

PROJETO DE PESQUISA

Título:

**QUINAZOLINAS INIBIDORAS DE ADENOSINA
QUINASE AUMENTAM A EXPRESSÃO DO PPAR γ
EM CAMUNDONGOS LDLR^{-/-}.**

Campinas, 12 julho de 2007.

ÍNDICE

I.	Resumo.....	pg. 3
II.	Introdução.....	pg. 5
III.	Objetivos	pg. 9
IV.	Métodos	pg. 10
V.	Resultados.....	pg. 12
VI.	Discussão.....	pg. 15
VII.	Conclusão.....	pg. 17
VIII.	Referências bibliográficas.....	pg. 18

RESUMO

As projeções da Organização Mundial de Saúde indicam que a morbidade e a mortalidade causadas pela doença cardiovascular, nas próximas décadas, constituirão a primeira causa de morte em todo o mundo. A aterosclerose é uma doença cardiovascular que envolve alterações homeostáticas, fenômenos celulares, bioquímicos e inflamatórios associados à disfunção endotelial e à deposição de lipoproteínas relacionadas com os níveis de colesterol plasmático.

Evidências crescentes apontam para a implicação do receptor proliferador-ativador de peroxissomos da subfamília γ (PPAR γ) na regulação da resposta imune, particularmente no controle inflamatório. Como o processo inflamatório exerce grande influência no desenvolvimento da lesão aterosclerótica, justifica-se que agonistas do PPAR γ apresentem efeitos antiateroscleróticos - o que foi comprovado em estudos com diferentes modelos animais.

Assim sendo, o estudo do metabolismo de lipídios e sua intrincada interação com o sistema imunológico são relevantes e o PPAR γ está inserido neste contexto. O composto quinazolínico 6,7-Dimetoxi-4-N-(3'-N',N'-dimetil)fenilaminoquinazolina (DMA) é um produto completamente produzido e desenvolvido no Brasil, pelo Instituto de Química e pela Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Suas propriedades antiinflamatórias e anti-ateroscleróticas estão sendo avaliadas em alguns modelos experimentais com resultados preliminares positivos.

Dessa forma, o presente estudo avaliará a expressão de PPAR γ em fígado e tecido adiposo de camundongos LDLR^{-/-}/C57BL6/J - nocauteados para o receptor de LDL – submetidos à dieta normocolesterolêmica e hipercolesterolêmica, sendo que aqueles alimentados com dieta hiperlipídica serão subdivididos em grupos sem tratamento, tratados com veículo e tratados com o composto quinazolínico 6,7-Dimetoxi-4-N-(3'-N',N'-dimetil)fenilaminoquinazolina (DMA). Os dados obtidos ajudarão a compreender melhor o modelo experimental de aterosclerose no camundongo nocaute para LDL, a relevância da dieta para a expressão do PPAR γ nestes animais, bem como a influência do composto DMA nesses processos.

Uma vez comprovado que este composto apresenta propriedades antiinflamatórias, outros estudos em modelos animais podem se seguir e, futuramente, a avaliação de um eventual potencial terapêutico em doenças inflamatórias em seres humanos.

INTRODUÇÃO

Aterosclerose e ação antiinflamatória do PPAR γ

O processo inflamatório é fundamentalmente um mecanismo de proteção, cujos objetivos principais são livrar o organismo de agentes que causem lesão de células e tecidos (por exemplo, microorganismos e toxinas) e remover as células e tecidos danificados em consequência a uma injúria. . No entanto os processos de inflamação e reparo podem ser potencialmente danosos ao organismo quando sua intensidade ou duração ultrapassam o suficiente e necessário para conter o agente agressor, como ocorre na aterosclerose.

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, que envolve a presença de alterações da homeostasia e de fenômenos celulares, bioquímicos e inflamatórios associados à disfunção endotelial (1). Diversos estudos epidemiológicos demonstraram forte associação entre os níveis de colesterol plasmático e o surgimento de eventos ateroscleróticos (2).

A aterosclerose tem sido considerada uma resposta à injúria, sendo esta injúria representada por perda do revestimento endotelial da parede vascular (3) (4). A lesão ou o(s) fator(es) de desestabilização que iniciam o processo inflamatório são alvo de discussão na literatura, especulando-se o papel do LDL oxidado (LDLoxi), lesão mecânica, lesão imunológica, homocisteína e vírus (5).

