



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE MOLÉCULAS DESENHADAS A PARTIR DO ÁCIDO
ANACÁRDICO E A PROTEÍNA PPAR USANDO FERRAMENTAS *IN SILICO*

ALUNO: JÔNATAS CUNHA BARBOSA LIMA
ORIENTADOR: JOÃO ALEXANDRE RIBEIRO GONÇALVES BARBOSA

11 DE FEVEREIRO DE 2016
BRASÍLIA - DF

JÔNATAS CUNHA BARBOSA LIMA

ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE MOLÉCULAS DESENHADAS A PARTIR DO ÁCIDO
ANACÁRDICO E A PROTEÍNA PPAR γ USANDO FERRAMENTAS *IN SILICO*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa

Brasília - DF
2016

Dissertação de autoria de Jônatas Cunha Barbosa Lima, intitulada: “ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE MOLÉCULAS DESENHADAS A PARTIR DO ÁCIDO ANACÁRDICO E A PROTEÍNA PPAR γ USANDO FERRAMENTAS *IN SILICO*”, apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, em 11 de fevereiro de 2016, defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa
Universidade de Brasília
(Orientador)

Prof. Dr. Werner Treptow
Universidade de Brasília
(Examinador Interno)

Prof. Dr. Shaker Chuck Farah
Universidade de São Paulo
(Examinador Externo)

Prof. Dr. Antônio Francisco Pereira de Araújo
Universidade de Brasília
(Examinador Interno - Suplente)

Brasília - DF
2016

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus pela sua misericórdia demonstrada durante cada momento da minha vida, o reconhecimento em todos e meus caminhos e sei que Ele tem endireitado as minhas veredas. Ao único Deus e Senhor, mediante Jesus Cristo meu Salvador, a glória pelos séculos dos séculos.

Agradeço a minha esposa Karla por todo apoio, paciência, amor e carinho que me proporcionou nesse período, e por sua ajuda tanto direta quanto indiretamente. Aos meus pais, Jolson e Lilian, por fazerem tudo que estava ao alcance deles para me proporcionar condições de manter meus estudos. Aos meus irmãos, familiares e amigos pelo apoio.

Ao meu orientador Dr. João Alexandre Barbosa, por ter me proporcionado esses momentos de aprendizagem, não somente científica, durante esses anos. Aos demais professores do laboratório de Biofísica Molecular Dra. Sonia Freitas e Dr. Napoleão Valadares pelo auxílio e correções em diversos momentos.

Aos colaboradores Dra. Kelly Grace e Erika Sampaio, do Laboratório de Imunologia e Inflamação, e Dr. Luiz Romeiro, do Laboratório de Desenvolvimento e Inovação Terapêutica da Universidade de Brasília pela cooperação amistosa que tanto enriqueceu o presente trabalho. Ao Dr. Igor Polikarpov, Instituto de Física de São Carlos – USP, por gentilmente nos ceder o plamídeo contendo o gene para usarmos nos experimentos de bancada.

A todos os amigos do Laboratório de Biofísica Molecular: Faheem, João Paulo, Diogo, Júlia, Gideane, Liana, André, Amanda, e tantos outros pelo convívio, ajudas nos experimentos e tantas boas ideias.

Aos membros da banca Dr. Werner Treptow, Universidade de Brasília, e Dr. Shaker Chuck Farah, Universidade de São Paulo, pela disponibilidade e sugestões para construção deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por me conceder a bolsa para me manter durante este tempo de estudo.

Este trabalho não ocorreria sem a contribuição de cada um de vocês. A todos o meu muito obrigado.

“Este é a imagem do Deus invisível, o primogênito de toda a criação; pois, nele, foram criadas todas as coisas, nos céus e sobre a terra, as visíveis e as invisíveis, sejam tronos, sejam soberanias, quer principados, quer potestades. Tudo foi criado por meio dele e para ele. Ele é antes de todas as coisas. Nele, tudo subsiste.”

(Colossenses 1:15-17)

