

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM DIFERENTES
GLITAZONAS SOBRE O ENDOTÉLIO DE CAMUNDONGOS
C57BL6/J SUBMETIDOS À DIETA ATEROGÊNICA**

AMANDA KAROLINA SOARES E SILVA

**Recife
2010**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM DIFERENTES
GLITAZONAS SOBRE O ENDOTÉLIO DE CAMUNDONGOS
C57BL6/J SUBMETIDOS À DIETA ATEROGÊNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas, na área de Biotecnologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aluna: Amanda Karolina Soares e Silva

Orientadora: Christina Alves Peixoto

Recife
2010

Silva, Amanda Karolina Soares e

Avaliação do tratamento com diferentes glitazonas sobre o endotélio de camudongos C57BL6/J submetidos á dieta aterogênica / Amanda Karolina Soares e Silva. – Recife: O Autor, 2010.

75 folhas : il., fig.

Orientadora: Christina Alves Peixoto

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

CCB. Ciências Biológicas, 2010.

Inclui bibliografia e anexos

1. Vasos sanguíneos – Doenças 2. Farmacologia cardiovascular I. Título.

616.13

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-117

AMANDA KAROLINA SOARES E SILVA

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM DIFERENTES
GLITAZONAS SOBRE O ENDOTÉLIO DE CAMUNDONGOS
C57BL6/J SUBMETIDOS À DIETA ATEROGÊNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas, na área de Biotecnologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada em 30-07-2010

BANCA EXAMINADORA:

Eduardo I. Carneiro Beltrão
Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
Departamento de Bioquímica – UFPE

Teresinha G. Silva
Dra. Teresinha Gonçalves da Silva
Departamento de Antibióticos – UFPE

Christina Alves Peixoto
Dra. Christina Alves Peixoto
Laboratório de Ultraestrutura – CPqAM/FIOCRUZ
(Orientadora)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

REITOR

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr. Ângela Maria Isidoro de Farias

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr. Sílvia Regina Arruda de Moraes

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS**

Prof^a. Dr. Maria Tereza dos Santos Correia

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS**

Prof^a. Dr. Suely Lins Galdino

Aos Meus Pais Fernando Antônio e Maria do Socorro, ao meu irmão Fernando,
Aos meus tios Gidelcio (*in memorian*) e Betânia.

Ao meu grande amor, João!

Agradeço a Deus, pelo milagre da vida!

À Dra. Christina Alves Peixoto, minha querida orientadora, toda minha gratidão, admiração, carinho e amizade! Obrigada pela confiança e oportunidade de me fazer crescer profissionalmente.

À Dra. Ana Célia Oliveira Santos, pelo compromisso com este trabalho, muito obrigada!

A todos do biotério experimental, pela paciência, disponibilidade e momentos felizes!

À Karina Saraiva, minha co-orientadora de iniciação científica. Obrigada!

À Dilênia Cipriano, agradeço pela dedicação incondicional e essencial em todas as etapas do desenvolvimento desse projeto. Obrigada por todo o carinho, paciência, ensinamento e apoio minha amiga!

À Bruna Santos (Brunilda), pela ajuda inicial no laboratório e por me apoiar ao longo desses anos. Ofereço minha grande admiração e amizade!

À Mariana Donato, pelo apoio, amizade e momentos divertidos no laboratório!

As amigas do laboratório de ultraestrutura, Edlene (Ed), Sura (Surashion), Andrezza, Karla, Fabi, e Maysa pelo apoio, conversas e risadas. Obrigada!

As meninas do CETENE Carol (Carola), Josy, Ceça e Katarina, obrigada pelo apoio e momentos felizes!

As minhas amigas de faculdade e do coração Dani, Andresa e Raiana. Obrigada pela paciência, carinho e amizade!

Ao meu marido, João, pelo amor, paciência, carinho e companheirismo em todos os momentos. Você foi peça fundamental para a realização desse sonho. Obrigada!

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

RESUMO

A aterosclerose caracteriza-se pelo espessamento da parede arterial sendo considerada a causa primária de doença arterial coronariana e doença cerebrovascular. As tiazolidinadionas (TZDs) são uma classe de fármacos utilizadas clinicamente para tratar pacientes com diabetes mellitus tipo 2, sendo consideradas ligantes sintéticos para o receptor- γ ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR γ). Estudos têm indicado que em adição à sua atividade antidiabética, as TZDs também possuem ações antiateroscleróticas, inibindo a formação das lesões iniciais em modelo animal como também reduzindo a espessura da artéria carótida em pacientes com diabetes mellitus tipo 2. De forma controversa, as TZDs estão associadas ao desenvolvimento de eventos cardiovasculares. Diante disso, linhas de pesquisas têm investido na busca por novas moléculas a fim de se obter alternativas terapêuticas mais seletivas e menos danosas. O objetivo deste trabalho foi verificar a ação de novos derivados tiazolidínicos candidatos a fármacos, LPSF/GQ-02 e LPSFGQ-16, sobre o processo aterosclerótico através de análises bioquímicas e morfológicas. Camundongos deficientes do receptor de LDL (LDLR^{-/-}) foram divididos em quatro grupos (n=8). Os animais foram alimentados com dieta aterogênica por 10 semanas e nas duas últimas semanas de dieta experimental, os camundongos receberam Pioglitazona, LPSF/GQ-02 e LPSF/GQ-16 diariamente, via gavagem. Após o tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia, e a coleta de sangue foi realizada para as análises bioquímicas e as aortas foram dissecadas e processadas para microscopia óptica e eletrônica de transmissão. Com relação ao perfil lipídico, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados e o controle. No teste oral de tolerância à glicose, foi observada que a velocidade de absorção da glicose dos grupos LPSF/GQ-16 e LPSF/GQ-02 foi mais rápida quando comparada com os grupos controle e Pioglitazona. As análises morfométricas revelaram que a LPSF/GQ-02 foi mais eficaz quando comparada com os demais grupos, em reduzir a espessura da aorta e a lesão aterosclerótica. As análises ultraestruturais mostraram um aumento de células apoptóticas e grande degeneração do endotélio no grupo tratado com a Pioglitazona. Por sua vez, o novo derivado tiazolidínico LPSF/GQ-16 induziu grande degeneração do endotélio e destruição do espaço subendotelial. Entretanto, após o tratamento com o novo derivado tiazolidínico LPSF/GQ-02 o endotélio aórtico apresentou alterações celulares mínimas. Essas características indicam que a LPSF/GQ-02 possui efeitos vasculares diretos. Dessa forma, essa nova molécula torna-se um potencial candidato a fármaco na melhora do processo aterosclerótico e seus fatores de risco associados. **Palavras-chave:** Aterosclerose, novos fármacos, ultraestrutura.

ABSTRACT

Atherosclerosis is characterized by thickening of the arterial wall and considered the primary cause of coronary artery disease and cerebrovascular disease. The thiazolidinediones (TZDs) are a class of drugs used clinically to treat type 2 diabetes patients, used as synthetic ligands peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ). Studies have indicated that in addition to its anti-diabetic activity, the TZDs also have anti-atherosclerotic actions by inhibiting the formation of early lesions in animal models as well as reducing the thickness of the carotid artery in patients with type 2 diabetes. Controversially, TZDs are associated with the development of cardiovascular events. Thus, investigations have been searched for new molecules in order to obtain more selective and less harmful therapeutic alternatives. The objective of this work was to verify the action of new drug candidates thiazolidine derivatives LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16 on the atherosclerotic process through biochemical and morphological analyses. Mice deficient of the LDL receptor (LDLR^{-/-}) were divided into four groups (n = 8). Animals were fed with atherogenic diet for 10 weeks and in the last two weeks of experimental assay, the mice were daily given Pioglitazone, LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16 through gavage. After treatment, the blood was withdrawn for biochemical analysis and the aortas were dissected and processed for light microscopy and transmission electron microscopy. With regard to lipid profile, no significant differences were observed between treated groups and control. In the oral glucose tolerance test was observed that the rate of glucose absorption of groups LPSF/GQ-16 LPSF/GQ-02 was faster when compared with the control group and Pioglitazone. Morphometric analysis revealed that LPSF/GQ-02 was more effective when compared with other drugs, to reduce the thickness of the aorta and atherosclerotic lesions. Ultrastructural analysis showed an increase of apoptotic cells and important degeneration the endothelium in group treated with Pioglitazone. In turn, the new thiazolidine derivative LPSF/GQ-16 induced high degeneration of the endothelium and destruction of the sub-endothelial space. However, after treatment with the new thiazolidine derivative LPSF/GQ-02 the aortic endothelium showed minimal cellular changes. These characteristics indicate that LPSF/GQ-02 has direct vascular effects. Thus, this new molecule becomes a potential drug candidate for the improvement of the atherosclerotic process and its associated risk factors. **Keywords:** Atherosclerosis, new drugs, ultrastructure.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Metabolismo das lipoproteínas. ApoB, apolipoproteína B; VLDLs, lipoproteínas de muito baixa densidade; LDLs, lipoproteínas de baixa densidade; LDLR, receptor de LDL; SR-B1, receptor *scavenger* classe B tipo 1; HDLs, lipoproteínas de alta densidade; ApoA-I, apolipoproteína A-I, transportador ABCA1, transportador ABCG1, LXR, receptor nuclear hepático; LCAT, lecitina colesterol aciltransferase, CETP, proteína de transferência de ésteres de colesterol, PLTP, proteína de transferência de fosfolipídios.
- Figura 2** Evolução da aterosclerose. A – adesão de leucócitos e plaquetas. B – formação das estrias gordurosas. C – Formação de um núcleo necrótico, capa fibrosa e neovascularização. D – Ruptura da placa com conseqüente ativação do sistema de coagulação e formação do trombo.
- Figura 3** Estrutura linear representando os domínios funcionais dos receptores nucleares. Região amino-terminal (AF-1); Domínio de ligação ao DNA (DBD); Dobradiça (*hinge*); Domínio de ligação ao ligante (LBD); Domínio AF-2 (AF-2).
- Figura 4** Representação esquemática mostrando a ativação dos PPARs.
- Figura 5** Integração metabólica dos PPARs. As três isoformas de PPAR regulam a homeostase de lipídios e glicose através de suas atividades coordenadas no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo.
- Figura 6** Estrutura química das tiazolidinadionas.
- Figura 7** Fórmula química dos compostos GQ-02 e GQ-16.
- Figura 8** Análises morfométricas. (A) quantificação da espessura da parede da aorta. (B) quantificação da área da lesão aterosclerótica. Tamanho-10x.
- Figura 9** Aorta do grupo HFD mostrando espessura da parede arterial e lesão aterosclerótica (Fig. A, B). O tratamento com a pioglitazona (Fig. C, D) e GQ-16 (Fig. E, F) não reverteu as condições causadas pela HFD, mostrando espessura da parede e grande lesão aterosclerótica. A GQ-02 reverteu as condições causadas pela HFD (Fig. G, H). Espessura da parede (estrela) e área da lesão (seta). Figuras A, E- 5x. C, G- 10x. B, D, F, H- 20x. (A, C, E, G) perfil da aorta inteira. (B, D, F, H) detalhes das mesmas figuras, respectivamente.

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

- Tabela 1** - Subfamílias dos receptores nucleares presente em mamíferos.
- Tabela 2** - Efeito do tratamento com diferentes glitazonas sobre parâmetros bioquímicos sanguíneos nos camundongos LDLR ^{-/-}.
- Tabela 3** - Avaliação do decaimento de glicose após a utilização de diferentes glitazonas em camundongos LDLR ^{-/-}.
- Gráfico 1** - Espessura da aorta ascendente após o tratamento com diferentes glitazonas em camundongos LDLR ^{-/-}.
- Gráfico 2** - Área da lesão aterosclerótica após o tratamento com diferentes glitazonas em camundongos LDLR ^{-/-}.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCA1	Transportadores cassete ligados ao ATP A1
ABCG1	Transportadores cassete ligados ao ATP G1
ALT	Alanina Aminotransferase
AP-1	Proteína ativadora 1
aP2	Proteína de ligação a ácido graxo
ApoA-1	Apolipoproteína A-1
ApoB	Apolipoproteína B
ApoC-III	Apolipoproteína C-III
ApoE	Apolipoproteína E
CCR2	Receptor para MCP-1
CD-36	Receptor <i>scavenger</i> de classe B
CD-40L	Ligante solúvel de CD-40
CD-68	Receptor <i>scavenger</i> de classe D
CETP	Proteína de transferência de ésteres de colesterol
CT	Colesterol Total
CXCL16	Quimiocina pertencente à subfamília CXC
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
eNOS	Sintase de óxido nítrico endotelial
FATP-1	Proteína transportadora de ácido graxo 1
HDL-C	Colesterol lipoproteína de alta densidade
iNOS	Sintase de oxido nítrico induzível
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6

IL-18	Interleucina-18
LBD	Domínio de ligação ao ligante
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferase
LDL-C	Colesterol lipoproteína de baixa densidade
LDLR	Receptor de LDL
LPL	Lipoproteína lipase
LXR α	Receptor X do fígado α
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito-1
MMP-9	Matriz metaloproteinase-9
MMPs	Matriz metaloproteinases
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NF-K β	Fator nuclear kapa β
NO	Óxido nítrico
oxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1
PCR	Proteína C Reativa
PEPKC	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PLTP	Proteína de transferência de fosfolipídios
PPRE	Elementos responsivos aos proliferadores de peroxissomos
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos
PPAR- α	Receptor- α ativado por proliferadores de peroxissomos
PPAR- δ/β	Receptor- δ/β ativado por proliferadores de peroxissomos
PPAR- γ	Receptor- γ ativado por proliferadores de peroxissomos
RAR	Receptor do Ácido Retinóico
RN	Receptor nuclear
RXR	Receptor X retinóide

SMCs	Células musculares lisas
SR-BI	Receptor scavenger classe B tipo I
STAT	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TG	Triglicérides
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TZDs	Tiazolidinadionas
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1
VDR	Receptor da Vitamina D
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Objetivos	18
1.1.1 Objetivo Geral	18
1.1.2 Objetivos Específicos	18
1.2 Justificativa	19
CAPÍTULO 1	20
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
1.1 Lipídios e risco cardiovascular	21
1.2 Patogênese da aterosclerose	24
1.3 Inflamação e aterosclerose	27
1.4 Modelo animal	28
1.5 Receptores nucleares	29
1.5.1 Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos (PPARs)	32
1.5.2 Receptor γ ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR γ)	36
1.5.3 Novos ligantes do PPAR γ	40
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO 2	49
Artigo a ser Submetido à revista: Metabolism	50
CONCLUSÕES	73
ANEXO	74
Certificado de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	75

1 INTRODUÇÃO

A doença cardiovascular aterosclerótica constitui um dos problemas mais sérios de saúde pública mundial (FRANCA & ALVES, 2006). As complicações decorrentes de distúrbios no sistema circulatório permanecem como a principal causa de morte no século 21 (MATURANA, 2007).

No Brasil, as doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade, o que representa cerca de 80 mil óbitos anuais (ISHITANI, 2006). De acordo com o Sistema de Informação sobre Mortalidade do Ministério da Saúde (SIM-MS), no ano de 2007 foram 308.466 mil óbitos decorrentes de doenças do aparelho circulatório, sendo 71.997 mil causadas por infarto agudo do miocárdio e 96.804 mil ocasionadas por doenças cerebrovasculares.

Dentre os fatores que vem contribuindo para o crescente aumento das doenças cardiovasculares, pode-se citar o estilo de vida ocidental, o qual tem levado os seres humanos a uma dependência crescente de alimentos rápidos do tipo “*fast food*”. Esse tipo de alimentação apresenta elevado teor de gordura, especialmente gordura saturada, que aumenta o estresse oxidativo e prejudica a saúde cardiovascular, endócrina e reprodutiva daqueles indivíduos que regularmente ingerem esses nutrientes (ERHARDT et al., 1997). Atualmente, a obesidade situa-se entre os maiores fatores de risco para doença arterial coronariana, ao lado de hipercolesterolemia, hipertensão, tabagismo e diabetes, com prevalência e incidência crescentes dos números de casos a cada ano (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2004). Em conjunto, esses fatores compõem a “Síndrome Metabólica” e aumentam o risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (LAROSA et al., 2004) e diabetes tipo 2 (LORENZO et al., 2003).

Durante o desenvolvimento da aterosclerose, a parede arterial se espessa gradualmente para formar a placa aterosclerótica, resultando na diminuição do lúmen da artéria. Consequentemente, a quantidade de sangue fornecido ao órgão é reduzida, afetando de forma mais comum o coração e o cérebro. As placas formadas podem romper abruptamente, causando a formação de coágulo que pode levar ao infarto do miocárdio ou a um acidente vascular cerebral (AVC) (STARY, 2000).

A participação de lipoproteínas que contêm Apo-B, como as LDLs estão associadas ao desenvolvimento da aterosclerose (RADER; DAUGHERTY, 2008). Evidências sugerem que a LDL modificada por oxidação ou glicação provoca uma resposta inflamatória na parede da artéria, desencadeando muitos dos processos biológicos que participam do início, progressão, e complicação da aterosclerose (GLASS; WITZTUM, 2001).

Em contraste com o colesterol LDL, concentrações plasmáticas de colesterol HDL são inversamente associadas com doença aterosclerótica. O mais bem conhecido mecanismo pelo qual HDLs protegem contra a aterosclerose é através da promoção do efluxo de colesterol dos macrófagos e transporte do excesso de colesterol tecidual para o fígado através da corrente sanguínea, onde ocorrerá a excreção na bile e fezes (RADER; DAUGHERTY, 2008).

