-ULLRICH et al., 2000; ZHAO; ROBBINS, 2009).

As citocinas possuem diversas funções que são altamente relevantes para pesquisas com radiações ionizantes. As citocinas pró-inflamatórias são os principais componentes da resposta imediata dos genes, podendo ser rapidamente ativadas após a irradiação dos tecidos. Essas moléculas podem afetar significativamente a radiosensibilidade celular individual, a incidência e o tipo de complicação tecidual radioinduzida e a estabilidade genômica (SCHAUE; KACHIKWU; MCBRIDE, 2012).

Logo após a exposição dos tecidos à radiação uma cascata de citocinas e quimiocinas é iniciada, ocorrendo uma liberação contínua de mediadores pró-inflamatórios intensificando a resposta inflamatória por um longo período, levando a uma possível inflamação crônica e conseqüentemente a lesão tecidual. Dentre as várias citocinas expressas após a exposição das células ou tecidos à radiação ionizante estão o TNF-alfa, IL-1- α , IL-1- β , IFN, GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-18, VEGF e bFGF e TGF- β . A produção de citocinas é *tempo-dependente*, com pico geralmente entre 4 e 24 horas após a exposição à RI e subsequente diminuição para os níveis basais dentro de 24 horas a poucos dias (DI MAGGIO et al., 2015). Muitas aparecem como respostas imediatas dos genes e são classificadas como “radio-induzíveis”. No entanto, diversos fatores de confusão como a influência de produtos microbianos, a composição genética do indivíduo, tumores e outros estímulos estranhos ao organismo podem alterar os perfis de citocinas produzidas após a exposição à radiação, levantando a questão do que se entende por “radio-induzíveis” (KIM; JENROW; BROWN, 2014; SCHAUE; KACHIKWU; MCBRIDE, 2012).

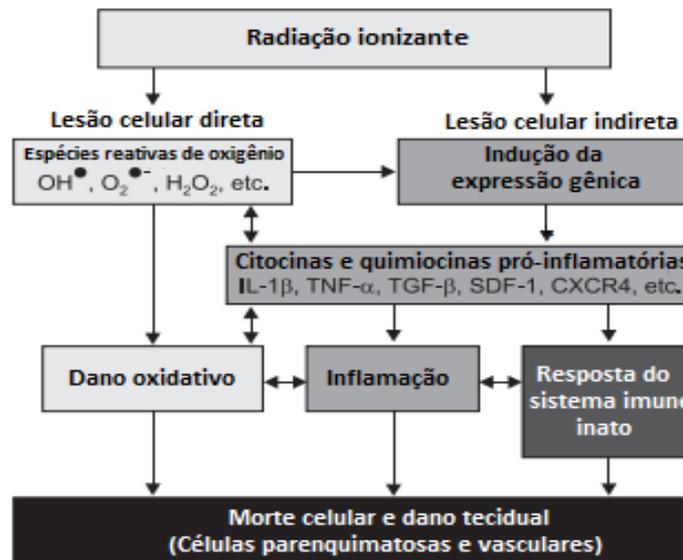
Inúmeras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias são produzidas excessivamente imediatamente após a irradiação de órgãos como a pele, pulmão e cérebro, sendo as

interleucina-1 e 6 (IL-1, IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa - tumor necrosis factor-alpha) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β - transforming growth factor beta) as principais citocinas envolvidas na resposta às radiações nesses tecidos. Essas citocinas são multifuncionais, afetando diversos processos celulares. O TGF- β está envolvido em processos como o crescimento de células epiteliais, proliferação de células mesenquimais e produção de matriz extracelular. Os níveis de expressão do TGF- β têm sido correlacionados com os altos níveis de fibrose tecidual radioinduzida (resultado da produção excessiva de matriz extracelular), uma complicação comum observada após a radioterapia torácica e abdominopélvica em órgãos como a pele e pulmão (KIM; JENROW; BROWN, 2014). As citocinas IL-1 e TNF-alfa também têm sido associadas ao desenvolvimento da fibrose radioinduzida. A citocina IL-1- β é regulada positivamente pela radiação e está associada à ativação de moléculas inflamatórias tal como as metaloproteinases de matriz (LIU et al., 2006). Em relação ao TNF-alfa, diversos estudos direcionados à sua inativação têm sido desenvolvidos para proteger dos tecidos sadios contra os danos radioinduzidos. Por exemplo, Przybyszewska M e colaboradores (2011) relataram que o uso de um receptor solúvel do TNF-alfa pode ser um método simples e seguro para inativar parcialmente a atividade do TNF-alfa e prevenir a lesão pulmonar radioinduzida. Além disso, a expressão do TNF-alfa leva a indução da expressão do TGF- β . Essas duas citocinas, em conjunto, regulam a fibrose radioinduzida através de múltiplos mecanismos que necessitam ser mais explorados (PRZYBYSZEWSKA et al., 2011; SULLIVAN et al., 2005).

Em relação ao estresse oxidativo radioinduzido, além da formação de espécies reativas de oxigênio (em inglês, reactive oxygen species ou ROS) resultantes da interação da radiação ionizante com as moléculas de água presentes nas células, as quais podem causar danos ao DNA, outras fontes podem dar origem a formação dessas moléculas reativas incluindo a infiltração de leucócitos e macrófagos ativados. A hipóxia tecidual resultante do dano vascular é outra fonte contínua de geração de ROS. Além disso, células como os fibroblastos podem ser estimuladas por citocinas pró-inflamatórias a produzir ROS. A geração dessas moléculas reativas é parte do sistema imune inato ajudando na recuperação da região lesada, no entanto, a produção excessiva de ROS pode causar graves danos teciduais incluindo fibrose e até mesmo levar ao desenvolvimento de neoplasias (KIM; JENROW; BROWN, 2014).

A Figura 2 ilustra esquematicamente as interações dinâmicas envolvidas na resposta celular radioinduzida, como a geração de espécies reativas de oxigênio, respostas pró-inflamatória e do sistema imune inato, as quais acredita-se que contribuam para a seletiva morte celular, dano tecidual e déficit funcional dos tecidos e órgãos.

Figura 2 – Vias moleculares envolvidas na resposta celular radioinduzida



Fonte: Adaptada de (KIM; JENROW; BROWN, 2014)

Dessa forma, enquanto os eventos físico-químicos e a formação de radicais livres ocorrem em escala de microssegundos na célula após a exposição às radiações ionizantes, a resposta inflamatória subsequente se estende pela formação recorrente de ROS, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento com infiltrados inflamatórios associados, caracterizando os danos radioinduzidos aos tecidos normais como um processo contínuo, que evolui com o tempo como resultado dos vários processos regulatórios envolvidos na recuperação da região lesada (SCHAUE et al., 2015).

Nesse sentido, o novo paradigma a respeito do desenvolvimento das lesões radioinduzidas fornece uma base racional para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas para o uso de agentes farmacológicos, objetivando a modulação das etapas na cascata de eventos celulares que levam a expressão dos danos teciduais.

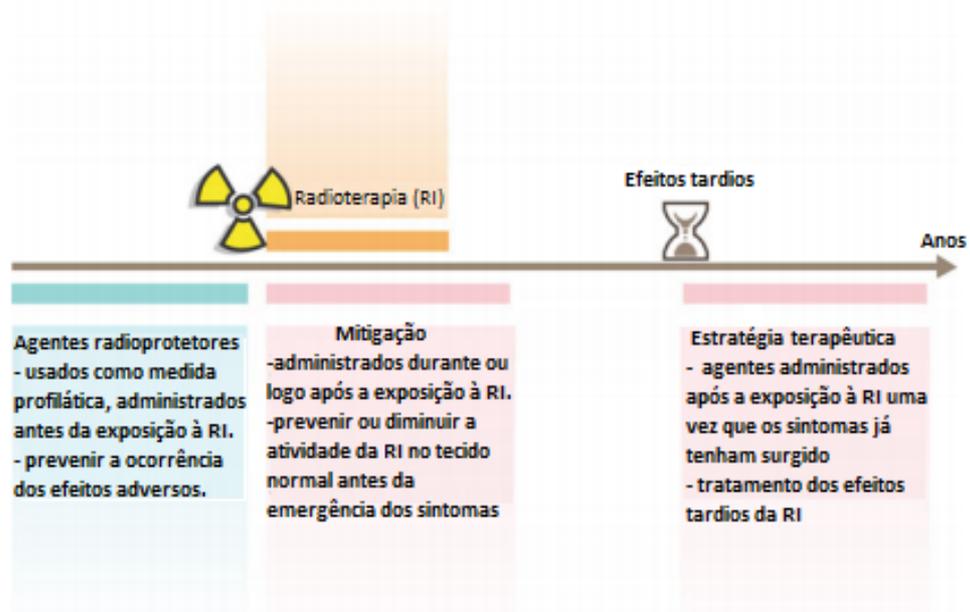
2.3 Intervenções farmacológicas na radioterapia

Conforme esquematizado na Figura 3, segundo Citrin e colaboradores, os agentes farmacológicos são classificados como:

- Radioprotetores - quando administrados antes a radioterapia, prevenindo o surgimento dos efeitos adversos
- Mitigadores - quando administrados durante ou logo após a radioterapia, reduzindo assim a ação da radiação nos tecidos normais antes de surgirem os efeitos adversos.

- Agentes terapêuticos - quando administrados após a radioterapia, utilizados após a manifestação dos efeitos adversos.

Figura 3 – Classificação dos agentes farmacológicos radioprotetores



Fonte: Adaptada de (BOURGIER et al., 2012)

Os conceitos de radioprotetores, mitigadores e agentes terapêuticos apresentados neste trabalho serão utilizados neste texto, muito embora a ICRP (Comissão Internacional de Proteção Radiológica) declare, em seu relatório 118/2012, não haver distinção clara entre esses termos (F.A. STEWART et al., 2012). Assim, o termo radioprotetor é utilizado neste trabalho de forma genérica, para designar qualquer substância que proteja os tecidos saudáveis dos danos induzidos pela radiação ionizante.

As atividades de radioproteção, de mitigação e a relacionada ao tratamento dos efeitos das radiações nos tecidos saudáveis têm sido descritas para certo número de agentes farmacológicos.

Algumas substâncias, embora não afetem diretamente a radiosensibilidade celular, podem proteger os tecidos da radiação, causando vasoconstrição ou, de alguma forma, alterando os processos normais do metabolismo a tal ponto que a concentração de oxigênio nos órgãos críticos é reduzida, conferindo-lhes assim uma medida de proteção, uma vez que sob hipóxia, as células são menos sensíveis à radiação. Dentre essas substâncias estão o cianeto de sódio, o monóxido de carbono, a epinefrina, a histamina e a serotonina (HALL; GIACCIA, 2006). No entanto, esses compostos não são radioprotetores per se. O grupo mais notável de

radioprotetores verdadeiros são os compostos de sulfidril. A cisteína, o mais simples, foi descoberta por Patt e colaboradores (1949) como uma droga que poderia proteger os tecidos de ratos dos efeitos da radiação, após a exposição de corpo inteiro dos animais aos raios-X, se injetada ou ingerida em grandes quantidades antes da exposição à radiação. Quase ao mesmo tempo, Bacq e colaboradores (1954) descobriram que a cisteamina (outro composto sulfidrílico) poderia proteger os tecidos de ratos após a exposição de corpo inteiro à raios-X (BACQ, 1954; HALL; GIACCIA, 2006; PATT et al., 1949).

A descoberta em 1949 de compostos que apresentam atividade protetora contra a ação das radiações ionizantes despertou o interesse das pesquisas em radioproteção. Diversos compostos sulfidrílicos similares têm sido testados e descritos como radioprotetores. Os mais eficientes compartilham algumas características estruturais: um grupo SH livre (ou um potencial grupo SH) em uma extremidade da molécula e uma função básica forte, como amina ou guanidina, na outra extremidade, separadas por uma cadeia linear de dois ou três átomos de carbono. Os compostos sulfidrílicos são radioprotetores eficazes contra radiações esparsamente ionizantes, como raios-X e raios gama. Os mecanismos mais implicados na citoproteção mediada pelo grupo SH incluem a eliminação de radicais livres e a doação de átomos de hidrogênio, este último para facilitar o reparo químico direto à sítios do DNA danificado (HALL; GIACCIA, 2006).

Vários agentes anti-inflamatórios, incluindo drogas anti-inflamatórias não-esteroidais, têm sido utilizadas como mitigadores para lesões radioinduzidas na pele. Entre esses agentes estão os inibidores da ciclooxigenase-1 (COX-1) e (COX-2), utilizados com a intenção de inibir a síntese de prostaglandinas (mediadores biológicos que produzem algumas manifestações locais e sistêmicas da inflamação). O celecoxib (em desuso no Brasil), um inibidor da COX-2, apresentou um moderado efeito mitigador em modelos de estudos pré-clínicos (KIM; JENROW; BROWN, 2014).

A amifostina e os nitróxidos são descritos como radioprotetores, atuando como eliminadores de radicais livres. A palifermina é um agente mitigador utilizado na clínica para a redução da incidência e duração da mucosite oral em pacientes com malignidades hematológicas submetidos à RT e quimioterapia. A molécula halofuginona, também utilizada como agente mitigador apresentou inibição da fibrose radioinduzida em ratos (BOURGIER et al., 2012; CITRIN et al., 2010).

Utilizados como agentes radioprotetores, mitigadores e no tratamento de lesões radioinduzidas, os bloqueadores do sistema renina-angiotensina (RAS- renin-angiotensin system) mostraram-se um dos mais bem-sucedidos agentes farmacológicos em estudos

experimentais (MOULDER; COHEN, 2007; ZHAO; DIZ; ROBBINS, 2007). O RAS é um complexo sistema hormonal que promove a liberação de angiotensina II, principal componente do sistema. A angiotensina II, além de exercer um papel fundamental no controle da pressão arterial e na homeostasia hidroeletrolítica do organismo, possui também propriedades mitogênica, pró-inflamatória e pró-fibrótica, as quais contribuem para a inflamação e fibrose tecidual em doenças como hipertensão, aterosclerose e diabetes. Uma melhoria na fibrose tecidual radioinduzida nos pulmões e nos rins foi observada após a administração de bloqueadores da angiotensina II. A administração crônica de ramipril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina, foi associado com uma redução na severidade da neuropatia óptica em ratos submetidos a irradiação do cérebro (ZHAO; ROBBINS, 2009).

Agentes agonistas dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs- peroxisomal proliferator-activated receptors), uma família de receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição dependentes de ligantes, apresentaram atividades anti-inflamatória, antioxidante e anti-apoptótica em vários modelos experimentais de doença/lesão dos sistemas nervoso central, pulmonar e cardiovascular. A administração da pioglitazona, um agonista da isoforma PPAR-gama, durante a irradiação do cérebro de ratos preveniu a disfunção cognitiva radioinduzida (ZHAO et al., 2007; ZHAO; ROBBINS, 2009).

As estatinas, uma classe de drogas inibidoras da enzima HMG-CoA redutase (responsável pela formação do colesterol no fígado), são utilizadas amplamente na clínica para o tratamento da hipercolesterolemia e aterosclerose. Além do seu conhecido modo de ação, as estatinas possuem diversos efeitos pleiotrópicos, ainda sob investigação, tais como: inibição da proliferação celular, restauração da atividade endotelial, inibição da reatividade de plaquetas, uma potencial atividade antioxidante além de possuir propriedades anti-inflamatórias (KIM; JENROW; BROWN, 2014). As estatinas apresentaram uma atenuação significativa na lesão pulmonar radioinduzida em ratos, mostrando uma redução nas populações de macrófagos e linfócitos nos animais tratados com lovastatina. A administração de pravastatina também apresentou eficácia na mitigação da lesão intestinal tardia induzida por radiação em ratos (HAYDONT et al., 2007; WILLIAMS et al., 2004).

Assim, várias estratégias terapêuticas incluindo estratégias antioxidativas e anti-inflamatórias são utilizadas em estudos pré-clínicos a fim de prevenir ou reduzir a toxicidade das radiações nos tecidos. Os dados emergentes a nível molecular e celular indicam que as lesões crônicas ou agudas radioinduzidas nos tecidos saudáveis podem ser prevenidas e/ou tratadas, fornecendo uma justificativa para o desenvolvimento de abordagens de intervenção farmacológicas para o tratamento dessas lesões.

2.3.1 A resposta anti-inflamatória na estratégia radioterapêutica

O reconhecimento da resposta inflamatória após uma lesão radioinduzida no tecido normal levou à utilização de abordagens anti-inflamatórias como estratégia terapêutica. Há evidências experimentais da eficácia de intervenções anti-inflamatórias na modulação dos efeitos radioinduzidos, através do uso de vários agentes farmacológicos, particularmente anti-inflamatórios não-esteroidais (MOULDER, 2003).

Existem muitos aspectos relacionados à complexa resposta inflamatória resultante de um dano tecidual radioinduzido, no entanto, uma característica comum é a natureza progressiva dos eventos celulares. A constante interferência entre a lesão radioinduzida e o sistema imune inicia um ciclo inflamatório que por feedback com a medula óssea recruta mais células inflamatórias, o que leva a consequências sistêmicas devido a extensão da inflamação para além da região irradiada. As crescentes evidências que indicam uma perpetuação pró-inflamatória e pró-oxidativa deve-se ao fato de que a administração de drogas anti-inflamatórias não esteroidais e anti-oxidativas podem atenuar os danos radioinduzidos, pelo menos *in vivo*, bem como reduzir as mutações celulares induzidas pela inflamação (SCHAUE et al., 2015).

Dentre as tentativas terapêuticas anti-inflamatórias no tratamento das lesões radioinduzidas, compostos alvejando diretamente as vias do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β - transforming growth factor beta), uma citocina considerada um determinante primário na resposta pró-fibrótica radioinduzida nos tecidos, têm sido utilizados em estudos experimentais. A halofuginona, um alcaloide vegetal desenvolvido para o tratamento da esclerodermia se mostrou eficaz na mitigação da fibrose induzida por radiação em ratos. Estudos utilizando um inibidor do receptor 1 do TGF- β , LY-364947 também apresentaram uma significativa diminuição da fibrose tecidual (AVRAHAM et al., 2010; XAVIER et al., 2004).

Vários inibidores do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa - tumor necrosis factor-alpha) o qual está entre as citocinas que estimulam a fase aguda da inflamação, são utilizados na clínica para o tratamento de doenças como artrite reumatoide e psoríase. A utilização do etanercept, um inibidor do TNF-alfa, mostrou-se eficaz na mitigação da lesão cutânea radioinduzida em ratos (KIM; JENROW; BROWN, 2014).

O componente amiloide P sérico, um membro da família das proteínas pentraxina inibiu *in vitro* a diferenciação de monócitos em fibrócitos, os quais estão envolvidos na fibrose tecidual, em estudo com células de pacientes com artrite reumatoide, esclerose sistêmica e doença mista do tecido conjuntivo. A bleomicina é um agente radio-mimético frequentemente

utilizado em modelos de fibrose pulmonar em roedores, caracterizado pelos eventos celulares inflamatórios e fibróticos similares àqueles observados na fibrose pulmonar radioinduzida. Em estudos com esse modelo de fibrose pulmonar, a administração da pentraxina diminuiu significativamente a fibrose induzida por bleomicina (CHAUDHARY; SCHNAPP; PARK, 2006; MOELLER et al., 2008; MURRAY et al., 2010; PILLING et al., 2007).

Muitos estudos têm relatado a atividade antitumoral das isoflavonas de soja, compostos encontrados em vegetais como a soja e derivados, através da inibição das vias de sobrevivência celular ativadas pela radiação aumentando a eficácia da quimioterapia e radioterapia no tratamento do câncer de próstata. Além disso, esses compostos têm apresentado poderosas propriedades anti-inflamatórias levando pesquisadores à hipótese de que além de melhorar a eficácia da terapia com radiações através da sensibilização das células tumorais, as isoflavonas de soja poderiam prevenir os efeitos colaterais radioinduzidos quando administrados em associação com a radioterapia (RT).

Um estudo piloto foi realizado para investigar os efeitos da suplementação de isoflavonas de soja sobre a toxicidade da RT em pacientes com câncer de próstata localizado. Avaliados durante seis meses, os efeitos adversos nos trato urinário e intestinal e nas funções sexuais resultantes da terapia com radiações para o câncer de próstata foram significativamente reduzidos no grupo tratado com isoflavona, quando comparado com o grupo placebo, sugerindo que a administração das isoflavonas em associação com a RT poderia reduzir tais efeitos adversos em pacientes com câncer de próstata (AHMAD et al., 2010).