RESUMO

Os receptores nucleares ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) se mostram de grande importância nos mais diversos tecidos, dentre eles o tecido adiposo e o muscular de forma especial por estarem relacionados ao metabolismo glicose e lipídeos. Sendo assim, sua alteração pode estar relacionada a vários tipos de doenças como: diabetes, aterosclerose, hipertensão, dislipidemia e câncer, entre outras. Os PPAR tem sua conformação alterada após a interação com o ligante, podendo este ser diversas gorduras da dieta ou diversos metabólitos de lipídeos, permitindo assim a modulação de sua atividade pela ligação de diferentes cofatores. Devido a sua grande importância em várias partes do metabolismo, os PPAR têm sido alvo de várias moléculas contra as mais variadas doenças. Sendo assim, o presente trabalho usou análises *in silico* para estudar a interação entre a proteína PPAR γ e possíveis ligantes derivados do ácido anacárdico. Para este objetivo, utilizou-se o programa Autodock Vina para realização das análises de *docking* e o Gromacs para a dinâmica molecular. Observou-se nas duas estratégias distintas de *docking* utilizadas (rígido e flexível) que todos os ligantes mostraram capacidade de interagir na região próxima à hélice 12 (RH12) e próxima à hélice 3 e às fitas β (RH3). Os ligantes LDT11, 13, 208, 380 e 383 apresentaram mais ligações de hidrogênio, o que pode estar relacionado a maior estabilidade do ligante:hélice 12, possivelmente gerando um maior recrutamento de coativadores. Uma terceira posição (RH3'), interagindo de modo polar com resíduos como Glu259 e Arg280, muito presente no *docking* rígido, quase não esteve presente no flexível que foi feito com alguns aminoácidos flexíveis, apresentando valores de afinidade menores. Nos experimentos de dinâmica molecular o LDT11 realizou interações durante longos períodos com a Ser289, His449 e Tyr473 na região da hélice 12, levando a menores valores de RMSD do que a estrutura apo, principalmente com dois ligantes no sítio de interação, o que pode indicar a cooperatividade como importante na estabilização dessa região da proteína. Na hélice 3 e fitas β , os contatos foram com a Arg288, Glu291, Ser342 e Glu343, possivelmente relacionado à estabilização e consequente inibição da fosforilação da Ser273. A região de interação com o ligante (LBD) da PPAR γ foi expressa em grande porcentagem solúvel nas cepas de *E. coli* BL21 (DE3) e BL21 (DE3) pLysE a 25°C e na BL21 (DE3) pLysS a 28°C. A purificação da proteína foi executada por cromatografia de afinidade a metal imobilizado, sendo eluída a 250 mM de imidazol.

ABSTRACT

The nuclear peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are active and important in many tissues, such as the adipose and muscle tissue, due to their involvement in glucose and lipid metabolism. For that reason, alterations in their gene expression can lead to diseases like diabetes, atherosclerosis, hypertension, dyslipidemia and cancer, among others. PPAR suffers conformational changes when binding to ligands derived from fat or lipid metabolites, which modulate PPAR's ability to bind to different co-factors. Because of their important role in metabolism, PPARs have been targeted with a variety of molecules to treat different diseases. Thereby, the objective of this study is to test the interaction of designed ligands derived from anacardic acid with PPAR γ . To fulfill this task, docking was performed with the Autodock Vina program and molecular dynamics with the Gromacs program. In both types of docking (rigid and flexible) all ligands showed interaction capacity in regions close to helix 12 (RH12) and helix 3 and β sheets (RH3). The ligands LDT11, 13, 208, 380 and 383 had more hydrogen bonds; this fact can be related to the greater ligand:helix 12 stabilization, possibly inducing better co-activator recruiting. In another docking pose (RH3'), the ligand interacts via polar contacts with residues like Glu259 and Arg280. This pose is consistently observed in protein rigid docking results, while in flexible docking this pose was not frequent, moreover this pose showed smaller affinity values. In molecular dynamics experiments LDT11 had interactions during long periods with Ser289, His449 and Tyr473 in the region of helix 12, leading to smaller RMSD values than the apo structure, especially in experiments with two simultaneous ligands, possibly indicating the importance of agonist cooperation. In helix 3, the contacts with Arg288, Glu291, Ser342 and Glu343 indicate a local stabilization capacity that might be related to the inhibition of Ser273 phosphorylation. The ligand binding domain (LBD) of PPAR γ was expressed in soluble form in *E. coli* BL21 (DE3) and BL21 (DE3) pLysE at 25°C and BL21 (DE3) pLysS at 28°C. The protein was purified by immobilized metal affinity chromatography, eluting with 250 mM of imidazole.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representação esquemática da regulação da transcrição em NR por coativadores (verde) e correpressores (vermelha) (PERISSI; ROSENFELD, 2005).

Figura 2- Processo de passagem de um NR dependente de ligante reprimido para ativo (PERISSI; ROSENFELD, 2005).

Figura 3- Ativação das proteínas PPAR e resultado desta na célula. RA é o ácido retinóico (SAHEBKAR; CHEW; WATTS, 2014).

Figura 4- Estrutura dos PPAR. (A) Ordem dos domínios que compõe as proteínas PPAR. A primeira região “A/B” contém o domínio AF-1. A região “C” é a região relacionada ao domínio DBD. A “D” é uma região de *hinge* que esta relacionada a alteração conformacional após interação com o ligante. A “E/F” é a região LBD. (B) Comparação entre os domínios dos diferentes PPAR. Os valores acima de cada região estão se referindo ao número do resíduo de aminoácido onde começa e termina cada um dos diferentes domínios que compõe os PPAR (BURNS; VANDEN HEUVEL, 2007; USUDA, 2014).