A investigação dos mecanismos da aterosclerose tem determinado que a inflamação desempenha um papel central no desenvolvimento, progressão e letalidade dessa doença (LIBBY, 2002; ROCHA; LIBBY, 2009). A descoberta do envolvimento da atividade inflamatória na aterosclerose tem estimulado e determinado a adoção de biomarcadores inflamatórios para o prognóstico de risco cardiovascular (PACKARD; LIBBY, 2008). Alguns desses biomarcadores incluem: Moléculas de adesão como VCAM-1; citocinas tais como TNF- α , interleucina-1 (IL-1), interleucina-18 (IL-18) e interleucina-6 (IL-6); proteases como a metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9); produtos de plaquetas incluindo CD40 ligante solúvel (CD40L); adipocinas como adiponectina e reagentes de fase aguda tais como Proteína C Reativa (PCR), inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e fibrinogênio (PACKARD; LIBBY, 2008).

O receptor- γ ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR- γ) é um fator de transcrição presente em adipócitos, macrófagos, monócitos, células musculares e endoteliais. Ele pertence à superfamília de receptores nucleares que se ligam a agonistas específicos, também conhecidos como ligantes ou ativadores de PPARs (HEIKKINEN et al., 2007). As tiazolidinadionas (TZDs), são agonistas sintéticos do PPAR γ , utilizada clinicamente para tratar pacientes com diabetes tipo 2 atuando como sensibilizadora da ação da insulina (DAY, 1999).

Além da expressão no tecido adiposo, o PPAR γ é expresso em células que compõem as lesões ateroscleróticas, como células endoteliais, musculares lisas e monócitos/macrófagos (COLLINS et al., 2001). Diante disso, evidências têm indicado que em adição à sua atividade antidiabética, as TZDs apresentam também atividade antiaterosclerótica e o seu potencial antiaterogênico tem sido sugerido através de estudos com modelos animais de aterosclerose (LI et al., 2000; COLLINS et al., 2001) e em ensaios clínicos utilizando pacientes com diabetes tipo 2 (MINAMIKAWA et al., 1998; LANGENFELD et al., 2005).

Apesar de existirem diversos estudos mostrando os efeitos vasculares favoráveis dos agonistas de PPAR γ , os efeitos cardiovasculares das TZDs tornam-se alvo de intensa discussão. Em uma recente metanálise, o tratamento com rosiglitazona foi associado a

aumento dos riscos de infarto do miocárdio e mortalidade por causas cardiovasculares (NISSEN; WOLSKI, 2007). De forma controversa, no estudo PROactive, o tratamento com pioglitazona foi associado à redução do risco combinado de infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e mortalidade em 16%, entre pacientes diabéticos de alto risco cardiovascular (DORMANDY et al., 2005). É possível que os efeitos danosos apresentados pela rosiglitazona sejam específicos dessa molécula, não representando um efeito de classe. Entretanto, os mecanismos determinantes do aumento de risco cardiovascular associado às TZDs ainda não são conhecidos.

Dessa forma, linhas de pesquisa têm investido na busca por novas moléculas a fim de se obter alternativas terapêuticas mais seletivas e menos danosas contra a patogênese da aterosclerose e seus fatores de risco associados. Portanto, o objetivo desse estudo foi investigar em camundongos deficientes do receptor de LDL (LDLR^{-/-}), a ação de novos derivados tiazolidínicos sobre o processo aterosclerótico, através de análises bioquímicas e morfológicas.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Analisar a ação dos novos derivados tiazolidínicos LPSF/GQ-02 e LPSF/GQ-16 sobre o desenvolvimento de placas de ateroma em camundongos C57Bl6/J, através de análises morfológicas (morfométricas e ultraestruturais) e bioquímicas.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil lipídico, perfil hepático, glicemia, insulinemia, marcadores inflamatórios em camundongos deficientes no receptor de LDL, submetidos a tratamentos com diferentes glitazonas.

- Caracterizar as modificações histopatológicas e ultra-estruturais do endotélio da aorta de camundongos deficientes no receptor de LDL, submetidos a tratamentos com diferentes glitazonas.

1.2 Justificativa

Entender o processo aterosclerótico não apenas como decorrência de distúrbios no metabolismo lipídico, mas também como um processo complexo, que envolve a participação do processo inflamatório e a ocorrência de disfunção endotelial, é uma abordagem que permite estudos de novos tratamentos e medidas preventivas no campo da doença arterial coronariana. Os fatores de risco chamados “tradicionais” (hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, tabagismo, dislipidemia e/ou herança genética) não explicam completamente a etiologia da aterosclerose e não estão presentes em muitos casos. Atualmente, as glitazonas têm sido utilizadas como ferramentas terapêuticas importantes no tratamento da aterosclerose. Todavia, existem lacunas na aplicação destes fármacos que ainda necessitam de investigação necessária para a ampliação do seu potencial farmacológico. O presente trabalho se propõe a verificar a influência do tratamento com os novos derivados tiazolidínicos LPSF/GQ-02 e LPSF/GQ16, sintetizados pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, sobre o processo inflamatório, estresse oxidativo e disfunção endotelial de camundongos deficientes no receptor de LDL. A expressão desse receptor é responsável por modular o nível de colesterol no sangue e centenas de mutações já foram detectadas em portadores de hipercolesterolemia familiar (DEPARTAMENTO DE ATEROSCLEROSE DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007). Através de análises morfológicas (morfométricas e ultra-estruturais) bioquímicas (perfil lipídico e marcadores inflamatórios), será possível avaliar o efeito do tratamento com estes novos fármacos para possíveis analogias com casos humanos.

Capítulo 1

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Lipídios e risco cardiovascular

Os lipídios constituem um grupo de compostos hidrofóbicos com muitas funções biológicas, como componentes estruturais de membranas celulares, fonte de energia e complexos sistemas de sinalização intracelular (HEGELE, 2009).

Um adulto ingere cerca de 60 a 150g de lipídeos diariamente, dos quais normalmente mais de 90% são constituídos por triglicérides (TG), formados por uma molécula de glicerol esterificada a três ácidos graxos denominados saturados, monoinsaturados, poliinsaturados e *trans*. O restante dos lipídeos da dieta consiste principalmente de colesterol, ésteres de colesterol, fosfolipídeos e ácidos graxos não-esterificados (“livres”) (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006). Dentre os lipídios existentes, o TG e colesterol são considerados os mais importantes clinicamente (HEGELE, 2009).

A insolubilidade do colesterol e TG no plasma exige que eles sejam transportados em macromoléculas esféricas chamadas lipoproteínas, que têm um núcleo hidrofóbico contendo fosfolipídio, antioxidantes solúvel em gordura, vitaminas, ester de colesterol e um revestimento hidrofílico que contém colesterol livre, fosfolipídio e proteínas denominadas apolipoproteínas. As principais lipoproteínas transportadoras de TG são quilomícrons e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). As principais lipoproteínas transportadoras de colesterol são lipoproteína de densidade baixa (LDL) e lipoproteína de densidade alta (HDL). Lipoproteínas são distinguidas uma das outras pelo tamanho, densidade, mobilidade eletroforética, composição e função. (HEGELE, 2009)

A função das lipoproteínas é manter os lipídios em solução durante seu transporte entre os tecidos. O intestino absorve a gordura da dieta e a empacota em quilomicrons (Lipoproteínas grandes, ricas em triglicérides) que são transportadas para os tecidos periféricos através do sangue. Ao chegar ao tecido muscular e adiposo, os quilomicrons são digeridos pela lipase lipoproteica, liberando ácidos graxos livres que se inserem nestes tecidos. Os quilomicrons remanescentes são posteriormente removidos pelo fígado. O fígado então sintetiza VLDLs a partir de lipídios e apolipoproteína B (ApoB), que posteriormente, na circulação sanguínea, sofrem lipólise pela lipase lipoproteica para formar LDLs. Estas últimas são, em seguida, removidas pelo fígado através da ligação ao receptor de LDL (LDLR), bem como através de outras vias (Figura 1) (RADER; DAUGHERTY, 2008).

A apolipoproteína A-I (ApoA-I), sintetizada pelas células intestinais e hepáticas, recruta colesterol desses órgãos através da ação dos transportadores cassete ligados ao ATP AI (ABCA1), formando as HDLs nascente. Nos tecidos periféricos, as HDLs nascentes promovem o efluxo do colesterol dos tecidos, inclusive de macrófagos, através da ação do transportados ABCA1. Similarmente, as HDLs maduras também promovem esse efluxo, mas através da ação dos transportadores ABCG1. O colesterol livre é esterificado em ésteres de colesterol nas HDLs nascentes pela enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), formando HDLs maduras. O colesterol presente nas HDLs retorna para o fígado, quer diretamente, através de sua absorção pelo receptor SR-BI, ou indiretamente, pela sua transferência para LDLs e VLDLs, que é realizado pela proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP). O conteúdo lipídico de HDLs é alterado pelas enzimas lipase hepática e lipase endotelial e pelas proteínas de transferência CETP e proteína de transferência de fosfolipídios (PLTP) (Figura 1) (RADER; DAUGHERTY, 2008).

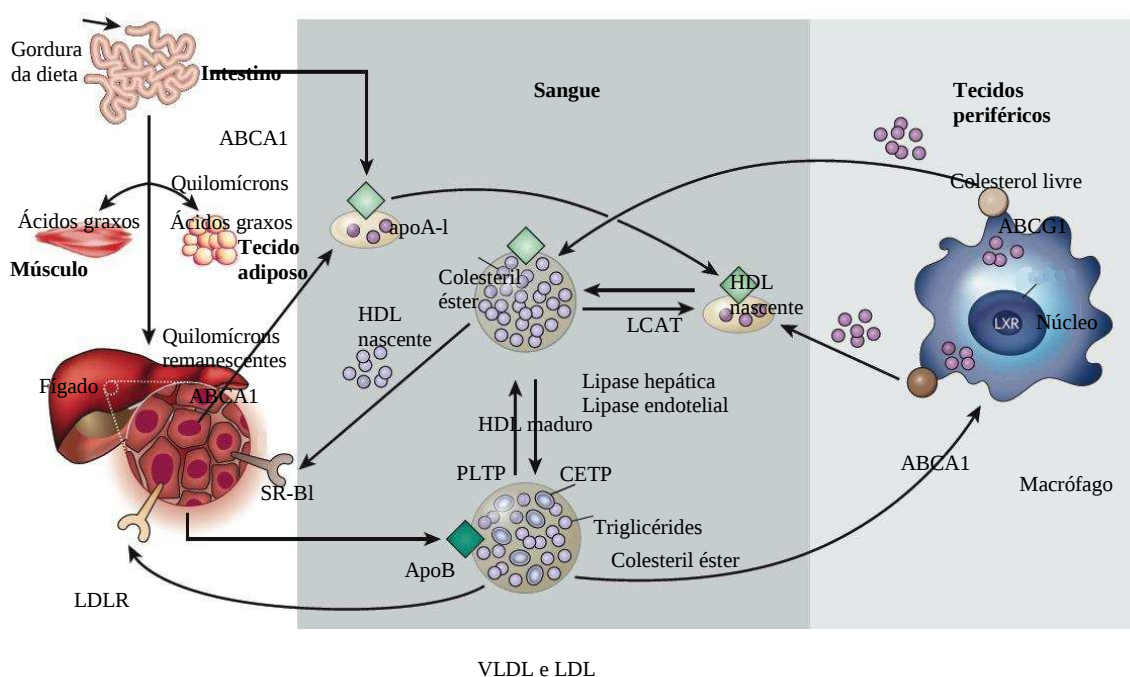


Figura 1 – Metabolismo das lipoproteínas. ApoB, apolipoproteína B; VLDLs, lipoproteínas de muito baixa densidade; LDLs, lipoproteínas de baixa densidade; LDLR, receptor de LDL; SR-B1, receptor scavenger classe B tipo 1; HDLs, lipoproteínas de alta densidade; ApoA-I, apolipoproteína A-I, transportador ABCA1, transportador ABCG1, LXR, receptor nuclear hepático; LCAT, lecitina colesterol aciltransferase, CETP, proteína de transferência de ésteres de colesterol, PLTP, proteína de transferência de fosfolipídeos. Fonte: Rader; Daugherty (2008).

Durante o desenvolvimento da aterosclerose, a parede arterial se espessa gradualmente para formar a placa aterosclerótica, resultando na diminuição do lúmen da artéria. Consequentemente, a quantidade de sangue fornecido ao órgão é reduzida, afetando de forma mais comum o coração e o cérebro. As placas formadas podem romper abruptamente, causando a formação de coágulo que pode levar ao infarto do miocárdio ou AVC (STARY, 2000).

A participação de lipoproteínas que contêm Apo-B, como as LDLs estão associadas ao desenvolvimento da aterosclerose (RADER; DAUGHERTY, 2008). O acúmulo de LDL no compartimento plasmático pode ocorrer em virtude de uma dieta rica em gordura, da síntese endógena de colesterol ou até mesmo pela diminuição do catabolismo da LDL pelo fígado, causado por um defeito gênico que promove a deficiência na expressão ou função dos seus receptores, resultando em hipercolesterolemia (THOMPSON et al., 1981).

Evidências sugerem que a LDL modificada por oxidação ou glicação provoca uma resposta inflamatória na parede da artéria, desencadeando muitos dos processos biológicos que participam do início, progressão, e complicação da aterosclerose (GLASS; WITZTUM, 2001). Desta forma, a LDL oxidada (oxLDL) tem sido implicada em muitos processos aterogênicos como disfunção endotelial, migração de macrófagos e células musculares lisas e produção de citocinas inflamatórias. De modo geral, a oxLDL é endocitada pelos macrófagos, transformando esses macrófagos em células espumosas e a formação de placas ateroscleróticas (ISHIGAKI; OKA; KATAGIRI, 2009).

Em contraste com o colesterol LDL, concentrações plasmáticas de colesterol HDL são inversamente associadas com doença aterosclerótica. O mais bem estabelecido mecanismo pelo qual HDLs protegem contra a aterosclerose é através da promoção do efluxo de colesterol de macrófagos e transportando o colesterol para o fígado para a excreção na bile e fezes (RADER; DAUGHERTY, 2008). HDLs têm várias outras propriedades que poderiam contribuir para a sua propriedade antiaterogênica. Por exemplo, HDLs podem estimular a atividade da óxido nítrico sintase 3 (NOS3; também conhecida como eNOS) e assim aumentar a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (MINEO et al., 2006). Além disso, HDLs têm efeitos antiinflamatórios igualmente *in vitro* e *in vivo*, e estes têm sido o objetivo de intensivos estudos (BARTER et al., 2004).

As LDLs e HDLs são as lipoproteínas mais abundantes no plasma e desenvolvem, de forma diferente, ações pro e antiaterogênicas, respectivamente. Dessa forma, o metabolismo dessas lipoproteínas é alvo das principais intervenções para prevenir e tratar a doença cardiovascular aterosclerótica (RADER; DAUGHERTY, 2008).

1.2 Patogênese da Aterosclerose

O endotélio, uma vez considerado uma barreira simples e seletivamente permeável entre a circulação sanguínea e a parede vascular externa, é agora reconhecido como um órgão homeostático, fundamental para a estrutura e regulação do tônus vascular. Sob condições fisiológicas normais, as células endoteliais induzem a produção e liberação de NO, que se difunde em volta de tecidos e células e exerce seu papel protetor cardiovascular, relaxando as células musculares lisas, impedindo a migração e adesão de leucócitos na parede arterial, a proliferação das células musculares lisas, adesão e agregação plaquetária e expressão de moléculas de adesão (LUSCHER; VANHOUTTE, 1990).

Em condições patológicas, incluindo a presença de fatores de risco cardiovascular, o endotélio sofre alterações funcionais e estruturais, perdendo assim o seu papel de proteção, tornando-se uma estrutura pro-aterosclerótica (LUSCHER; VANHOUTTE, 1990). Essa alteração inicial no endotélio é conhecida como "disfunção endotelial e evidências sugerem que esse processo inicia o desenvolvimento aterosclerótico e pode ser detectada antes de mudanças estruturais na parede do vaso (DAVIGNON; GANZ, 2004). Condições comuns que predis põem a aterosclerose, tais como hipercolesterolemia, hipertensão, diabetes e tabagismo, estão associadas à disfunção endotelial (LANDMESSER; HORNING; DREXLER, 2004).

A disfunção endotelial caracteriza-se por ser um dos primeiros estágios da aterosclerose. O endotélio lesado, expressa em sua superfície moléculas de adesão que atraem monócitos, linfócitos e plaquetas, acarretando um aumento na permeabilidade do vaso sanguíneo para os componentes lipídicos presentes no plasma, principalmente a LDL (HANSSON, 2005). Uma vez dentro da íntima, as lipoproteínas aterogênicas são modificadas por oxidação ou atividade enzimática agregando-se dentro do espaço íntimal (RADER; DAUGHERTY, 2008). Os monócitos migram para dentro da íntima e se transformam em macrófagos, onde começam a fagocitar a oxLDL e outros lipídios, transformando-se em células espumosas, constituindo o primeiro estágio da lesão aterosclerótica (conhecido como estrias gordurosas) na íntima (figura 2) (WEBER; ZERNECKE; LIBBY, 2008). Estrias gordurosas são frequentemente presentes em aorta de crianças, em artérias coronárias de adolescentes e em vasos periféricos de adultos jovens. Mesmo não causando nenhuma patologia clínica, essas estrias gordurosas são consideradas lesões iniciais que levam ao desenvolvimento de complexas lesões ateroscleróticas (RADER; DAUGHERTY, 2008).