Assim, diversas abordagens farmacológicas têm apresentado experimentalmente a mitigação e a proteção contra as lesões induzidas pelas radiações ionizantes (RIs) em vários órgãos e tecidos, com alguns testes clínicos bem-sucedidos utilizando planejamentos radioterápicos relevantes e agentes farmacológicos que já foram aprovados para uso humano (MOULDER; COHEN, 2007).

No entanto, na prática clínica, a utilização de fármacos com atividade protetora dos danos induzidos pelas RIs é bastante limitada. Para o uso na radioterapia clínica, um agente radioprotetor ou mitigador deve apresentar características como baixa toxicidade, não apresentar proteção ao tecido tumoral e apresentar proteção aos tecidos considerados mais radiosensíveis. Embora se conheça certo número de compostos que atendem a maioria ou a todos esses critérios, poucos radioprotetores são utilizados na clínica (CITRIN et al., 2010).

Neste cenário, ações em pesquisa e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos na proteção contra as lesões radioinduzidas nos tecidos normais constituem uma opção estratégica importante para maior eficácia da RT (MANGONI et al., 2016).

Neste sentido, estudos têm focado no uso de agonistas dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (Peroxisome Proliferator Activated Receptors - PPARs). Os PPARs são receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição, regulando diversos processos metabólicos (ZHAO; ROBBINS, 2009). A isoforma PPAR-gama desses receptores nucleares tem sido extensivamente estudada como um importante fator de transcrição que modula a resposta inflamatória, através da inibição de citocinas pró-inflamatórias como o TNF-alfa, IL-1, e IL-6 e por um mecanismo de transrepressão, regulando negativamente a expressão de mediadores inflamatórios, sendo este o possível modo de ação principal no seu efeito anti-inflamatório. Muitos ligantes agonistas sintéticos do PPAR-gama foram desenvolvidos e seus potenciais efeitos benéficos são estudados em modelos animais e humanos de doenças inflamatórias, como artrite reumatoide e esclerose múltipla (LINARD; GREMY; BENDERITTER, 2007). Dado o papel da resposta pró-inflamatória no desenvolvimento e progressão da lesão radioinduzida nos tecidos normais, o conhecimento dos vários agonistas sintéticos dos PPARs aliado às atividades atribuídas a esses receptores, os tornam importantes alvos terapêuticos nas pesquisas por novos agentes protetores/mitigadores das lesões radioinduzidas.

2.4 Receptores ativados por proliferadores de peroxissomas

Os receptores nucleares compreendem uma superfamília de receptores protéicos pertencentes à classe dos fatores de transcrição. Esses receptores constituem uma das mais abundantes classes de reguladores transcricionais nos animais, desempenhando diversas funções regulatórias no desenvolvimento, reprodução, homeostase e metabolismo dos organismos (ROBINSON-RECHAVI; GARCIA; LAUDET, 2003). Os receptores nucleares possuem a capacidade de se ligar a cromatina condensada e recrutar uma variedade de fatores de transcrição e correguladores para a região promotora dos genes, promovendo todo o processo de transcrição gênica. Essas características os tornam importantes iniciadores da transcrição gênica e ressaltam sua significância biológica, sendo promissores alvos farmacológicos estimulando um grande interesse científico e o desenvolvimento de pesquisas nesse campo (NATALIA NOVAC ; THORSTEN HEINZEL, 2004).

Essa superfamília de receptores inclui receptores para glicocorticoides, andrógenos, progesterona, vitaminas, ácido retinóico, mineralocorticoides e outros ligantes, atuando na regulação da transcrição gênica nos processos metabólicos. A maior parte desses receptores

pode ser dividida com base na estrutura do seu sítio de ligação nos genes alvo em duas subfamílias: os receptores esteroides (reconhecendo/ligando-se aos elementos responsivos¹ ao hormônio (HREs) na forma de homodímeros) e os receptores tiroidianos (reconhecendo seus elementos responsivos usualmente na forma de heterodímero com o receptor do ácido X retinóico (RXR) (NASCIMENTO, 2009).

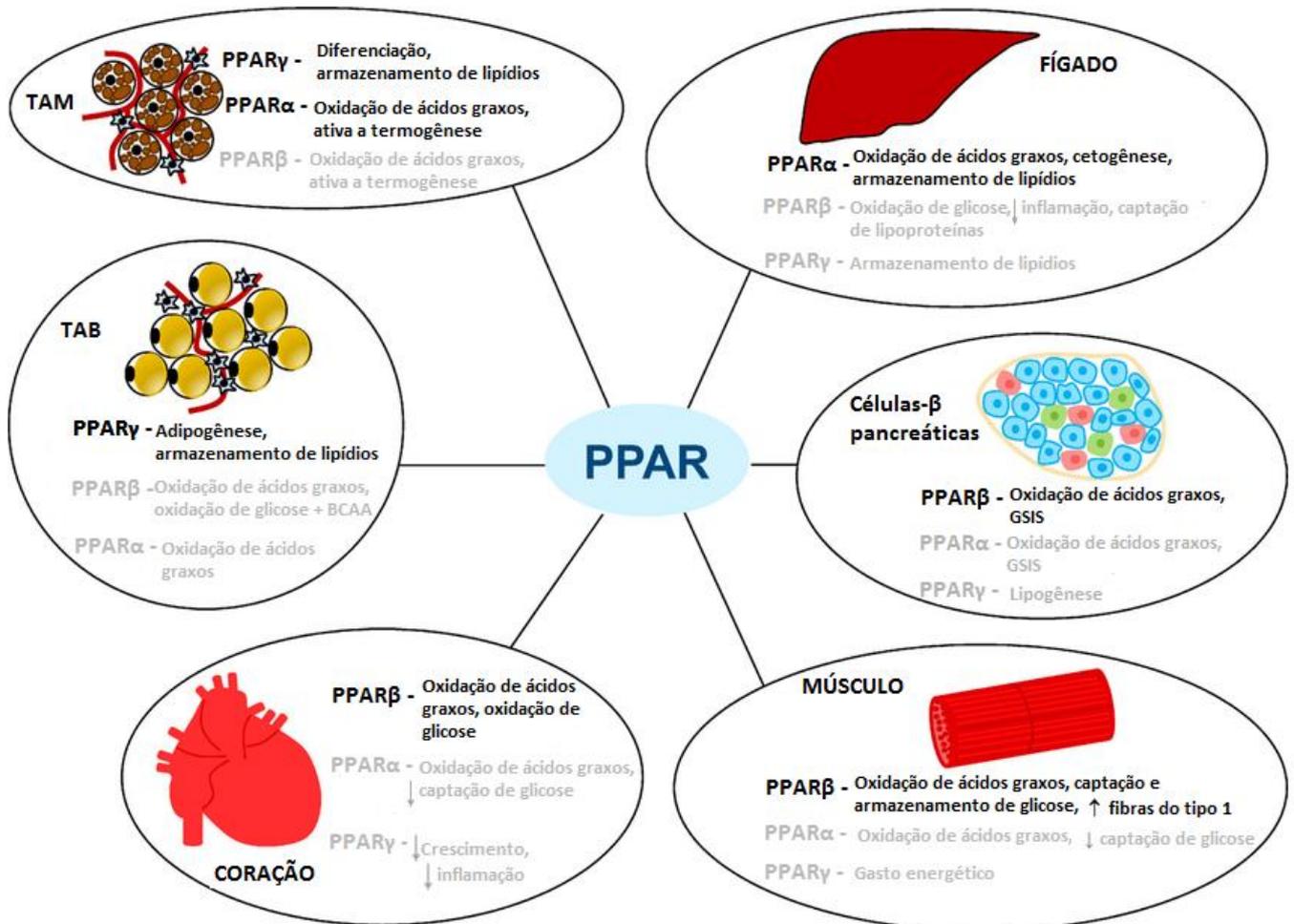
Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) são fatores de transcrição membros da subfamília dos receptores nucleares tiroidianos. Três isoformas codificadas por genes distintos foram identificadas: PPAR-alfa, PPAR-beta e PPAR-gama (BERGER; WAGNER, 2002), sendo o PPAR-alfa o primeiro membro da família a ser identificado, apresentando a capacidade de responder a compostos que induzem a proliferação de peroxissomas em pesquisas com roedores, dando origem ao nome do grupo. No entanto, essa característica não é compartilhada por outros membros do grupo (TONTONZOZ; SPIEGELMAN, 2008).

Apesar de apresentarem grande homologia, as diferentes isoformas dos PPARs possuem diferentes padrões de distribuição tecidual e distintas funções fisiológicas (CIMINI et al., 2005). As três isoformas dos PPARs são expressas principalmente em tecidos envolvidos no metabolismo energético. No entanto, cada subtipo mantém um alto grau de individualidade, realizando funções específicas, incluindo regeneração tecidual, diferenciação celular, metabolismo lipídico e resposta imune. O PPAR-alfa é expresso principalmente no fígado, coração, músculo esquelético e no rim, aumentando o catabolismo de ácidos graxos e agindo como alvo molecular de drogas hipolipemiantes. O PPAR-beta é expresso de forma ubíqua e está envolvido na regulação de uma variedade de processos como diferenciação de queratinócitos, cicatrização de feridas, utilização de lipídios e glicose. O PPAR-gama é altamente expresso em adipócitos e macrófagos, e é essencial na diferenciação de adipócitos, armazenamento de lipídios e na regulação da inflamação. O PPAR-gama também é alvo molecular das tiazolidinedionas, drogas sensibilizadoras à insulina utilizadas no tratamento do diabetes tipo 2 (MATSUDA; KOBAYASHI; KITAGISHI, 2013; YOUSSEF; BADR, 2013).

A Figura 4 apresenta a distribuição e função dos PPARs nos tecidos metabólicos.

¹Elementos responsivos são sequências de nucleotídeos característicos dos sítios do DNA (localizados na região promotora do gene que está sob seu controle transcricional), que liga diversos receptores nucleares.

Figura 4 – Distribuição e função dos PPARs nos tecidos



Os principais subtipos de PPAR expressos em altos níveis em cada tecido estão indicados em negrito, enquanto os subtipos expressos em níveis mais baixos estão indicados em cinza. TAM (tecido adiposo marrom); TAB (tecido adiposo branco); BCAA (branched chain amino acids – aminoácidos de cadeia ramificada); GSIS (glucose stimulated insulin secretion- secreção de insulina estimulada por glicose).

Fonte: Adaptada de (POULSEN; SIERSBÆK; MANDRUP, 2012).

Assim como a maioria dos membros da superfamília dos receptores nucleares, os PPARs possuem uma estrutura modular com três domínios funcionais, conforme ilustrado na Figura 5. O domínio N-terminal ou amino terminal, não possui sua função completamente conhecida. No entanto, sabe-se que essa região possui atividade transcricional independente do ligante, denominada função de ativação 1 (AF-1). Sabe-se ainda que o domínio N-terminal possui atividade transcricional quando ligada a região C-terminal ou carboxi-terminal do próprio receptor (HE et al., 2002; ROGERSON; FULLER, 2000). Os PPARs se ligam ao DNA através de dois “dedos de zinco²” em seu domínio de ligação ao DNA, (DBD - DNA binding

² Motivos em proteínas de ligação ao DNA e RNA, cujos aminoácidos estão dobrados em uma única unidade estrutural em torno de um átomo de zinco.

domain), um domínio altamente conservado localizado na região central dos receptores nucleares. Localizado na região C-terminal do receptor, o domínio LBD (ligand binding domain) é responsável pela interação com o ligante, além de possuir a função de dimerização com o receptor do ácido X retinóico (RXR) necessária para sua ligação ao DNA. A heterodimerização entre o PPAR e o RXR independe de ligante, ocorrendo com a heterodimerização das interfaces LBDs e DBDs dos dois receptores. Além dessas funções, o LBD possui uma região denominada função de ativação 2 (AF-2), fundamental para a ativação transcricional (POULSEN; SIERSBÆK; MANDRUP, 2012; RIBEIRO; KUSHNER; BAXTER, 1995; WU; XU; KOENIG, 2001). Entre os domínios centrais DBD e LBD encontra-se uma região denominada hinge, bastante flexível funcionando como uma dobradiça, promovendo movimento de rotação do domínio DBD em relação ao LBD (BARRA et al., 2004).

Figura 5 – Estrutura primária representando os domínios funcionais dos receptores nucleares



Fonte: Adaptada de (POULSEN; SIERSBÆK; MANDRUP, 2012)

A transativação gênica dos PPARs é mediada pela função de ativação dependente de ligante 2 (AF-2) no domínio LBD e pela função de ativação independente de ligante 1 (AF-1) no domínio N-terminal dos receptores. Em função do acoplamento de um agonista na cavidade de ligação do LBD, os PPARs sofrem dimerização e uma mudança estrutural ocorre no domínio LBD levando-o ao estado ativado, criando uma cavidade hidrofóbica que permite a interação direta com complexos co-ativadores e assim, a sua ligação ao DNA. Quando ligado ao DNA, o complexo formado pelo receptor heterodimérico e as proteínas co-ativadoras recruta a maquinaria basal de transcrição celular (POULSEN; SIERSBÆK; MANDRUP, 2012).

Desde a primeira clonagem do PPAR-alfa em 1990, vários ligantes naturais dos PPARs como ácidos graxos e seus derivados, incluindo prostaglandinas e eicosanóides foram identificados. Posteriormente, foi demonstrado que esses receptores são os principais alvos para uma variedade de classes de agentes sintéticos utilizados no tratamento do diabetes e

dislipidemia. Nesse sentido, o entendimento dos mecanismos moleculares e das características fisiológicas desses receptores se tornou extremamente importante para a utilização e o desenvolvimento de drogas usadas no tratamento de doenças metabólicas (TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007).

Além disso, diversas outras funções têm sido propostas para os PPARs, despertando o interesse da comunidade científica. Várias pesquisas têm apresentado dados que indicam funções regulatórias para os PPAR-gama e PPAR-alfa em uma variedade de eventos envolvendo a vasculatura, como a formação e estabilidade da placa aterosclerótica, tónus vascular e angiogênese. As três isoformas dos PPARs parecem estar envolvidas na regulação da diferenciação celular normal e da patofisiologia da carcinogênese. O PPAR-beta tem sido associado à mielinogênese e maturação das células da glia. Dessa forma, muitos ligantes agonistas sintéticos dos PPARs, incluindo as tiazolidinedionas e os fibratos permitiram a investigação dos muitos papéis desses receptores em diversos estados patológicos e as observações acima podem eventualmente levar a um novo uso terapêutico desses ligantes (BERGER; MOLLER, 2002).

2.4.1 PPAR-gama

Durante muito tempo, as investigações sobre o receptor ativado por proliferadores de peroxissomas gama (PPAR-gama) deve-se ao fato de seu importante papel na regulação do metabolismo celular. O PPAR-gama é expresso em uma ampla variedade de tecidos e regula a expressão de vários genes alvo em uma multiplicidade de processos metabólicos (GROMMES; LANDRETH; HENEKA, 2004).

Esse receptor desempenha um papel dominante na diferenciação de adipócitos (TONTONNOZ; SPIEGELMAN, 2008). No tecido adiposo, o PPAR-gama controla a expressão de vários fatores que influenciam na sensibilização à insulina, assim como modulam a expressão de genes envolvidos na homeostase da glicose (AHMADIAN et al., 2013).

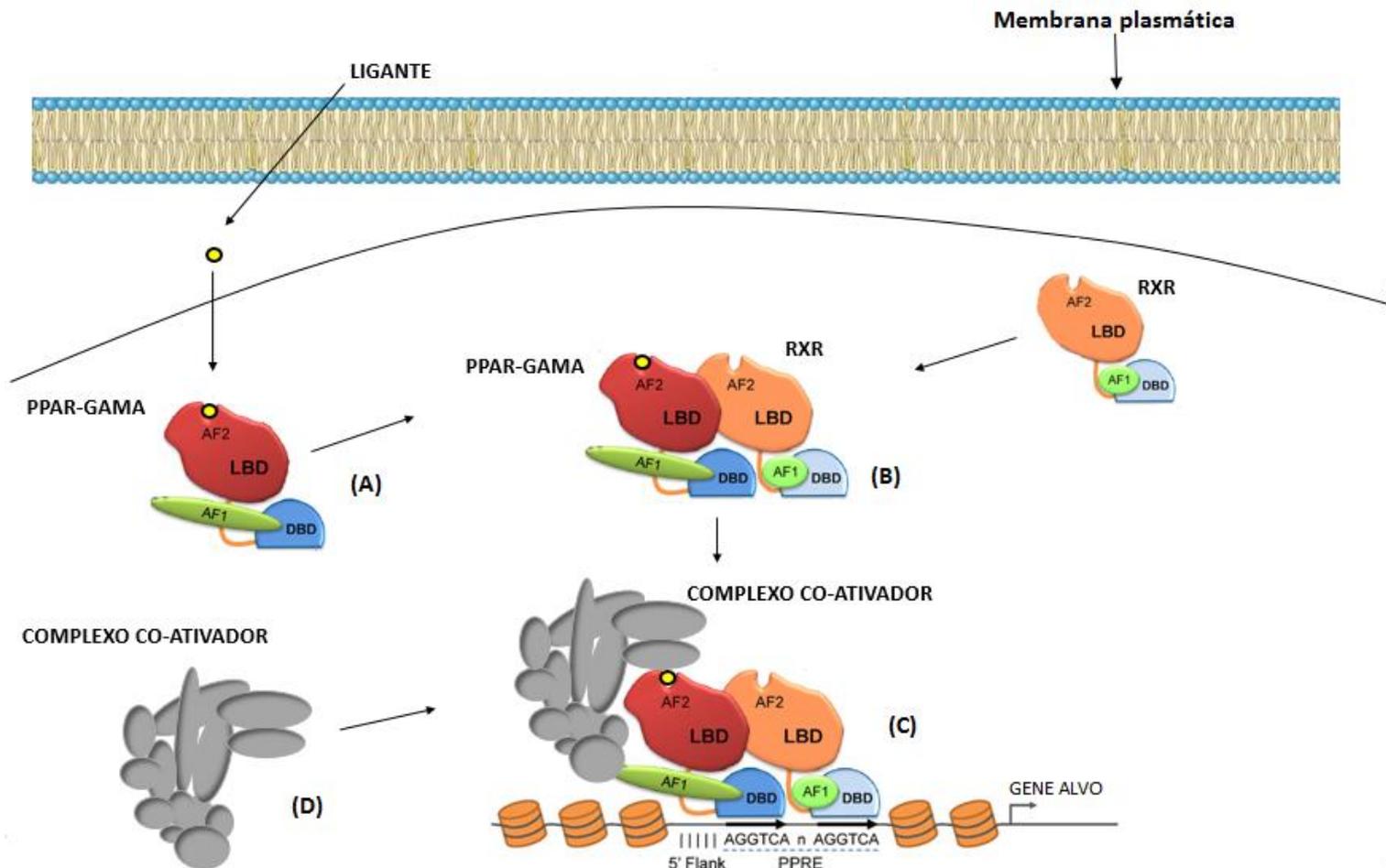
A diminuição da concentração sérica de glicose no diabetes, resultado da ativação do PPAR-gama levou ao desenvolvimento de ligantes agonistas sintéticos desses receptores os quais são utilizados na clínica como drogas antidiabéticas (por exemplo, rosiglitazona e pioglitazona) (GROMMES; LANDRETH; HENEKA, 2004).

Além das ações metabólicas bem estabelecidas, nos últimos anos o PPAR-gama tem emergido como um regulador chave das respostas imune e inflamatória (RICOTE; GLASS,

2007). Sua expressão foi observada em diversos tipos celulares incluindo células do sistema imune, tal como macrófagos, linfócitos B e linfócitos T, eosinófilos e células dendríticas (SZELES; TOROCSIK; NAGY, 2007).

Assim como os outros membros da subfamília dos PPARs, o PPAR-gama possui uma organização modular com domínios funcionais e atua de maneira dependente de ligante. A Figura 6 apresenta o mecanismo de ação do PPAR-gama. Após serem ativados (A), esses receptores se heterodimerizam com receptor do ácido X retinóico (RXR) (B), o que permite sua ligação a específicos elementos responsivos dos proliferadores de peroxissomas (PPERS) localizados na região promotora dos genes (C), para dar início a regulação da expressão dos seus genes alvo. Nesse processo, a ligação com um agonista altera a conformação estrutural do receptor, que recruta vários co-fatores de transcrição para os genes alvo resultando em um aumento na transcrição gênica (D) (BERGER; MOLLER, 2002).