Figura 5- Sete isoformas de transcritos de PPAR γ e suas respectivas isoformas proteicas traduzidas com o tamanho da cadeia polipeptídica e massa (AZHAR, 2010).

Figura 6- Sítios de modificações covalentes em PPAR γ e os resultados das mesmas na atividade da proteína (AHMADIAN *et al.*, 2013).

Figura 7- Esquema do resultado da acetilação em NR. Os NR são acetilados por algumas acetiltransferases (p300/CBP, P/CAF, SRCs, Tip60, GCN5) e desacetilados por HDACs (WANG *et al.*, 2011).

Figura 8- Estrutura do domínio LBD da apo-PPAR γ . (a) Estrutura terciária demonstrando o posicionamento das hélices α (ciano) e fitas β (verde). (b) Cadeia principal da PPAR γ (azul escuro) mostrando a área não ocupada do sítio de interação com o ligante, que apresenta um volume aproximado de 1300 Å³. (c) Alinhamento da região LBD das PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ , mostrando as regiões de hélices α (caixas vermelhas) e as fitas β (setas azuis) e os resíduos conservados em amarelo. Além disso, os resíduos que apresentam interação com a rosiglitazona estão sublinhados. A região descrita como H AF abrange a hélice 12 (NOLTE *et al.*, 1998).

Figura 9- Distribuição dos resíduos em cada um dos braços do LBP da LBD da PPAR γ (ZOETE; GROSDIDIER; MICHIELIN, 2007).

Figura 10- Estrutura do domínio LBD (PDB 1F9M) mostrando o heterodímero

PPAR γ (verde):RXR(laranja) estabilizado por contatos das respectivas H10. Cada uma das proteínas apresenta um ligante em seu sítio, GI262570 (amarelo) em PPAR γ e 9cRA (ciano) em RXR. Hélices da proteína coativadora SRC-1 são observadas em vermelho e magenta.

Figura 11- Estrutura região LBD de PPAR γ e SRC-1, coativador, em interação com o ligante rosiglitazona. Hélices α (ciano) e fitas β (magenta), mostrando resíduos em contato com o ligante (verde), e o motivo LXXLL de SRC-1 (laranja). (A) Estrutura em cartoon da interação. (B) Alguns dos resíduos que interagem diretamente com a rosiglitazona (PDB: 2PRG).

Figura 12- Interação entre o *NR box* do coativador SRC-1 e o LBD da PPAR γ (azul escuro). Os resíduos do *charge clamp*, Glu471 na H12 (laranja) e Lys301, podem ser vistos interagindo com o motivo, o que auxilia na estabilização da ligação. Além disso, a interação entre as Leu318 e 468 da PPAR γ com as Leu do motivo também estão mostradas (ZOETE; GROSDIDIER; MICHIELIN, 2007).

Figura 13- Sobreposição das estruturas de PPAR em interação com os motivos do SRC-1 e o SMRT (branco e magenta, respectivamente). A H12 (laranja) em interação com o coativador (verde) e a mesma (amarelo) em conformação diferente na interação com o corressor (azul) (ZOETE; GROSDIDIER; MICHIELIN, 2007).

Figura 14- Controle da hélice 12 através da hélice 11. Diferentes tipos de agonistas (estrelas) controlam a dinâmica da hélice 12 de diferentes formas. Agonistas totais por interação direta, os parciais por deslocamento da hélice 11 e antagonistas indiretos por empurrarem a hélice 11 para o local da H12 (NETTLES; GREENE, 2005).

Figura 15- Interação indireta do TBBPA dentro do LBP da PPAR γ com o resíduo Tyr473 através de moléculas de água (DELFOSSÉ *et al.*, 2014).

Figura 16- Interação entre o agonista parcial GW0072 e a PPAR γ . (A) Estruturas dos ligantes rosiglitazona e GW0072 e (B) modo de interação do segundo composto (esfera de van der waals) no domínio LBD (cadeia principal em amarelo). (C) Interação com resíduos His323, His449 e Tyr473 realizada pela rosiglitazona, todavia o GW0072 não realiza essas interações que estabilizam a H12 (OBERFIELD *et al.*, 1999).

Figura 17- Interação das moléculas (A) 9-HODE (verde e ciano) e (B)13-HODE (magenta) no LBP da PPAR γ (ITOH *et al.*, 2008).

Figura 18- Estrutura de moléculas derivadas de TZD (SAKAMOTO *et al.*, 2000).

Figura 19- Desenho das estruturas dos agonistas sintéticos de PPAR γ (A) rosiglitazona e (B) farglitazar.