Em um segundo estágio, as estrias gordurosas progridem formando uma placa aterosclerótica madura que acumula subpopulações de células inflamatórias e lipídios

extracelulares, essas mudanças formam um núcleo que é rodeado por uma capa de células musculares lisas (SMCs) e matriz rica em colágeno. A secreção de citocinas e fatores de crescimento pelas células da placa e mais deposição de componentes da matriz extracelular, contribui para a progressão da lesão e causa um estreitamento do lumen arterial (estenose). O núcleo central da lesão pode tornar-se necrótico, e o desenvolvimento de neovascularização na placa pode permitir perda dos componentes do sangue e hemorragia. (Figura 2) (WEBER; ZERNECKE; LIBBY, 2008).

Ao longo do tempo, a secreção de proteases que degradam a matriz e a produção de citocinas pelas células da placa pode causar um desbaste da capa fibrosa, o que impede o contato entre o sangue e o material pró-trombótico na placa. Finalmente, a lesão pode se desintegrar, causando a erosão ou ruptura da placa. A liberação de detritos resultantes da placa e o contato do fator tecidual com o sangue acionam uma cascata da coagulação e ocorre a formação de um trombo, este pode obstruir a artéria e resultar em infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral. O alargamento e a remodelação da artéria para acomodar a expansão da íntima pode levar à formação de um aneurisma. (Figura 2) (WEBER; ZERNECKE; LIBBY, 2008).

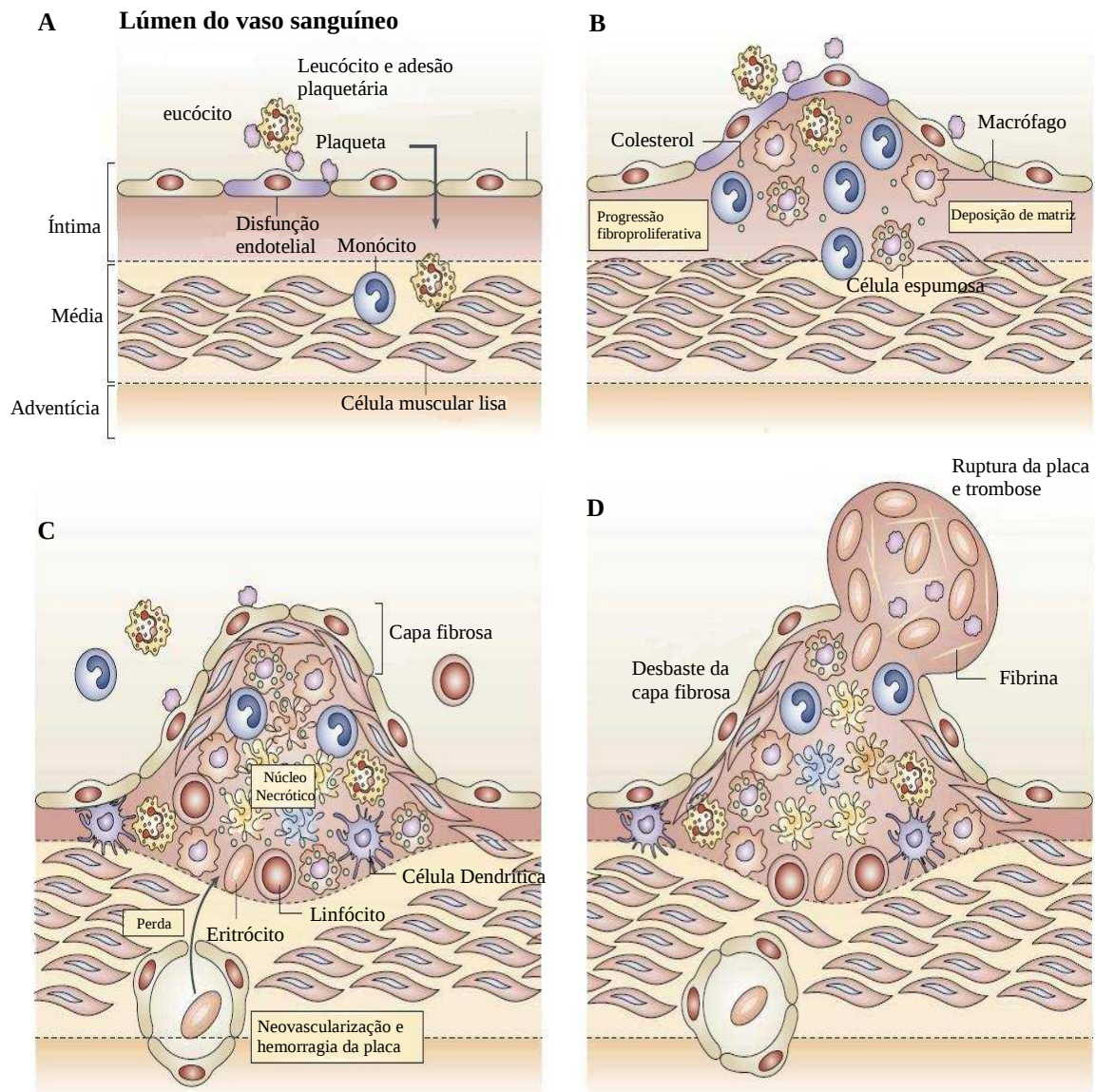


Figura 2 – Evolução da aterosclerose. A – adesão de leucócitos e plaquetas. B – formação das estrias gordurosas. C – Formação de um núcleo necrótico, capa fibrosa e neovascularização. D – Ruptura da placa com conseqüente ativação do sistema de coagulação e formação do trombo. Fonte: Weber; Zernecke; Libby (2008).

1.3 Inflamação e Aterosclerose

A aterosclerose é considerada uma doença inflamatória crônica que envolve a participação de componentes da imunidade inata e adaptativa que juntos medeiam à iniciação, progressão e complicações trombóticas da aterosclerose (WEBER; ZERNECKE; LIBBY, 2008).

Células endoteliais normalmente resistem à adesão de leucócitos. Estímulos pró-inflamatórios, incluindo uma dieta rica em gordura saturada, hipercolesterolemia, obesidade, hiperglicemia, resistência à insulina, hipertensão e tabagismo, desencadeiam a expressão endotelial de moléculas de adesão como a P-selectina e molécula de adesão celular vascular (VCAM-1), que medeiam à ligação de monócitos e leucócitos circulante (CYBULSKY et al., 2001). Fatores quimiotáticos, incluindo a proteína-1 quimiotática de monócitos (MCP-1), produzida por células da parede vascular em resposta a lipoproteínas modificadas, direcionam a migração e diapedese de monócitos aderentes. MCP-1 se liga ao seu receptor específico, o CCR2, sobre a superfície de monócitos circulantes para exercer os seus efeitos (GU et al., 1998).

Dentro da íntima, os monócitos se transformam em macrófagos sobre a influência do fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), molécula que é expressa de forma abundante na íntima inflamada (CLINTON et al., 1992). O M-CSF também favorece a uma maior expressão de “receptores scavenger” nos macrófagos. Esses receptores estão envolvidos na formação das células espumosas, através da captação desregulada de lipoproteínas modificadas pelos macrófagos. Os principais “receptores scavenger” incluem o CD-36, CD-68, CXCL16, SR-A e SR-BI (HANSSON; LIBBY, 2006)

Os macrófagos proliferam dentro da lesão e ampliam a resposta inflamatória através de secreção de numerosos fatores de crescimento e citocinas, tais como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina - 1 β (IL-1 β). Essas duas citocinas são importantes uma vez que aceleram a resposta inflamatória e são capazes de induzir a expressão de VCAM-1, MCP-1, M-CSF e Matriz Metaloproteinases (MMPs) (HANSSON; LIBBY, 2006).

No estágio avançado da placa, mediadores inflamatórios podem inibir a síntese de colágeno e influenciar a expressão de collagenases como as metaloproteinases, pelas células espumosas dentro da íntima. Como consequência, ocorre à diminuição do conteúdo de colágeno da capa fibrosa, tornando a lesão frágil e propensa à ruptura (PACKARD; LIBBY, 2008).

A importância do envolvimento da inflamação na aterosclerose tem estimulado a descoberta e adoção de biomarcadores inflamatórios para o prognóstico de risco cardiovascular. Alguns desses biomarcadores incluem: Moléculas de adesão como VCAM-1; citocinas tais como TNF- α , interleucina-1 (IL-1), interleucina-18 (IL-18) e interleucina-6 (IL-6); proteases como a metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9); produtos de plaquetas incluindo CD40 ligante solúvel (CD40L); adipocinas como adiponectina e reagentes de fase aguda tais como Proteína C Reativa (PCR), inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e fibrinogênio (PACKARD; LIBBY, 2008).

Dessa forma, a prevenção eficaz da aterosclerose inclui o tratamento dos mais importantes fatores de risco cardiovascular, como hipertensão, diabetes, hipercolesterolemia e obesidade. Entretanto, a ausência dos chamados “tradicionais” fatores de risco não completamente protege contra a doença e novos “fatores emergentes” tem sido identificados, incluindo marcadores de inflamação (CORRADO; NOVO, 2005).

1.4 Modelo animal

Várias espécies animais têm sido utilizadas como modelo de estudo de patogênese e terapêutica das lesões ateroscleróticas. Em especial, os camundongos são altamente resistentes a desenvolver aterosclerose. Somente quando são alimentados por muitos meses com dieta rica em colesterol ou dieta rica em colesterol suplementada com ácido cólico, seus níveis de colesterol plasmático aumentam e desenvolvem diversas camadas de células espumosas (JAWIEN et al., 2004). Pesquisas genéticas e a aplicação de técnicas transgênicas em camundongos resultaram na geração de uma ampla gama de linhagens de camundongos mais adequados para serem utilizados como modelo para aterosclerose, incluindo camundongo deficiente de apolipoproteína-E (ApoE^{-/-}) e camundongo deficiente do receptor de LDL (LDLR^{-/-}) (HOFKER; BREUER, 1998).

O camundongo ApoE^{-/-} é um modelo genético bem estabelecido de hipercolesterolemia aterogênica em que os animais desenvolvem hipercolesterolemia e aterosclerose de forma espontânea mesmo quando são alimentados com uma dieta padrão. Esses camundongos também desenvolvem lesões de placas fibrosas generalizadas em áreas vasculares tipicamente afetadas na aterosclerose humana, representando um bom modelo para estudar as influências genéticas e ambientais sobre o processo aterosclerótico (REDDICK et al., 1994).

O camundongo deficiente de LDL (LDLR^{-/-}) é tipicamente um modelo de hipercolesterolemia familiar. Estes camundongos possuem uma anormalidade lipoproteica mais modesta quando comparado com apoE^{-/-}, apresentando um aumento nos níveis de colesterol LDL e VLDL (colesterol total ~250mg/dl) não desenvolvendo aterosclerose quando alimentado com dieta padrão. Entretanto, após a administração de uma dieta rica em gordura, seus níveis de colesterol total aumentam para aproximadamente 1500mg/dl, desenvolvendo grandes lesões ateroscleróticas (JAWIEN et al., 2004).

O perfil lipoproteico de LDLR^{-/-} é mais compatível com o perfil humano, uma vez que o aumento do colesterol plasmático é encontrado primariamente em LDL aterogênica com pequenas quantidades em VLDL (ISHIBASHI et al., 1993). Por outro lado, camundongos ApoE^{-/-} têm aumento de colesterol ligado a partículas de VLDL, como a principal lipoproteína (VENIANT et al., 2001)

Como foi mencionado anteriormente, os camundongos deficientes de LDLR^{-/-} quando alimentados com uma dieta padrão enriquecida com 1% de colesterol tem predominantemente uma elevação nos níveis de colesterol LDL e extensiva aterosclerose sem características da síndrome metabólica. Essas características são observadas quando os animais são alimentados com uma dieta chamada “ocidental” (0,06% de colesterol + 21% de gordura de leite), desenvolvendo um aumento no ganho de peso, glicose, insulina, VLDL rica em triglicérides, VLDL rica em colesterol e esteatose hepática (HARTVIGSEN et al., 2007). De acordo com Li et al (2000), essas são características clínicas de muitos pacientes diabéticos candidatos ao tratamento com agonistas de PPAR γ .

1.5 Receptores nucleares

Os receptores nucleares (RN) são conhecidos primariamente como fatores de transcrição regulados por ligantes que modulam a transcrição de genes alvos, participando de forma essencial no desenvolvimento embrionário, manutenção da diferenciação de fenótipos celulares, metabolismo e morte celular. A disfunção na sinalização dos RN pode levar a doenças proliferativas, reprodutivas e metabólicas como o câncer, infertilidade, obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2 (GRONEMEYER; GUSTAFSSON; LAUDET, 2004)

Esses receptores são agrupados em uma grande superfamília e acredita-se que eles evoluíram de um ancestral comum. Uma lista dos receptores clássicos e órfãos, ou seja receptores para os quais ainda não foram identificados seus ligantes, são apresentados na tabela 1 (ARANDA; PASCUAL, 2001). A análise evolucionária levou a subdivisão desses

receptores em seis diferentes famílias (LAUDET, 1997). Uma grande família é formada por receptores do hormônio tireoidiano (TRs), receptores do ácido retinóico (RAR), receptores de vitamina D (VDR) e receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR), bem como diferentes receptores órfãos. A segunda família contém entre outros, o receptor X retinóide (RXR). Quando esse receptor se liga ao 9-*cis*-ácido retinóico desempenha um papel importante na sinalização do receptor nuclear, eles são parceiros para diferentes receptores que se ligam de forma heterodimérica ao DNA. A terceira família é formada principalmente pelos receptores esteróides e alguns receptores órfãos. As famílias IV, V e VI contêm os receptores órfãos NGFI-B, FTZ-1/SF-1 e GCNF, respectivamente (ARANDA; PASCUAL; 2001).

Tabela 1 – Subfamílias dos receptores nucleares presente em mamíferos.

	Receptor	Subtipo	Denominação	Ligantes
Classe I	TR	α , β	Receptor Hormônio tireoidiano	Hormônio tireoidiano (T ₃)
	RAR	α , β , γ	Receptor do ácido retinóico	Ácido retinóico
	VDR		Receptor da vitamina D	1-25(OH) ₂ vitamin D ₃
	PPAR	α , β , γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos	Eicosanóides; Tiazolidinadionas (TZDs); 15-deoxi-12,41prostaglandina J ₂ ; ácidos graxos poliinsaturados
	PXR		Receptor X pregnane	Pregnanes;
	CAR/MB67	α , β	Receptor androstane constitutivo	Androstanes
Classe II	LXR	α , β	Receptor X do fígado	Oxisteróis
	FXR		Receptor X farsenóide	Ácido biliar
	RevErb	α , β	ErbA reverso	Desconhecido
	RZR/ROR	α , β , γ	Receptor Z retinóide	Desconhecido
	UR		Receptor Ubiquitous	Desconhecido
	RXR	α , β , γ	Receptor X retinóide	9- <i>cis</i> -ácido retinóico
Classe III	COUP-TF	α , β , γ		Desconhecido
	HFN-4		Fator 4 nuclear do hepatócito	Acil-coA graxo Thioesters
	TLX	α , β , γ	Tailles-related receptor	Desconhecido
	PNR		Receptor nuclear fotorreceptor específico	Desconhecido
	TR2	α , β	Receptor de testículo	Desconhecido
	GR		Receptor de glicocorticóides	Glicocorticóides
Classe IV	AR		Receptor de andrógenos	Andrógenos
	PR		Receptor de progesterona	Progestinas
	ER	α , β	Receptor de estrogênio	Estradiol
	ERR	α , β , γ	Receptor relacionado a estrogênio	Desconhecido
	NGFI-B	α , β , γ	Clone B induzindo NGF	Desconhecido
Classe V	SF-1	α , β	Fator 1 esteroidogênico	Oxisterois
Classe VI	GCNF		Fator nuclear de células germinativas	Desconhecido

Fonte: Aranda; Pascual, 2001.

Os receptores nucleares possuem estrutura globular com domínios funcionais distintos. Os principais domínios são: região amino-terminal, responsável pela transativação independente do ligante composto pela região AF-1; domínio de ligação ao DNA (DBD); dobradiça (*hinge*), domínio de ligação ao ligante (LBD) e domínio AF-2 que promove a transativação dependente da presença do ligante (figura 3) (SONODA; PEI; EVANS, 2008)

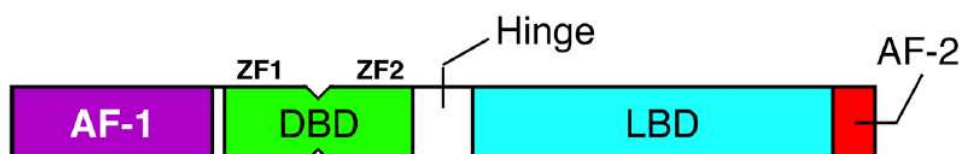


Figura 3 – Estrutura linear representando os domínios funcionais dos receptores nucleares. Região amino-terminal (AF-1); Domínio de ligação ao DNA (DBD); Dobradiça (*hinge*); Domínio de ligação ao ligante (LBD); Domínio AF-2 (AF-2). Fonte: Sonoda; Pei; Evans, 2008.

A região amino-terminal é responsável pelo reconhecimento de co-ativadores e outros fatores de transcrição. Esta região mostra atividade celular específica sugerindo que esta região da proteína contribui para a especificidade de ação entre isoformas de um receptor (LEE et al., 1999). O DBD é o módulo mais conservado entre as famílias dos receptores nucleares, sua estrutura possui dois radicais de zinco (ZF1 e ZF2) e tem normalmente 60 a 70 aminoácidos. Essa região é responsável pelo reconhecimento de seqüências específicas (elementos responsivos) e ativação dos genes possuindo uma seqüência de nove cisteínas conservadas ao longo da família dos RN que é responsável pela alta afinidade do DBD ao DNA (SHAO; LAZAR, 1999).