Figura 6 – Mecanismo de ação do PPAR-gama

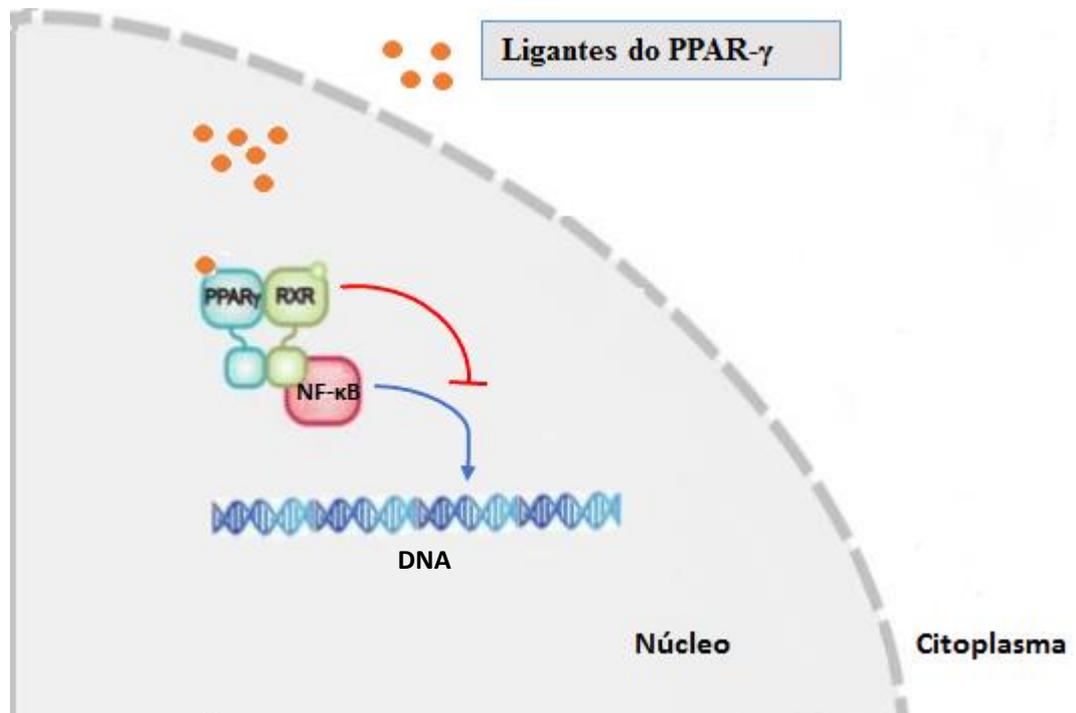


A figura ilustra o mecanismo de ação do PPAR-gama. (A) ativação do receptor nuclear PPAR-gama pelo ligante; (B) heterodimerização com o receptor do ácido X retinóico; (C) ligação do heterodímero aos elementos responsivos dos proliferadores de peroxissomas (PPRES) no DNA, para dar início a transcrição gênica; (D) recrutamento de co-fatores de transcrição para os genes alvo, resultando em um aumento da transcrição gênica.

Fonte: Adaptada de (POULSEN; SIERSBÆK; MANDRUP, 2012)

No entanto, além desse prototípico mecanismo de transativação dependente de ligante dos PPARs, também foi descrito o mecanismo de transrepressão dependente de ligante para esses receptores. Os PPARs podem regular negativamente a expressão gênica através da inibição da atividade de outros fatores de transcrição, tal como os membros das famílias do NF- κ B (fator nuclear kappa B) e AP-1 (proteína ativadora-1), importantes fatores de transcrição que modulam a expressão de moléculas pró-inflamatórias. A Figura 7 ilustra o mecanismo de transrepressão pelo PPAR-gama. Em contraste com o mecanismo de transativação, a transrepressão não envolve a ligação do PPAR com os PPRE na região promotora do gene alvo (RICOTE; GLASS, 2007).

Figura 7 – Mecanismo de transrepressão pelo PPAR-gama



A figura ilustra o PPAR-gama ativado pelo ligante (dímero PPAR-gama-RXR), inibindo a ação do fator nuclear kappa B (NF-KB). A interação física do complexo heterodimérico PPAR-gama-RXR com o fator de transcrição NF-KB impede sua ligação aos seus genes alvo.

Fonte: Adaptada de (SCHMIDT; BRÜNE; VON KNETHEN, 2010)

Ligantes sintéticos do PPAR-gama têm apresentado inibição da produção de diversos mediadores inflamatórios em vários tipos celulares, incluindo monócitos/macrófagos, células epiteliais, células endoteliais, células musculares lisas, células dendríticas e linfócitos (DAYNES; JONES, 2002; RADINA KOSTADINOVA; WALTER WAHLI AND LILIANE MICHALIK, 2005). Estudos clínicos também sugerem que a regulação negativa da expressão gênica de mediadores inflamatórios seja a base para alguns dos efeitos sensibilizadores à insulina da rosiglitazona observados em pacientes com diabetes tipo 2 (HAFFNER et al., 2002).

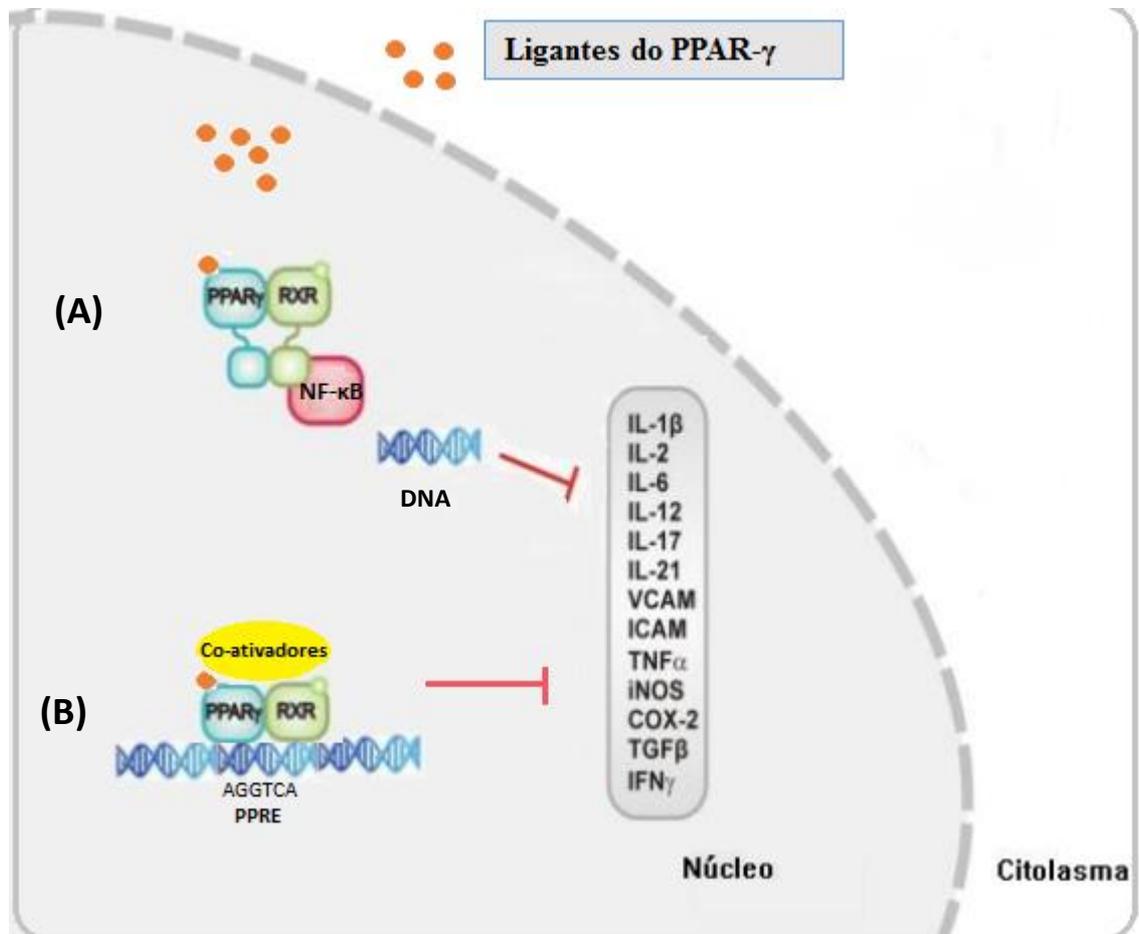
Além disso, a administração de ligantes do PPAR-gama, como a rosiglitazona e pioglitazona, representantes da classe de fármacos das tiazolidinedionas (TZDs ou glitazonas) apresentou efeito anti-inflamatório em vários modelos de doenças, como aterosclerose, psoríase, Parkinson, doenças inflamatórias intestinais e artrite (RICOTE; GLASS, 2007). Nas doenças inflamatórias intestinais, a administração preventiva das TZDs reduziu significativamente a mortalidade, severidade, lesões histológicas e os mediadores inflamatórios em diferentes modelos animais (ratos, camundongos e porcos) de colite induzida (ANNESE et al., 2012).

Em monócitos, ligantes do PPAR-gama inibiram a expressão das citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- alfa) e das interleucina-6 (IL-6, IL-1 β) e a expressão do IFN- γ -induzido por proteína 10 (IP-10), moléculas de adesão celular e endotelina-1 em células endoteliais. Em macrófagos, ativadores do PPAR-gama reprimiram a expressão da óxido nítrico-sintase induzida (iNOS - inducible nitric oxide synthase) e aumentou a produção do receptor antagonista da IL-1. Em splenócitos de ratos, a ativação do PPAR-gama pela ciglitazona levou a diminuição da produção interferon gama (IFN- γ) e IL-12 (CHINETTI; FRUCHART; STAELS, 2001; CUNARD et al., 2002; MEIER et al., 2002).

Em diferentes modelos animais de aterosclerose, as glitazonas reduziram a expressão do TNF- alfa e da metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) na raiz da aorta e em modelos *in vivo* de inflamação e hiperalgesia induzidas, ligantes do PPAR-gama reduziram a formação de edema (CHINETTI; FRUCHART; STAELS, 2003; TAYLOR et al., 2002). Nas células dendríticas, as principais células apresentadoras de antígenos capazes de induzir uma resposta imune mediada por células-T, a ativação do PPAR-gama por rosiglitazona reduziu a secreção da IL-2, uma citocina pro-inflamatória envolvida na aterogênese (FAVEEUW et al., 2000). Nas células-T, o pré-tratamento com ativadores do PPAR-gama (rosiglitazona ou pioglitazona) reduziram a síntese de citocinas, incluindo IFN-gama e TNF- alfa (MARX et al., 2002) e também exerceu efeito antiproliferativo (CLARK et al., 2000). A inibição da proliferação e da produção de citocinas nas células-T está associada com a supressão dos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B (WANG et al., 2001). Dessa forma, considerando o importante papel das células de adesão e das moléculas quimioatraentes no recrutamento de células do sistema imune para o sítio da inflamação, como monócitos e macrófagos, a regulação negativa desses genes por PPAR-gama pode prevenir o desenvolvimento de doenças inflamatórias. Assim, esses dados sugerem que a ativação do PPAR- gama pode ter um profundo impacto na resposta imune local afetando a progressão de doenças inflamatórias crônicas (CHINETTI; FRUCHART; STAELS, 2003; RICOTE; GLASS, 2007).

A Figura 8 apresenta os mecanismos de inibição da expressão de genes pró-inflamatórios dependentes de PPAR-gama.

Figura 8 – Mecanismos de inibição da expressão de genes pró-inflamatórios dependentes de PPAR-gama



A figura ilustra os mecanismos de inibição da expressão de genes pró-inflamatórios pelo PPAR-gama. (A) Mecanismo de transrepressão, com o PPAR-gama inibindo a ação do fator nuclear kappa B (NF-KB). (B) Mecanismo de transativação, com o PPAR-gama ligando-se aos elementos responsivos dos proliferadores de peroxissomas, no DNA, para transcrever os genes anti-inflamatórios.

Fonte: Adaptada de (SCHMIDT; BRÜNE; VON KNETHEN, 2010)

Há ainda estudos que apontam para a redução da expressão do PPAR-gama após estresse celular, tal como dano mecânico ou infecção, como um mecanismo que contribui para a resposta inflamatória exacerbada. Após tais estímulos, vários receptores intimamente relacionados ao sistema imunológico e mecanismos de reparo são expressos e ativados, o que mostrou afetar a expressão do PPAR-gama (DUBUQUOY et al., 2003). Em um modelo de pancreatite aguda induzida por hiperestimulação com ceruleína em ratos, foi avaliado o efeito da pancreatite induzida por ceruleína na expressão do PPAR-gama e na expressão de citocinas inflamatórias no tecido pancreático para correlacionar a relação entre a inflamação aguda e a

expressão e função do PPAR-gama. O estudo utilizou agonistas do PPAR-gama correlacionando diretamente seus efeitos anti-inflamatórios com o nível de expressão do PPAR-gama durante a pancreatite aguda. Neste estudo, foi observado que a expressão do PPAR-gama se correlacionou inversamente com a severidade da pancreatite e a expressão das citocinas pró-inflamatórias interleucina-6 e fator de necrose tumoral- α . A estimulação com ceruleína reduziu a expressão do PPAR-gama em 60% do total da proteína no pâncreas. A administração profilática dos agonistas troglitazona e 15d-PGJ₂ mantiveram os níveis de expressão do PPAR-gama, diminuindo também o infiltrado inflamatório no pâncreas e inibindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, ligando assim os níveis celulares do PPAR-gama com a redução na severidade da pancreatite e dos sinais pró-inflamatórios (ROLLINS et al., 2006).

Pacientes com colite ulcerativa parecem ter um nível reduzido da proteína PPAR-gama no revestimento epitelial do cólon (LINARD; GREMY; BENDERITTER, 2007). Deficiências similares foram sugeridas por Katayama e colaboradores (2003) em modelo de colite ulcerativa em ratos, mas somente nos macrófagos da lâmina própria. Esses estudos sustentam assim, a hipótese de que níveis suficientes de PPAR-gama são necessários para manter um intestino saudável não inflamado. Linard e colaboradores (2007) avaliaram o perfil da expressão do PPAR-gama em mucosa de cólon de ratos submetidos a irradiação abdominal (10 Gy) e se a resposta aguda inflamatória radioinduzida poderia ser modulada com um ligante ativador do PPAR-gama, o ácido 5-aminossalicílico (5-ASA).

Nos animais não tratados com 5-ASA a irradiação reduziu drasticamente os níveis de PPAR-gama, tanto o mRNA quanto a proteína, em 60% três dias após a irradiação comparando com os controles não irradiados. As análises Western blot das proteínas totais e também do citoplasma e do núcleo confirmaram que a diminuição dos níveis de proteína leva a diminuição do PPAR-gama nuclear três dias após a irradiação. O pré-tratamento com 5-ASA limitou a repressão do PPAR-gama. O tratamento com 5-ASA regulou positivamente o mRNA e as proteínas PPAR-gama normalizando seus níveis de translocação. Além disso, as análises da ativação do PPAR-gama mostraram que a irradiação inibiu em aproximadamente duas vezes a capacidade de ligação do receptor com o DNA, sendo esta capacidade significativamente aumentada pelo tratamento com 5-ASA. O 5-ASA preveniu, portanto, o processo inflamatório radioinduzido bem como a expressão do TNF-alfa, proteína quimiotática monócito-1, óxido nítrico sintase e a infiltração de macrófagos. Esses dados indicam que agonistas do PPAR-gama podem ser eficazes na prevenção do processo pró-inflamatório e respostas imunes durante e após a radioterapia pélvica. Este estudo foi o primeiro a relatar que a irradiação modula os níveis de expressão do PPAR-gama (LINARD; GREMY; BENDERITTER, 2007). Sugere-se

que a diminuição dos níveis do PPAR-gama durante a inflamação é devida a nitração do receptor, o que impede sua translocação para o núcleo. Essa nitração, pode ser causada pelo peroxinitrito produzido pelo superóxido e radicais de óxido nítrico, diretamente pela produção dessas espécies reativas de oxigênio induzida pela radiação ou indiretamente pela superexpressão do TNF-alfa e da óxido nítrico sintase induzível (iNOS).

Em relação à ação de ligantes do PPAR-gama, um estudo demonstrou que alguns ligantes desse receptor se mostraram eficazes contra a nitração relacionada à artrite reumatoide e à uma linhagem de macrófagos estimulada com TNF-alfa (LINARD; GREMY; BENDERITTER, 2007; SHIOJIRI et al., 2002).

Ainda no trabalho de Linard e colaboradores (2007), os autores observaram uma supressão da superexpressão radioinduzida da iNOS pelo 5-ASA, sendo sugerido que esta contribuiu para a diminuição da nitração do PPAR-gama resultando na restauração dos níveis do receptor. No entanto, até o momento, ainda não há clareza a respeito da regulação da expressão do PPAR-gama (LINARD; GREMY; BENDERITTER, 2007).

De forma interessante, drogas agonistas do PPAR-gama têm apresentado atividades antifibrótica e antineoplásica, tanto em estudos *in vivo* quanto *in vitro* (GROMMES; LANDRETH; HENEKA, 2004; MILAM et al., 2008). Em relação as estratégias de intervenção farmacológica para a prevenção e o tratamento de lesões radioinduzidas nos tecidos sadios após o procedimento de radioterapia, as evidências que sugerem o papel da resposta inflamatória no desenvolvimento e progressão dessas lesões aliadas às propriedades anti-inflamatória, antineoplásica e antifibrótica dos agonistas sintéticos do PPAR-gama torna essa classe de fármacos importante nas investigações em busca de novos agentes radioprotetores (MANGONI et al., 2016). Além disso, a atividade antineoplásica desses agonistas sugerem um possível modo de ação distinto entre os tecidos sadio e tumoral(MANGONI et al., 2015).

Em estudos com modelos de lesão cerebral radioinduzida, um conjunto de evidências indica que a resposta inflamatória microglial contribui para os danos cerebrais observados após a irradiação (RAMANAN et al., 2009). Dado o papel da inflamação na lesão radioinduzida do cérebro e o fato de agonistas do PPAR-gama apresentarem um potencial terapêutico no tratamento de doenças neurológicas, Zhao e colaboradores (2007) realizaram estudos do possível efeito mitigador das lesões cerebrais mediante a administração do agonista do PPAR-gama pioglitazona em modelo de irradiação fracionada do cérebro de roedores. A administração da TZD pioglitazona antes, durante e após a irradiação do cérebro preveniu a disfunção cognitiva radioinduzida (ZHAO et al., 2007).

Para a radioterapia torácica, em um tratamento de câncer de pulmão ou de abdômen por exemplo, as principais toxicidades limitantes do tratamento são a pneumonite e a fibrose pulmonar da radiação. Devido as propriedades antifibrótica e antineoplásica dos agonistas do PPAR-gama, Mangoni e colaboradores (2015) avaliaram a atividade radioprotetora da rosiglitazona em modelo de lesão pulmonar radioinduzida, avaliando também se a radioproteção foi seletiva para as células saudáveis e tumorais. A rosiglitazona reduziu os sinais radiológicos e histológicos de fibrose, do infiltrado inflamatório e também diminuiu significativamente a expressão do NF- κ B e TGF- β . Observou-se também que a rosiglitazona protegeu os tecidos saudáveis enquanto os tecidos tumorais não foram protegidos em ensaios *in vitro* e *in vivo* (MANGONI et al., 2015). Da mesma forma, em um modelo de toxicidade intestinal radio-induzida, foi observado o efeito radioprotetor da rosiglitazona nos tecidos normais, com redução das alterações nas estruturas intestinais e da inflamação sem interferir no efeito da radiação nas células tumorais. Ainda, a RSG reduziu a sobrevivência clonogênica das células tumorais, produzindo uma leve redução do crescimento do tumor (MANGONI et al., 2017).

Assim, as evidências do papel do PPAR-gama na regulação das respostas imune e inflamatória tornou essa classe de receptores um foco de grande interesse nas pesquisas para o tratamento de complicações inflamatórias. Além disso, os efeitos anti-inflamatórios exercidos por ativadores do PPAR-gama após lesões teciduais radioinduzidas no procedimento de radioterapia para o tratamento do câncer, de forma a não interferir na atividade terapêutica da radioterapia nas células cancerígenas, sugere uma maior investigação dos agonistas desses receptores como uma possível opção terapêutica para a prevenção e o tratamento das lesões radioinduzidas nos tecidos normais.