Desde as fases mais precoces do processo aterosclerótico fica bastante clara a relevância da inflamação. Dieta aterogênica é capaz de induzir a expressão de moléculas de adesão presentes nas células endoteliais arteriais, propiciando a ligação de várias classes de leucócitos, observando-se particularmente a adesão de monócitos e linfócitos T à molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1). Uma vez aderidos ao endotélio, os leucócitos penetram na íntima por diapedese através das junções entre as células endoteliais. Citocinas com propriedades quimioatrativas (quimiocinas), como a proteína quimioatrativa do monócito (MCP-1), apresentam grande expressão em ateromas com o consequente recrutamento celular. O monócito situado na íntima

adquire propriedades de macrófago tecidual, expressando receptores removedores e gerando a internalização de partículas de lipoproteínas modificadas por oxidação e glicosilação. A partir desse processo, os macrófagos convertem-se em células esponjosas as quais modificam sobremaneira o microambiente ao secretar citocinas pró-inflamatórias que exacerbam a resposta inflamatória local e induzem a produção dos radicais de oxigênio reativo. Além disso, os fagócitos mononucleares estão diretamente relacionados ao processo de desestabilização e trombose da placa visto que a degradação da matriz extracelular se faz pela ação das metaloproteinases e exposição ao fator tecidual (altamente pró-coagulante), ambos produtos destas células.

Os processos inflamatórios determinam, portanto, um desequilíbrio entre as propriedades homeostáticas do endotélio que podem levar à estimulação local da cascata de coagulação e a um estado pró-trombótico local e sistêmico. A estimulação da cascata de coagulação na lesão aterosclerótica gera o recrutamento de plaquetas, as quais contêm diversas moléculas que podem estimular a quimioatração leucocitária, estimular a proliferação de células musculares lisas e de fibroblastos e promover a síntese de colágeno (6).

Atualmente sabe-se que regiões bastante propensas ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas são aquelas de maior fluxo turbilhonar. O aumento do estresse gerado na parede do vaso induz a produção de proteoglicanos pelas células musculares lisas, determinando a retenção de partículas como lipoproteínas, e contribuindo para a piora do processo oxidativo local (7).

O desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de desordens metabólicas como a aterosclerose pode, portanto, se basear no estudo de mecanismos moleculares de proteínas de transdução envolvidas nas vias metabólicas e anabólicas do organismo humano e atuantes no processo inflamatório. Os receptores proliferador-ativadores de peroxissomos (PPARs) são proteínas transdutoras que pertencem à superfamília de receptores nucleares. PPARs regulam inúmeras vias metabólicas, tais como a biossíntese de lipídios e o metabolismo da glicose, ao ligarem-se à seqüência-específica de elementos de resposta de PPAR na região promotora de genes

alvos. Entretanto, em estudos recentes constatou-se que ligantes de um subtipo específico de PPAR – subtipo γ – teriam função reguladora das respostas inflamatória celular e imune. Acredita-se que exerçam efeitos antiinflamatórios ao regularem negativamente a expressão de genes pró-inflamatórios. Assim, ligantes do PPAR γ apresentam propriedades antiinflamatórias, as quais podem ser utilizadas no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como a aterosclerose (8).

O fator de transcrição ativado por ligantes (PPAR) do subtipo γ é o único membro de uma família de receptores nucleares que se encontra expresso em altos níveis, especificamente no tecido adiposo com importante papel na adipogênese. Sua expressão também é aumentada em indivíduos obesos, relacionando-se com o aumento do volume dos adipócitos (9).

Os PPARs estão implicados no controle de respostas inflamatórias e na homeostase da energia e, portanto, podem ser definidos como fatores de transcrição metabólicos e antiinflamatórios. Seu efeito antiinflamatório provém da inibição da indução de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e proteínas da matriz extracelular ou pela estimulação da produção de moléculas antiinflamatórias. Além disso, PPARs modulam a proliferação, diferenciação e sobrevivência de células imunes, dentre elas macrófagos, células B e T (10).