Figura 20- Estrutura do ácido anacárdico (SUNG *et al.*, 2008).

Figura 21- Ligantes derivados de ácido anacárdico utilizados no presente trabalho.

Figura 22- Posições principais obtidas pelos ligantes, RH3 (preto), RH3' (verde) e RH12 (vermelho) em interação no LBP do LBD da PPAR γ , braço um (vermelho), braço dois (verde) e braço três (azul). (A) Estrutura do LBD da PPAR γ (2VSR) mostrando a posição de interação dos ligantes. (B) Esquema das interações, onde os resíduos nas tabelas são os que compõe cada um dos braços. Aminoácidos voltados para o interior já haviam sido anteriormente citados compondo cada um do braços (ZOETE; GROSDIDIER; MICHIELIN, 2007). No exterior estão resíduos que participaram das diferentes interações nas análises de docking.

Figura 23- Interações entre a proteína PPAR γ (2VSR) e o LDT11. Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína: com o RH3 ocupado com o 9-(S)-HODE (A), a proteína apo (C) e com o RH12 ocupado (D). (B) Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre o ligante LDT11 (branco) com os aminoácidos Ser289, His323, Tyr327 e Tyr473 (rosa) da proteína PPAR γ ocupando o RH3.

Figura 24- Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre (A) o ligante LDT11 (branco) com os aminoácidos Glu 291 (azul) da proteína PPAR γ (2VSR), (B) com os resíduos de aminoácido Arg288 ao ocupar a RH12 com o 9-(S)-HODE (C) com os resíduos de aminoácido His323 ao ocupar a RH3 com o 9-(S)-HODE.

Figura 25- Interações entre a proteína PPAR γ (2VSR) e o LDT13. (A) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína apo (B) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH12 ocupado com o ligante 9-(S)-HODE. (C) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH3 ocupado. (D) Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre o ligante LDT13 (azul) com os aminoácidos Ser289, His323, Tyr327 e Tyr473 (rosa) da proteína PPAR γ ocupando o RH3.

Figura 26- Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre (A) o ligante LDT13 (ciano) com o resíduo Arg288 (azul) da proteína PPAR γ (2VSR), (B) com os resíduos de aminoácido Arg288 ao ocupar a RH12 com o 9-(S)-HODE (C) com os resíduos de aminoácido His323 ao ocupar a RH3 com o 9-(S)-HODE.

Figura 27- Interações entre a proteína PPAR γ (2VSR) e o LDT15. (A) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína apo. (B) Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre o ligante LDT15 (rosa) com os

aminoácidos Ser289, His323 e Tyr473 (rosa) da proteína PPAR γ . (C) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH12 ocupado com o ligante 9-(S)-HODE. (C) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH3 ocupado.

Figura 28- Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre (A) o ligante LDT15 (rosa) na RH12 da proteína PPAR γ (2VSR) (azul), (B) na RH3 ao ocupar a RH12 com o 9-(S)-HODE (C) com o resíduo de aminoácido His323 ao ocupar a RH3 com o 9-(S)-HODE.

Figura 29- Interações entre a proteína PPAR γ (2VSR) e o LDT28. (A) Interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína apo. (B) Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre o ligante LDT28 (roxo) com o resíduo Arg288 (rosa) da proteína PPAR γ . (C) Interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH12 ocupado com o ligante 9-(S)-HODE. (D) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH3 ocupado.

Figura 30- Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre (A) o ligante LDT28 (rosa) na RH3 da proteína PPAR γ (2VSR) (azul) com o resíduo Arg288, (B) na RH3 ao ocupar a RH12 com o 9-(S)-HODE (C) com o resíduo de aminoácido Tyr473 ao ocupar a RH3.

Figura 31- Interações entre a proteína PPAR γ (2VSR) e o LDT29. (A) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína apo. (B) Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre o ligante LDT29 (amarelo) com o resíduo Arg288 e Glu295 (rosa) da proteína PPAR γ . (C) Interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre o ligante e a proteína com o RH12 ocupado com o ligante 9-(S)-HODE. (D) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH3 ocupado.

Figura 32- Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre (A) o ligante LDT29 (amarelo) na RH3 da proteína PPAR γ (2VSR) (azul), (B) na RH3 ao ocupar a RH12 com o 9-(S)-HODE e (C) ao ocupar a RH3.

Figura 33- Interações entre a proteína PPAR γ (2VSR) e o LDT30. (A) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína apo. (B) Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre o ligante LDT29 (amarelo) com o resíduo Arg288 (rosa) da proteína PPAR γ . (C) Interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH12 ocupado com o ligante 9-(S)-HODE. (D) Interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH3 ocupado.