A região de dobradiça (*hinge*) liga o DBD ao LBD, permitindo assim a movimentação de um módulo para o outro não sendo conservada entre a superfamília dos RNs. Essa região esta relacionada, em muitos casos, à sinalização, estando também envolvida com co-reguladores dos RN, pois alterações nessa região interferem nas interações entre receptores e co-reguladores, podendo até cessá-las (NASCIMENTO et al., 2006).

O LBD atua como domínio desencadeador do mecanismo de ação dos RNs, é responsável pela localização nuclear, homo-hetero dimerização, associação com co-repressores e coativadores, proteínas de choque térmico, como também possuem a chamada

região de transativação AF-2 ou função de ativação ligante-dependente (WURTZ et al., 1996).

A sinalização celular entre os receptores nucleares ocorre pela resposta destes as centenas de moléculas sinalizadoras, como proteínas, aminoácidos, esteróides, retinóides, nucleotídeos etc. Os RNs se localizam no núcleo, em estado reprimido, através da ação de co-repressores. Esses elementos repressores inibem a transcrição gênica mantendo a cromatina condensada. Quando ocorre a interação de agonistas com o domínio LBD do fator de transcrição, acontece uma resposta direta fazendo com que haja uma mudança conformacional, em contrapartida o complexo co-repressor é dissociado e ocorre o recrutamento de coativadores (YU; REDDY, 2007). Em seguida, o receptor se associa ao complexo ativador seguindo-se da ligação ao DNA, desencadeando o início da transcrição (BOURDONCLE et al., 2005). Como foi dito anteriormente, os RNs participam de processos fisiológicos importantes para o organismo. Entretanto, a ativação desses processos é realizada pela ação de um determinado ligante, seja ele natural ou sintético, e por essa razão, os RNs tornam-se importantes alvos farmacológicos.

1.5.1 Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomos (PPAR)

Peroxissomos são organelas subcelulares, que tem como função clássica remover o hidrogênio por meio do uso de oxigênio molecular através de uma série de enzimas oxidase e catalase. Eles também desempenham um papel crucial em diversos processos metabólicos celulares, incluindo o catabolismo de colesterol para bile e β -oxidação dos ácidos graxos. Em condições fisiológicas normais, o metabolismo nos peroxissomos ocorre de forma secundária ao sistema mitocondrial (VAMECQ; DREY, 1989), e envolve principalmente a oxidação de ácidos graxos de cadeia longa que não podem ser metabolizados de outra forma. Em hepatócitos de ratos a ativação dos peroxissomos por vários estímulos farmacológicos mostrou induzir o aumento dos peroxissomos em tamanho e número (LOCK et al., 1989) e esse aumento foi associado a uma maior expressão de genes relacionados a oxidação dos ácidos graxos. Em humanos, agentes farmacológicos também atuam aumentando a expressão de genes peroxissomais, mas não se observa um aumento no tamanho e número de peroxissomos tal como visto em roedores (KLIEWER et al., 2001).

Em 1990, a clonagem de um gene de roedor ligado a proliferação de peroxissomos foi descrita pela primeira vez (ISSEMAN; GREEN, 1990). Posteriormente, foi descoberto que a proliferação de peroxissomos atuava através da estimulação de um receptor de hormônio

nuclear órfão que foi nomeado de receptor ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR). O receptor original é conhecido como PPAR α . Subsequentemente, foram descobertos mais dois isotipos, o PPAR δ/β e PPAR γ (ROBINSON; GRIEVE, 2009), considerados importantes reguladores do metabolismo de lipídios e carboidratos.

Os PPARs possuem organização estrutural semelhante a outros membros da superfamília de receptores nucleares, como o receptor do ácido retinóico e vitamina D. De modo geral, contém uma região N-terminal exibindo um ligante independente, um domínio de trans-ativação fraco chamado AF-1, domínio de ligação ao DNA (LBD) e uma região C – terminal que é responsável pela dimerização com o receptor X retinóide (RXR) (FEIGE et al., 2006).

Em resposta a ligação de um determinado ligante o PPAR promove uma mudança conformacional que facilita a formação de um complexo heterodimérico com outro receptor nuclear ativado por ligantes, o receptor X retinoide (RXR) (WILLSON et al., 2000). Essa mudança conformacional induzida por ligante também facilita a ligação e liberação de pequenas moléculas acessórias que são importantes para realização do complexo transcricional (DIRENZO et al., 1997). Essas moléculas acessórias incluem proteínas co-repressoras, como a N-Cor, liberada após a ativação do PPAR e proteínas co-ativadoras, como a PPAR γ co-ativador 1 (PGC-1), recrutada para a ativação, por exemplo, do receptor nuclear PPAR γ (YANG et al., 2000). O complexo heterodimérico formado pelo PPAR/RXR pode então interagir via domínio de ligação ao DNA com elementos responsivos do PPAR (PPREs), situados em sítios regulatórios de cada gene e então induzir a expressão de genes alvos (Figura 4) (WILLSON et al., 2000).

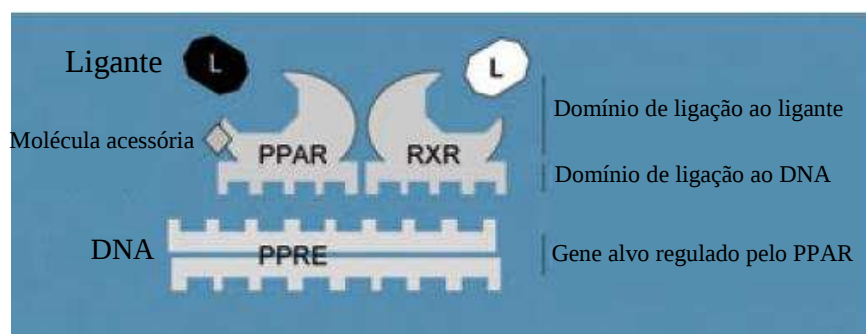


Figura 4 – Representação esquemática mostrando a ativação dos PPARs. Fonte: Willson et al., 2000.

Os PPARs podem não somente induzir, mas também reprimir a transcrição de genes e esta ação ocorre através da interação com outros fatores de transcrição como o fator nuclear

Kapa β (NF- $\kappa\beta$), Transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT), Proteína ativadora-1 (AP-1) e fator nuclear de células T ativadas (NFAT) (CHINETTI et al., 2000). Apesar desses elementos múltiplos comuns aos PPARs, cada isotipo mantém papéis biológicos distintos que integrados, garantem a coordenação do metabolismo energético (Figura 5) (EVANS et al., 2004).

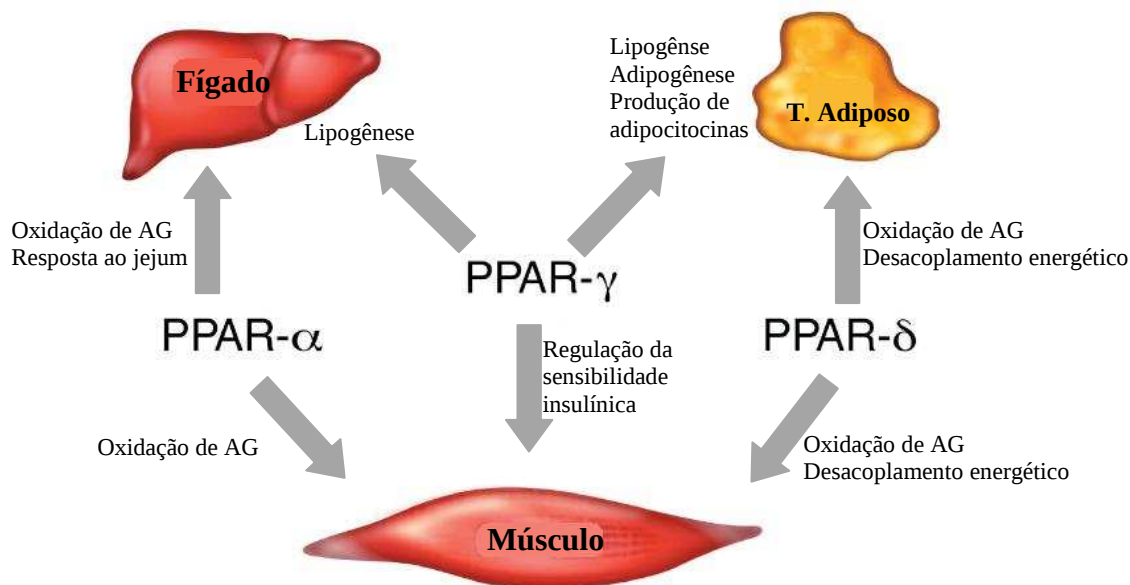


Figura 5 – Integração metabólica dos PPARs. As três isoformas de PPAR regulam a homeostase de lipídios e glicose através de suas atividades coordenadas no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. Fonte: Evans et al. (2004).

O PPAR- α , primeiro isotipo do PPAR conhecido é predominantemente expresso no fígado e em menor intensidade no coração, músculo esquelético, intestino e rim onde exerce um papel importante em controlar a oxidação dos ácidos graxos (LEFEBVRE et al., 2006). A ativação do PPAR- α está relacionada com a transcrição de aproximadamente 80-100 genes, atuando sobre a oxidação dos ácidos graxos, metabolismo lipídico e inflamação (AHMED et al., 2007). O PPAR- α atua também sobre o metabolismo das lipoproteínas, estando envolvido na regulação da síntese de lipoproteínas ricas em triglicérides e HDL-C. Nesses aspectos suas ações principais são induzir o aumento da apolipoproteína A1, um elemento chave na formação de partículas de HDL-C. Atua também sobre a síntese lipoproteína lipase (LPL), uma enzima central no metabolismo dos triglicérides e reprime a apolipoproteína C-III (apoC-III), que é inibidora endógena da LPL (LEE et al., 2003)

Como foi mencionado anteriormente o PPAR- α também participa de eventos relacionados ao processo inflamatório (LEFEBVRE et al., 2006). Em geral, Inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, bem como reprimindo a expressão de VCAM-1 (STAELS et al., 1998). Consistentes com esses achados, camundongos deficientes do PPAR- α manifestam um aumento basal no seu estado inflamatório com resposta prolongada a estímulos pró-inflamatórios (DEVCHAND et al., 1996). Os fibratos são os ligantes sintéticos do PPAR- α e são utilizados para tratar dislipidemias em humanos (FORMAN et al., 1997). A administração dos fibratos diminui os níveis de triglicérides e estudos clínicos têm mostrado que esses fármacos são capazes de reduzir a incidência de eventos cardiovasculares e aterosclerose (BENSINGER; TONTONNOZ, 2008).

O PPAR- δ/β é o menos estudado entre os isotipos de PPARs, embora possua expressão significativa em tecidos responsáveis por controlar o metabolismo lipídico, como os adipócitos, intestino delgado, coração, músculo esquelético e macrófagos (GROSS; STAELS, 2007). A retirada do gene que codifica a isoforma PPAR- δ/β se torna letal para o desenvolvimento inicial de quase todos os embriões, devido a um defeito na formação da placenta (NADRA et al., 2006) e por esse motivo, essa isoforma desempenha um papel importante não só na regulação do metabolismo, mas também no desenvolvimento do organismo (GRIMALDI, 2007). Existem fortes indícios que relacionam os ácidos graxos, triglicérides e prostaciclina como ativadores endógenos do PPAR- δ/β . Na linha de ligantes sintéticos, uma série de compostos tem sido desenvolvidos, mas ainda não existe nenhum agonista do PPAR- δ/β aprovado para uso clínico, embora a molécula GW501516 Esteja na fase II de desenvolvimento para tratar dislipidemias (BISHOP-BAILEY; BYSTROM, 2009). Evidências experimentais sugerem que a ativação do PPAR- δ/β pode ter um valor terapêutico no tratamento da síndrome metabólica. A utilização de agonistas do PPAR- δ/β no tratamento de primatas e camundongos obesos aumentou os níveis de HDL e diminuiu os níveis de partículas de LDL pequenas e densas (LEIBOWITZ et al., 2000; OLIVER et al., 2001). De acordo com Oliver et al. (2001) o tratamento com GW1516 elevou o conteúdo plasmático de apolipoproteína AI, A-II e CIII, também foi observado uma maior expressão de ABCA1 com consequente aumento do efluxo do colesterol nos macrófagos, fibroblastos e células intestinais. Outro estudo mostrou que a ativação do PPAR- δ/β reduziu lesões ateroscleróticas em cerca de 50% em camundongos LDLR^{-/-}. Essa redução na área da lesão não foi acompanhada por mudanças nos níveis de HDL e LDL, mas sim pela diminuição na expressão de MCP-1 e ICAM-1 na aorta dos camundongos tratados (GRAHAM et al., 2005). Esses dados indicam que o PPAR- δ/β encontra-se envolvido em muitos mecanismos

biológicos que regulam o metabolismo lipídico e algumas observações sugerem que a ativação farmacológica desse isotipo pode ter ações benéficas sobre aterosclerose.

O PPAR γ , isotipo mais estudado dentre as isoformas de PPAR será abordado de forma mais específica a seguir.

1.5.2. Receptor γ ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR γ)

O gene PPARG foi clonado a partir de vertebrados, incluindo camundongos (ZHU et al., 1993) e humanos (GREENE et al., 1995). A análise filogenética dessa estrutura revelou que ela é bem conservada entre humanos e camundongos (99% de similaridade e 95% de identidade) (ZHU et al., 1995; FAJAS et al., 1997). Em humanos, a transcrição do gene PPARG dá origem a quatro RNAs mensageiros (mRNA) diferentes: PPAR γ 1, PPAR γ 2, PPAR γ 3 e PPAR γ 4 que são transcritos a partir de quatro promotores distintos (FAJAS et al., 1997, FAJAS; FRUCHART; AUVERX, 1998, SUNDVOLD; LIEN, 2001). Em camundongos somente dois subtipos de mRNA são encontrados, o PPAR γ 1 e PPAR γ 2 (ZHU et al., 1995).

Apesar do PPAR γ apresentar quatro subtipos de mRNA em humanos, só existe duas isoformas de proteínas conhecidas (hPPAR γ 1 e hPPAR γ 2) que diferem em sua extremidade 5', como consequência de diferentes promotores e a *splicing* alternativos. O mRNA do PPAR γ 1, PPAR γ 3 e PPAR γ 4 dão origem a proteína hPPAR γ 1. O mRNA do PPAR γ 2 codifica a proteína hPPAR γ 2 que tem 30 aminoácidos adicionais na sua região N-terminal (ZIELENIAK; WÓJCIK; WOZNIAK, 2008). Em condições fisiológicas a proteína hPPAR γ 2 é quase exclusivamente produzida pelo tecido adiposo branco e marrom, enquanto que a proteína hPPAR γ 1 é detectada em outros tecidos incluindo células imunes, intestino, rim e fígado (VIDAL-PUIG et al., 1997).

O PPAR γ exerce papel crucial na diferenciação de adipócitos, induzindo a expressão de importantes marcadores envolvidos no metabolismo de lipídios como a proteína de ligação a ácido graxo (aP2) (TONTONOZ et al., 1994a), fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPKC) (TONTONOZ et al., 1995) e LPL (SCHOONJANS et al., 1996). Também controla a expressão da proteína transportadora de ácidos graxos 1 (FATP-1) e CD-36 (SFEIR; IBRAHIMI; AMRI, 1997), ambas envolvidas na captação de lipídios pelos adipócitos. A importância do PPAR γ na adipogênese tem sido demonstrada por vários trabalhos. Por

exemplo, PPAR γ é induzido durante a diferenciação de pré-adipócitos *in vitro* e sua expressão ectópica em fibroblastos não adipogênicos estimula a adipogênese na presença de ligantes de PPAR γ (TONTONNOZ; HU; SPIEGELMAN, 1994b).

Uma série de ligantes naturais podem ativar o PPAR γ , incluindo ácidos graxos insaturados, eicosanóides e componentes de LDLs oxidadas. Entretanto, a afinidade dos receptores para muitos desses ligantes é baixa e, em alguns casos, a relevância fisiológica do ligante ainda não foi determinada (BENSINGER; TONTONNOZ, 2008).

O PPAR γ é o alvo molecular de uma classe de ligantes sintéticos conhecidos como Thiazolidinadionas (TZDs). Essas moléculas possuem como característica principal a presença de um anel diona (figura 6). A Ciglitazona, o primeiro agonista do PPAR γ apresentou bons resultados em melhorar a glicemia em modelo de resistência a insulina, entretanto não foi comercializada por causar hepatotoxicidade. Troglitazona, foi a primeira agonista de PPAR γ aprovada pela *US food and drug Administration* (FDA) para o tratamento da diabetes tipo 2 em 1997, mas foi encontrado casos de hepatotoxicidade (WATKINS; WHITCOMB, 1998) foi retirada do mercado após a confirmação de grave hepatotoxicidade e morte (ISLEY, 2003). Rosiglitazona e pioglitazona, aprovadas para uso pela FDA em 1999, são consideradas a segunda geração de agonistas do PPAR γ .