Como o processo inflamatório exerce grande influência no desenvolvimento da lesão aterosclerótica, justifica-se que agonistas do PPAR γ apresentem efeitos anti-ateroscleróticos - o que foi comprovado em estudos com diferentes modelos animais (11). Durante a deposição da placa aterosclerótica nos vasos, há os processos de rolamento e adesão de monócitos circulantes. As moléculas celulares envolvidas na adesão são: molécula de adesão intercelular (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular (VCAM-1), E-selectina e P-selectina (12) (13) (14). Em células endoteliais, agonistas de PPAR γ inibiram a expressão da molécula de adesão celular vascular (VCAM-1) e da molécula de adesão intercelular (ICAM-1), resultando em acúmulo de monócitos na camada íntima do vaso (15). Em macrófagos humanos, os agonistas de PPAR γ inibiram o MMP-9, uma enzima responsável pela ruptura de plaquetas (16) (17) (18). Já em

experimentos com monócitos humanos *in vitro*, tais ligantes reprimiram a expressão de mediadores inflamatórios como o TNF- α e a IL-6 (19). Os ligantes de PPAR γ também atuaram inibindo a proliferação das células musculares lisas da camada média vascular (VSMCs) que, ao se proliferarem nessa camada e migrarem para a íntima, geram o processo de estenose do vaso (20) (21) (22).

O composto a ser testado

O composto quinazólico a ser utilizado, o 6,7-Dimetoxi-4-N-(3'-N',N'-dimetil)fenilaminoquinazolina (DMA), foi desenvolvido e inicialmente testado pelo Instituto de Química e pela Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Este projeto é parte de projeto maior cujo objetivo amplo é caracterizar o potencial terapêutico de compostos quinazólicos sintetizados e estudados no Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular com apoio da Fapesp (Projetos 01/11698-1 - Temático; 03/05505-1-Pedido de Patente protocolado no INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL (INPI), em 02.03.04, às 13:51 horas sob nº 970.).

O composto DMA apresenta tanto atividade de inibição de tirosina quinases, como da adenosina quinase. Resultados prévios, ainda não publicados, demonstram que a inibição da adenosina quinase se dá em doses e concentrações bem menores que aquelas necessárias para inibição de tirosina quinases (Franchini K., comunicação pessoal). Este estudo utilizando o modelo experimental de camundongos nocaute para LDL que apresentam lesões ateroscleróticas procura investigar a ação antiinflamatória de um novo composto, 6,7-Dimetoxi-4-N-(3'-N',N'-dimetil)fenilaminoquinazolina (DMA), inibidor de adenosina quinase, avaliando assim seu potencial terapêutico em patologias de causa inflamatória.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

O objetivo geral do presente projeto é avaliar a expressão de PPAR γ em fígado e tecido adiposo de camundongos LDLR-/-/C57BL6/J - nocauteados para o receptor de LDL - tratados com dieta normocolesterolêmica e hipercolesterolêmica em relação aos camundongos sob as mesmas condições tratados com o veículo e o composto quinazólico 6,7-Dimetoxi-4-N-(3'-N',N'-dimetil)fenilaminoquinazolina (DMA).

Objetivos específicos:

1. Comparar a expressão de PPAR γ (em fígado e tecido adiposo) entre: camundongos LDLR-/-/C57BL6/J submetidos à dieta normal e os submetidos à dieta hipercolesterolêmica.

2. Comparar a expressão de PPAR γ (em fígado e tecido adiposo) entre: camundongos LDLR-/-/C57BL6/J submetidos à dieta hipercolesterolêmica e os submetidos à dieta hipercolesterolêmica tratados somente com veículo.

3. Comparar a expressão de PPAR γ (em fígado e tecido adiposo) entre: camundongos LDLR-/-/C57BL6/J submetidos à dieta hipercolesterolêmica e os submetidos à dieta hipercolesterolêmica tratados com o composto DMA.

4. Comparar a expressão de PPAR γ (em fígado e tecido adiposo) entre: camundongos LDLR-/-/C57BL6/J submetidos à dieta hipercolesterolêmica tratados somente com veículo e os submetidos à dieta hipercolesterolêmica tratados com o composto DMA.