Figura 34- Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre (A) o ligante LDT30 (cinza) na RH3 da proteína PPAR γ (2VSR) (azul), (B) na RH3 ao ocupar a RH12 com o 9-(S)-HODE e (C) na RH12 ao ocupar a RH3.

Figura 35- Interações entre a proteína PPAR γ (2VSR) e o LDT208. (A) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína apo. (B) Interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH12 ocupado com o ligante 9-(S)-HODE. (C) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH3 ocupado. (D) Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre o ligante LDT29 (amarelo) com o resíduo Arg288 (rosa) da proteína PPAR γ .

Figura 36- Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre (A) o ligante LDT208 (verde) na RH3 da proteína PPAR γ (2VSR) (azul), (B) na RH3 ao ocupar a RH12 com o 9-(S)-HODE e (C) na RH12 ao ocupar a RH3.

Figura 37- Interações entre a proteína PPAR γ (2VSR) e o LDT380. (A) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína apo. (B) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH12 ocupado com o ligante 9-(S)-HODE. (C) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH3 ocupado. (D) Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre o ligante LDT380 (laranja) com os resíduos His323, His449 e Tyr473 (rosa) da proteína PPAR γ .

Figura 38- Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre (A) o ligante LDT380 (laranja) na RH3 da proteína PPAR γ (2VSR) (azul), (B) na RH3 ao ocupar a RH12 com o 9-(S)-HODE e (C) na RH12 ao ocupar a RH3.

Figura 39- Interações entre a proteína PPAR γ (2VSR) e o LDT383. (A) Interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína apo. (B) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH12 ocupado com o ligante 9-(S)-HODE. (C) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH3 ocupado. (D) Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre o ligante LDT383 (preto) com os resíduos His323, Tyr327, Lys367, His449 e Tyr473 (rosa) da proteína PPAR γ .

Figura 40- Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre (A) o ligante LDT383 (preto) na RH12 da proteína PPAR γ (2VSR) (azul), (B) na RH3 ao ocupar a RH12 com o 9-(S)-HODE e (C) na RH12 ao ocupar a RH3.

Figura 41- Análises dos experimentos com o ligante com diferentes tipos de carga, gerada pelo site do PRODRG e a junção de cargas de ligantes similares (PAPER). (A)

RMSD da cadeia principal das diferentes MD. (B) RMSD dos ligantes em interação no LBP da PPAR γ com diferentes tipos de carga.

Figura 42- Gráficos de RMSD dos experimentos de MD (A) e da região de fitas β (B), da H3 (C) e da H12 (D).

Figura 43- Gráficos de RMSF dos experimentos de MD (A) e da região de fitas β (B), da H3 (C) e da H12 (D).

Figura 44- RMSD do ligante inteiro, cabeça e cauda durante os experimentos de MD. (A) Dinâmica apresentando o LDT11 somente na RH3. (B) Experimento com o ligante na RH12. (C) LDT11 em interação em ambos os sítios simultaneamente.

Figura 45- Interações entre o LDT11 e a PPAR γ durante a MD, com a RH12, ocupada nos tempos de (A) 2 ns (B) 3 ns (C) 4 ns (D) 15 ns (E) 20 ns e (F) 30 ns. As distâncias entre os átomos pesados (Å) das ligações de hidrogênio são mostrados em preto.

Figura 46- Interações entre o LDT11 e a PPAR γ durante a MD, com a RH3 e RH12 ocupadas, nos tempos de (A) 1 ns (B) 2 ns (C) 3 ns (D) 3,5 ns (E) 25 ns (F) 35 ns (G) 40 ns (H) 45 ns. As distâncias entre os átomos pesados (Å) das ligações de hidrogênio são mostrados em preto.

Figura 47- Gel SDS-PAGE 12% da expressão da PPAR γ (LBD) a 28°C e 37°C com a cepa (A) BL21(DE3) (B) BL21(DE3) pLysE e (C) BL21(DE3) pLysS. C1 e C2 referisse a duas colônias escolhidas na etapa da transformação. O P.I. esta relacionado ao padrão de expressão da célula antes da indução com IPTG. O Ref são proteínas de tamanho conhecido usados como padrão: albumina bovina (66 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). A seta vermelha indica a posição da banda da aproximada da proteína no gel (aproximadamente 30 kDa).

Figura 48- Gel SDS-PAGE 12% do teste de solubilidade da PPAR γ (LBD). DE3 referisse a cepa BL21(DE3), PE BL21(DE3) pLysE e PS BL21(DE3) pLysS. S28 indica o poço onde foi aplicada a fração solúvel a 28°C, P37 a insolúvel a 37°C e S37 a solúvel a 37°C. A seta vermelha indica a posição da banda da aproximada da proteína no gel (aproximadamente 30 kDa).