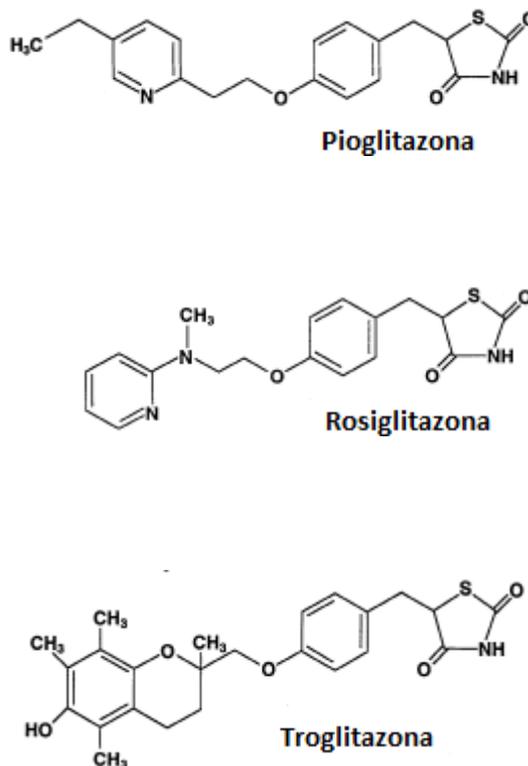
2.5 TZDs

As Tiazolidineionas (TZDs), ou glitazonas, são uma classe de fármacos amplamente utilizada no tratamento do diabetes do tipo 2, caracterizadas predominantemente pela ação de aumentar a sensibilidade à insulina nos tecidos alvo (SILVA; LAZARETTI-CASTRO, 2010). Essas drogas foram descritas como poderosos e altamente seletivos ligantes agonistas do receptor ativado por proliferadores de peroxissomas gama (PPAR-gama). Por meio da ação sobre esse receptor, as TZDs promovem uma maior sensibilidade à insulina no músculo periférico, redução da produção hepática de glicose e dos níveis de ácidos graxos livres,

inibição da lipólise periférica em adipócitos e redução da adiposidade visceral. Devido aos bons resultados apresentados na manutenção do controle glicêmico e melhora nos parâmetros metabólicos dos pacientes com diabetes mellitus tipo 2, essa classe de drogas é uma das mais prescritas no tratamento da doença (SILVA; LAZARETTI-CASTRO, 2010; TONTONZOZ; SPIEGELMAN, 2008).

Fazem parte dessa classe de fármacos a pioglitazona, a rosiglitazona e a troglitazona, consideradas as principais TZDs. Esses protótipos das TZDs foram aprovados para uso clínico no final dos anos noventa, embora o uso da troglitazona tenha sido suspenso devido aos relatos de casos de hepatotoxicidade. A estrutura química das principais TZDs está representada na Figura 9 (DAY, 1999; TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007).

Figura 9 – Estrutura química das TZDs



Fonte: (DAY, 1999)

Além do tratamento do diabetes tipo 2, as TZDs vem sendo utilizadas em outras patologias relacionadas a resistência insulínica como a síndrome dos ovários policísticos e intolerância à glicose (GLINTBORG et al., 2008). Com as evidências de uma possível regulação

das respostas imunológica e inflamatória mediada pelo PPAR-gama, as TZDs também têm sido utilizadas em estudos para o tratamento de doenças inflamatórias. Os estudos mostram que além dos efeitos metabólicos, as TZDs apresentaram atividade terapêutica em diversos modelos de doenças inflamatórias e autoimunes (MANGONI et al., 2015).

Várias linhas de evidências apontam para o fato das TZDs possuírem propriedades anti-inflamatórias tanto em estudos *in vivo* quanto *in vitro*. Foi primeiramente observado que, *in vitro*, as TZDs foram capazes de suprimir a produção de citocinas inflamatórias induzida por PMA (phorbol myristyl acetate) em monócitos humanos (JIANG; TING; SEED, 1998). Também foi mostrado que, em macrófagos, as TZDs inibem a expressão das proteínas que são reguladas positivamente durante a diferenciação e ativação de macrófagos, como óxido nítrico-sintase induzida (iNOS - inducible nitric oxide synthase) e gelatinase B através da inibição das atividades dos fatores de transcrição STAT (signal transducers and activators of transcription), NF- κ B (fator nuclear κ B) e AP-1 (proteína ativadora-1) (RICOTE et al., 1998). Esses dados *in vitro* então, sugerem que a ativação do PPAR-gama pelas TZDs pode modular a atividade de macrófagos e monócitos, tendo um impacto no processo inflamatório.

Além disso, diversos estudos com modelos animais estão de acordo com esses dados. Cuzzocrea e colaboradores pela primeira vez, mostraram que a rosiglitazona exerceu poderosos efeitos anti-inflamatórios em modelos de edema de pata e pleurisia induzidos por carragenina em roedores. Eles observaram após a administração intraperitoneal de rosiglitazona concomitantemente com a carragenina a inibição do edema da pata, da formação do exsudato pleural, redução da infiltração das células mononucleares e da lesão histológica. Ainda, a fim de elucidar se o efeito protetor da rosiglitazona está relacionado com a ativação do PPAR-gama, foi analisado o efeito de um antagonista do receptor, o bisfenol A diglicidil éter, administrado antes do tratamento com a rosiglitazona. A administração do bisfenol A diglicidil éter suprimiu quase completamente a ação anti-inflamatória da rosiglitazona, mostrando que os efeitos benéficos da rosiglitazona foram mediados pelo PPAR-gama (CUZZOCREA et al., 2004).

Zingarelli e colaboradores realizaram estudos *in vivo*, em modelo de sepse polimicrobiana induzida em ratos, levando assim à falência múltipla dos órgãos (com 50% de mortalidade) e elevação dos níveis plasmáticos do TNF-alfa, interleucina-6 (IL-6 e IL-10). O tratamento com a ciglitazona, outro derivado das TZDs, melhorou a sobrevivência, bloqueou a produção de citocinas e reduziu a infiltração de neutrófilos no pulmão, cólon e fígado. Esses efeitos do ligante do PPAR-gama foram associados à regulação das vias do NF- κ B (fator nuclear κ B) e AP-1 (proteína ativadora-1) (ZINGARELLI et al., 2003).

Diversos estudos clínicos também apontam para um importante papel das TZDs na modulação das vias inflamatórias. Ghanime e colaboradores investigaram os possíveis efeitos anti-inflamatórios da troglitazona, avaliando a supressão do NF- κ B e outros marcadores inflamatórios em sete pacientes obesos não-diabéticos. O tratamento dos pacientes com a troglitazona ao longo de quatro semanas reduziu de forma significativa o conteúdo nuclear de NF- κ B em células mononucleares, sendo observada também a redução da geração de espécies reativas de oxigênio nas células, outra complicação resultante do processo inflamatório. Os mesmos autores também realizaram o estudo com um grupo de sete pacientes obesos e com diabetes tipo 2, os quais apresentaram resultados idênticos em relação a redução dos níveis de NF- κ B e da geração de espécies reativas de oxigênio nas células mononucleares (ALJADA et al., 2001; GHANIM et al., 2001).

Um estudo com mais de trezentos pacientes com diabetes tipo 2, mostrou uma redução de mais de 20% nos níveis plasmáticos da proteína C reativa e da matriz metaloproteinase-9, ambos marcadores inflamatórios, e uma redução de 12% na contagem das células brancas sanguíneas com uma discreta redução dos níveis plasmáticos da IL-6, após o tratamento a longo prazo com a rosiglitazona (HAFFNER et al., 2002). Em um modelo de artrite reumatoide induzida em roedores, o tratamento com a rosiglitazona apresentou uma melhora dos sinais clínicos, reduzindo o grau de danos oxidativos e os níveis plasmáticos do TNF, IL-1 β e IL-6 (CUZZOCREA et al., 2003). Além do bem estabelecido benefício das TZDs no tratamento do diabetes tipo 2, esse conjunto de dados acerca dos efeitos anti-inflamatórios das TZDs pode ser portanto, relevante para um possível uso desses compostos na terapia de outras doenças/complicações caracterizadas por um estado inflamatório (CONSOLI; DEVANGELIO, 2005).

Com as evidências de que a patogênese da lesão tecidual radioinduzida envolve uma resposta do tipo inflamatória, abrem-se novos caminhos para as pesquisas em terapias que utilizam radiações ionizantes (como a radioterapia no tratamento do câncer), no sentido de otimizar o tratamento, melhorando a sobrevivência e a qualidade de vida dos pacientes através de novas abordagens terapêuticas para a prevenção ou tratamento das lesões nos tecidos normais radioinduzidas resultantes da terapia. A radiação ionizante é capaz de regular diversos genes e fatores envolvidos na modulação das respostas imune e inflamatória. Um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio bem como a ativação de fatores pró-inflamatórios, mais precisamente citocinas pró-inflamatórias, foi observado *in vivo* e *in vitro*, e nesse sentido, os efeitos anti-inflamatórios das TZDs torna essa classe de fármacos interessante para as

investigações no tratamento e prevenção das lesões radioinduzidas nos tecidos (ZHAO; ROBBINS, 2009).

Além disso, como citado nos tópicos anteriores, as TZDs apresentam propriedades antifibrótica e antineoplásica e sua atividade radioprotetora têm sido bem documentada no cérebro, pulmão e intestino e ainda, seu efeito antineoplásico sugere uma atividade radioprotetora seletiva para os tecidos normais (MANGONI et al., 2015, 2016; ZHAO et al., 2007).

As TZDs geralmente são bem toleradas no seu uso clínico, no entanto, seu uso pode estar associado com vários efeitos adversos. Alguns dos efeitos colaterais comuns associados às TZDs são edema, ganho de peso, edema macular, insuficiência cardíaca e perda de massa óssea. A primeira TZD, a troglitazona, foi rapidamente retirada do mercado devido a sérios problemas de hepatotoxicidade (RIZOS et al., 2009). Mais recentemente, em 2010, a agência americana de controle de alimentos e medicamentos (FDA - Food and Drug Administration) restringiu o uso da rosiglitazona devido a um aumento do risco de eventos cardiovasculares (GONÇALEZ, 2010).

Atualmente, a única glitazona disponível no mercado para uso clínico é a pioglitazona, destacando a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos que mantenham a ação das TZDs sem os efeitos adversos associados à primeira geração de derivados dessa classe.

2.6 LPSF/GQ-16

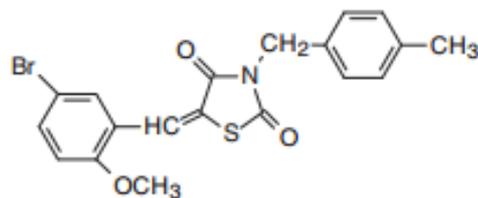
As tiazolidinedionas (TZDs), descritas como agentes insulino-sensibilizantes que são altamente eficazes no tratamento do diabetes tipo 2, atuam não só na regulação metabólica mas também na limitação das respostas dos processos inflamatórios. No entanto, apesar dos efeitos positivos sobre o metabolismo, o uso das TZDs tem sido assolado por efeitos colaterais insidiosos, tais como ganho de peso, edema, toxicidade cardiovascular e perda de massa óssea (AMATO et al., 2012). Embora os compostos suspensos tenham compartilhado efeitos colaterais comuns, a razão para a interrupção foi sempre composto-específico. Tem sido demonstrado que é provável que os efeitos adversos resultem de doses elevadas de agonistas totais do receptor ativado por proliferadores de peroxissomas gama (PPAR-gama) (RUBENSTRUNK et al., 2007).

Uma estratégia para reduzir os efeitos adversos associados à ampla ativação do PPAR-gama é o desenvolvimento de ligantes que mantenham as atividades terapêuticas desse receptor,

porém sem os efeitos adversos observados com a utilização de agonistas totais. Nesse sentido, significantes esforços têm sido direcionados ao desenvolvimento de novos ligantes do PPAR-gama mais eficazes nos últimos anos, e, de fato, um dos resultados mais atraentes tem sido a descoberta de agonistas parciais do PPAR-gama, ligantes com apenas eficácia parcial na ativação do PPAR-gama que mantêm suas ações terapêuticas. Muitos agonistas parciais do PPAR-gama foram relatados como tendo menos efeitos colaterais comparados aos agonistas totais, como as TZDs clássicas, sugerindo que ligantes mantendo as ações terapêuticas das TZDs sem os efeitos colaterais indesejados podem ser desenvolvidos (AMATO et al., 2012).

Dado o potencial terapêutico e farmacológico dos agonistas do PPAR-gama e a escassez de fármacos atualmente disponíveis no mercado, pesquisadores da Universidade Federal de Pernambuco sintetizaram uma série de novos ligantes do PPAR-gama. Entre eles, o LPSF/GQ-16 ((5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona), um derivado das tiazolidinedionas que será o composto investigado neste trabalho (MOURÃO et al., 2005). A estrutura química do LPSF/GQ-16 está representada na Figura 10.

Figura 10– Estrutura química do LPSF/GQ-16



Fonte: (SOARES E SILVA et al., 2013)

O LPSF/GQ-16 além de ser específico para o PPAR-gama, diferentemente das TZDs clássicas apresentou atividade agonista parcial neste receptor. Estudos demonstraram que este composto sintético utiliza um modo de ligação com o PPAR-gama distinto de outros ligantes, como a rosiglitazona. Amato e colaboradores (2012) demonstraram que o LPSF/GQ-16 apresentou propriedades antidiabéticas, aumentando a sensibilidade à insulina em ratos submetidos a dietas hiperlipídicas sem promover ganho de peso nos animais e a retenção de líquido, efeitos colaterais comuns do tratamento com as TZDs clássicas (AMATO et al., 2012).

Estudos também mostraram que o LPSF/GQ-16 reduziu significativamente a proliferação de células mesangiais induzida pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), em um padrão de curva dose resposta, semelhante à rosiglitazona e pioglitazona, reduzindo também a atividade transcrricional do promotor do TNF-alfa. Foi avaliado também o efeito antifibrótico,

através da expressão do mRNA do fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), que, embora não se tenha obtido resultados apresentando significância estatística, foram similares à rosiglitazona, concluindo-se assim que o LPSF/GQ-16 apresenta um efeito antiproliferativo, anti-inflamatório e possivelmente antifibrótico (MARTINI, 2012).

Em um modelo animal de aterosclerose, Collins e colaboradores observaram uma substancial atenuação da aterosclerose após o tratamento tanto com a rosiglitazona quanto com o LPSF/GQ-16. As lesões histológicas indicaram que os vasos sanguíneos dos ratos tratados com LPSF/GQ-16 apresentavam uma abundância de células semelhantes a condrócitos, sugerindo a reparação da lesão quando comparado aos vasos dos ratos não tratados e tratados com rosiglitazona. Na avaliação de marcadores inflamatórios de adipócitos, o LPSF/GQ-16 e a rosiglitazona preservaram a expressão de adiponectina e atenuaram os genes pró-inflamatórios tais como as interleucina-1 alfa IL-1 α e IL-1 β , mostrando o potencial terapêutico do LPSF/GQ-16 para tratamento de distúrbios inflamatórios e metabólicos (ALAN R COLLINS et al., 2012). Em relação às pesquisas no contexto de radioproteção, um estudo recente avaliou a atividade do LPSF/GQ-16 em células humanas irradiadas *in vitro*. O estudo avaliou os níveis séricos de citocinas em células irradiadas na presença e na ausência do LPSF/GQ-16, observando-se uma inibição significativa das concentrações séricas das citocinas IFN- γ , TNF-alfa, IL-17A e IL-2 (LEITE, 2017). Os resultados desse estudo motivam investigações acerca da eficácia do LPSF/GQ-16 como radioprotetor.

Portanto, dado o relevante papel da inflamação nas reações adversas à RT e a atividade inibitória dos processos inflamatórios relatada para a ação agonista das TZDs sobre o PPAR-gama, aliados à potencialidade do LPSF/GQ-16 em exercer seus efeitos terapêuticos de agonista parcial do PPAR-gama, resolvemos investigar neste trabalho a ação do LPSF/GQ-16 sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias e do PPAR-gama em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) irradiadas *in vitro* partindo da hipótese de sua capacidade de reprimir a expressão radioinduzida de mediadores pró-inflamatórios, sendo assim uma droga possível candidata à radioprotetora.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Recrutamento dos indivíduos

Este estudo foi do tipo experimental ou ensaio clínico não randomizado, tendo sido aprovado pelo comitê de ética em pesquisa, conforme parecer de número 1084.387, emitido em 24 de junho de 2015 (ANEXO A). Todos os indivíduos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO B). Após a assinatura do TCLE, os indivíduos responderam a um questionário (ANEXO C) com dados epidemiológicos e clínicos. Dados de identificação pessoal são mantidos sob sigilo. Amostras de sangue periférico foram coletadas de 7 indivíduos saudáveis, com faixa etária entre 18 a 60 anos, obedecendo aos critérios de inclusão e exclusão (ANEXO D).

3.2 Compostos Químicos

O composto estudado foi o LPSF/GQ-16 (5-(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona), um derivado das TZDs (MOURÃO et al., 2005). O LPSF/GQ-16 foi sintetizado e cedido pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) da UFPE, obtido sob a forma liofilizada. Através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência observou-se que o LPSF/GQ-16 apresentou 100% de pureza, conforme observado nos cromatogramas (ANEXO F). O composto anti-inflamatório padrão utilizado foi a metilprednisolona (6-alfa metilprednisolona) obtido sob a forma liofilizada em farmácia comercial. A rosiglitazona (5-[[4-[2-(Methyl-2-pyridinylamino)ethoxy]phenyl]methyl]-2,4-thiazolidinedione (Sigma) foi utilizada como controle positivo para a ativação do PPAR-gama, obtida sob a forma liofilizada. Para utilização nas culturas de PBMCs, o LPSF/GQ-16, a metilprednisolona e a rosiglitazona foram dissolvidos individualmente em DMSO obtendo-se uma solução mãe de 50 mM. A partir dessa solução, obteve-se a solução de trabalho na concentração de 100 µM para os fármacos. A escolha da concentração de 100 µM foi baseada nos trabalhos anteriores, os quais indicaram essa concentração como atóxica para as células, exercendo suas ações farmacológicas (DA ROCHA JUNIOR et al., 2013; LEITE, 2017).

3.3 Coleta e irradiação do material biológico

Foram coletados de cada indivíduo ($n = 7$) 36 mL de sangue periférico em 04 tubos de 9 mL contendo heparina sódica, utilizando sistema a vácuo, obedecendo aos procedimentos de biossegurança e, conseqüentemente, boas práticas de laboratório. Duas amostras foram mantidas como controle não irradiado e duas foram irradiadas *in vitro* utilizando um arranjo experimental já bem estabelecido nas pesquisas do Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia da Universidade Federal de Pernambuco (Figura 11) (GERAR).

Os tubos contendo as amostras de sangue foram imersos em cuba contendo água, sendo em seguida irradiados, com dose de 2 Gy, com raios-X gerados por um acelerador linear de 6 MV (Siemens/Modelo Primus), pertencente ao Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) de Pernambuco.

A Figura 11 mostra a etapa de irradiação das amostras. É possível observar imersão das amostras em cuba contendo água a fim de simular a densidade do tecido mole humano ($\rho=1,0\text{g/cm}^3$). Nesta fase, ajustou-se o “setup” de irradiação para obter uma dose de 2 Gy.

Figura 11 – Setup de irradiação das amostras de sangue total



Fonte: O autor

As configurações operacionais para a irradiação foram:

- Campo de 20 x 18,5 cm;
- Distância da fonte à superfície de 80 cm;
- Distância da fonte ao isocentro de 100 cm;
- Distância da superfície ao isocentro de 20 cm;
- Taxa de dose 27 mGy/s;
- Tempo de irradiação \cong 74 s.

Após a irradiação, as amostras foram acondicionadas em isopor, sem controle de temperatura e encaminhadas ao Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada (LAMBDA), do Departamento de Energia Nuclear da UFPE onde foram realizados os procedimentos de manipulação experimental.

3.4 Obtenção das células mononucleares

Para obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs – Pheripheral Blood Mononuclear Cells) todas as amostras foram individualmente e cuidadosamente transferidas para tubos plásticos de 15 mL (Falcon) contendo uma solução de ficoll (densidade = $1,077 \pm 0,001 \text{ g.m.L}^{-1}$) (GE Healthcare) na proporção de 1:1 e então centrifugadas a 400 x g por 45 minutos. Após a centrifugação, as frações do sangue foram separadas por sedimentação e a interface de PBMCs foi coletada. As PBMCs obtidas foram transferidas para tubo Falcon e em seguida, foi adicionada uma solução de PBS (pH = 7,2-7,4) na proporção de 2 PBS:1 PBMCs para a retirada de resíduos das células. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 350 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as PBMCs foram ressuspendidas em 5 mL de PBS. As células foram novamente centrifugadas com o mesmo parâmetro de centrifugação anterior.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 5 mL de meio RPMI 1640 (Cultilab, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil) ao pellet celular obtido.