MÉTODOS

Animais: os experimentos foram realizados utilizando-se camundongos machos LDLR-/-/C57BL6/J, ou seja, com uma mutação de ponto que inativa a expressão do receptor da lipoproteína LDL nas membranas celulares. Foram selecionados quatro grupos, todos compostos por camundongos com a mutação que inativa o receptor LDL. Os camundongos do grupo 1 foram submetidos à dieta normal, enquanto aqueles pertencentes ao grupo 2 foram alimentados com dieta hipercolesterolêmica por 15 dias. Os animais do grupo 3 foram submetidos à dieta hipercolesterolêmica por 15 dias e tratados com veículo através de gavagem, enquanto os camundongos do grupo 4 – também alimentados com dieta hipercolesterolêmica por 15 dias – foram tratados com o composto DMA (na dose de 30 mg/kg/dia) por gavagem. Todos os grupos tiveram ingestão irrestrita de água. Foram utilizados nos experimentos tecidos retirados do fígado e gordura dos animais.

Expressão do PPAR γ

Extração de tecido do animal:

Os camundongos foram pesados e, posteriormente, sacrificados. Fez-se uma incisão longitudinal em seu abdômen para a retirada de tecidos do fígado e gordura dos camundongos. Após a retirada, os tecidos foram limpos com soro fisiológico, pesados e fez-se um *pull* do tecido extraído dos animais. O material foi macerado, diluído em *TRIZOL* (Invitrogen) e armazenado em *falcons*, sendo que cada tipo de tecido de cada grupo ocupou um *falcon* individualmente. Os tecidos foram então armazenados em freezer à temperatura de -80°C.

Extração de RNA total de células:

O RNA total foi extraído diretamente dos tecidos dos camundongos através do protocolo baseado em *TRIZOL* (*Invitrogen*), que utiliza por princípio o método de fenol/guanidino isotiocianato.

Quantificação de RNA:

O material contido nos *eppendorfs* foi quantificado no aparelho Nanodrop, de modo que 1 µl de cada amostra não diluída é suficiente para que se obtenha os valores da concentração de RNA em ηg por µl - unidade depois convertida em µg por µl. O aparelho fornece também o valor de ratio na faixa de 260 a 280 nm.

Eletroforese para verificação da integridade do RNA:

Esse procedimento visa à separação de moléculas de RNA em função de seu tamanho. Para uma boa separação de fragmentos de 0,5 a 10 kb, emprega-se uma concentração de gel de agarose de 0,8 a 1,0 %. Corre-se o gel de agarose para verificar a integridade do RNA extraído.

Técnicas de RT-PCR:

A reação de transcrição reversa (RT) visa a conversão do RNAm obtido em cDNA para a realização da técnica do PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para a amplificação específica de determinado gene. A técnica de RT-PCR utilizada segue o protocolo da NIH, baseada no uso de *dntp mix* - constituído de dATP, dGTP, dCTP, dTTP e água DEPC-, de *superscript*, *buffer* de RT-PCR, *primer sense*, *primer anti-sense* e enzima TAQ Polimerase. Foram obedecidos ciclos de diferentes temperaturas e duração no termociclador (42L70) determinados pelo protocolo.

Os produtos do RT-PCR são detectados em um sistema de eletroforese com gel a 1% de agarose.

Para a amplificação do cDNA foram utilizados os seguintes pares de primers:

PPAR γ

sense : 5-AAA GAT GGA GTC CTC ATC TC-3'

antisense: 5-AGC AGG GGG TGA AGG CTC AT-3'

RESULTADOS

Expressão de PPAR γ

A dieta hipercolesterolêmica foi acompanhada de aumento de cerca de 2 vezes na expressão de PPAR γ tanto no fígado quanto no tecido adiposo. O tratamento com DMA (30 mg/kg/dia) potencializou o aumento da expressão de PPAR γ em camundongos LDLR^{-/-} produzindo aumentos de cerca de 10 e 3,5 vezes no fígado e tecido adiposo, respectivamente.

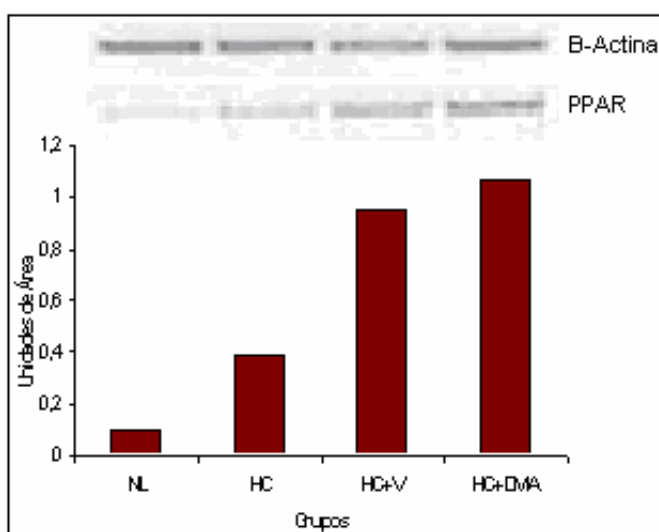


Fig 1. RT-PCR para PPAR γ de fígado. Gráfico em unidades arbitrárias normalizado pela β -actina.