Figura 49- Gel SDS-PAGE 12% da expressão e teste de solubilidade da PPAR γ (LBD) a 19°C com a cepa (A) BL21(DE3) e a (B) BL21(DE3) pLysE. O P.I. esta relacionado ao padrão de expressão da célula antes da indução com IPTG e ON (*overnight*) 16 horas após a indução. O P referisse a fração insolúvel e o S a solúvel. A seta vermelha indica a posição da banda da aproximada da proteína no gel (aproximadamente 30kDa).

Figura 50- Gel SDS-PAGE 12% da expressão e teste de solubilidade da PPAR γ (LBD) com as cepas BL21(DE3), no gel indicada por DE3, e BL21(DE3) pLysE, PE, a 25°C. ON (*overnight*) esta relacionado ao padrão de expressão da célula 16 horas após a indução. O P referisse a fração insolúvel e o S a solúvel. A seta vermelha indica a posição da banda da aproximada da proteína no gel (aproximadamente 30 kDa).

Figura 51- Purificação da PPAR γ (LBD). Cent se refere ao pellet formado após centrifugação antes da injeção na coluna. FT1 e FT2 indicam o *flow through* coletado em dois momentos. O L1 referesse a primeira lavagem, onde foi passado na coluna tampão fosfato com 50 mM de imidazol. O P1, P2 e P3 representa os três picos coletados com a passagem de tampão fosfato com 250 mM de imidazol. A seta vermelha indica a posição da banda aproximada da proteína no gel (aproximadamente 30 kDa).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Afinidade de ligação das melhores poses dos ligantes no *docking* rígido e os valores de RMSD. RH3 referisse a região próxima a H3 e as fitas β , e a RH12 a região próxima a H12. Os valores separados por barra se referem a afinidades das duas melhores poses (duplicata). Os dois valores de RMSD foram calculados entre as estruturas dos ligantes da duplicata antes de serem superpostos (primeiro número) e depois da superposição (segundo número). A cor preta se refere a localização do ligante próximo a RH3, vermelho próximo a RH12 e verde interação com resíduos próximos a Arg280, no braço dois.

Tabela 2 – Afinidade de ligação das melhores poses dos ligantes no *docking* com alguns resíduos flexíveis e os valores de RMSD. RH3 referisse a região próxima a H3 e as fitas β , e a RH12 a região próxima a H12. Os valores separados por barra se referem a afinidades das duas melhores poses (duplicata). Os dois valores de RMSD foram calculados entre as estruturas dos ligantes da duplicata antes de serem superpostos (primeiro número) e depois da superposição (segundo número). A cor preta se refere a localização do ligante próximo a RH3, vermelho próximo a RH12 e verde interação com resíduos próximos a Arg280 no braço dois.

Tabela 3- Interações realizadas pelos ligantes derivados do ácido anacárdico com os resíduos do LBP no LBD da PPAR γ no docking rígido e com cadeias laterais flexíveis (Arg288, Glu291, His323, Glu343, His449 e Tyr473). Vermelho representa as ligações de hidrogênio. Verde no docking rígido indica os resíduos que realizam contatos hidrofóbicos reconhecidos pelo Ligplot. Verde no docking flexível indica os resíduos com distâncias inferiores a 4 Å de distância dos átomos do ligante.

Tabela 4- Tempo de existência das ligações de hidrogênio na MD com LDT11 posicionado na RH3.

Tabela 5- Tempo de existência das ligações de hidrogênio na MD com LDT11 posicionado RH12 nos tempos de 0 a 12 ns e 15 a 45 ns.

Tabela 6- Tempo de existência das ligações de hidrogênio na MD com LDT11 posicionado na RH12.

Tabela 7- Tempo de existência das ligações de hidrogênio na MD com duas moléculas de LDT11 posicionadas na RH3 e RH12 respectivamente.

Tabela 8- Tempo de existência das ligações de hidrogênio na MD com LDT11 posicionado na RH3 e RH12 no tempo de 0 a 5 ns.

Tabela 9- Tempo de existência das ligações de hidrogênio na MD com LDT11 posicionado na RH3 e RH12 no tempo de 5 a 50 ns.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido anacárdico
acetilCoA	Acetil coenzima A
AF-1 e AF-2	Domínios de transativação 1 e 2
CDK5	Quinase dependente de ciclina 5
CDKs	Quinases dependentes de ciclinas
DA	Ácido decanóico
DBD	Domínio de ligação ao DNA
ER	Receptores de estrogênio
FGF	Fatores de crescimento de fibroblastos
HATs	Histona acetiltransferases
HD	Domínio de <i>hinge</i>
HDCAs	Histona deacetilases
HDX	Troca isotópica de hidrogênio/deutério
LBD	Domínio de ligação ao ligante
LBP	Bolsão de interação com o ligante
LCoR	Correpresor de receptor nuclear dependente de ligante
MAPKs	Proteino-quinases ativadas por mitógenos
MCFA	Ácido graxo de tamanho médio
NcoEx	Fatores de troca de correpressores nucleares
NR	Receptores nucleares
OGA	O-GlcNAcase
OGT	O-GlcNAc transferase
PDGF	Fatores de crescimento derivados de plaqueta
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PPAR	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
PPRE	Elementos responsivos a proliferadores de peroxissomos
RAR	Receptores de ácido retinóico
REA	Repressor da atividade do receptor de estrogênio
RIP140	Proteína de interação com os receptores nucleares 140
RXR	Receptor de retinoide X
SPPARMs	Moduladores seletivos de PPAR