3.4.1 – Ajuste da concentração celular

Um volume de 50 μL da suspensão celular final obtida foi adicionado à 50 μL do corante azul de tripan 0,4% v/v (Sigma-Aldrich, Brasil). As células foram dispensadas na câmara de Neubauer para análise por microscopia óptica. Para a primeira cultura celular, realizada com 3 indivíduos, a concentração celular foi ajustada para 5×10^5 células/mL de meio RPMI 1640 suplementado com SFB. Para a segunda cultura celular, realizada com 4 indivíduos, a concentração celular foi ajustada para 4×10^6 células/mL de meio RPMI 1640 suplementado com SFB.

As concentrações celulares foram definidas obedecendo aos critérios estabelecidos pelo fabricante do reagente utilizado para a extração do RNA total das células (Purelink RNA Mini Kit – Ambion, USA). O ajuste da concentração celular para 4×10^6 células/mL de meio RPMI 1640 suplementado com SFB para a segunda cultura foi adotado com o objetivo de se obter um maior rendimento de RNA total no procedimento de extração.

3.5 Cultura celular

As PBMCs isoladas foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com L-Glutamina, Soro Fetal Bovino, 10mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Cultilab, Brasil). O ajuste das concentrações celulares foi realizado conforme já descrito no item 3.4.1.

Estas células foram cultivadas em placas de cultura celular de 6 poços durante 24 horas em incubadora a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO₂, sendo analisadas, tanto para as amostras irradiadas quanto para as amostras não irradiadas, as seguintes condições:

- Poços contendo apenas células;
- Poços contendo células + PMA e Ionomicina (PMA-IONO³);
- Poços contendo células + PMA-IONO + metilprednisolona;
- Poços contendo células + PMA-IONO + Rosiglitazona;
- Poços contendo células + PMA-IONO + LPSF/GQ-16

Após o período de incubação, os sobrenadantes foram retirados e ao pellet celular foi adicionada solução estabilizante de RNA (RNAlater®, Applied Biosystems). As células

³ O acetato de forbol miristato (PMA) e a ionomicina são utilizados como estimulantes da expressão gênica de citocinas, pois, em níveis basais, as PBMCs produzem poucas ou nenhuma citocina, o que provavelmente inviabilizaria a detecção dos mRNAs dessas moléculas.

foram armazenadas a temperatura de -80°C até o momento da realização da extração do RNA total.

3.6 Extração do RNA total

Para avaliação da expressão gênica das citocinas e do receptor nuclear alvos desse estudo, as células cultivadas foram submetidas à extração do RNA total, utilizando o kit comercial Purelink RNA Mini Kit (Ambion, USA), seguindo as instruções do fabricante, como é descrito a seguir.

3.6.1 Lise e homogeneização

As células armazenadas previamente em solução estabilizante de RNA foram descongeladas até atingirem a temperatura ambiente e centrifugadas a $2000 \times g$ por 5 minutos para a obtenção do pellet celular. A solução estabilizante de RNA foi descartada e em seguida foram adicionados às amostras $600 \mu\text{L}$ de Tampão de Lise contendo 1% de 2-mercaptoetanol. As amostras foram vortexadas até a dispersão do pellet.

3.6.2 Purificação do RNA total

Foi adicionado para cada homogeneizado celular um volume de etanol 70% (1:1). As amostras foram vortexadas para a homogeneização e transferiu-se até $700 \mu\text{L}$ para a coluna de extração (com o tubo coletor); em seguida as amostras foram centrifugadas a $12.000 \times g$ por 15 segundos à temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e à coluna de extração foi adicionado $700 \mu\text{L}$ do Tampão de Lavagem I e, em seguida, centrifugou-se a $12.000 \times g$ por 15 segundos à temperatura ambiente. O filtrado foi descartado. Em seguida, adicionou-se $500 \mu\text{L}$ do Tampão de Lavagem II e centrifugou-se a $12.000 \times g$ por 15 segundos à temperatura ambiente. O filtrado foi desprezado e repetiu-se a lavagem com Tampão de Lavagem II. Em seguida, as colunas de extração foram centrifugadas a $12.000 \times g$ por 1 minuto para a completa secagem da membrana com o RNA aderido; o tubo coletor foi substituído. Foram adicionados $20 \mu\text{L}$ de água RNase-free ao centro da coluna de extração, que ficou em repouso por 1 minuto à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada por 2 minutos a $12.000 \times g$ à temperatura ambiente para eluir o RNA da membrana para o tubo de coleta.

Após a extração, foram realizadas a quantificação utilizando o Qubit™ 3 Fluorometer (Invitrogen). O RNA purificado foi armazenado à temperatura de -80°C até o momento de sua utilização nos ensaios de síntese de cDNA.

3.6.3 Síntese de cDNA

Após a quantificação, foi calculada a quantidade de amostra necessária para se realizar a síntese de cDNA com massa final de 500ng. Uma vez aliquotadas, essas amostras foram tratadas com DNase (DNA-free kit DNase treatment and removal reagents, Thermofisher). Nesta etapa, foram adicionados 1 µL de DNase, 3 µL de tampão e água nuclease-free q.s.p 20 µL às amostras. As amostras foram incubadas no termociclador por 20 minutos a uma temperatura de 37°C. Em seguida, foram adicionados 3 µL de acetato de sódio 0,2 M e 75 µL de etanol absoluto (100%) às amostras, e então, foram incubadas à -30°C por 24 horas para a precipitação do RNA. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.600 x g a 4°C. O sobrenadante foi desprezado cuidadosamente com auxílio de pipeta e foram adicionados 100 µL de etanol a 70% às amostras. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 10.600 x g a 4°C. O sobrenadante foi desprezado com auxílio de pipeta cuidadosamente e foram adicionados 10 µL de água ultrapura às amostras. Após o tratamento das amostras com DNase descrito acima, os reagentes do kit de síntese de cDNA (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermofisher) foram descongelados. Os reagentes do kit foram adicionados em um microtubo separado, contendo (para 1 amostra):

- 2,0 µL de tampão 10x
- 0,8 µL de 25x dNTPs (Desoxirribonucleotídeos trifosfato)
- 2,0 µL do random primer 10x
- 3,2 µL de água DNase/RNase free
- 1,0 µL da MultiScribe RT*
- 1,0 µL da RNase out* (Inibidor de RNase)

* foram adicionados por último, devido a sua alta instabilidade.

Foi calculado o volume de reagentes (mix) necessário para o número de amostras. Em seguida, um volume de 10 µL de amostra foi adicionado em microtubos eppendorfs devidamente identificados. Na sequência, adicionou-se 10 µL do mix em cada amostra,

homogeneizando e fazendo um *spin* nos tubos para evitar possíveis bolhas. Após esta etapa, as amostras foram levadas ao termociclador onde ocorreu a reação de síntese de cDNA com ciclagem de 10 minutos à 25°C e 120 minutos à 37°C (40 ciclos). Em seguida, as amostras foram estocadas à -30°C até a utilização em ensaios de PCR em tempo real.

3.6.4 Avaliação da expressão gênica

A quantificação da expressão gênica das citocinas TNF-alfa, INF-gama e do receptor nuclear PPAR-gama foi realizada por PCR em tempo real, utilizando o equipamento StepOnePlus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems). As amostras foram individualmente diluídas em H₂O DNase/RNase free na razão de 1:10. O mix da reação foi preparado para cada sonda. Foi utilizado o Taq Man Fast Universal PCR Master Mix, seguindo as especificações de diluição e ciclagem descritas pelo fabricante. As alíquotas de amostra e mix da reação foram distribuídas em placas de 96 poços de fundo cônico. Após esta etapa, as placas foram vedadas e levadas ao termociclador de PCR em tempo real para a amplificação do cDNA contendo as sequências desejadas, com ciclagem de 1 segundo à 95°C e 20 segundos à 60°C (40 ciclos).

3.7 Análise estatística

As análises estatísticas univariadas foram baseadas nos testes Mann-Whitney e Wilcoxon em nível de confiança de 95%. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 6.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

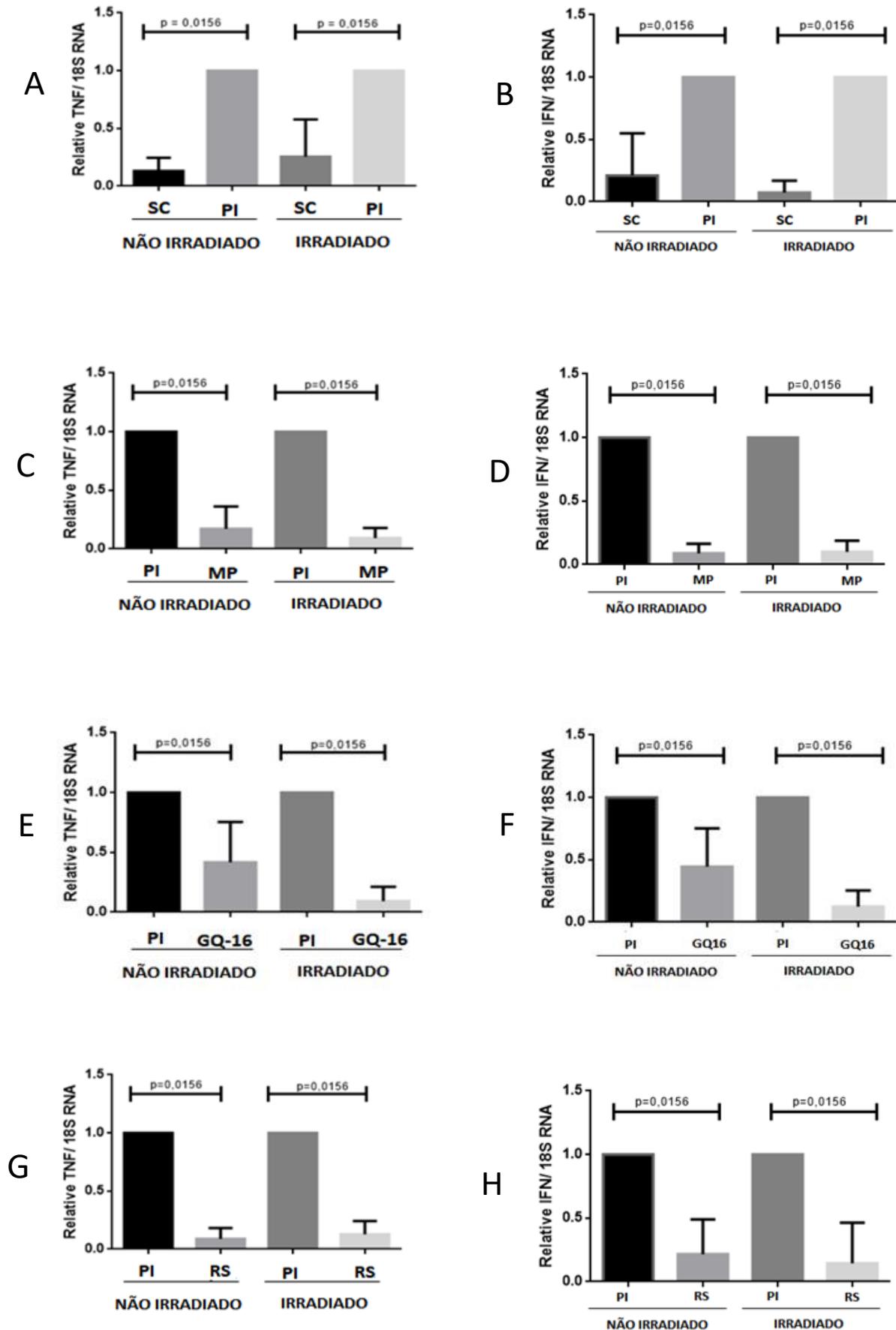
4.1 Expressão das citocinas TNF-alfa e IFN-gama em amostras não irradiadas e irradiadas, tratadas e não tratadas com os estímulos PMA-Ionicina e tratadas com os compostos MP, RSG e LPSF/GQ-16.

Para avaliar o potencial efeito radioprotetor do LPSF/GQ16, foram analisados os níveis de expressão do mRNA de citocinas pró-inflamatórias em células humanas tratadas com LPSF/GQ-16 (100 μ M) irradiadas (2 Gy) e não irradiadas (0 Gy) *in vitro* por RT-qPCR. O estabelecimento da dose de 2 Gy para a irradiação das amostras nessa pesquisa, visando analisar sua influência no perfil das citocinas inflamatórias e do PPAR-gama motivou-se pelo frequente uso dessa fração de dose em protocolos radioterápicos, como no tratamento do câncer de mama e sarcoma (GOTTLÖBER et al., 2001). Nesta seção, foram avaliadas para todos os indivíduos, a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa e IFN-gama, nas condições: células estimuladas ou não com PMA-IONO, células estimuladas com PMA-IONO tratadas com os compostos metilprednisolona (MP), rosiglitazona (RSG) e LPSF/GQ-16 (GQ16) para as amostras irradiadas e não irradiadas.

A Figura 12 (A-H) apresenta a expressão relativa, para o gene de referência 18S, das citocinas TNF-alfa e IFN-gama nas amostras irradiadas e não irradiadas, cultivadas por 24 horas e estimuladas com PMA-IONO.

Na Figura 12 (A-B), é possível observar a elevada expressão das citocinas TNF-alfa e IFN-gama após o estímulo com PMA-IONO tanto para as amostras irradiadas quanto para as não irradiadas, indicando assim o funcionamento da cultura celular, devido ao efeito estimulante exercido por PMA-IONO. A Figura 12 (C-D), apresenta uma significativa inibição das citocinas TNF-alfa e IFN-gama nas amostras tratadas com a MP, em relação à condição estimulada com PMA-IONO, tanto para o grupo irradiado como para o grupo não irradiado. Ainda na Figura 12 (E-F), também é possível observar a inibição do TNF-alfa e do IFN-gama nas amostras tratadas com o LPSF/GQ-16 para os grupos irradiado e não irradiado. A RSG também inibiu o TNF-alfa e IFN-gama nos grupos irradiado e não irradiado (Figura 12 G-H).

Figura 12 – Variação dos níveis de citocinas em amostras não irradiadas e irradiadas (2 Gy), tratadas e não tratadas com PMA-IONO e tratadas com MP, RS e LPSF/GQ-16.



SC: Só célula; PI: PMA + Ionomicina; MP: Metilprednisolona; GQ-16: LPSF/GQ-16 (100uM) e RS:

Rosiglitazona.

Nestas análises, é possível observar que os fármacos MP e RSG inibem as citocinas TNF-alfa e IFN-gama de forma semelhante nos grupos irradiado e não irradiado. No entanto, de forma interessante, o LPSF/GQ-16 apresentou uma maior inibição das citocinas TNF-alfa e IFN-gama nas condições irradiadas.

Vale ressaltar que os níveis de expressão de citocinas tanto para as amostras irradiadas quanto para as amostras não irradiadas, foram avaliados também na condição “só células” (sem o estímulo PMA-IONO). Nesta condição, em todas as análises, a expressão desses marcadores foi semelhante à condição estimulada. No entanto, esse trabalho considerou a condição “células estimuladas com PMA-IONO” para fins comparativos, devido à ampla aplicabilidade desses compostos em estudos envolvendo estimulação de citocinas (BARAN et al., 2001; JUNG et al., 1993).

Apesar das evoluções na tecnologia da radiação, com o desenvolvimento de novas técnicas radioterápicas, a irradiação de um tumor afeta inevitavelmente tecidos saudáveis adjacentes. Essa toxicidade nos tecidos normais é considerada o principal fator limitante do tratamento, uma vez que a eficácia da radioterapia (RT) é definida pelo equilíbrio entre a toxicidade do tecido sadio e o controle do tumor (MANGONI et al., 2016).

De fato, a RT tem um significativo efeito na modulação do sistema imune através da ativação de uma cascata de citocinas, o que pode influenciar na radiosensibilidade celular. Estudos *in vitro* e *in vivo* relatam a expressão de diversas citocinas e fatores de crescimento após a exposição de células ou tecidos à radiação ionizante, tais como: TNF-alfa, IL1-alfa, IL-6, GM-CSF, TGF-beta e IFN-gama (DI MAGGIO et al., 2015).

Estudos com ligantes do PPAR-gama, principalmente fármacos pertencentes à classe das tiazolidinedionas (TZDs), a qual inclui o composto estudado nesse trabalho, demonstram que esses ligantes apresentam propriedades anti-inflamatórias em diversos modelos de doenças inflamatórias e autoimunes. Por exemplo, a TZD TM17 inibiu a expressão da citocina IL-6 em esplenócitos de ratos assim como das citocinas IL-17A, IL-22 e IFN-gama em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide (DA ROCHA JUNIOR et al., 2013). Em um estudo com um modelo animal de artrite induzida por colágeno, a rosiglitazona (RSG) reduziu significativamente os níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa, IL-1-beta e IL-6 (CUZZOCREA et al., 2003).

Ainda, foi relatada atividade antineoplásica e antifibrótica das TZDs em modelos *in vitro* e *in vivo* (CUZZOCREA et al., 2003; GROMMES; LANDRETH; HENEKA, 2004; MILAM et al., 2008). Estudos utilizando TZDs em diversos modelos de lesão tecidual radioinduzida têm apresentado resultados promissores. Mangoni e colaboradores (2016)

observaram que a RSG reduziu significativamente os sinais histológicos de estruturas intestinais alteradas (e.g. encurtamento das vilosidades, espessamento submucosal e edema) observando-se também uma significativa inibição da expressão dos mediadores inflamatórios TGF-beta, TNF-alfa e MMP-13 (Matrix metalloproteinase 13) em um modelo de toxicidade intestinal radioinduzida. Nesse estudo, também foi avaliado a ação da RSG em células de câncer de cólon HT-29 em um modelo *in vivo*, observando-se a redução da sobrevivência clonogênica dessas células, porém, produzindo apenas uma discreta redução do tumor (MANGONI et al., 2016).

A TZD pioglitazona, preveniu a disfunção cognitiva em ratos submetidos à irradiação fracionada do cérebro. A RSG reduziu os sinais histológicos da fibrose pulmonar radioinduzida em ratos (MANGONI et al., 2015; ZHAO et al., 2007).

Em concordância com trabalhos anteriores, nas presentes análises (Figura 12 A-H) as TZDs RSG e LPSF/GQ-16 apresentaram inibição das citocina pró-inflamatórias TNF-alfa e IFN-gama nas amostras irradiadas *in vitro*, assim como foi observado para o controle positivo metilprednisolona (MP). Estudos com o LPSF/GQ-16 demonstraram que esse composto apresentou as atividades antidiabéticas e anti-inflamatórias descritas para as TZDs clássicas, como a rosiglitazona e a pioglitazona. Amato e colaboradores (2012) demonstraram que o LPSF/GQ-16 aumentou a sensibilidade dos tecidos à insulina em ratos diabéticos. Martini (2012) demonstrou que o LPSF/GQ-16 reduziu significativamente a proliferação de células mesangiais induzida pelo TNF-alfa, em um padrão de curva dose-resposta, semelhante à rosiglitazona e pioglitazona.

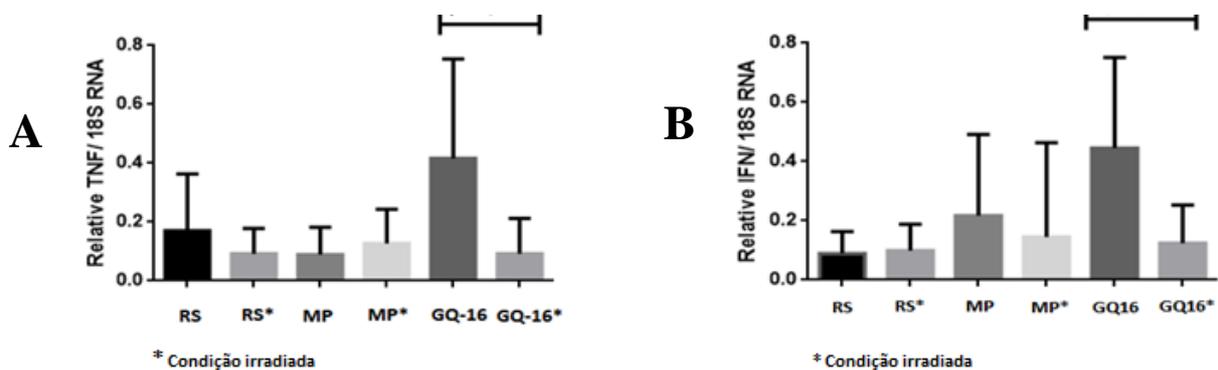
Também foi possível observar a redução da atividade transcricional do promotor do TNF-alfa. Ainda, nesse estudo, foi avaliado o efeito anti-fibrótico do LPSF/GQ-16 através da expressão do mRNA do TGF-beta, onde, embora os resultados não tenham apresentado significância estatística, foram similares aos observados com a rosiglitazona (AMATO et al., 2012, p. 16; MARTINI, 2012). No entanto, até o momento, há apenas um estudo direcionado à investigação de uma possível atividade radioprotetora do LPSF/GQ-16. Consistindo com os nossos resultados, Leite (2017) observou uma redução na concentração das citocinas TNF-alfa e IFN-gama em sobrenadante de cultura de PBMCs irradiadas *in vitro* após o tratamento com o LPSF/GQ-16 (LEITE, 2017).