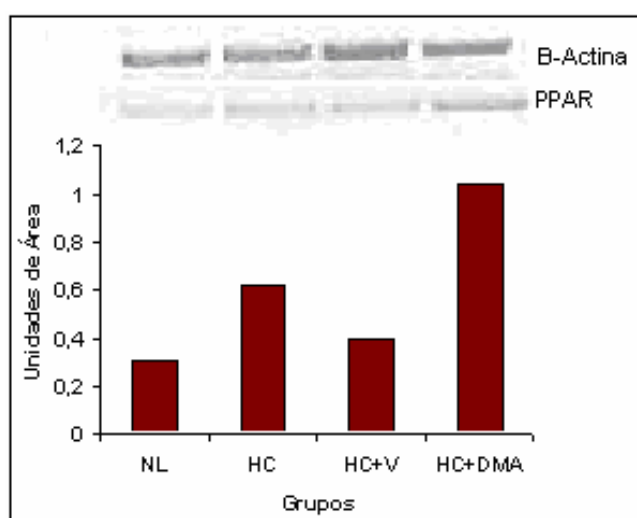


Fig 2. RT-PCR para PPAR γ de gordura. Gráfico em unidades arbitrárias normalizado pela β -actina.

RESULTADOS COMPLEMENTARES

Citocinas séricas

A dieta hipercolesterolêmica aumentou em cerca de 2 e 3 vezes os níveis de TNF α e interleucina-6, respectivamente, sendo que o tratamento com DMA cancelou estes aumentos.

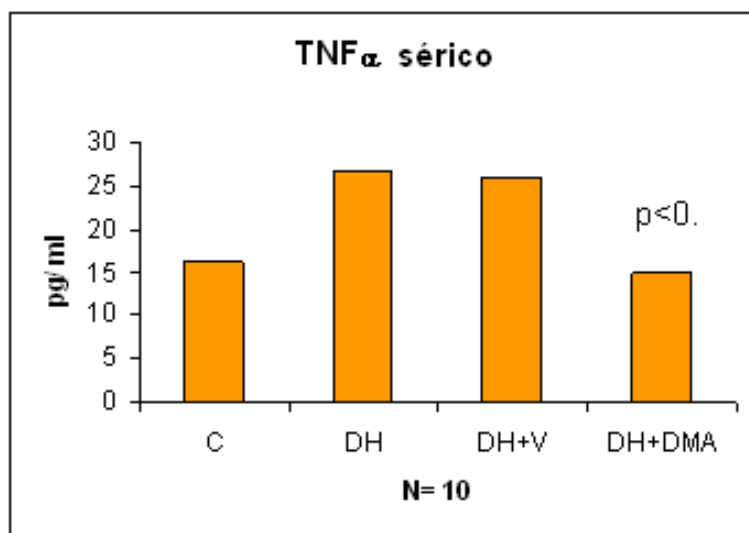


Fig 3. Níveis de TNF α no plasma.