TA	Agonistas baseados em tirosina
TBL1	Beta transducina tipo 1
TBLR1	Beta transducina tipo 1 relacionada a proteina 1
TZD	Tiazolidinediona

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Receptores nucleares	20
1.2. PPAR	24
1.3. PPARγ	26
1.3.1. ESTRUTURA DO LBD	30
1.3.1.2. Hélice 12 (AF-2)	33
1.3.2. TIPOS DE INTERAÇÃO COM PPAR γ	34
1.3.3. AGONISTAS DE PPAR γ	44
1.3.4. ÁCIDO ANACÁRDICO	47
2. OBJETIVOS	49
2.1. Objetivo geral	49
2.2. Objetivos específicos	49
3. JUSTIFICATIVAS	50
4. MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1. Docking	51
4.1.1 DESENHO DOS LIGANTES	51
4.1.2. SELEÇÃO DA PROTEÍNA	52
4.1.3. DOCKING	52
4.2. Dinâmica molecular	54
4.3. Expressão e purificação do PPARγ	55
4.3.1. OBTENÇÃO DO GENE	55
4.3.2. PREPARO DAS CÉLULAS COMPETENTES	55
4.3.3. TRANSFORMAÇÃO	56
4.3.4. OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO	56
4.3.5. ANÁLISE EM GEL SDS-PAGE 12%	57
4.3.6. TESTE DE SOLUBILIDADE	58
4.3.7. PURIFICAÇÃO DA PPAR γ	58
5. RESULTADOS	60
5.1. Docking	60
5.1.1. LDT11	65
5.1.2. LDT13	68
5.1.3. LDT15	71

5.1.4. LDT28	74
5.1.5. LDT29	77
5.1.6. LDT30	80
5.1.7. LDT208	83
5.1.8. LDT380	86
5.1.9. LDT383	89
5.2. Dinâmica molecular	92
5.3. Expressão heteróloga e purificação da proteína	105
6. DISCUSSÃO	111
7. CONCLUSÃO	120
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	121
9. REFERÊNCIAS	122

1. INTRODUÇÃO

1.1. Receptores nucleares

A superfamília de proteínas que são receptores nucleares (NR) de mamíferos é composta por mais que 45 fatores de transcrição (em humanos 48) sendo que vários desses são dependentes de interação com ligantes (PERISSI; ROSENFELD, 2005). Este grupo é composto de importantes receptores como os de estrogênio, os de hormônios da tireoide, de ácido retinóico (RARs), e os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR), dentre outros (AHMADIAN *et al.*, 2013; ENCINAR *et al.*, 2015; NOLTE *et al.*, 1998). Estas proteínas altamente reguláveis são responsáveis de mediar os efeitos a nível transcricional de inúmeras moléculas lipofílicas (GUREVICH; FLORES; ANESKIEVICH, 2007).

Os NR não são importantes somente no grupo dos mamíferos, estão relacionados à regulação metabólica em diversos organismos, por exemplo, atuam diretamente na metamorfose de alguns insetos e na formação embrionária dos metazoários. Sendo preditos 228 genes em *C. elegans*, o que indica a grande importância desses receptores para os nematoides (SLUDER *et al.*, 1999).

Para realizar a sua ação essas proteínas dependem da interação com ligantes dos mais variados tipos, como: hormônios esteroides, ácidos graxos e prostaglandinas, dentre várias outras moléculas, todavia alguns receptores dessa família ainda são considerados órfãos, ou seja, não se sabe qual o ligante que atua nesta proteína (PERISSI; ROSENFELD, 2005). Os cofatores são também de grande importância para o funcionamento dos NR, dentre esses alguns realizam o papel de reprimir a transcrição (correpressores) dos genes alvo e outros ativam (coativadores) (GUREVICH; FLORES; ANESKIEVICH, 2007).

De acordo com o que era visto na literatura em geral, supunha-se que enquanto não ocorria interação com agonistas a proteína estava ligada a correpressores. Após a interação com o ligante, os NR deixariam de interagir com esses repressores, formariam um heterodímero com o receptor de retinoide X (RXR) e se ligariam com coativadores, gerando alterações conformacionais que permitiriam a interação com os elementos responsivos, sequências específicas de DNA, levando a expressão de diversos genes alvos (GUREVICH; FLORES; ANESKIEVICH, 2007; YU; MERTZ, 2001).