4.2 Expressão das citocinas TNF-alfa e IFN-gama em amostras não irradiadas e irradiadas, tratadas com MP, RSG e LPSF/GQ-16.

Foi realizada uma análise comparativa da ação do LPSF/GQ-16 com a ação do fármaco anti-inflamatório padrão metilprednisolona (MP) e da TZD rosiglitazona (RSG) sobre a expressão gênica das citocinas TNF-alfa e IFN-gama.

A Figura 13 A e B, apresenta os níveis de expressão gênica das citocinas TNF-alfa e IFN-gama em amostras não irradiadas e irradiadas (asterisco) após o tratamento com a RSG, MP e LPSF/GQ-16.

Figura 13 – Variação dos níveis de TNF-alfa e IFN-gama em amostras não irradiadas e irradiadas (2 Gy), tratadas com MP, RS e LPSF/GQ-16.



RS: Rosiglitazona; MP: Metilprednisolona e GQ-16: LPSF/GQ-16 (100uM).

Observa-se que tanto na condição não irradiada quanto na irradiada, os fármacos inibem a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa e IFN-gama. Observe que não houve diferença estatisticamente significativa na inibição das citocinas para as amostras tratadas com MP e RSG nas condições não irradiada e irradiada. Apenas foi encontrada significância estatística nas amostras tratadas com o LPSF/GQ-16, que apresentou uma maior inibição das citocinas na condição irradiada. Observa-se também que, na condição irradiada, o LPSF/GQ-16 apresentou inibição semelhante à RSG para ambas as citocinas. De forma geral, os dados demonstram que o LPSF/GQ-16 inibiu a expressão gênica radioinduzida das citocinas de forma equiparável ao corticoide MP e à TZD RSG.

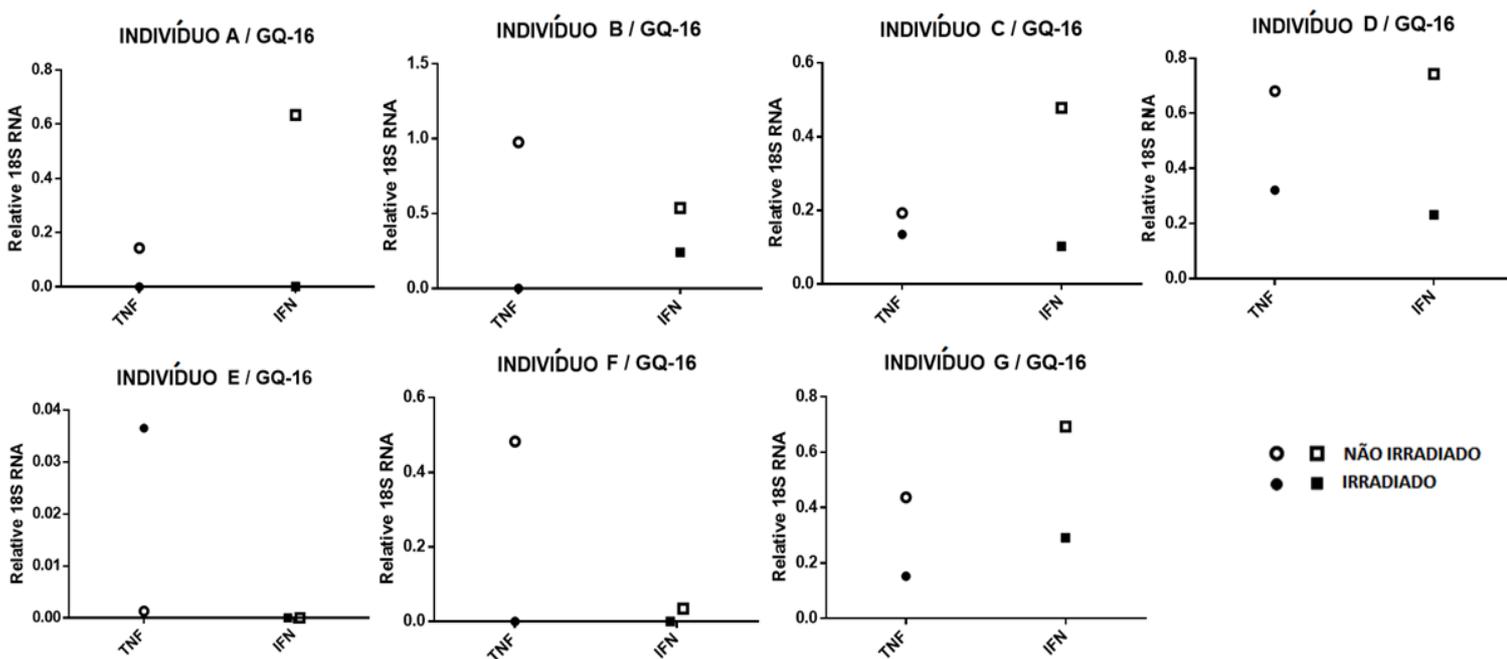
A MP é um corticosteroide sintético com conhecida propriedade anti-inflamatória e imunomoduladora. A MP se liga e ativa receptores nucleares específicos, resultando na alteração da expressão gênica e inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias

(PUBCHEM, [s.d.]). São escassas pesquisas sobre a aplicação de corticoides como radioprotetores. Leite (2017) demonstrou que a MP inibiu significativamente as citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa, IFN-gama e IL-17A em células humanas irradiadas *in vitro*, consistindo com os nossos resultados. A RSG inibiu o processo inflamatório radioinduzido em diversos modelos experimentais. Assim, nossos resultados indicam que o LPSF/GQ-16 possui atividade moduladora sobre a expressão gênica radioinduzida das citocinas TNF-alfa e IFN-gama, motivando investigações adicionais acerca de sua eficiência na inibição do processo inflamatório radioinduzido.

4.3 Perfil individual de expressão de citocinas em amostras tratadas com o LPSF/GQ-16.

Foi realizada a análise das variações dos níveis individuais (indivíduos A a G) de expressão gênica das citocinas TNF-alfa e IFN-gama das amostras não irradiadas e irradiadas tratadas com o LPSF/GQ-16 (Figura 14). É possível observar que, excetuando-se os níveis de expressão gênica da citocina IFN-gama no indivíduo E, o LPSF/GQ-16 apresentou uma maior inibição das citocinas na condição irradiada.

Figura 14 – Perfil individual de expressão do TNF-alfa e IFN-gama em amostras tratadas com o LPSF/GQ-16.



Como citado anteriormente, as TZDs têm sido descritas como possuindo atividade anti-inflamatória em diversos modelos *in vivo* e *in vitro* de doenças inflamatórias e autoimunes, assim como propriedades antifibróticas e antineoplásica.

Também, em modelos de lesão tecidual radioinduzida, as TZDs, como a rosiglitazona e a pioglitazona inibiram os processos inflamatórios associados ao desenvolvimento dessas lesões, conferindo à esses fármacos atividade radioprotetora (MANGONI et al., 2015, 2016). Os estudos mostram que o LPSF/GQ-16 mantém as propriedades antidiabéticas e anti-inflamatórias das TZDs (AMATO et al., 2012; MARTINI, 2012). Até o momento, apenas um estudo avaliou a ação do LPSF/GQ-16 sobre a expressão radioinduzida de citocinas pró-inflamatórias.

Neste estudo, que avaliou a concentração de citocinas em sobrenadante PBMCs, os resultados demonstram que o LPSF/GQ-16 apresentou uma maior inibição das citocinas nas células irradiadas quando comparadas às células não irradiadas, estando de acordo com os nossos resultados (LEITE, 2017).

Como observado no presente trabalho, a rosiglitazona apresentou uma inibição das citocinas de forma similar nas condições irradiada e não irradiada. Diferente das TZDs clássicas, como a rosiglitazona, a pioglitazona e a troglitazona, o LPSF/GQ-16 é descrito como agonista parcial do PPAR-gama. Apesar de ativar apenas parcialmente esse receptor, o LPSF/GQ-16 retém a atividade da classe (TZD) devido ao seu distinto modo de ligação à porção LBD do PPAR-gama.

O modo de ligação do LPSF/GQ-16 ao PPAR-gama é descrito como característica chave para manter ação terapêutica da TZD sem, no entanto, promover os efeitos indesejados associados à outras drogas pertencentes às tiazolidinedionas (AMATO et al., 2012).

Seria precipitado, porém, associar o comportamento do LPSF/GQ-16 sobre a expressão das citocinas nas células irradiadas à sua ação agonista parcial no receptor PPAR-gama. Isso porque, ainda que estabelecidas as ações hipoglicemiantes e anti-inflamatória das TZDs, o mecanismo exato pelo qual o PPAR-gama promove esses efeitos ainda não foi completamente elucidado (MARYAM AHMADIAN et al., 2013; ROSEN; SPIEGELMAN, 2001).

No entanto, esses resultados são interessantes para os estudos em radioproteção, fazendo-se mister, no entanto, a realização de mais investigações com o LPSF/GQ-16 direcionadas à proteção dos tecidos sadios.

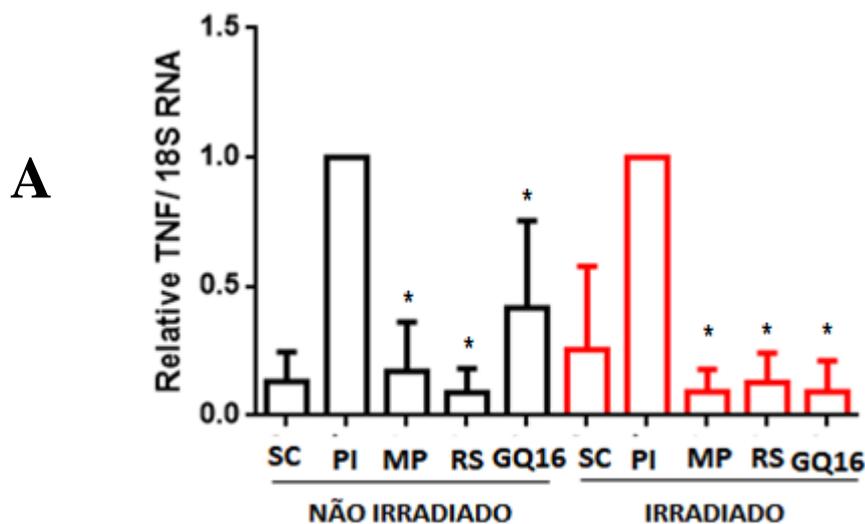
4.4 Ação do LPSF/GQ-16 sobre a expressão do TNF-alfa, IFN-gama e do PPAR-gama em amostras não irradiadas e irradiadas.

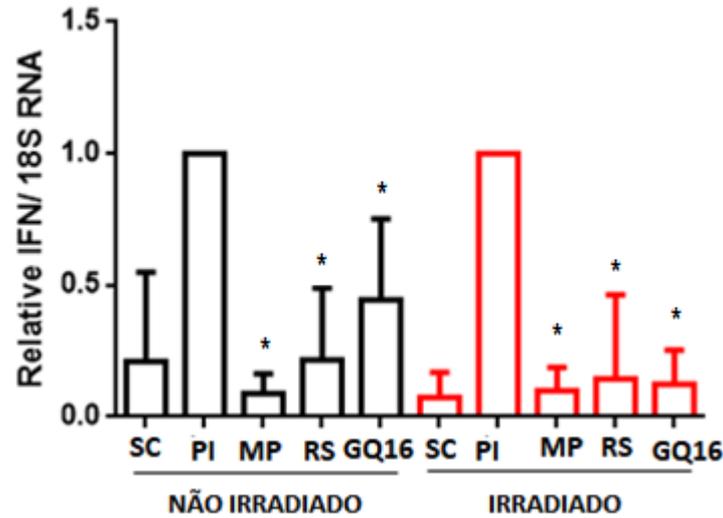
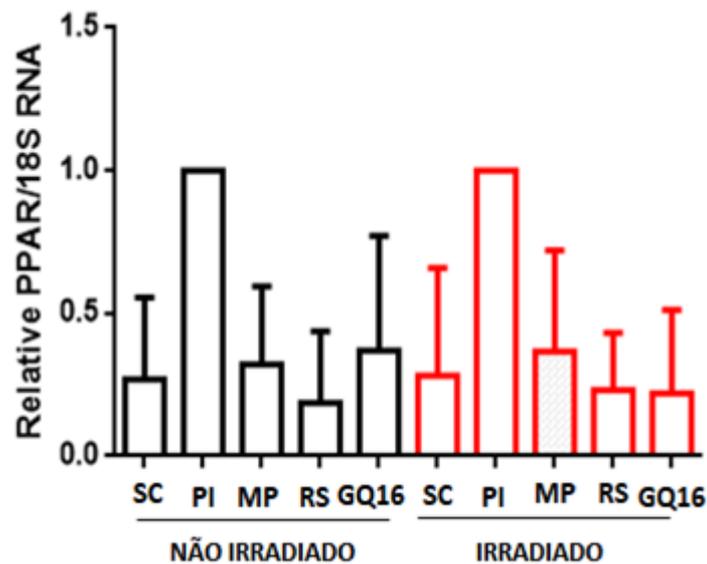
Foi analisado, para todos os indivíduos, a ação do LPSF/GQ-16 sobre a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa e IFN-gama e do receptor nuclear PPAR-gama em amostras não irradiadas e irradiadas *in vitro*. A Figura 15 (A-C) apresenta a expressão relativa, para o controle endógeno 18 S, das citocinas e do PPAR-gama em amostras não irradiadas e irradiadas tratadas com os estímulos PMA-IONO e com os fármacos MP, RSG e LPSF/GQ-16.

Observe que a MP e a RSG inibiram de forma significativa a expressão das citocinas TNF-alfa e IFN-gama tanto nas amostras não irradiadas quanto nas irradiadas (Figura 15 A e B). Também foi observada uma inibição do receptor nuclear PPAR-gama nas amostras tratadas com a MP e a RSG nos grupos não irradiado e irradiado (Figura 15 C).

O LPSF/GQ-16 apresentou inibição das citocinas TNF-alfa, IFN-gama e do receptor PPAR-gama nas condições não irradiada e irradiada. Como já observado em nossas análises, o LPSF/GQ-16 apresentou uma maior inibição das citocinas nas mostras irradiadas. Esse comportamento não foi observado quando avaliado os níveis de expressão do receptor nuclear PPAR-gama, apresentando apenas uma leve redução da expressão do PPAR-gama no grupo de amostras irradiado (Figura 15 A-C).

Figura 15 – Variação dos níveis de TNF-alfa, IFN-gama e PPAR-gama em amostras não irradiadas e irradiadas tratadas com o LPSF/GQ-16.



B**C**

SC: Só célula; PI: PMA + Ionomicina; MP: Metilprednisolona; RS: Rosiglitazona e GQ-16: LPSF/GQ-16 (100uM). O asterisco (*) imediatamente acima do box representa diferença estatisticamente significativa ($p=0,0156$) nas análises intragrupo (PMA + Ionomicina x respectivo tratamento), enquanto o subseqüente refere-se às análises intergrupo (tratamento na condição não irradiada x mesmo tratamento na condição irradiada).

Essas análises demonstraram que o LPSF/GQ-16 inibiu a expressão gênica das citocinas e do PPAR-gama tanto nas amostras não irradiadas quanto nas irradiadas, apresentando uma maior inibição das citocinas na condição irradiada. A ação do LPSF/GQ-16 sobre a expressão dos três marcadores analisados foi semelhante à ação da RSG na condição irradiada.

Como já explanado, as TZDs possuem atividade anti-inflamatória e apresentaram, por exemplo no caso da RSG e da pioglitazona, inibição do processo inflamatório radioinduzido (MANGONI et al., 2016; ZHAO et al., 2007).

Nesse sentido, nossos resultados estão de acordo com a literatura, demonstrando que o LPSF/GQ-16 apresentou inibição da expressão dos mediadores pró-inflamatórios após a irradiação das células de forma semelhante à RSG. O que torna o LPSF/GQ-16 um composto interessante para uso na prevenção ou tratamento das complicações teciduais radioinduzidas, é o seu modo de ação agonista parcial no PPAR-gama, que lhe confere os efeitos benéficos das TZDs, porém, sem promover os efeitos colaterais associados à outros fármacos da classe.

No entanto, nossos resultados divergem com os estudos sobre a modulação dos níveis de expressão do PPAR-gama, onde, aqui, não foi observada a regulação positiva desse receptor pelas TZDs RSG e LPSF/GQ-16.

Os estudos indicam uma redução da expressão do PPAR-gama após estresse, como dano mecânico ou infecção, sugerindo essa redução como um mecanismo que contribui para uma resposta inflamatória exacerbada (DUBUQUOY et al., 2003).

No entanto, foi demonstrado que após a redução da expressão do PPAR-gama nas células provocada pelo processo inflamatório, a administração de agonistas desse receptor restaura os seus níveis de expressão celular, resultando em uma subsequente redução da inflamação.

Zingarelli e colaboradores (2003) observaram uma significativa redução da expressão do PPAR-gama no pulmão e na aorta torácica após a sepse induzida por ligadura e punção do ceco em ratos. Nesse estudo, o tratamento com a ciglitazona (TZD) ou com o 15d-PGJ2, um agonista do PPAR-gama, atenuou a resposta inflamatória na sepse e, além disso, foi observado que esses agonistas regularam positivamente a expressão do PPAR-gama no pulmão e na aorta torácica (ZINGARELLI et al., 2003).

Rollins e colaboradores (2006) demonstraram que a pancreatite aguda induzida por ceruleína em ratos reduziu a expressão do PPAR-gama no pâncreas e que, o pré-tratamento com seus agonistas mantiveram sua expressão no início da pancreatite. O estudo demonstrou que a expressão do PPAR-gama correlacionou-se inversamente com a severidade da pancreatite e expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa e IL-6 (ROLLINS et al., 2006).

Estudos também demonstraram que o gene do PPAR-gama é extremamente sensível à radiação ionizante. Ramanan e colaboradores (2009) relataram que a irradiação das células endoteliais microvasculares do cérebro de ratos levou a uma rápida e significativa redução do mRNA e da proteína do PPAR-gama. Esses autores também observaram que, um ano após a

irradiação fracionada do cérebro de ratos, a expressão gênica do PPAR-gama foi significativamente menor no cérebro dos animais irradiados em relação a observada no grupo controle (placebo) (RAMANAN et al., 2009).

Linard e colaboradores (2007) demonstraram que a irradiação abdominal de ratos induziu uma significativa e até mesmo drástica redução da expressão do PPAR-gama em três dias após a irradiação em relação ao grupo controle não irradiado. Nesse trabalho, a administração do 5-aminosalicylate (5-ASA), um potente ligante ativador do PPAR-gama, restaurou a expressão do PPAR-gama em três dias após a irradiação, prevenindo os processos inflamatórios radioinduzidos bem como a expressão do TNF-alfa, da MCP-1 (Proteína Quimiotática de Monócitos 1), da iNOS (óxido nítrico sintase induzível) e a infiltração de macrófagos (LINARD; GREMY; BENDERITTER, 2007).

No presente trabalho, não se observa alteração nos níveis de expressão gênica do PPAR-gama após a irradiação das células. Também, as TZDs RSG e LPSF/GQ-16 não regulam positivamente a expressão do receptor, havendo até, uma discreta redução na sua expressão gênica.

A divergência dos nossos resultados com os apresentados nos trabalhos anteriores em relação à modulação do PPAR-gama pela ação da radiação ionizante pode ser explicada pelo baixo “n” (n=7) do trabalho, sendo necessária uma investigação com um maior número de indivíduos. Também, o tempo de 24 horas da cultura celular, adotado para os ensaios de avaliação de expressão gênica de citocinas, pode não ter sido suficiente para observar o comportamento do receptor nuclear após a exposição à radiação ionizante. Faz-se necessário investigações com um maior tempo de cultura celular para uma melhor e mais segura observação do comportamento do PPAR-gama após a irradiação.

No que diz respeito à modulação dos níveis do PPAR-gama pelas TZDs, foi observado que a RS, assim como a TM17 regularam positivamente os níveis do PPAR-gama em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis, no entanto, na ausência dos estímulos PMA-IONO. Nesse trabalho, a RSG e a TM17 inibiram a expressão do PPAR-gama nas PBMCs estimuladas com PMA-IONO (DA ROCHA JUNIOR et al., 2013).