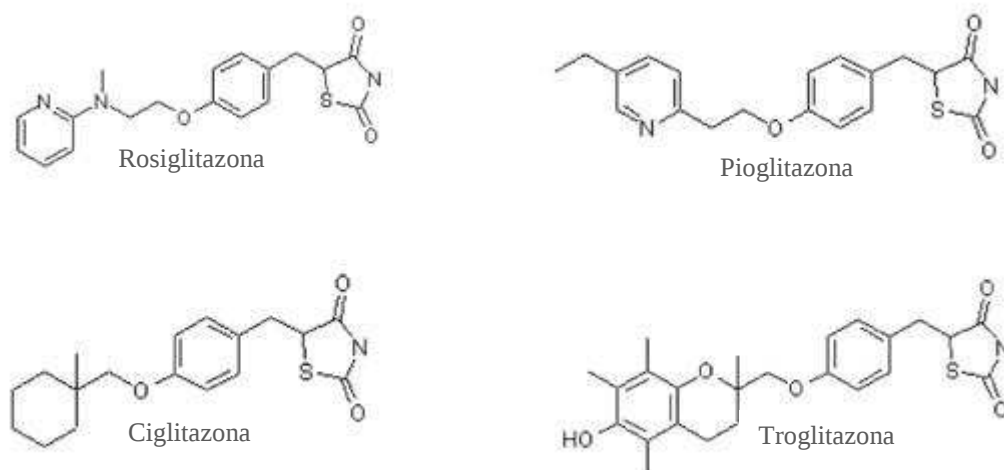


Figura 6 – Estrutura química das tiazolidinadionas. Fonte: (GUO et al., 2006)

Primariamente as TZDs exercem ações sensibilizadoras da ação da insulina diretamente sobre os adipócitos e indiretamente por alterar a liberação de adipocitocinas. De acordo com o efeito direto, as TZDs promovem a captação e estoque de ácidos graxos no tecido adiposo, aumentando a massa desse tecido e poupando outros tecidos sensíveis à

insulina, como o músculo esquelético e fígado (YKI-JARVINEN, 2004). Em outras palavras, as TZDs promovem a distribuição de gordura das células do fígado e músculo esquelético para os adipócitos.

Os efeitos indiretos das TZDs sobre o tecido adiposo e melhora da sensibilização da insulina está relacionado com a adiponectina. Essa proteína é secretada exclusivamente pelo tecido adiposo e possui propriedades sensibilizadoras da insulina, promovendo uma maior captação de ácidos graxos, maior captação e utilização da glicose no tecido adiposo e muscular e a menor produção hepática de glicose, promovendo, assim, um melhor controle dos níveis séricos de glicose, de ácidos graxos livres e triglicérides (FEIGE et al., 2006). De acordo com Bajaj et al. (2004), a utilização da pioglitazona em pacientes com diabetes tipo 2 resultou em um aumento significativo nos níveis plasmáticos de adiponectina que foi associada com a melhora da resistência à insulina e diminuição no conteúdo de lipídio hepático.

Além da expressão no tecido adiposo, o PPAR γ é expresso em células que compõem as lesões ateroscleróticas, como células endoteliais, musculares lisas e monócitos/macrófagos (COLLINS et al., 2001). Diante disso, evidências têm indicado que em adição à sua atividade antidiabética, as TZDs apresentam também atividade antiaterosclerótica e o potencial antiaterogênico dos agonistas de PPAR γ tem sido sugerido em estudos com modelos animais de aterosclerose (LI et al., 2000; COLLINS et al., 2001) e em ensaios clínicos utilizando pacientes com diabetes tipo 2 (MINAMIKAWA et al., 1998; LANGENFELD et al., 2005).

De acordo com Li et al. (2000), agonistas específicos de PPAR γ foram capazes de inibir o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em camundongos LDLR^{-/-}, apesar de aumentar a expressão do receptor scavenger CD36 na parede arterial. Os efeitos antiaterogênicos foram associados a uma melhora na sensibilização da insulina e diminuição da expressão tecidual do fator de necrose tumoral α (TNF- α) e MMP-9, indicando ações coordenadas locais e sistêmicas. Similarmente, em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), a pioglitazona conseguiu diminuir a espessura da carótida, a qual esta fortemente associada com o desenvolvimento de acidente vascular cerebral e infarto (LANGENFELD et al., 2005).

Um número de genes-alvo do PPAR γ tem sido documentado estar relacionado com as ações biológicas locais mediadas por esse receptor nuclear no sistema cardiovascular. Por exemplo, ligantes de PPAR γ reduziram a produção de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), por

inibir a atividade de fatores de transcrição como AP-1, STAT e NF- κ B em monócitos/macrófagos (JIANG; TING; SEED, 1998). Esses dados sugerem que a ativação do PPAR γ pode ter efeitos benéficos na modulação da resposta inflamatória na aterosclerose.

A expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais leva à adesão de leucócitos, que é considerado um passo crítico no início da lesão aterosclerótica. Evidências comprovam o papel importante dos ligantes de PPAR γ em inibir a expressão de VCAM-1 e ICAM-1 e também diminuir a produção de quimiocinas, como IL-8 e MCP-1, através de supressão do AP-1 e NF- κ B em células endoteliais (PASCERI et al., 2000). As células musculares lisas também desempenham um papel importante na progressão da aterosclerose, através da sua proliferação e migração dentro das lesões ateroscleróticas e as TZDs inibem esses dois eventos celulares (MARX et al., 1998).

Por outro lado, a ativação do PPAR γ nos macrófagos desencadearia efeitos proaterogênicos, uma vez que ele regula positivamente a expressão do receptor “scavenger” CD-36, responsável pela captação de oxLDL e consequente formação de células espumosas (TONTONNOZ et al., 1998). Entretanto, estudos comprovam que a ativação de PPAR γ não induz a formação das células espumosas, isto porque eles também são capazes de induzir a expressão do gene que codifica o transportador ABCA1, responsável por controlar o efluxo de colesterol dos macrófagos mediado pela apoAI. Esses efeitos são provavelmente devido ao aumento na expressão do receptor X do fígado (subtipo α) (LXR α), um receptor nuclear que é ativado por oxisteróis e que tem a capacidade de induzir a transcrição do transportador ABCA1 (CHINETTI et al., 2001). Dessa forma, a ativação farmacológica do PPAR γ pode reprimir vários eventos patológicos importantes que são necessários para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose.

Apesar de existirem diversos estudos mostrando os efeitos vasculares favoráveis dos agonistas de PPAR γ , os efeitos cardiovasculares das TZDs tornam-se alvo de intensa discussão. Em uma recente metanálise, o tratamento com rosiglitazona foi associado a um aumento dos riscos de infarto do miocárdio e mortalidade por causas cardiovasculares (NISSEN; WOLSKI, 2007). De forma controversa, no estudo PROactive, o tratamento com pioglitazona foi associado a redução do risco combinado de infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e mortalidade em 16%, entre pacientes diabéticos de alto risco cardiovascular (DORMANDY et al., 2005). É possível que os efeitos danosos apresentados pela rosiglitazona sejam específicos dessa molécula, não representando um efeito de classe.

Entretanto, os mecanismos determinantes do aumento de risco cardiovascular associado às TZDs ainda não são conhecidos.

1.5.3 Novos Ligantes do PPAR γ

O envolvimento do PPAR γ em diversos processos biológicos, principalmente na modulação do metabolismo lipídico e resposta inflamatória torna esse receptor nuclear um importante alvo para o desenvolvimento de novas moléculas. As TZDs, utilizada clinicamente para tratar pacientes com DM2, são moléculas que possuem interação específica com o PPAR γ e por essa razão são consideradas potentes agonistas desse receptor nuclear. Entretanto, a utilização das TZDs está relacionada com diversos efeitos colaterais como ganho de peso, retenção de fluído e hepatotoxicidade (YKI-JARVINEN, 2004), os quais podem ser responsáveis pelos riscos cardíacos associados com a utilização desses fármacos (NISSEN; WOLSKI, 2007). Dessa forma, diversas pesquisas estão sendo realizadas para encontrar bons candidatos a fármacos, que possibilite o tratamento dessas patologias sem causar efeitos colaterais tão severos.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE DEPARTAMENTO DE ATEROSCLEROSE DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** 77 (suplemento I), 2007.

AGUILA, M. B; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Aorta wall quantitative alterations due to different long-term high-fat diet in rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 41, p. 1391-97, 2003.

AHMED, W.; ZIOUZENKOVA, O.; BROWN, J. et al. PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation? **Journal of Internal Medicine**. v. 269, p.184-198, 2007.

ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. **Physiol Rev**. v. 81, p. 1269 –1304, 2001.

BAJAJ, M.; SURAMORNKUL, S.; PIPER, P. et al. Decrease plasma adiponectin concentrations are closely related to hepatic fat content and hepatic insulin resistance in pioglitazone-treated type 2 diabetic patients. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 89, p. 200-6, 2004.

BARTER, P. J.; NICHOLLS, S.; RYE, K. et al. Antiinflammatory properties of HDL. **Circ. Res**. v. 95, p. 764-772, 2004.

BENSINGER, S. J.; TONTONOS, P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. **Nature**. v. 454, p. 470-477, 2008.

BISHOP-BAILEY, D.; BYSTROM, J. Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ in inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 124, p. 141–150, 2009.

BOURDONCLE, A.; LABESSE, G.; MARGUERON, R. et al. The nuclear receptor coactivator PCG-1 α exhibits modes of interaction with the estrogen receptor distinct from those of SRC-1. **Journal of molecular biology**. V. 347 (5), p. 921-34, 2005.

CHAMPE, P. C.; HARVERY, R. A.; FERRIER, D. R. Bioquímica Ilustrada. 3ª ed. Porto Alegre: Ed. **Artmed**, 2006.

CHINETTI, G.; FRUCHART, J. C.; STAELS, B. peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. **Inflamm Res**. v. 49, p. 497-505, 2000.

CHINETTI, G.; LESTAVEL, S.; BOCHER, V. et al. PPAR α and PPAR γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. **Nature Medicine**. v. 7 (1) p. 53-58, 2001.

CLINTON, S. K.; UNDERWOOD, R.; HAYES, L. et al. Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. **Am J Pathol**. v. 140, p. 301-316, 1992.

COLLINS, A. R.; MEEHAN, W. P.; KINTSCHER, U. et al. Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic lesions in diabetic and nondiabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice. **Arterioscler Throm Vasc Biol.** v. 21, p. 365-371, 2001.

CORRADO, E.; NOVO, S. Role of inflammation and infection in vascular disease. **Acta Chir Belg.** v. 105, p. 567-579, 2005

CYBULSKY, M. I.; IYAMA, K.; LI, H. et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. **J Clin Invest.** v. 107, p. 1255-1262, 2001.

DAVIGNON, J.; GANZ, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation.** v. 109, suppl III, p. III-27-III-32, 2004.

DAY, C. Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. **Diabet Med.** v. 16 (3), p. 179-92, 1999.

DEVCHAND, P.; KELLER, H., PETERS, J. et al. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. **Nature.** v. 384, p. 39-43, 1996.

DIRENZO, J.; SODERSTROM, M.; KUROKAWA, R. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. **Molecular cell biology.** v. 17, p. 2166-2176, 1997.

DORMANDY, J. A.; CHARBONNEL, B.; ECKLAND, D. J. et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. **Lancet.** v. 366, p. 1279-1289, 2005.

ERHARDT, J. G.; LIM, S. S.; BODE, J. C. et al. A diet rich in fat and poor in dietary fiber increased the in vitro formation of reactive oxygen species in human feces. **Journal of Nutrition.** v. 127, p. 706-709, 1997.

EVANS, R. M.; BARISH, G. D.; WANG, Y. X. PPARs and the complex journey to obesity. **Nature Medicine.** v. 10 (4), p. 3551-361, 2004.

FAJAS L., AUBOEUF D., RASPÉ E., et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR-gamma gene. **J Biol Chem.** v. 272, p. 18779-18789, 1997.

FAJAS L.; FRUCHART J. C.; AUVERX J. PPAR-gamma3 mRNA: a distinct PPAR-gamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. **FEBS Lett.** v. 438, p. 55-60, 1998.

FEIGE, J. N.; GELMAN, L.; MICHALIN, L. et al. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. **Prog Lipid Res.** v. 45 (2), p. 120-159, 2006.

FLORENCIO, M. S. et al. The effects of diethylcarbamazine on ultrastructure of lung cells in vivo. **Tissue and Cell.** v. 37, p. 241-246, 2005.

FORMAN, B. M.; CHEN, J.; EVANS, R. M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . **Proc. Natl Acad. Sci.** v. 94, p. 4312–4317, 1997.

FRANCA, E.; ALVES, J. G. B. Dislipidemia entre crianças e adolescentes de Pernambuco. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia.** v. 87, p. 722-727, 2006.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of Low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without Use of the preparative Ultracentrifuge. **Clinical Chemistry.** v. 18 (6), p. 499-502, 1972.

GAME, B.A.; HE, L.; JARIDO, V. et al. Pioglitazone inhibits connective tissue growth factor expression in advanced atherosclerotic plaques in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Atherosclerosis.** v. 192, p. 85-91, 2007.

GLASS, C. K; WITZTUM, J. L. Atherosclerosis: the road ahead. **Cell.** v. 04, p. 503–16, 2001.

GRAHAM, T. L.; MOOKHERJEE, C.; SUCKLING, K. E. et al. The PPARdelta agonist GW0742X reduces atherosclerosis in LDLR(–/–) mice. **Atherosclerosis.** v. 181. p. 29–37, 2005.

GREENE M. E.; BLUMBERG B.; MCBRIDE O. W. et al. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. **Gene Expr.** v. 4, p. 281–299, 1995.

GRIMALDI, P. A. Regulatory functions of PPAR β in metabolism: implications for the treatment of metabolic syndrome. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids** v. 1771, p. 983-990, 2007

GRONEMEYER H.; GUSTAFSSON J.A.; LAUDET V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. **Nature Reviews Drug Discovery.** v. 3 (11) p. 950-964, 2004.

GROSS, B.; STAELS, B. PPAR agonists: multimodal drugs for the treatment of type-2 diabetes. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism** v. 21 (4), p. 687–710, 2007.

GU, L.; OKADA, Y.; CLINTON, S. K. et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. **Mol Cell.** v. 2, p. 275-281, 1998.

GUO, L.; ZHANG, L.; YONGMING, S. et al. Differences in hepatotoxicity and gene expression profiles by anti-diabetic PPAR- γ agonists on rat primary hepatocytes and human HepG2 cells. **Molecular Diversity.** v. 10, p. 349-360, 2006.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N. Engl. J. Med.** v. 352, p. 1685–1695, 2005.

HANSSON, G. K.; LIBBY, P. The immune response in atherosclerosis: a Double-edged sword. **Nat Rev Immunol.** v. 6, p. 508-519, 2006.

HARTVIGSEN, K.; BINDER, J. C. et al. A diet-induced hypercholesterolemic murine model to study atherogenesis without obesity and metabolic syndrome. **Arteriosclerosis, Thombosis, and vascular Biology**. v. 27, p. 878-855, 2007.

HEGELE R.A. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. **Nature reviews/Genetics**, v.10, p. 109-119, 2009.

HEIKKINEN, S.; AUWERX, J.; ARGMANN, C. A. PPAR- γ in human and mouse physiology. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1771, p. 999-1013, 2007.

HOFKER, M.H.; BREUER, M. Generation of transgenic mice. **Methodos in molecular biology**, v. 110, p. 63-78, 1998.

ISHIBASHI, S.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J.L. et al. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 92, p. 883-893, 1993.

ISHIGAKI, Y; OKA, Y; KATAGIRI, H. Circulating oxidized LDL: a biomarker and a pathogenic factor. **Curr Opin Lipidol**. v. 20 (5), p. 363-9, 2009.

ISHITANI, L. M. et al. Desigualdade social e mortalidade precoce por doenças cardiovasculares no Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v. 40, p. 684-691, 2006.

ISLEY, W.L., Hepatotoxicity of thiazolidinediones, **Expert. Opin. Drug Saf**. v. 2, p. 581–586, 2003.

ISSEMAN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**. v. 347, p. 645-9, 1990.

JAWIEN, J.; NASTALEK, P.; KORBUT R. Mouse models of experimental atherosclerosis. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.55, p. 503-517, 2004.

JIANG C, TING AT, SEED B. PPAR- γ agonists inhibit production of monocytes inflammatory cytokines. **Nature**. v. 391, p. 82 – 86, 1998.

KLIEWER, S. A., XU, H. E., LAMBERT, M. H., & WILLSON, T. M. Peroxisome proliferatoractivated receptors: from genes to physiology. **Recent Prog Horm Res**. V. 56, p. 239–263, 2001.

LANDMESSER, U.; HORNIG, B.; DREXLER, H. Endothelial Function: A critical determinant in atherosclerosis? **Circulation**. v. 109[suppl II], p. II-27-II-33, 2004.

LANGENFELD, M. R.; FORST, T.; HOHBERG, C. et al. Pioglitazone decreases carotid íntima-media thickness independently of glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: results from a controlled randomized study. **Circulation**. v. 111(19), p. 2525-31, 2005.

LAROSA, J. C.; GOTTO, A. M. JR. Past, present, and future standards for management of dyslipidemia. **Am J Med**. v. 116 (6a), p.3s-8s, 2004.