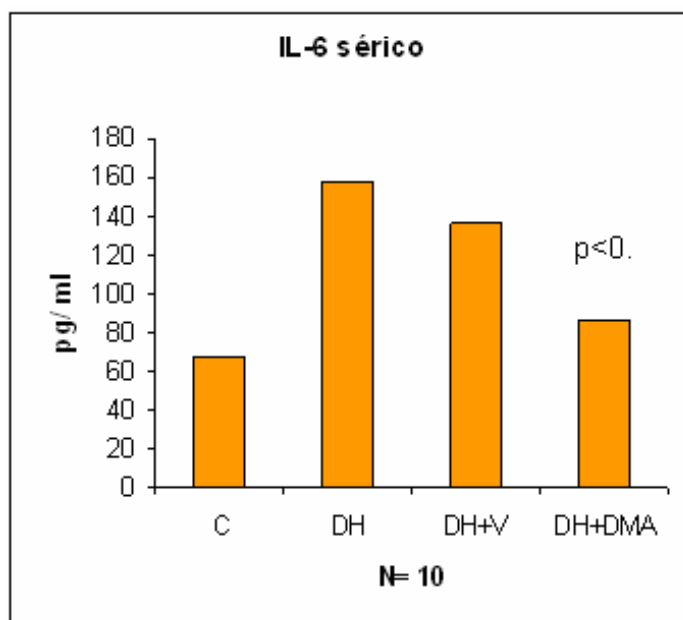


Fig 4. Níveis de IL-6 no plasma.

Aterosclerose

Camundongos LDLR^{-/-} tratados com dieta hipercolesterolêmica apresentaram lesões características do acúmulo inicial de lípidos na íntima da aorta ascendente. O tratamento com DMA atenuou o acúmulo de lípidos na aorta.

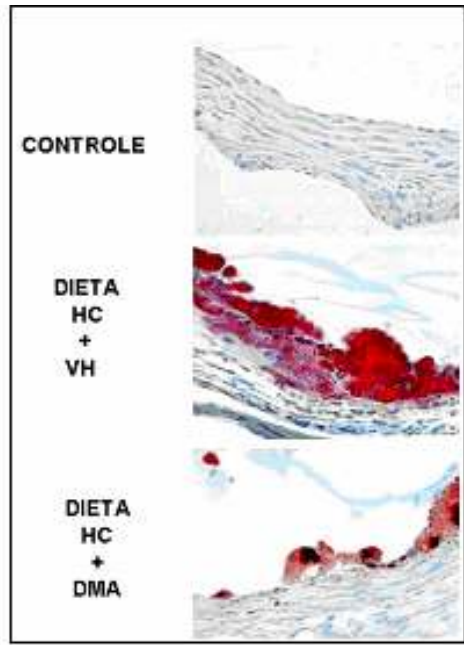


Fig 5. Distribuição das áreas de lesão avaliadas por planimetria em camundongos LDLR^{-/-} alimentados com dieta normocolesterolêmica, dieta hipercolesterolêmica e veículo e dieta hipercolesterolêmica e DMA.

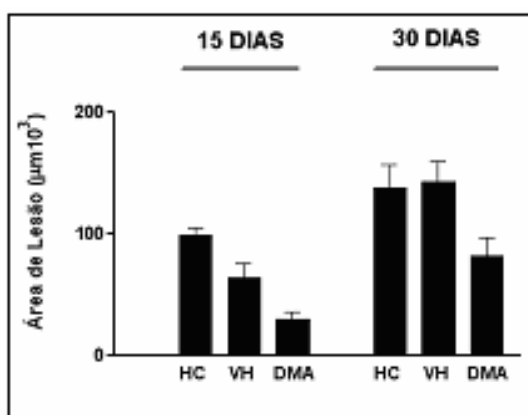


Fig 6 - Medida da área de lesões ateroscleróticas de camundongos LDLR^{-/-} alimentados por 15 e 30 dias com dieta hipercolesterolêmica (HC), dieta hipercolesterolêmica e veículo (VH) e dieta hipercolesterolêmica e DMA (DMA).

DISCUSSÃO

Os resultados demonstrados aqui são consistentes com a hipótese de atividade anti-inflamatória do composto DMA.

O tratamento com DMA gerou aumento da expressão dos PPARs nos tecidos adiposo e hepático. Em vista do efeito anti-inflamatório dos PPARs através da modulação de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e células imunes, um aumento na expressão desses receptores indicaria diminuição da resposta inflamatória.

Estudos preliminares em nosso laboratório revelaram que o composto quinazolinico gera aumento da biodisponibilidade da adenosina nos tecidos. A adenosina possui efeito antiinflamatório por modular a liberação de citocinas pró-inflamatórias como algumas interleucinas (IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12) e modular a ativação de células do sistema imune, como neutrófilos e leucócitos. Além disso, diferentes concentrações de adenosina geraram aumento da expressão dos PPARs o que indicaria uma ação antiinflamatória indireta desse metabólito no processo inflamatório.