É importante ressaltar que não há estudos sobre a modulação dos níveis de PPAR-gama por TZDs no ambiente inflamatório radioinduzido, fazendo-se necessário a realização de mais investigações a esse respeito para assim, se poder tirar alguma conclusão sobre a ação dessa classe de fármacos sobre a expressão do PPAR-gama nesse tipo de estudo.

Ainda que, não regulando positivamente os níveis do receptor PPAR-gama, o que se observou também para a RSG, o LPSF/GQ-16 mostrou possuir atividade modulatória das

citocinas pró-inflamatórias em PBMCs irradiadas, sendo a inibição das citocinas TNF-alfa e IFN-gama equiparável à do controle positivo MP, apontando para uma possível atividade radioprotetora desse fármaco em PBMCs, sugerindo investigações adicionais direcionadas para o seu uso na proteção dos tecidos contra os danos radioinduzidos.

5 CONCLUSÃO

Nesse trabalho, não foi observada alteração significativa da expressão do PPAR-gama após a exposição das PBMCs à radiação ionizante. Também não houve alteração significativa da expressão do PPAR-gama após a administração do LPSF/GQ-16, assim como da MP e RS. Esse resultado está, possivelmente, relacionado ao reduzido tempo de cultura celular. É necessária a realização de mais estudos com um maior tempo de cultura celular para melhor explorar o comportamento do PPAR-gama após a irradiação das PBMCs e após a administração do LPSF/GQ-16.

Os resultados dessa pesquisa mostram que o LPSF/GQ-16 apresentou uma boa atividade imunomoduladora em PBMCs humanas irradiadas *in vitro*. O LPSF/GQ-16 apresentou maior eficácia na inibição das citocinas pró-inflamatórias nas células irradiadas em relação às células não irradiadas. Pode-se concluir que o LPSF/GQ-16 é um possível candidato a fármaco radioprotetor, no entanto, investigações posteriores devem ser realizadas.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, I. U. et al. Soy Isoflavones in Conjunction With Radiation Therapy in Patients With Prostate Cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 62, n. 7, p. 996–1000, 23 set. 2010.
- AHMADIAN, M. et al. PPAR[gamma] signaling and metabolism: the good, the bad and the future. **Nat Med**, v. 99, n. 5, p. 557–566, maio 2013.
- ALAN R COLLINS et al. A Novel PPAR γ Ligand, GQ16, decreases Inflammation and Atherosclerosis in a Mouse Model of the Metabolic Syndrome. In: **Cardiometabolic Risk (Translational)**. Meeting Abstracts. [s.l.] The Endocrine Society, 2012. p. OR03-5-OR03-5.
- ALJADA, A. et al. Nuclear Factor- κ B Suppressive and Inhibitor- κ B Stimulatory Effects of Troglitazone in Obese Patients with Type 2 Diabetes: Evidence of an Antiinflammatory Action? ¹. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 7, p. 3250–3256, jul. 2001.
- ALSBEIH, G. et al. SNPs in genes implicated in radiation response are associated with radiotoxicity and evoke roles as predictive and prognostic biomarkers. **Radiation Oncology**, v. 8, n. 1, p. 125, 22 maio 2013.
- ALSBEIH, G. et al. Among 45 variants in 11 genes, HDM2 promoter polymorphisms emerge as new candidate biomarker associated with radiation toxicity. **3 Biotech**, v. 4, n. 2, p. 137–148, 1 abr. 2014.
- AMATO, A. A. et al. GQ-16, a Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR γ) Ligand, Promotes Insulin Sensitization without Weight Gain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 33, p. 28169–28179, 10 ago. 2012.
- ANDREASSEN, C. N.; ALSNER, J.; OVERGAARD, J. Does variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis – where and how to look for it? **Radiotherapy and Oncology**, v. 64, n. 2, p. 131–140, 2002.
- ANNESE, V. et al. PPAR γ in inflammatory bowel disease. **PPAR research**, v. 2012, 2012.
- AVRAHAM, T. et al. Radiation therapy causes loss of dermal lymphatic vessels and interferes with lymphatic function by TGF- β 1-mediated tissue fibrosis. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 299, n. 3, p. C589, 26 ago. 2010.
- BACQ, Z. M. The Amines and Particularly Cysteamine as Protectors against Roentgen Rays. **Acta Radiologica**, v. 41, n. 1, p. 47–55, jan. 1954.
- BARAN, J. et al. Three-Color Flow Cytometry Detection of Intracellular Cytokines in Peripheral Blood Mononuclear Cells: Comparative Analysis of Phorbol Myristate Acetate-Ionomycin and Phytohemagglutinin Stimulation. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 2, p. 303–313, mar. 2001.
- BARCELLOS-HOFF, M. H.; PARK, C.; WRIGHT, E. G. Radiation and the microenvironment – tumorigenesis and therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 11, p. 867–875, nov. 2005.

BARNETT, G. C. et al. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 2, p. 134–142, fev. 2009.

BARNETT, G. C. et al. No association between SNPs regulating TGF- β 1 secretion and late radiotherapy toxicity to the breast: Results from the RAPPER study. **Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology**, v. 97, n. 1, p. 9–14, out. 2010.

BARRA, G. B. et al. Mecanismo molecular da ação do hormônio tireoideano. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, p. 25–39, 2004.

BERGER, J.; MOLLER, D. E. The mechanisms of action of PPARs. **Annual review of medicine**, v. 53, n. 1, p. 409–435, 2002.

BERGER, J.; WAGNER, J. A. Physiological and therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptors. **Diabetes technology & therapeutics**, v. 4, n. 2, p. 163–174, 2002.

BOURGIER, C. et al. Pharmacological strategies to spare normal tissues from radiation damage: useless or overlooked therapeutics? **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 31, n. 3, p. 699–712, 2012.

BURNET, N. G. et al. RAPPER: The Radiogenomics of Radiation Toxicity. **Clinical Oncology**, v. 25, n. 7, p. 431–434, 2013.

CHAUDHARY, N. I.; SCHNAPP, A.; PARK, J. E. Pharmacologic Differentiation of Inflammation and Fibrosis in the Rat Bleomycin Model. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 173, n. 7, p. 769–776, 1 abr. 2006.

CHEUK, I. W. Y. et al. Association of XRCC1 and XRCC3 gene haplotypes with the development of radiation-induced fibrosis in patients with nasopharyngeal carcinoma. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 2, n. 4, p. 553–558, jul. 2014.

CHINETTI, G.; FRUCHART, J.-C.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors with functions in the vascular wall. **Zeitschrift für Kardiologie**, v. 90, n. 3, p. 125–132, 2001.

CHINETTI, G.; FRUCHART, J.-C.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation: from basic science to clinical applications. **International Journal of Obesity**, v. 27, p. S41–S45, dez. 2003.

CIMINI, A. et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and retinoic acid receptors (RXRs) in rat cortical neurons. **Neuroscience**, v. 130, n. 2, p. 325–337, 2005.

CITRIN, D. et al. Radioprotectors and Mitigators of Radiation-Induced Normal Tissue Injury. **The Oncologist**, v. 15, n. 4, p. 360–371, 1 abr. 2010.

CLARK, R. B. et al. The Nuclear Receptor PPAR γ and Immunoregulation: PPAR γ Mediates Inhibition of Helper T Cell Responses. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 3, p. 1364–1371, 1 fev. 2000.

- CONSOLI, A.; DEVANGELIO, E. Thiazolidinediones and inflammation. **Lupus**, v. 14, n. 9, p. 794–797, 1 set. 2005.
- COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860–867, 2002.
- CUNARD, R. et al. Regulation of Cytokine Expression by Ligands of Peroxisome Proliferator Activated Receptors. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 6, p. 2795–2802, 15 mar. 2002.
- CUZZOCREA, S. et al. Reduction in the evolution of murine type II collagen–induced arthritis by treatment with rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator–activated receptor γ . **Arthritis & Rheumatism**, v. 48, n. 12, p. 3544–3556, 1 dez. 2003.
- CUZZOCREA, S. et al. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ , reduces acute inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 483, n. 1, p. 79–93, 1 jan. 2004.
- DA ROCHA JUNIOR, L. F. et al. Synthesis of a Novel Thiazolidinedione and Evaluation of Its Modulatory Effect on IFN- γ , IL-6, IL-17A, and IL-22 Production in PBMCs from Rheumatoid Arthritis Patients. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–8, 2013.
- DAY, C. Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. **Diabetic Medicine**, v. 16, n. 3, p. 179–192, 1 mar. 1999.
- DAYNES, R. A.; JONES, D. C. Emerging roles of PPARS in inflammation and immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 10, p. 748–759, out. 2002.
- DE SOUZA SILVA, E. C.; CAVALCANTI, M. B.; CARNEIRO, P. F. P. Radioterapia versus Radiossensibilidade Individual. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-FACIPE**, v. 1, n. 3, p. 111–117, 2014.
- DENT, P. et al. MAPK pathways in radiation responses. **Oncogene**, v. 22, n. 37, p. 5885–5896, 2003.
- DI MAGGIO, F. et al. Portrait of inflammatory response to ionizing radiation treatment. **Journal of Inflammation**, v. 12, n. 1, p. 14, 2015.
- DUBUQUOY, L. et al. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 124, n. 5, p. 1265–1276, maio 2003.
- EDVARDSEN, H. et al. SNP in TXNRD2 Associated With Radiation-Induced Fibrosis: A Study of Genetic Variation in Reactive Oxygen Species Metabolism and Signaling. **International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics**, v. 86, n. 4, p. 791–799, 2013.
- F.A. STEWART et al. ICRP PUBLICATION 118: ICRP Statement on Tissue Reactions and Early and Late Effects of Radiation in Normal Tissues and Organs — Threshold Doses for Tissue Reactions in a Radiation Protection Context. **Annals of the ICRP**, v. 41, n. 1–2, p. 1–322, 1 fev. 2012.
- FAVEEUW, C. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ activators inhibit interleukin-12 production in murine dendritic cells. **FEBS letters**, v. 486, n. 3, p. 261–266, 2000.

GHANIM, H. et al. Suppression of Nuclear Factor- κ B and Stimulation of Inhibitor κ B by Troglitazone: Evidence for an Anti-inflammatory Effect and a Potential Antiatherosclerotic Effect in the Obese. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 3, p. 1306–1312, 1 mar. 2001.

GLINTBORG, D. et al. Association of Pioglitazone Treatment with Decreased Bone Mineral Density in Obese Premenopausal Patients with Polycystic Ovary Syndrome: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 5, p. 1696–1701, 1 maio 2008.

GONÇALEZ, R. **Suspensão de medicamento**. Disponível em: <<http://portal.crfsp.org.br/index.php/noticias/2248-suspensao-de-medicamento.html>>. Acesso em: 20 out. 2016.

GOTTLÖBER, P. et al. Interferon-gamma in 5 patients with cutaneous radiation syndrome after radiation therapy. **International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics**, v. 50, n. 1, p. 159–166, 2001.

GROMMES, C.; LANDRETH, G. E.; HENEKA, M. T. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. **The Lancet Oncology**, v. 5, n. 7, p. 419–429, 2004.

GUO, Z. et al. Radiogenomics helps to achieve personalized therapy by evaluating patient responses to radiation treatment. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 3, p. 307–317, 1 mar. 2015.

HAFFNER, S. M. et al. Effect of Rosiglitazone Treatment on Nontraditional Markers of Cardiovascular Disease in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. **Circulation**, v. 106, n. 6, p. 679, 6 ago. 2002.

HALL, E. J.; GIACCIA, A. J. **Radiobiology for the Radiologist**. [s.l.] Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

HALL, E. J.; GIACCIA, A. J. **Radiobiology for the Radiologist**. [s.l.] Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

HAYDONT, V. et al. Successful Mitigation of Delayed Intestinal Radiation Injury Using Pravastatin is not Associated with Acute Injury Improvement or Tumor Protection. **International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics**, v. 68, n. 5, p. 1471–1482, 1 ago. 2007.

HE, B. et al. Dependence of selective gene activation on the androgen receptor NH₂- and COOH-terminal interaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 28, p. 25631–25639, 2002.

HEINZEL, N. N. AND T. Nuclear Receptors: Overview and Classification. **Current Drug Target -Inflammation & Allergy**, v. 3, n. 4, p. 335–346, 2004.

HIRST, D. G.; ROBSON, T. Molecular biology: the key to personalised treatment in radiation oncology? **The British Journal of Radiology**, v. 83, n. 993, p. 723–728, 1 set. 2010.

HO, A. Y. et al. Genetic Predictors of Adverse Radiotherapy Effects: The Gene-PARE project. **International Journal of Radiation Oncology • Biological • Physics**, v. 65, n. 3, p. 646–655, 2006.

HUBENAK, J. R. et al. Mechanisms of Injury to Normal Tissue after Radiotherapy: A Review. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 133, n. 1, p. 49e–56e, jan. 2014.

IAEA. **Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students**. [s.l.: s.n.].

JIANG, C.; TING, A. T.; SEED, B. PPAR-[gamma] agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 82–86, 1 jan. 1998.

JUNG, T. et al. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 159, n. 1, p. 197–207, 26 fev. 1993.

KAMRAN, M. Z. et al. Radioprotective Agents: Strategies and Translational Advances: RADIOPROTECTIVE AGENTS. **Medicinal Research Reviews**, v. 36, n. 3, p. 461–493, abr. 2016.

KERNS, S. L.; OSTRER, H.; ROSENSTEIN, B. S. Radiogenomics: Using Genetics to Identify Cancer Patients at Risk for Development of Adverse Effects Following Radiotherapy. **Cancer Discovery**, v. 4, n. 2, p. 155–165, 1 fev. 2014.

KIM, J. H.; JENROW, K. A.; BROWN, S. L. Mechanisms of radiation-induced normal tissue toxicity and implications for future clinical trials. **Radiation Oncology Journal**, v. 32, n. 3, p. 103, 2014.

LEITE, L. L. B. **ATIVIDADE RADIOPROTETORA DO GQ-16 EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO**, jun. 2017.

LINARD, C.; GREMY, O.; BENDERITTER, M. Reduction of Peroxisome Proliferation-Activated Receptor Expression by -Irradiation as a Mechanism Contributing to Inflammatory Response in Rat Colon: Modulation by the 5-Aminosalicylic Acid Agonist. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 324, n. 3, p. 911–920, 19 dez. 2007.

LIU, W. et al. Interleukin 1 β (IL1B) Signaling is a Critical Component of Radiation-Induced Skin Fibrosis. **Radiation Research**, v. 165, n. 2, p. 181–191, 1 fev. 2006.

LU, H. Inflammation, a Key Event in Cancer Development. **Molecular Cancer Research**, v. 4, n. 4, p. 221–233, 1 abr. 2006.

MACARTHUR, M.; HOLD, G. L.; EL-OMAR, E. M. Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 286, n. 4, p. G515–G520, 2004.

MANGONI, M. et al. Association Between Genetic Polymorphisms in the XRCC1, XRCC3, XPD, GSTM1, GSTT1, MSH2, MLH1, MSH3, and MGMT Genes and Radiosensitivity in Breast Cancer Patients. **International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics**, v. 81, n. 1, p. 52–58, 2011.

MANGONI, M. et al. A PPAR-gamma agonist attenuates pulmonary injury induced by irradiation in a murine model. **Lung Cancer**, v. 90, n. 3, p. 405–409, dez. 2015.

MANGONI, M. et al. A PPAR-gamma agonist protects from radiation-induced intestinal toxicity. **United European Gastroenterology Journal**, v. 5, n. 2, p. 218–226, mar. 2016.

MARTINI, A. G. **GQ-16, agonista parcial de PPAR γ , diminui proliferação de células mesangiais humanas.** Dissertação / Dissertation. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/handle/10482/12166?mode=full&submit_simple=Mostrar+item+em+formato+completo>. Acesso em: 25 out. 2016.

MARX, N. et al. PPAR Activators as Antiinflammatory Mediators in Human T Lymphocytes. **Circulation Research**, v. 90, n. 6, p. 703, 5 abr. 2002.

MARYAM AHMADIAN et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. maio 2013.

MATSUDA, S.; KOBAYASHI, M.; KITAGISHI, Y. Expression and Function of PPARs in Placenta. **PPAR Research**, v. 2013, p. 256508, 2013.

MEIER, C. A. et al. REGULATION OF THE INTERLEUKIN-1 RECEPTOR ANTAGONIST IN THP-1 CELLS BY LIGANDS OF THE PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR γ . **Cytokine**, v. 18, n. 6, p. 320–328, 1 jun. 2002.

MILAM, J. E. et al. PPAR- γ agonists inhibit profibrotic phenotypes in human lung fibroblasts and bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 294, n. 5, p. L891–L901, 1 maio 2008.

MOELLER, A. et al. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 40, n. 3, p. 362–382, 2008.

MOULDER, J. E. Pharmacological intervention to prevent or ameliorate chronic radiation injuries. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 13, n. 1, p. 73–84, jan. 2003.

MOULDER, J. E.; COHEN, E. P. Future Strategies for Mitigation and Treatment of Chronic Radiation-Induced Normal Tissue Injury. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 17, n. 2, p. 141–148, abr. 2007.

MOURÃO, R. H. et al. Synthesis and Biological Activity of Novel Acridinylidene and Benzylidene thiazolidinediones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 11, p. 1129–1133, nov. 2005.

MURRAY, L. A. et al. Serum Amyloid P Therapeutically Attenuates Murine Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis via Its Effects on Macrophages. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9683, 12 mar. 2010.

NASCIMENTO, A. S. **Interações dos receptores nucleares com seus ligantes: Estudos estruturais do receptor de hormônio tireoidiano, do receptor de mineralocorticoide e do receptor ativado por proliferadores peroxissomais.** [s.l: s.n.].

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846–852, 2002.

PATT, H. M. et al. Cysteine Protection against X Irradiation. **Science**, v. 110, n. 2852, p. 213, 26 ago. 1949.

PETERS, C. A. et al. TGFB1 Single Nucleotide Polymorphisms Are Associated With Adverse Quality of Life in Prostate Cancer Patients Treated With Radiotherapy. **International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics**, v. 70, n. 3, p. 752–759, 2008.

PHILIP, M.; ROWLEY, D. A.; SCHREIBER, H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. **Seminars in Cancer Biology**, v. 14, n. 6, p. 433–439, 2004.

PILLING, D. et al. Reduction of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis by Serum Amyloid P. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 6, p. 4035–4044, 15 set. 2007.

POULSEN, L. LA C.; SIERSBÆK, M.; MANDRUP, S. PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. **Nutrient Sensing Pancreas Development**, v. 23, n. 6, p. 631–639, ago. 2012.

PRZYBYSZEWSKA, M. et al. Soluble TNF- α Receptor I Encoded on Plasmid Vector and Its Application in Experimental Gene Therapy of Radiation-Induced Lung Fibrosis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 59, n. 4, p. 315, 3 jun. 2011.

PUBCHEM. **methylprednisolone**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6741>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

RAABE, A. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the genes ATM, GSTP1, SOD2, TGFB1, XPD and XRCC1 with risk of severe erythema after breast conserving radiotherapy. **Radiation Oncology**, v. 7, n. 1, p. 65, 26 abr. 2012.

RADINA KOSTADINOVA; WALTER WAHLI AND LILIANE MICHALIK. PPARs in Diseases: Control Mechanisms of Inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 25, p. 2995–3009, 2005.

RAMANAN, S. et al. Role of PPARs in Radiation-Induced Brain Injury. **PPAR Research**, v. 2010, p. 1–12, 2009.

RIBEIRO, R. C.; KUSHNER, P. J.; BAXTER, J. D. The nuclear hormone receptor gene superfamily. **Annual review of medicine**, v. 46, n. 1, p. 443–453, 1995.

RICOTE, M. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-[gamma] is a negative regulator of macrophage activation. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 79–82, 1 jan. 1998.

RICOTE, M.; GLASS, C. K. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1771, n. 8, p. 926–935, 2007.

RIZOS, C. et al. How safe is the use of thiazolidinediones in clinical practice? **Expert opinion on drug safety**, v. 8, n. 1, p. 15–32, 2009.

ROBINSON-RECHAVI, M.; GARCIA, H. E.; LAUDET, V. The nuclear receptor superfamily. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 4, p. 585, 15 fev. 2003.

ROGERSON, F. M.; FULLER, P. J. Mineralocorticoid action. **Steroids**, v. 65, n. 2, p. 61–73, fev. 2000.

ROLLINS, M. et al. Anti-inflammatory Effects of PPAR- γ Agonists Directly Correlate With PPAR- γ Expression During Acute Pancreatitis. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 10, n. 8, p. 1120–1130, set. 2006.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. PPAR γ : a Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 41, p. 37731–37734, 12 out. 2001.