- LAUDET, V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. **Journal of Molecular Endocrinology**. v. 19, p. 207–226, 1997.
- LEE, C. H.; OLSON, P.; EVANS, R. M. Lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology*. v.144, p. 2201-7, 2003.
- LEE, S.K.; KIM, H. J.; KIM, J. W. et al. Steroid receptor coactivator-1 and its family members differentially regulate transactivation by the tumor suppressor protein p53. **Molecular endocrinology**. v. 13 (11), p. 1924-33, 1999.
- LEFEBVRE, P.; CHINETTI, G.; FRUCHART, J. C. et al. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. **Journal of clinical investigation**. v. 116 (3), p. 571-580, 2006.
- LEIBOWITZ, M. D.; FIEVET, C.; HENNUYER, N. et al. Activation of PPARdelta alters lipid metabolism in db/db mice. **FEBS Lett**. v. 473, p. 333–336, 2000.
- LI, A. C. ; BROWN, K. K.; SILVESTRE, M. J. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 106, p. 523-531, 2000.
- LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**. v. 420, p. 868-874, 2002.
- LOCK, E. A.; MITCHELL, A. M.; ELCOMBE, C. R. Biochemical mechanisms of induction of hepatic peroxisome proliferation. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. V. 29, p.145–163, 1989.
- LORENZO, C; OKOLOISE, M; WILLIAMS, K. et al. The metabolic syndrome as predictor of type 2 diabetes: the San Antonio Heart study. **Diabetes care**. v. 26 (11), p. 3153-9, 2003.
- LUSCHER, T. F, VANHOUTTE, P. M. The Endothelium: Modulator of Cardiovascular Function. Boca Raton. FL. CRC Press. 1990.
- MARX N, SCHONBECK U, LAZAR MA. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. **Circ Res**. v. 83, p. 1097– 1103, 1998.
- MATURANA, M. A.; IRIGOYEN, M. C.; SPRITZER, P M. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. **Clinics**. v. 62, p. 77-86, 2007.
- MINAMIKAWA, J.; TANAKA, S.; YAMAUCHI, M. et al. Potent inhibitory effects of troglitazone on carotid arterial wall thickness in type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 83, p. 1818-20, 1998.
- MINEO, C.; DEGUCHI, H.; GRIFFIN, J. H. et al. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. **Circ. Res**. v. 98, p. 1352-1364, 2006.
- MOURÃO, R.H.; SILVA, T. G.; SOARES, A. L et al. Synthesis and Biological Activity of Novel Acridinylidene and Benzylidene thiazolidinediones. **European Journal of medicinal chemistry**. v. 40, p. 1129-1133, 2005.

NADRA, K.; ANGHEL, S.I.; JOYE, E. et al. Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. **Mol. Cell. Biol.** v. 26, p. 3266–3281, 2006.

NASCIMENTO, A. S.; DIAS, S. M.; NUNES, F. M. et al. Structural Rearrangements in the Thyroid Hormone Receptor Hinge Domain and Their Putative Role in the Receptor Function. **Journal of Molecular Biology.** V. 360 n 03. P 586-598. 2006.

NISSEN, S. E.; WOLSKI, K. Effect of Rosiglitazone on the Risk of Myocardial Infarction and Death from Cardiovascular Causes. **N. Engl. J. Med.** v. 356 (24), p. 2457-2471, 2007.

OLIVER, W. R.; SHENK, J. L.; SNAIT, M. R. et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 98, p. 5306–5311, 2001.

PACKARD, R. R. S.; LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. **Clinical Chemistry.** v. 54 (1), p. 24-38, 2008.

PASCERI, V.; WU, H. D.; WILLERSON, J. T. Et al. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor- γ activators. **Circulation.** v. 101, p. 235 – 238, 2000.

RADER, D. J.; DAUGHERTY, A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. **Nature.** v. 451. p. 904-913, 2008.

REDDICK, R.L.; ZHANG, S.H.; MAEDA, N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesions development and progression. **Arteriosclerosis and Thrombosis.** v.14, p. 141-147, 1994.

ROBINSON, E.; GRIEVE, D. J. Significance of peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system in health and disease. **Pharmacology & Therapeutics.** v. 122, p. 246–263, 2009.

ROCHA, V.Z.; LIBBY, P. obesity, inflammation, and atherosclerosis. **Nature reviews Cardiology.** Advance online publication, www.nature.com/nrcardio. 2009

SCHOONJANS K.; PEINADO-ONSURBE, J.; LEFEBVRE, A. M. et al. PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. **EMBO J.** v. 15, p. 5336–5348, 1996.

SFEIR, Z.; IBRAHIMI, A.; AMRI, E. Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.** v. 57, p. 17-21. 1997.

SHAO, D.; LAZAR, M. A. Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. **Journal of clinical investigation.** v 103 (2), p. 1617-8, 1999.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. III Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia.** Volume 83 (Suplemento IV), 2004.

SONODA, J.; PEI, L.; EVANS, R. M. Nuclear Receptors: Decoding Metabolic Disease. *FEBS Lett.* v. 582(1), p. 2-9, 2008.

STAELS, B.; KOENIG, W.; HABIB, A. et al. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature.* v. 393, p. 790-793, 1998.

STARY, H. C. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* v. 20, p. 1177–1178, 2000.

SUNDEVOLD H.; LIEN S. Identification of a novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma promoter in man and transactivation by the nuclear receptor RORalpha1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 287. p. 383–390, 2001.

TANGIRALA, R. K.; RUBIN, E. M.; PALINSKI, W. Quantitation of atherosclerosis in murine models: Correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesion between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Lipids Research.* v. 36, p. 2320-28, 1995.

THOMPSON, G. R.; SOUTAR, A. K.; SPENGER, F. A. et al. Defects of receptor-mediated low density lipoprotein catabolism in homozygous familial hypercholesterolemia and hypothyroidism in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 78(4), p. 2591-2595, 1981.

TONTONOZ P.; HU E.; GRAVES R. A. et al. mPPAR γ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* v. 8, p. 1224–1234, 1994a.

TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* v. 79, p. 1147–1156, 1994b.

TONTONOZ P.; HU E.; DEVINE J. et al. PPAR γ 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase. *gene. Mol. Cell Biol.* v. 15, p. 351–357, 1995.

TONTONOZ, P.; NAGY, L.; ALVAREZ, J. G. et al. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell.* v. 93(2), p. 241-52, 1998.

VAMECQ, J.; DRAYE, J. P. Pathophysiology of peroxisomal beta-oxidation. *Essays Biochem.* v. 24, p. 115–225, 1989.

VENIANT, M. M.; WITHYCOMBE, S.; YOUNG, S. G. Lipoprotein size and atherosclerosis susceptibility in apoe(-/-) and Ldlr(-/-) mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* v. 21, p. 1567-1570, 2001.

VIDAL-PUIG, A. J.; CONSIDINE, R. V.; JIMENEZ-LIÑAN, M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues: effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *Journal of clinical investigation.* V. 99 (10), p. 2416-2422, 1997.

WATKINS, P.B.; WHITCOMB, R.W. Hepatic dysfunction associated with troglitazone. **N. Engl. J. Med.** v. 338, p. 916–917, 1998.

WEBER, C.; ZERNECKE, A.; LIBBY, P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. **Nature.** v. 8, p. 802-815, 2008.

WILLSON, T. M.; BROWN, P. J.; STERNBACH, D.D. et al. The PPARs: From Orphan Receptors to Drug Discovery. **Journal of medicinal chemistry.** v. 43, p. 527–550, 2000.

WURTZ, J. M.; BOURGUET, W.; RENAUD, J. P et al. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. **Nature Structural Biology.** v. 3. p 87 – 94, 1996.

YANG, W.; RACHEZ, C.; FREEDMAN, L. P. Discrete roles for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor in recruiting nuclear receptors coactivators. **Molecular cell biology.** v. 20, p. 8008-8017, 2000.

YKI-JARVINEN, H. Thiazolidinediones. **N. Engl J Med.** v.351 (11), p. 1106-18, 2004.

YU, S.; REDDY, K. J. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* V. 1771 (8), p 936-951, 2007.

ZHU Y.; ALVARES K.; HUANG Q. et al. Cloning of a new member of the peroxisome proliferator- activated receptor gene family from mouse liver. **J. Biol. Chem.** v. 268, p. 26817–26820, 1993.

ZHU, Y.; QI, C.; KORENBERG, J. R. et al. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR-gamma) gene: Alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR-gamma isoforms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 92, p. 7921–7925, 1995.

ZIELENIAK, A.; WÓJCIK, M.; WOŹNIAK, L. A. Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor γ . **Arch. Immunol. Ther. Exp.** V. 56, P. 331–345. 2008.

Capítulo 2

**EFFECT OF NEW THIAZOLIDINE DERIVATIVES ON
ATHEROSCLEROTIC LESIONS IN LDL RECEPTOR-DEFICIENT
MICE**

Artigo a ser submetido à revista: METABOLISM

Effect of New Thiazolidine Derivatives on Atherosclerotic Lesions in LDL
receptor-deficient mice

Amanda K. S. e Silva^{a,*}, Dilênia O. C. Torres^{a,b}, Ana Célia O Santos^d, Maria Do Carmo A. de
Lima^e, Suely L. Galdino^e, Ivan da R. Pitta^e, Christina A. Peixoto^{a,c}

^a*Laboratório de Ultraestrutura, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (FIOCRUZ),*

^b*Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Pernambuco,*

^c*Laboratório de Microscopia de Microanálise, Centro de Tecnologia Estratégicas do
Nordeste,*

^d*Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco,*

^e*Laboratório de planejamento e síntese de fármacos, Universidade federal de Pernambuco,
Recife, Brazil*

*Mailing address: Dr^a. Christina A. Peixoto, Laboratório de Ultraestrutura, Centro de
Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Recife, Brasil. CEP 50670-
420. Fax number: (55) 81 21012557. Email: Peixoto.christina@gmail.com

Acknowledgements: This study was supported by the Brazilian fostering agencies Conselho
Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a
Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Fundação Oswaldo Cruz
(FIOCRUZ) and Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

Abstract

Atherosclerotic cardiovascular disease is a chronic inflammatory condition. Individuals with diabetes have a greater disposition toward developing atherosclerosis. Thiazolidinediones (TZDs) are used to enhance sensitivity to insulin and have demonstrated a protective effect over a variety of cardiovascular markers and risk factors. Lines of research have invested in the search for new molecules in order to obtain more selective and less harmful treatment alternatives for the pathogenesis of atherosclerosis and its risk factors. The aim of the present study was to assess the action of two new thiazolidine derivatives (LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16) regarding the atherosclerotic process in LDL receptor-deficient mice. Animals were fed a diet rich in fat for 10 weeks. In the last two weeks of the experimental diet, animals received either Pioglitazone, LPSF/GQ-02 or LPSF/GQ-16 daily through gavage. At the end of the treatment, blood was collected for biochemical analysis and the aortas were dissected for subsequent morphometric and ultrastructural analyses. No changes in the blood lipid profile were found following the use of the drugs in comparison to the control. However, the new thiazolidine derivatives were more efficient in improving insulin resistance in comparison to pioglitazone and the control group. Morphometric analyses revealed that neither pioglitazone nor LPSF/GQ-16 led to satisfactory effects over atherosclerosis. However, LPSF/GQ-02 led to a reduction in aorta thickness and area of the atherosclerotic lesions. Ultrastructural analyses revealed extensive degeneration of the endothelium and an increase in apoptotic cells in the subendothelial space following the use of pioglitazone. LPSF/GQ-16 caused considerable degeneration of the endothelium and destruction of the endothelial space. However, LPSF/GQ-02 caused minimal cell alterations in the aortic endothelium. In conclusion, the results suggest that the new thiazolidine derivative LPSF/GQ-02 is a promising candidate for the treatment of atherosclerosis.

Introduction

Atherosclerosis is a progressive inflammatory disease characterized by hardening of the arteries due mainly to the depositing of lipids and fibrous elements, which form atherosclerotic plaque [1]. Atherosclerosis is recognized as one of the main complications of diabetes and is considered the number one cause of death among diabetic individuals [2]. Moreover, patients considered pre-diabetic, with insulin resistance, are at high risk for the development of atherosclerosis [3].

Thiazolidinediones (TZDs) have been used extensively to enhance the sensitivity to insulin in patients with type 2 diabetes mellitus. These drugs are synthetic ligands of the γ receptor activated by peroxisome proliferators (PPAR γ). PPAR γ is a transcription factor dependent on the presence of ligands that act on the regulation of target genes [4]. After the binding of a particular ligand, whether natural or synthetic, this receptor forms a heterodimer with another nuclear receptor – the retinoid X receptor (RXR) – and the PPAR γ /RXR complex binds to responsive elements of the PPARs in the regulatory site of the target genes, thereby modulating their transcription [5]. PPAR γ is highly expressed in fat tissue and is considered indispensable to the differentiation of adipocytes. However, its expression is also seen in the cell types that make up atherosclerotic lesions, such as endothelial cells, monocytes/macrophages and smooth muscle cells [6]. Thus, evidence has indicated that in addition to their anti-diabetic activity, TZDs also exhibit anti-atherosclerotic activity and their anti-atherogenic activity has been suggested through studies with animal models [6,7] as well as clinical trials involving patients with type 2 diabetes [8,9].

Studies involving patients with cardiovascular disease without the presence of diabetes have also demonstrated the beneficial effects of TZDs, as treatment with these molecules has been associated to a reduction in risk factors, such as carotid intima media thickness [10], and a reduction in markers of cardiovascular disease, including C-reactive protein and vascular cell adhesion molecule 1 [11]. In some cases, however, TZDs lead to weight gain, edema and hepatotoxicity [12,13]. Moreover, recent data indicate that the two synthetic ligands of PPAR γ (rosiglitazone and pioglitazone) have conflicting cardiovascular effects. In a recent meta-analysis, treatment with rosiglitazone was associated to an increased risk of myocardial infarction and mortality due to cardiovascular causes [14]. In contrast, the PROactive study reports that treatment with pioglitazone was associated to a 16% reduction in the combined risk of acute myocardial infarction, stroke and mortality among diabetic patients at high

cardiovascular risk [15]. The harmful effects of rosiglitazone may be specific to this molecule rather than representing an effect of the drug class. However, the determinant mechanisms of the increase in cardiovascular risk associated to TZDs remain unknown.

Lines of research have investing in the search for new molecules in order to obtain more selective and less harmful treatment alternatives for the pathogenesis of atherosclerosis and its risk factors. The aim of the present study was to assess the action of two new thiazolidine derivatives (LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16) regarding the atherosclerotic process in LDL receptor-deficient (LDLR^{-/-}) mice fed a diet rich in fat.

Methods

Synthesis of thiazolidine derivatives LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16

LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16, respectively representing the compounds 5-(4-chloro-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione and 5-(4-bromo-2-methoxy-benzylidene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (Figure 1), were synthesized at the Department of Antibiotics of the *Universidade Federal de Pernambuco* (Brazil) following the methodology described by Mourão et al. (2005) [16].

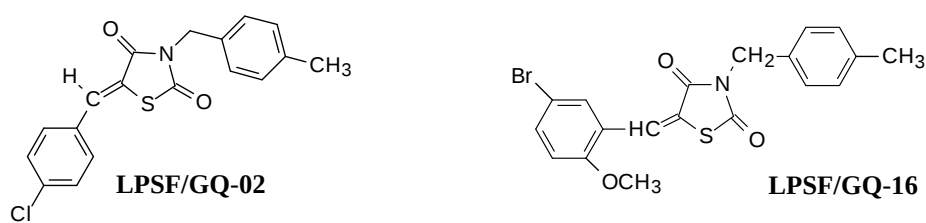


Figure 1: Chemical structure of new thiazolidine derivatives LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16

Study design

All procedures were carried out with the approval of the ethics committee (L-010/09 CEUA-FIOCRUZ). Thirty-two mice 30 days old, weighting approximately 17 g and homozygous for the absence of the LDL receptor ($LDLR^{-/-}$) gene generated on the C57Bl6/J background were used. This type of mouse is a commonly used murine model of hypercholesterolemia and atherogenesis, as the plasma cholesterol level in young $LDLR^{-/-}$ mice on regular chow is twice as high as that in C57BL/6 mice [17]. Animals were examined with regard to health status and acclimatized under a controlled light cycle (12 h of light and 12 h of darkness) at a constant temperature of $22 \pm 1^\circ$ C. During the eight-day adaptation period, the mice receive a standard laboratory chow with a 4% fat content. The mice were then fed a diet rich in fat (21% milk fat + 1.25% cholesterol) for ten weeks. In the last two weeks of the experimental diet, the animals were divided into four groups (n=8 in each group): control; pioglitazone (Actos) at 20 mg/kg/day [18]; LPSF/GQ-02 at 30 mg/Kg/day

[16]; and LPSF/GQ-16 at 30 mg/Kg/day [16]. Drugs were administered daily through gavage. The animals were weighted on a weekly basis throughout the ten weeks of the experiment for the assessment of weight evolution. At the end of the treatment, mice were anesthetized with ketamine (115 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Blood was collected (heart puncture) in a tube without anti-coagulant, centrifuged and the serum was separated and stored at -20° C for biochemical analysis. The aorta connected to the heart was rapidly dissected and fixed for optical microscopy and transmission electron microscopy.

Biochemical determinations

Serum levels of alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL) and triglycerides (TG) were determined photometrically in the Cobas Integra 400 automatic analyzer (Roche, Mannheim, Germany), using Roche kits. Low-density lipoprotein (LDL) and very low-density lipoprotein (VLDL) were determined using the Friedewald equation [19].

Oral test of glucose tolerance

Four days prior to sacrifice, the animals were fasted for four hours and then received a 20% glucose solution (0.75 mg/g of body weight) through gavage. Blood samples were taken from the tail at 0, 15, 30, 60 and 90 minutes. The glucose levels were immediately quantified in 2 µl of blood using a blood sugar meter (Accu-Chek® Active - Roche) [7].