O tratamento com DMA atenuou o acúmulo de lípidos na aorta dos camundondos LDLR^{-/-}, reduzindo o efeito aterogênico da dieta hiperlipídica. Assim, a atenuação da aterogênese pelo DMA demonstra o efeito anti-inflamatório sistêmico desse composto, visto a importância do processo inflamatório no estabelecimento da aterosclerose.

Recentemente o número de doenças qualificadas como inflamatórias crônicas aumentou. Foram incluídas patologias como aterosclerose, obesidade e resistência à insulina que estão associadas às doenças cardiovasculares, identificadas como maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo ocidental. A necessidade de entender a modulação do sistema imune se faz determinante para conseguirmos detectar possíveis alvos de atuação no controle dessas patologias.

Este trabalho iniciou uma avaliação dos potenciais efeitos anti-inflamatórios e anti-aterogênico do composto DMA, comprovando seu potencial para uso no tratamento farmacológico de patologias inflamatórias crônicas, como a aterosclerose.

CONCLUSÃO

Portanto, foi constatado que o composto DMA induz aumento significativo da expressão do PPAR γ em tecido adiposo e hepático de camundongos LDLR^{-/-}.

Estes resultados sugerem que os efeitos anti-inflamatório e anti-aterogênico do DMA podem ser mediados, ao menos em parte, pelo aumento da expressão e possivelmente atividade do PPAR γ .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Aterosclerose. Programa de Educação Médica Continuada: Módulo2. Rio de Janeiro: Diagraphic 2002;1(2):10-17. Pharmacol Exp Therap 2000;293:315-20.
2. Kannel WB, Castelli W, Gordon T. Cholesterol in the prediction of atherosclerosis disease: new perspectives based on the Framminghan Study. Ann Int Med 1979;90-5. 2003;14(2):14-21.
3. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. Part I. N Engl J Med 1976;295:369-77.
4. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. Part II. N Engl J Med 1976;295:420-25.
5. Davies, PF, Reidy MA, Goode TB, Bowyer DE. Scanning electron microscopy in the evaluation of endothelial integrity of the fatty lesion in atherosclerosis. Atherosclerosis 1976;25:125-30.
6. Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23:2131-137.
7. Lee RT, Yamamoto C, Feng Y, et al. Mechanical strain induces specific changes in the synthesis and organization of proteoglycans by vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 2001;276:13847-851.
8. Belvisi MG, Hele DJ, Birrell, MA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as therapy for chronic airway inflammation. Eur J Pharmacol. 2006.
9. Hermsdorff HHM, Monteiro JBR. Gordura Visceral, Subcutânea ou Intramuscular: Onde Está o Problema?. Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/6:803-811. Revisão
10. Kostadinova R, Wahli W, Michalik L. PPARs in diseases: control mechanisms of inflammation. Curr Med Chem. 2005; 12(25), 2995-3009. Review.

- 11.** Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998;93:241–52.
- 12.** Gerrity, R. G. The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* 103, 181– 190.1881.
- 13.** Li, H., Cybulsky, M. I., Gimbrone, M. A., Jr., Libby, P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb* 13, 197–204.1993.
- 14.** Marx, N., Sukhova, G. K., Collins, T., Libby, P., Plutzky, J. PPARA activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation* 99,3125– 3131.1999.
- 15.** Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation* 2000;101:235–8.
- 16.** Marx N, Sukhova G, Murphy C, Libby P, Plutzky J. Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am J Pathol* 1998;153:17–23.
- 17.** Marx N, Schonbeck U, Lazar MA, Libby P, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998;83:1097–103.
- 18.** Kota BP, Huang, THW, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research* 51 (2005) 85–94

19. Tontonoz, P., & Nagy, L. Regulation of macrophage gene expression by peroxisome-proliferator-activated receptor γ : implications for cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 10, 485–490.1999.

20. Hupfeld, C. J., Weiss, R. H. TZDs inhibit vascular smooth muscle cell growth independently of the cyclin kinase inhibitors p21 and p27. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281, E207–E216.2001.

21. Law, R. E., Goetze, S., Xi, X. P., et. al. Expression and function of PPAR γ in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 101, 1311–1318.2001.

22. Vosper H, Khoudoli GA, Graham TL, Palmer CNA. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists, hyperlipidaemia, and atherosclerosis. *Pharmacology & Therapeutics* 95 (2002) 47–62