RUBENSTRUNK, A. et al. Safety issues and prospects for future generations of PPAR modulators. **PPARs**, v. 1771, n. 8, p. 1065–1081, ago. 2007.

SCHAUE, D. et al. Radiation and Inflammation. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 25, n. 1, p. 4–10, jan. 2015.

SCHAUE, D.; KACHIKWU, E. L.; MCBRIDE, W. H. Cytokines in Radiobiological Responses: A Review. **Radiation Research**, v. 178, n. 6, p. 505–523, dez. 2012.

SCHMIDT, M. V.; BRÜNE, B.; VON KNETHEN, A. The Nuclear Hormone Receptor PPAR γ as a Therapeutic Target in Major Diseases. **The Scientific World JOURNAL**, v. 10, p. 2181–2197, 2010.

SCHMIDT-ULLRICH, R. K. et al. Signal Transduction and Cellular Radiation Responses. **Radiation Research**, v. 153, n. 3, p. 245–257, 2000.

SEVERIN, E. et al. Evidence for predictive validity of blood assays to evaluate individual radiosensitivity. **International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics**, v. 64, n. 1, p. 242–250, 2006.

SHIOJIRI, T. et al. PPAR γ ligands inhibit nitrotyrosine formation and inflammatory mediator expressions in adjuvant-induced rheumatoid arthritis mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 448, n. 2, p. 231–238, 19 jul. 2002.

SILVA, A. G. DA; LAZARETTI-CASTRO, M. Diabetes mellitus, thiazolidinediones and fractures: an unfinished story. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 4, p. 345–351, 2010.

SKIÖLD, S. **Radiation induced biomarkers of individual sensitivity to radiation therapy**. Stockholm: Department of Molecular Biosciences, The Wenner-Gren Institute, Stockholm University, 2014.

SOARES E SILVA, A. K. et al. Effect of new thiazolidine derivatives LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16 on atherosclerotic lesions in LDL receptor-deficient mice (LDLR $^{-/-}$). **Cardiovascular Pathology**, v. 22, n. 1, p. 81–90, jan. 2013.

STONE, H. B.; MCBRIDE, W. H.; COLEMAN, C. N. Modifying Normal Tissue Damage Postirradiation. **Radiation Research**, v. 157, n. 2, p. 204–223, 1 fev. 2002.

SULLIVAN, D. E. et al. Tumor Necrosis Factor- α Induces Transforming Growth Factor- β ₁ Expression in Lung Fibroblasts Through the Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 32, n. 4, p. 342–349, abr. 2005.

SZELES, L.; TOROCSIK, D.; NAGY, L. PPAR γ in immunity and inflammation: cell types and diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1771, n. 8, p. 1014–1030, ago. 2007.

TALBOT, C. J. et al. A replicated association between polymorphisms near TNF α and risk for adverse reactions to radiotherapy. **British Journal Of Cancer**, v. 107, p. 748, 5 jul. 2012.

TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (Pparg): estudo molecular na homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e abordagem terapêutica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, p. 526–533, 2007.

TAYLOR, B. K. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonists Inhibit Inflammatory Edema and Hyperalgesia. **Inflammation**, v. 26, n. 3, p. 121–127, 2002.

TERRAZZINO, S. et al. Common Variants of GSTP1, GSTA1, and TGF β 1 are Associated With the Risk of Radiation-Induced Fibrosis in Breast Cancer Patients. **International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics**, v. 83, n. 2, p. 504–511, 2012.

TONTONOZ, P.; SPIEGELMAN, B. M. Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR γ . **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, n. 1, p. 289–312, jun. 2008.

TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2563–2582, nov. 2014.

TWARDELLA, D.; CHANG-CLAUDE, J. Studies on radiosensitivity from an epidemiological point of view—overview of methods and results. **Radiotherapy and oncology**, v. 62, n. 3, p. 249–260, 2002.

WANG, P. et al. Inhibition of the transcription factors AP-1 and NF- κ B in CD4 T cells by peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 4, p. 803–812, abr. 2001.

WEST, C.; ROSENSTEIN, B. S. Establishment of a radiogenomics consortium. **Radiotherapy and Oncology**, v. 94, n. 1, p. 117–118, 2010.

WILLIAMS, J. P. et al. Effect of Administration of Lovastatin on the Development of Late Pulmonary Effects after Whole-Lung Irradiation in a Murine Model. **Radiation Research**, v. 161, n. 5, p. 560–567, 1 maio 2004.

WU, Y.; XU, B.; KOENIG, R. J. Thyroid Hormone Response Element Sequence and the Recruitment of Retinoid X Receptors for Thyroid Hormone Responsiveness. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 6, p. 3929–3936, 9 fev. 2001.

XAVIER, S. et al. Amelioration of Radiation-induced Fibrosis: INHIBITION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β SIGNALING BY HALOFUGINONE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 15, p. 15167–15176, 9 abr. 2004.

XIONG, H. et al. ATM Polymorphisms Predict Severe Radiation Pneumonitis in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer Treated With Definitive Radiation Therapy. **International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics**, v. 85, n. 4, p. 1066–1073, 2013.

YANG, M. et al. Association of P53 and ATM Polymorphisms With Risk of Radiation-Induced Pneumonitis in Lung Cancer Patients Treated With Radiotherapy. **International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics**, v. 79, n. 5, p. 1402–1407, 2011.

YIN, M. et al. Polymorphisms of Homologous Recombination Genes and Clinical Outcomes of Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Definitive Radiotherapy. **PLOS ONE**, v. 6, n. 5, p. 1–9, 2011a.

YIN, M. et al. Functional Polymorphisms of Base Excision Repair Genes XRCC1 and APEX1 Predict Risk of Radiation Pneumonitis in Patients With Non–Small Cell Lung Cancer Treated With Definitive Radiation Therapy. **International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics**, v. 81, n. 3, p. e67–e73, 2011b.

YIN, M. et al. Genetic variants of the nonhomologous end joining gene LIG4 and severe radiation pneumonitis in nonsmall cell lung cancer patients treated with definitive radiotherapy. **Cancer**, v. 118, n. 2, p. 528–535, 15 jan. 2012.

YOUSSEF, J. A.; BADR, M. Z. Tissue Distribution and Versatile Functions of PPARs. In: YOUSSEF, A. J.; BADR, Z. M. (Eds.). . **Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Discovery and Recent Advances**. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. p. 33–69.

YUAN, X. et al. Single Nucleotide Polymorphism at rs1982073:T869C of the TGF β 1 Gene Is Associated With the Risk of Radiation Pneumonitis in Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer Treated With Definitive Radiotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 20, p. 3370–3378, 10 jul. 2009.

ZHANG, L. et al. ATM Polymorphisms Are Associated With Risk of Radiation-Induced Pneumonitis. **International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics**, v. 77, n. 5, p. 1360–1368, 2010.

ZHAO, W. et al. Administration of the peroxisomal proliferator-activated receptor γ agonist pioglitazone during fractionated brain irradiation prevents radiation-induced cognitive impairment. **International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics**, v. 67, n. 1, p. 6–9, 2007.

ZHAO, W.; DIZ, D. I.; ROBBINS, M. E. Oxidative damage pathways in relation to normal tissue injury. **The British Journal of Radiology**, v. 80, n. special_issue_1, p. S23–S31, 1 set. 2007.

ZHAO, W.; ROBBINS, M. E. Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: therapeutic implications. **Current medicinal chemistry**, v. 16, n. 2, p. 130–143, 2009.

ZINGARELLI, B. et al. Peroxisome Proliferator Activator Receptor- γ Ligands, 15-Deoxy- Δ 12,14-Prostaglandin J2 and Ciglitazone, Reduce Systemic Inflammation in Polymicrobial Sepsis by Modulation of Signal Transduction Pathways. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 12, p. 6827–6837, 15 dez. 2003.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Saúde
Ministério da Saúde

Plataforma Brasil

principal

Público Pesquisador Alterar Meus Dados

Mariana Brayner Cavalcanti - Pesquisador

Cadastros Sua sessão expira em

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

— DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Ação do LPSF/GQ-16 Sobre a Expressão Gênica do PPAR-gama e Citocinas em Células Humanas Irradiadas *In Vitro*
 Pesquisador Responsável: Mariana Brayner Cavalcanti
 Área Temática:
 Versão: 2
 CAAE: 43275915.9.0000.5208
 Submetido em: 19/05/2015
 Instituição Proponente: CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIENCIAS
 Situação da Versão do Projeto: Aprovado
 Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
 Patrocinador Principal: CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIENCIAS

COORDENADOR

Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_486924

— DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Estudo: AÇÃO DO LPSF/GQ-16 SOBRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM CÉLULAS HUMANAS IRRADIADAS *IN VITRO*.

Pesquisadora: Diogo Manoel Alves de Queiroz e Silva Departamento e Energia Nuclear /
UFPE Av. Prof. Luiz Freire, N.1000 Recife – CEP : 50740-540
Número do Telefone: (81) 21267977

INTRODUÇÃO - Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Você deve ler e assinar este documento para participar deste estudo. Este documento lhe dará mais informações sobre este estudo. Você deve fazer todas as perguntas necessárias ao pesquisador ou à equipe do estudo antes de decidir se você deseja participar. Você não deve assinar este documento se quaisquer perguntas não forem respondidas. Você também pode discutir sobre a sua participação com qualquer pessoa que você escolher para melhor entender este estudo e suas opções.

OBJETIVO DO ESTUDO - O objetivo deste estudo é avaliar a atividade radioprotetora de um derivado das Tiazolidinedionas (LPSF/GQ-16) a partir dos níveis de expressão de citocinas por células irradiadas *in vitro*. Portanto, o objetivo deste estudo é desenvolver um agente farmacológico com efeito protetor contra os danos induzidos pela radiação ionizante em pessoas que são sensíveis às radiações.

QUANTO TEMPO DE DURAÇÃO TERÁ O ESTUDO E QUANTAS PESSOAS PARTICIPARÃO DO ESTUDO - Sua participação no estudo será de no máximo 05 minutos. Um profissional qualificado coletará o seu sangue por punção venosa (pela veia). Espera-se que 10 pessoas com ≥ 18 anos de idade participem deste estudo.

O QUE ACONTECERÁ DURANTE O ESTUDO - Serão coletados 36 ml de sangue (7½ colheres de chá serão colhidas - por punção de veia do braço). Essa amostra coletada será irradiada *in vitro*, ou seja, fora do seu corpo. Logo, você não terá nenhum contato com a radiação ionizante. A dose de radiação que será administrada será equivalente a dose do tratamento radioterápico. Após a irradiação, a sua amostra de sangue será levada ao laboratório e suas células serão cultivadas (tratadas para se manterem vivas fora do seu corpo) por um

período. Após o período do cultivo, os mRNAs das citocinas (proteínas) que foram produzidas pelas suas células em cultivo serão identificadas através de uma metodologia denominada RT-qPCR.

POSSÍVEIS RISCOS: Os riscos da coleta de sangue incluem desconforto temporário da agulha no seu braço, hematomas, inchaço no local da agulha e, raramente, infecção. Se você tiver sensação de desmaio, fale com o pesquisador ou com a equipe do estudo imediatamente.

POSSÍVEIS BENEFÍCIOS DO ESTUDO

Sua participação na pesquisa, contribuirá para:

1. Identificar o perfil de resposta imune nos pacientes durante o tratamento radioterápico.
2. Disponibilizar uma metodologia alternativa para a avaliação do processo inflamatório em pacientes submetidos ao tratamento radioterápico.
3. Capacitar pesquisadores da UFPE na área de pesquisa em Imunologia para o Desenvolvimento de Metodologias Aplicadas na área de Dosimetria.
4. Formar e capacitar recursos humanos especializados ao nível de graduação.

DIREITOS LEGAIS - Você não perderá quaisquer de seus direitos legais ao assinar este termo de consentimento livre e esclarecido.

INFORMAÇÕES DE CONTATO - Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os telefones e endereço estão na primeira página deste termo. Você pode fazer perguntas sobre o estudo a qualquer momento. Você pode ligar para o pesquisador ou para a equipe do estudo a qualquer momento, se você tiver quaisquer dúvidas ou queixas.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA - Sua participação neste estudo é voluntária. Ninguém pode forçá-lo a entrar no estudo. Você pode deixar o estudo a qualquer momento. Você não será punido por deixar a pesquisa, e não perderá quaisquer benefícios relacionados com a pesquisa.

CONFIDENCIALIDADE - A confidencialidade será mantida de acordo com as regulamentações vigentes no Brasil. Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Seu nome não será identificado em nenhum relatório ou publicações do estudo.

Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador, no endereço acima informado pelo período de mínimo 5 anos.

PAGAMENTO - Nada lhe será pago e nem cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

INFORMAÇÕES DE CONTATO COM O COMITÊ DE ÉTICA - Este estudo foi avaliado e aprovado Comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Av. das Engenharias, s/n. prédio do CCS - 1º andar, sala 4. Fone: 81 2126.8588, E-mail: cepccs@ufpe.br.

Rubrica: _____

VOLUNTÁRIO

Rubrica: _____

PESQUISADOR

ANEXO C – QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS

I. IDENTIFICAÇÃO PESSOAL

- Nome Completo: _____
- Sexo: Masculino Feminino
- Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: _____
- Contato: (____) _____

II. INFORMAÇÕES ADICIONAIS

- Consumiu álcool nas últimas 72 horas?
 Sim Não
- Fuma?
 Sim. Quantos cigarros/dia? _____ Não
- Fez uso de anti-inflamatórios e/ou outros medicamentos na última semana?
 Sim. Quais? _____
 Não
- Apresenta alguma patologia (autoimune/alergia/diabetes/tumor/outras)?
 Sim. Sabe qual? _____
 Não
- Passou por procedimento de transplante ou transfusão?
 Sim. Que tipo? _____; Há quanto tempo? _____
 Não
- Fez uso de vacinas ou imunoterapia recentemente?
 Sim. Qual e quando foi? _____
 Não
- Foi submetido a algum tipo de exame radiológico ou de medicina nuclear recentemente?
 Sim. Qual exame e quando? _____
 Não
- Foi submetido à radioterapia recentemente?
 Sim. Quando? _____
 Não

ANEXO D – CRITÉRIOS DO ESTUDO

CrITÉrios de Inclusão:

- IndivÍduos que assinem o TCLE;
- IndivÍduos que estejam em um bom estado de saÍde;
- IndivÍduos com idade entre 18 anos e 60 anos;
- IndivÍduos que não estejam tomando medicação que interfira no processo inflamatório (p.ex. anti-inflamatório e antibióticos).

CrITÉrios de Exclusão:

- Ter consumido álcool nas 72 h anteriores a coleta;
- Ter se submetido  exame radiológico ou de medicina nuclear nos últimos 3 meses;
- Ter se submetido à radioterapia nos últimos 6 meses.

ANEXO E – TERMO DE CONSENTIMENTO DO SUJEITO DE PESQUISA

Eu li as declarações contidas neste termo de consentimento livre e esclarecido. Eu tive a oportunidade de fazer perguntas e estou satisfeito com as explicações fornecidas pelo pesquisador ou pela equipe da pesquisa. Eu voluntariamente aceito participar da pesquisa e autorizo o uso e a divulgação das minhas informações juntamente com a pesquisa. Eu entendo que receberei uma cópia assinada deste termo de consentimento. Ao assinar este termo, eu não desisti dos meus direitos legais como um participante de pesquisa.

Nome do Participante

Assinatura do Participante

Data

Eu atesto que o participante acima nomeado teve tempo suficiente para considerar essas informações, teve oportunidade de fazer perguntas e concordou voluntariamente em participar deste estudo.

Nome da Pessoa Autorizada que Explicou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Assinatura da Pessoa que explicou o
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Data

Eu atesto que eu ou meu representante discutiu este estudo com o participante acima nomeado.

Nome do Pesquisador Principal

/ /

Assinatura do Pesquisador Principal

Data

Rubrica: _____

Rubrica: _____

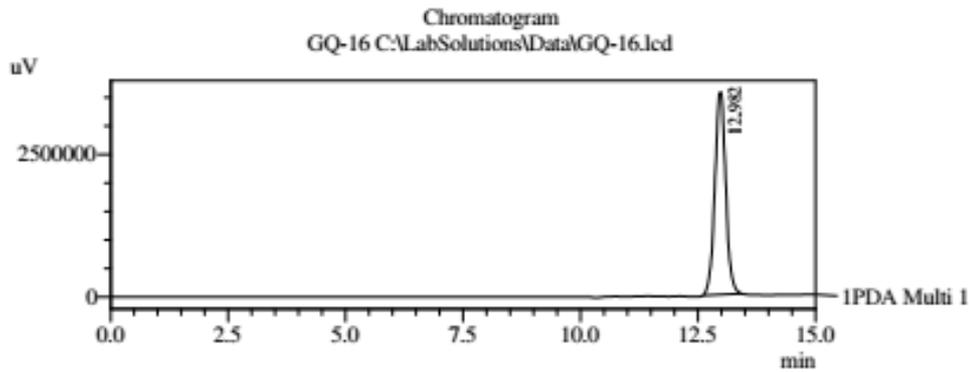
PESQUISADOR

VOLUNTÁRIO

ANEXO F –CROMATOGRAMAS DO LPSF/GQ-16

Sample Information

Acquired by : Admin
 Sample Name : GQ-16
 Sample ID : GQ-16
 Tray# : 1
 Vial# : 1
 Injection Volume : 5 uL
 Data Filename : GQ-16.lcd
 Method Filename : AC-129_hplc.lcm
 Batch Filename :
 Report Filename : Default.lcr
 Date Acquired : 9/15/2015 5:29:27 PM
 Data Processed : 9/15/2015 5:44:54 PM
 DS:27/07/2015



1 PDA Multi 1 / 205nm 4nm

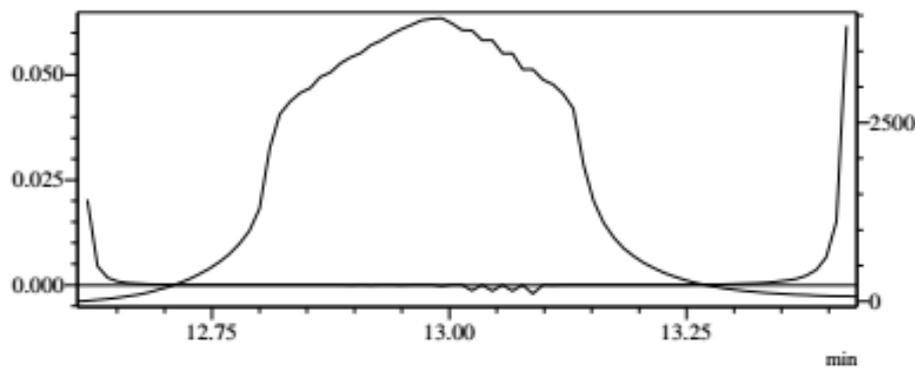
PeakTable

PDA Ch1 205nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	12.982	57364453	3549303	100.000	100.000
Total		57364453	3549303	100.000	100.000

Purity

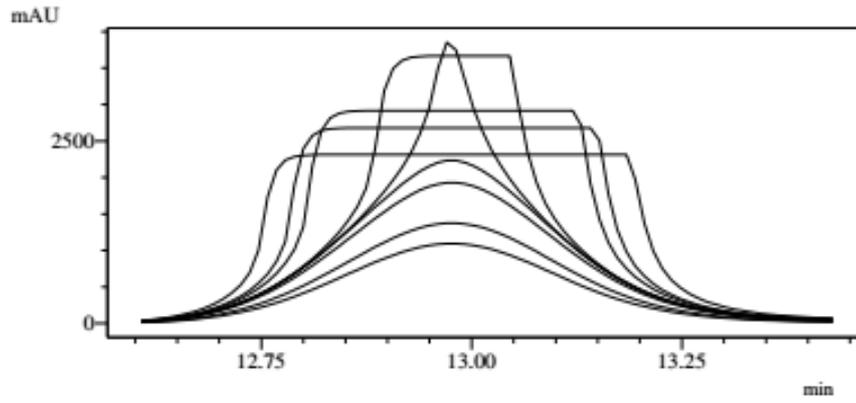
ID# : 1
 Retention Time : 12.982
 Compound Name : GQ-16



Impurity :Detected at 13.09 min
 Peak purity index : 0.997922
 Single point threshold : 0.999973
 Minimum peak purity index : -2051

Peak Profile

ID# : 1
Retention Time : 12.982
Compound Name : GQ-16
Wavelength Interval : 5nm



Library Search

<UV Library Filename>

<Search Parameters>

Search WL Range : 190nm - 800nm
Max # of Hits : 1

<Target Spectrum>

ID# : 1
Retention Time : 12.982
Compound Name : GQ-16
Spectrum Operation : None