Optical microscopy

The lower half of the heart to the descending aorta was carefully dissected, fixed in 10% formalin for 24 hours, processed and embedded in paraffin. Morphometric measurements of the ascending aortic wall thickness were performed using an adaptation of the method described by Aguila & Mandarim-de-Lacerda (2003) [20]. Ten histological cuts from a randomly chosen animal were used to determine the thickness of the artery wall from the mean measurement of four diametrically opposed points (0°, 90°, 180° and 270°) with the aid of an inverted microscope (Observer Z1, Zeiss MicroImaging GmbH) at a magnification of 10x, equipped with a camera (AxioCam MRm Zeiss) and coupled to the Axio Release 4.7.4 image analysis program (Zeiss). The same cuts were used to determine the area of the

atherosclerotic lesions using an adaptation of the method described by Tangirala et al. (1995) [21]. The delimitation between the intima and media was easily distinguished on the slides stained with hematoxylin and eosin (HE) and the drawing for delimiting the area of the atherosclerotic lesions was performed manually.

Transmission electron microscopy

Three to four animals were analyzed from each group. The aorta connected to the heart was fixed overnight in a solution containing 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. After fixation, the samples were washed three times in the same buffer, post-fixed in a solution of 1% osmium tetroxide, 5 nM calcium chloride and 0.8% potassium ferricyanide in a 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, contrasted *en bloc* with 2.5% uranyl acetate in distilled water, dehydrated in acetone and embedded in Epon 812 resin (Sigma Company, St Louis, MO, USA). Polymerization was performed at 60° C for two days. Ultra-thin cuts (70 nm) were then obtained with an ultra-microtome and collected in nickel grids with 300 mesh. Contrasting of the cuts was performed with 5% uranyl acetate and 1% lead citrate. The samples were examined in a Morgani 268D-FEI transmission electron microscope.

Statistical analysis

For the analysis of the biochemical parameters and thickness of the arterial wall in the different treatments, Bartlett's test was used to determine the homoscedasticity of the data. Differences between treatments were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's *post hoc* test. Analysis of the atherosclerotic lesion area was performed using non-parametric ANOVA (Kruskal-Wallis) and Dunn's *post hoc* test. For the oral glucose-tolerance test, the significance of the regressions and difference in the slope between regressions were analyzed using the Student's t-test.

Results

Effect of pioglitazone and new thiazolidine derivatives LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16 on body weight, biochemical blood parameters and glucose homeostasis in LDLR^{-/-} mice

No significant differences were found between the treated groups and control group with regard to body weight evolution (data not shown). Regarding serum lipids, no significant differences were found between the treated groups and control group in TC ($F_{(4,25)} = 0.80378$, $p = 0.53435$), TG ($F_{(4,25)} = 1.9184$, $p = 0.13861$), VLDL ($F_{(4,25)} = 1.9025$, $p = 0.14136$), HDL ($p > 0.05$) or LDL ($p > 0.05$). However, the serum concentration of HDL in the group treated with pioglitazone was significantly higher than that in the group treated with LPSF/GQ-16 ($F_{(4,24)} = 3.813$, $p = 0.015$; Tukey $p < 0.05$) and the LDL in the group treated with LPSF/GQ-16 was significantly higher than that in the group treated with LPSF/GQ-02 ($F_{(4,24)} = 3.067$, $p = 0.035$; Tukey $p < 0.05$). There were no significant differences between groups regarding the ALT level ($F_{(4,25)} = 0.68026$, $p = 0.61213$) (Table 1).

In the analysis of the oral glucose-tolerance test, the logarithmic regressions were compared, revealing significant differences between all treatments. The groups treated with LPSF/GQ-16 and LPSF/GQ-02 underwent a more accentuated decreased in glucose, 45.63 mg/dL and 40.32 mg/dL, respectively, for each ln of minute elapsed since the administration of the glucose. The control group and group treated with pioglitazone underwent a lesser decreased in glucose, dropping 17.86 mg/dL and 32.15 mg/dL for each ln of minute, respectively (Table 2).

Optical microscopy

The aortas from the control group exhibited innumerable macrophages in the subendothelial space, containing lipid droplets in their interior characterizing foamy cells (Fig. 1A). In the tunic media, smooth muscle cells exhibited a change in shape, going from a concentric circular configuration to a more radial shape (Fig. 1A). Similar characteristics were seen in the groups treated with pioglitazone (Fig. 1B) and LPSF/GQ-16 (Fig. 1C). In the group treated with LPSF/GQ-02, there were a smaller number of foamy cells in the subendothelial space, with the preservation of the tunic media (Fig. 1D).

In the morphometric analysis of aorta thickness, the group treated with pioglitazone had lesser wall thickness in comparison to the control group. The group treated with LPSF/GQ-16 had the greatest aortic wall thickness of all the groups, whereas group treated with LPSF/GQ-02 had the least aortic wall thickness of all the groups (Table 3). Regarding the area of the atherosclerotic lesions, the group treated with pioglitazone had a larger lesion area than that of the control group. The group treated with LPSF/GQ-16 had the largest lesion area of all the groups, whereas group treated with LPSF/GQ-02 had the minor lesion area of all the groups (Table 3).

Transmission electron microscopy

The endothelial cells from the control group exhibited innumerable alterations, such as an indented nucleus and destruction of the cytoplasm, with numerous vacuoles. Some regions of the elastic subendothelial lamina exhibited interruptions (Fig. 2A), with a characteristic buildup of foamy cells in the subendothelial space (Fig. 2B). The endothelial cells from the group treated with pioglitazone exhibited similar ultrastructural alterations. However, numerous cells in the subendothelial space were undergoing a process of apoptosis (Fig. 2C) and some foamy cells also exhibited apoptotic characteristics, such as the presence of apoptotic bodies and vesiculated cytoplasm (Fig. 2D). The group treated with LPSF/GQ-16 exhibited similar ultrastructural alterations, but of a greater intensity. Complete cell destruction occurred in the subendothelial space, along with the presence of inflammatory cells (Fig. 2E). Interestingly, the group treated with LPSF/GQ-02 exhibited minimal endothelial cell alterations, such as the presence of small vacuoles. The elastic lamina and myointimal cells were intact (Fig. 2F). Characteristic foamy cells were found in the groups treated with LPSF/GQ-16 and LPSF/GQ-02 (data not shown).

Discussion

Thiazolidinediones (TZDs) are a class of oral anti-diabetic drugs used primarily for the treatment of type 2 diabetes mellitus. TZDs reduce glucose levels in the blood by enhancing the sensitivity to insulin in peripheral tissues through the activation of PPAR γ [22]. When activated, PPAR γ regulates the transcription of genes responsive to insulin, which control the metabolism of both glucose and lipids [23]. Therefore, a number of studies have indicated that, along with its anti-diabetic action, this class of molecules also has anti-atherosclerotic effects [6], acting on crucial stages of the formation of atherosclerotic plaque, such as in the recruitment of monocytes [24], formation of foamy cells [25], reverse transport of cholesterol [26] and plaque stability [27]. Thus, the present study assessed the effects of the new thiazolidine derivatives LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16 on the atherosclerotic process in LDLR^{-/-} mice fed a diet rich in fat.

Disturbances in the lipid profile, such as an increase in triglycerides and LDL and a reduction in HDL, are associated to the development and progression of atherosclerosis [28]. Li et al. (2000) found that the use of the PPAR γ antagonists rosiglitazone and GW7845 in LDLR^{-/-} mice for two to ten weeks induced similar effects, diminishing the atherosclerotic lesions, but without improving the lipid profile [7]. Likewise, the administration of pioglitazone and the thiazolidine derivatives LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16 to LDLR^{-/-} mice for two weeks in the present study did not improve the lipid profile in relation to the control group. However, the group that received LPSF/GQ-16 had a higher LDL in relation to the group treated with LPSF/GQ-02 and the group treated with pioglitazone had a higher HDL in relation to the group treated with LPSF/GQ-16. These findings are interesting, as the PPAR γ antagonists (TZDs) do not have favorable effects on the lipid profile and are not considered a lipid-lowering class of drugs [6,18].

Troglitazone was the first TZD developed for the treatment of type 2 diabetes mellitus. However, its use was associated to severe liver failure and it was taken off the market [29]. According to Agarwal et al. (2010), ALT levels are important to the identification of hepatotoxic events related to the use of drugs [30]. In the present study, no significant changes in serum ALT levels occurred in the animals that received pioglitazone, LPSF/GQ-02 or LPSF/GQ-16, thereby indicating that the new thiazolidine derivatives LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16 do not have hepatotoxic effects.

Patients with diabetes have an increased risk of mortality, particularly due to cardiovascular disease, which accounts for more than 50% of deaths in this population [31]. Insulin resistance is a key dysfunction in the development and progression of type 2 diabetes mellitus [32]. Unlike other oral anti-diabetic agents, TZDs are the only drugs that increase the uptake of insulin-mediated glucose in skeletal muscle, suppress the production of hepatic glucose and improve the secretion of insulin in β cells of the pancreas [33]. In the present study, the animals treated with the new thiazolidine derivatives LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16 achieved a more accentuated decreased in glucose levels in comparison to the group treated with pioglitazone and the control group, suggesting a greater beneficial effect on insulin resistance, with possible protective cardiovascular effects.

The effects of PPAR γ ligands on the development and progression of atherosclerosis in animal models have been assessed by many researchers (6,34). The development of atherosclerotic lesions stems from endothelial injury and dysfunction triggered by cardiovascular risk factors. This injury facilitates the recruitment of circulating lipoproteins to within the arterial wall, where they are oxidized and consequently induce a chronic inflammatory response characterized by the appearance of inflammatory cells, including monocytes. The local production of cytokines increases the migration of monocytes/macrophages, which begin to capture oxidized lipoproteins, forming foamy cells and thereby constituting fatty streaks. Over time, smooth muscle cells migrate from the media chamber to the intima, where they proliferate, resulting in intimal hyperplasia and the formation of fibroproliferative lesions, which can rupture and lead to clinical events such as myocardial infarction or stroke [35].

TZDs and other PPAR γ activators are negative regulators of macrophages activation and antagonize the activity of pro-inflammatory transcription factors, such as nuclear factor Kappa β , signal transducers and activators of transcription and activator protein 1 [36]. Pioglitazone is able to reduce the proliferation and migration of monocytes, as it inhibits the expression of monocyte chemotactic protein 1 and its receptor CCR2 [37,38]. Imamoto et al. (2003) demonstrated that the *in vitro* use of pioglitazone on human umbilical vein endothelial cells activated by interleukin 1 β is able to inhibit the expression of vascular cell adhesion molecule, but without having any effect over intercellular adhesion molecule 1 and E-selectin, which are involved in the adhesion of monocytes to the vascular wall [39].

In contrast, using E2-KI mice that express human apolipoprotein E2 in place of mouse ApoE and develop atherosclerotic lesions nearly exclusively with the presence of foamy cells, Hennuyer et al. (2005) found that pioglitazone and rosiglitazone administrated for 10 weeks

improved glucose homeostasis, but were not capable of reducing the area of atherosclerotic lesions; the authors attributed this lack of effect to the animal model employed [40]. Likewise, the morphometric analyses performed in the present study revealed that pioglitazone was not capable of reducing the thickness of the aorta or atherosclerotic lesions area in LDLR^{-/-} mice. Regarding the new thiazolidine derivatives, LPSF/GQ-16 increased aortic thickness and the area of the lesions, thereby demonstrating no beneficial effects on atherosclerosis, whereas LPSF/GQ-02 reverted the alterations caused by the fat-rich diet, reducing both the thickness of the aorta and area of the atherosclerotic lesions.

The mechanisms that could explain the different effects of pioglitazone on the development of atherosclerotic lesions remain unclear. It is possible that such divergences in the results obtained in different studies are due to the different experimental models and methodologies employed. Regarding the new thiazolidine derivatives LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16, opposite results were found with the use of these two agents. Among the methods for the obtainment of new drugs, bioisosterism analyzes the influence of changing an atom or group of atoms regarding the biological activity of the original drug, the result of which may be identical to, more effective than or even antagonistic to the original drug [41]. Thus, the divergent results obtained with the use of the thiazolidine derivatives LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16 may be related to the different atoms inserted in these two molecules.

With advanced atherosclerotic lesions, there is an increase in macrophage apoptosis, which can lead to necrosis, with the rupture of the plaque and subsequent acute thrombosis. The main mechanism involved in the death of macrophages in advanced lesions is related to an excess of non-esterified intracellular cholesterol stemming from atherogenic lipoproteins [42]. After inducing advanced atherosclerotic lesions in LDLR^{-/-} mice, Thorp et al. (2007) administered pioglitazone for 10 weeks and found an increase in apoptosis with substantial necrosis and no change in the area of the atherosclerotic lesions [43]. Although the present study was carried out inducing initial atherosclerotic lesions in the mice, the ultrastructural analysis revealed an increase in the number of apoptotic cells in the group treated with pioglitazone. The analysis also revealed that LPSF/GQ-16 induced an increase in endothelial lesions and subendothelial space in comparison to the control group, whereas LPSF/GQ-02 reduced the damage caused by the fat-rich diet, with minimal alterations in the endothelium and subendothelial space.

In conclusion, the results of the present study demonstrate that the new thiazolidine derivative LPSF/GQ-02 improved insulin resistance, reduced the area of the atherosclerotic

lesions and offered a protective effect for the endothelium. LPSE/GQ-02 is therefore a promising candidate for the treatment of atherosclerosis.

References

- [1] Yang X, Peterson L, Thieringer R. Identification and validation of genes affecting aortic lesions in mice. *J Clin Invest* 2010;120:2414-2422.
- [2] Mukamal KJ, Nesto RW, Cohen MC, et al. Impact of diabetes on long-term survival after acute myocardial infarction: comparability of risk with prior myocardial infarction. *Diab care* 2001;24:1422–1427.
- [3] Howard G, O’leary DH, Zaccaro D, et al. Insulin sensitivity and atherosclerosis: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Investigators. *Circulation* 1996;93: 1809–1817.
- [4] Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N. Engl J Med* 2004;351(11):1106-18.
- [5] Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, et al. The PPARs: From Orphan Receptors to Drug Discovery. *J med chem* 2000;43:527–550.
- [6] Collins AR, Meehan WP, Kintscher U, et al. Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic lesions in diabetic and nondiabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Throm Vasc Biol* 2001;21:365-371.
- [7] Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 2000;106:523-531.
- [8] Minamikawa J, Tanaka S, Yamauchi M, et al. Potent inhibitory effects of troglitazone on carotid arterial wall thickness in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1818-20.
- [9] Langenfeld MR, Forst T, Hohberg C, et al. Pioglitazone decreases carotid intima-media thickness independently of glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: results from a controlled randomized study. *Circulation* 2005;111(19):2525-31.
- [10] Sidhu JS, Kaposzta Z, Markus HS, et al. Effect of rosiglitazone on common carotid intima-media thickness progression in coronary artery disease patients without diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(5):930–4.
- [11] Sidhu JS, Cowan D, Kaski JC. Effects of rosiglitazone on endothelial function in men with coronary artery disease without diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2004; 94(2):151–6.
- [12] Wang CH, Weisel RD, Liu PP, et al. Glitazones and heart failure: Critical appraisal for the clinician. *Circulation* 2003;107:1350-1354.
- [13] Scheen AJ. Thiazolidinediones and liver toxicity. *Diabetes Metab* 2001;27:305-313.
- [14] Nissen SE, Wolski K. Effect of Rosiglitazone on the Risk of Myocardial Infarction and Death from Cardiovascular Causes. *N Engl J Med* 2007;356(24):2457-2471.

- [15] Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet* 2005;366:1279-1289.
- [16] Mourão RH, Silva TG, Soares AL, et al. Synthesis and Biological Activity of Novel Acridinylidene and Benzylidene thiazolidinediones. *Eur J Med Chem* 2005;40:129-1133.
- [17] Napoli C, Nigris F, Welch JS, et al. Maternal Hypercholesterolemia During Pregnancy Promotes Early Atherogenesis in LDL Receptor-Deficient Mice and Alters Aortic Gene Expression Determined by Microarray. *Circulation* 2002;105:1360-1367.
- [18] Game BA, He L, Jarido V, et al. Pioglitazone inhibits connective tissue growth factor expression in advanced atherosclerotic plaques in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Atherosclerosis* 2007;192:85-91.
- [19] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of Low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without Use of the preparative Ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18(6):499-502.
- [20] Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Aorta wall quantitative alterations due to different long-term high-fat diet in rats. *Food Chem Toxicol* 2003;41:1391-97.
- [21] Tangirala RK, Rubin EM, palinski W. Quantitation of atherosclerosis in murine models: Correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesion between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res* 1995;36:2320-28.
- [22] Day C. Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabet Med* 1999;16(3):179-92.
- [23] Hseuh WA, Jackson S, Law, RE. Control of cardiovascular cell proliferation and migration by PPAR γ , a new approach to the macrovascular complications of diabetes. *Diab care* 2001;24:392-397.
- [24] Kintscher U, Goetze S, Wakino S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor and retinoid X receptor ligands inhibit monocytes chemotactic protein-1-direct migration of monocytes. *Eur J Pharmacol* 2000;401(3):259-270.
- [25] Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, et al. PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998;93(2):241-52.
- [26] Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, et al. PPAR α and PPAR γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nature Med* 2001;7(1):53-58.
- [27] Marx N, Schönbeck U, Lazar MA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998;83(11):1097-103.

- [28] Rizzo M, Kotur-Stevuljevic J, Berneis K. et al. Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress:a new look. *Transl Res* 2009;153:217–223.
- [29] Saha S, New LS, Ho H. K. Investigation of the role of the thiazolidinedione ring of troglitazone in inducing hepatotoxicity. *Toxicol Letters* 2010;192:141–149.
- [30] Agarwal VK, Mchutchison JG, Hoofnagle JH. Important Elements for the Diagnosis of Drug-Induced Liver Injury. *Clin gastroenterol hepatol* 2010;8:463–470.
- [31] Pyrola K, Pedersen TR, Kjekshus J, et al. Cholesterol lowering with simvastatin improves prognosis of diabetic patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Diab Care* 1997;20(4): 614-620.
- [32] Defronzo RA. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus [Banting Lecture]. *Diabetes* 2009;58:773-795.
- [33] Camp HS. Thiazolidinediones in diabetes: current status and future outlook. *Curr Opin in Investig Drugs* 2003;4:406-11.
- [34] Kalkin AC, Josephine MF, Craig M, et al. Rosiglitazone Attenuates Atherosclerosis in a Model of Insulin Insufficiency Independent of Its Metabolic Effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1903-1909.
- [35] Weber C, Zernecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nature* 2008;8:802-815.
- [36] Ricote M, Li AC, Willson TM, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998;391: 79-82, 1998.
- [37] Ishibashi M, Egashira K, Hiasa K, et al. Antiinflammatory and antiarteriosclerotic effects of pioglitazone. *Hypertension* 2002;40(5):687-93.
- [38] Joner M, Farb A, Cheng Q, et al. Pioglitazone inhibits in-stent restenosis in atherosclerotic rabbits by targeting transforming growth factor-beta and MCP-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(1):182-9.
- [39] Imamoto E, Yoshida N, Uchiyama K. et al. Inhibitory effect of pioglitazone on expression of adhesion molecules on neutrophils and endothelial cells. *Biofactors* 2004;20(1):37-47.
- [40] Hennuyer N, Tailleux A, Torpier G, et al. PPAR α , but not PPAR γ , Activators Decrease Macrophage-Laden Atherosclerotic Lesions in a Nondiabetic Mouse Model of Mixed Dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1897-1902.
- [41] Kier LB, Hall LH. Bioisosterism: Quantitation of Structure and Property Effects. *Chem biodiv* 2004;1:138-151.
- [42] Tabas I. Consequences and Therapeutic Implications of Macrophage Apoptosis in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2255-2264.

[43] Thorp E, Kuriakose G, Shah YM, et al. Pioglitazone Increases Macrophage Apoptosis and Plaque Necrosis in Advanced Atherosclerotic Lesions of Nondiabetic Low-Density Lipoprotein Receptor–Null Mice. *Circulation* 2007;116:2182-2190.

Table 1 – Effect of treatment with pioglitazone and new thiazolidine derivatives LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16 on biochemical blood parameters in LDLR^{-/-} mice

Parameters	Control	Pioglitazone	LPSF/GQ-02	LPSF/GQ-16
TC (mg dL ⁻¹)	1163.3±338.5	1223.7±200.5	1050.4±271.3	1322.2±468.9
LDL (mg/dL ⁻¹)	765.4±271.3	761.5±197.7	641.2±202.5 ^a	1183.2±528.2 ^b
HDL (mg/dL ⁻¹)	336.2±64.6	422.5±99.1 ^a	349.5±93.2	278.5±44.4 ^b
TG (mg dL ⁻¹)	307.2±88.5	313.5±72	244.6±65.8	454.5±227.6
VLDL (mg dL ⁻¹)	61.5±17.9	62.7±14.2	49±12.9	90.7±45.3
ALT (IU L ⁻¹)	31.6±13.6	34.7±9	31.2±9.3	26.3±2.7

Control – Diet rich in fat (21% milk fat + 1.25% cholesterol); values expressed as mean ± standard deviation; biochemical determinations performed with eight animals per group; TC – total cholesterol; LDL – low-density lipoprotein; HDL – high-density lipoprotein; TG – triglycerides; VLDL – very low-density lipoprotein; ALT – alanine aminotransferase; letters denote significant differences between treatments, $\alpha < 0.05$

Table 2 – Assessment of decreased in glucose level following use of pioglitazone, LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16 in *LDLR^{-/-}* mice

Parameters	Equation	a	b	r ²	p<
Control	$Y=a+b*\ln(X)$	227.17	- 17.86	0.418	0.007
Pioglitazone	$Y=a+b*\ln(X)$	286.43	-32.15	0.502	0.002
LPSF/GQ-02	$Y=a+b*\ln(X)$	313.65	-40.32	0.682	0.0002
LPSF/GQ-16	$Y=a+b*\ln(X)$	311.23	-45.63	0.674	0.0001

Control – Diet rich in fat (21% milk fat + 1.25% cholesterol); a = intercept; b = slope

Table 3 – Thickness of ascending aorta and area of atherosclerotic lesions following treatment with pioglitazone, LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16 in *LDLR^{-/-}* mice

Parameters	Control	Pioglitazone	LPSF/GQ-02	LPSF/GQ-16
Thickness (μm)	500.79±26.39 ^a	463.31±29.12 ^b	296.87±42.66 ^c	695.9±51.02 ^d
Lesion area (μm ²)	42933.62±22105.14 ^a	62700.38±7979.66 ^b	12372.27±1055.14 ^c	150041.2±7486.66 ^d

Significantly different thickness between treatments (ANOVA $F_{(3,31)} = 147.09$, $p <$

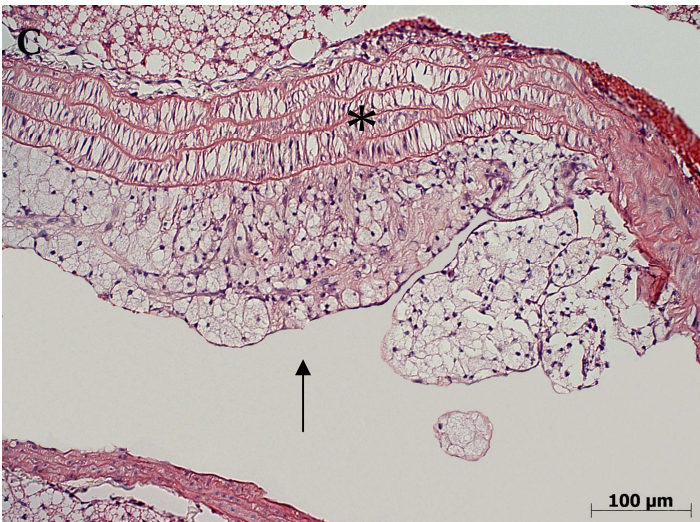
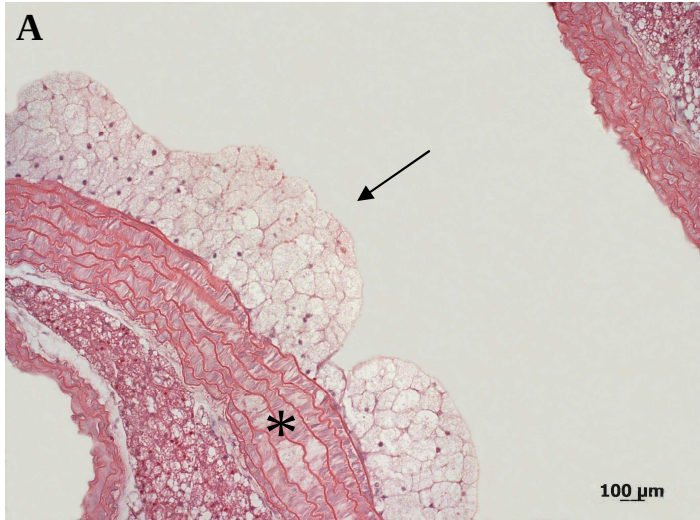
0.0001) Significantly different lesion area between treatments (ANOVA, $F_{(3,31)} = 150.81$,

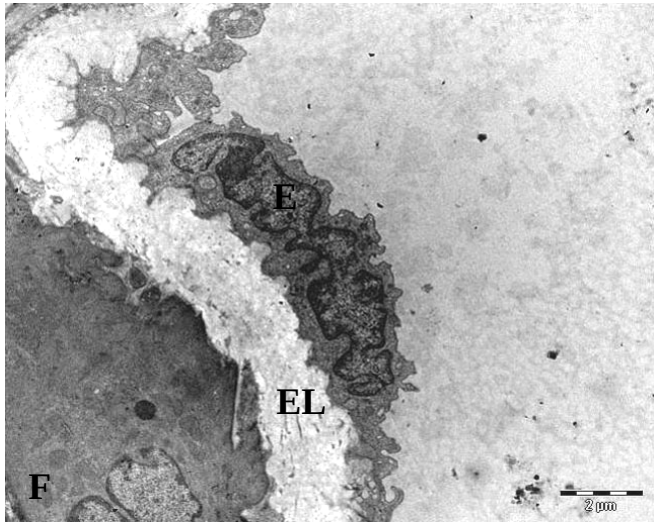
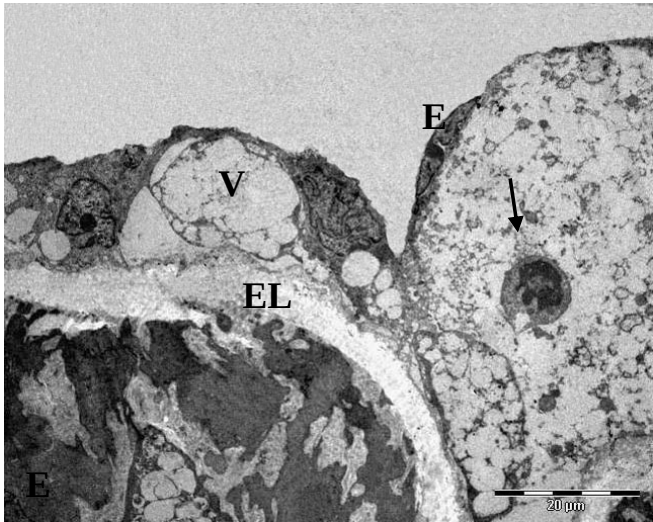
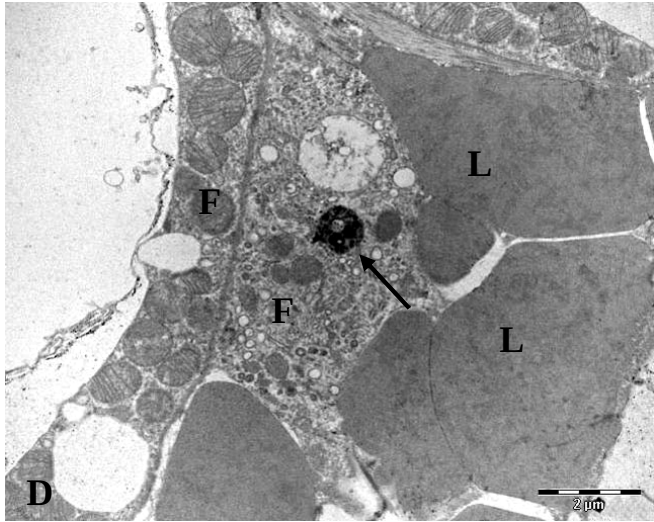
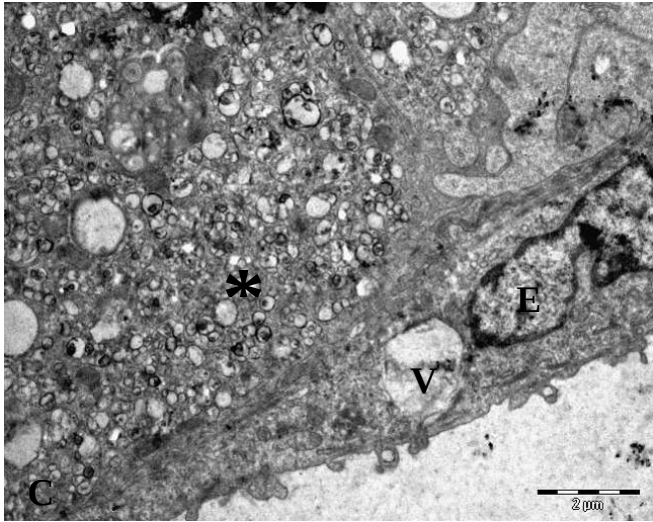
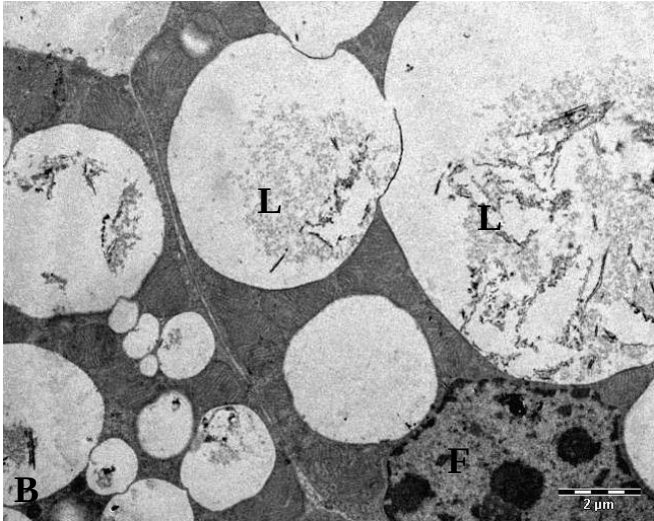
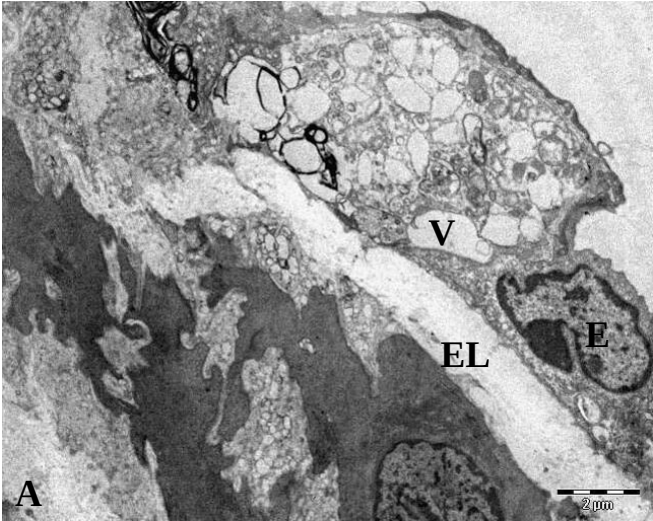
$p < 0.0001$) Letters denote significant differences between treatments, $\alpha < 0.05$

Figure Legends:

Figure 1 – Histological cuts of aorta with atherosclerotic lesions (A, B, C, D); Fig. 1 A – aorta of control group showing arterial wall thickness, with disorganization of smooth muscle cells (asterisk) and atherosclerotic lesions (arrow); treatment with pioglitazone (Fig. 1 B) and LPSF/GQ-16 (Fig. 1 C) did not revert conditions caused by fat-rich diet with regard to arterial wall thickness (asterisk) and disorganization of smooth muscle cells (arrow); LPSF/GQ-02 reverted conditions caused by fat-rich diet, preserving arterial wall (asterisk) and reducing atherosclerotic lesions (arrow) (Fig. 1 D); magnification 20x

Figure 2 – Ultrastructure of ascending aorta of LDLR^{-/-} mice with atherosclerotic lesions (A, B, C, D, E, F); Fig. 2 A – control group, elastic lamina with interruptions (asterisk) and endothelial cells rich in vacuoles; Fig. 2 B – foamy cell from control group replete with lipids; group treated with pioglitazone showing vacuolized endothelial cells, subendothelial space with apoptotic cells (asterisk) (Fig. 2 C) and foamy cell with apoptotic bodies (arrow) (Fig. 2 D); Fig. 2 E – group treated with LPSF/GQ-16 showing destruction of subendothelial space with inflammatory cells (arrow); Fig. 2 F – group treated with LPSF/GQ-02 showing continuous elastic lamina with well-preserved endothelial cells; E – endothelial cell; F – foamy cell; V – vacuoles; EL – elastic lamina; L – lipids



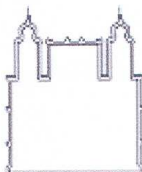


CONCLUSÕES

- Após a administração da dieta aterogênica, os animais apresentaram lesões ateroscleróticas características.
- A utilização da Pioglitazona, não reverteu às condições causadas pela dieta rica em gordura, não apresentando melhora no perfil lipídico, bem como na lesão aterosclerótica dos animais.
- Os novos derivados tiazolidínicos LPSF/GQ-02 e LPSF/GQ-16 exerceram uma melhor resposta sobre a resistência à insulina quando comparado com o grupo controle e Pioglitazona.
- O novo derivado tiazolidínico LPSF/GQ-16 não exerceu ações benéficas sobre a aterosclerose. Entretanto, a LPSF/GQ-02 apresentou ações positivas, diminuindo a lesão aterosclerótica.
- A utilização da Pioglitazona causou alterações ultraestruturais significativas como degeneração do endotélio e presença de células em processo apoptótico.
- Alterações ultraestruturais, tais como grande degeneração do endotélio e destruição do espaço subendotelial foi observada após a utilização do novo derivado tiazolidínico

LPSF/GQ-16. Em contrapartida, o novo derivado tiazolidínico LPSF/GQ-02 exerceu alterações ultraestruturais mínimas, apresentando um efeito protetor ao endotélio.

Anexo



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado :

" Estudo comparativo de tratamentos com glitazonas sobre o processo aterosclerótico em camundongos C57BL/6J. "

número P-510/08, proposto por Christina Alves Peixoto, foi licenciado pelo N° L-010/09.

Sua licença de N° L-010/09 autoriza o uso anual de :

- 120 *Mus musculus*

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 21 de janeiro de 2013.

Rio de Janeiro, 21/01/2009


Dra. Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora da CEUA
FIOCRUZ