Todavia, essa visão não abrange a totalidade dos acontecimentos em relação aos correpressores e à modulação da expressão dos genes alvos. O mecanismo de regulação

da transcrição por NR é altamente intrincado, apresentando a participação de uma grande quantidade de proteínas e complexos proteicos, como pode ser visto na figura 1.

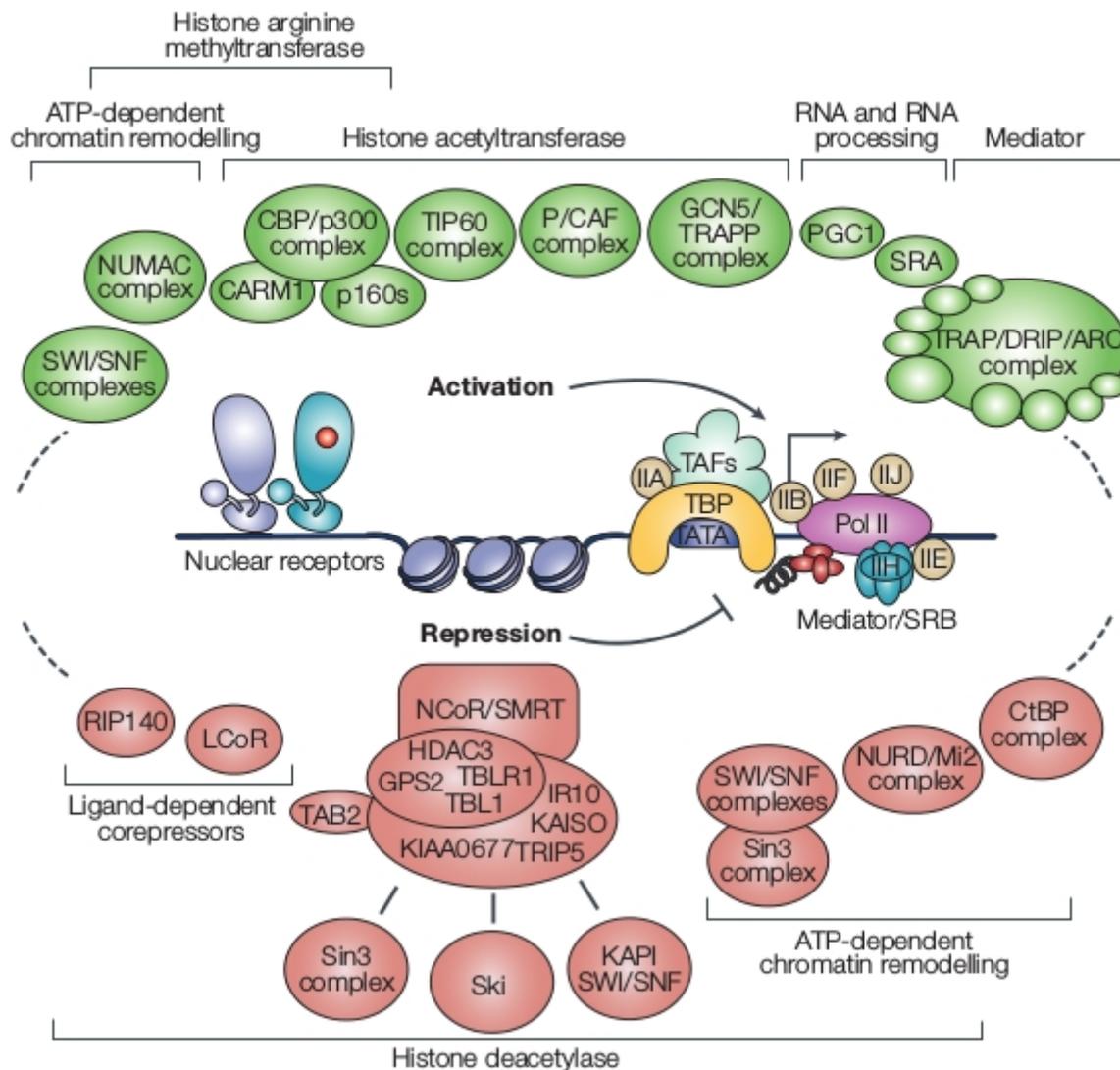


Figura 1- Representação esquemática da regulação da transcrição em NR por coativadores (verde) e correpressores (vermelha) (PERISSI; ROSENFELD, 2005).

Dessa forma, pode-se dizer que os NRs que não apresentam interação com o ligante preferencialmente interagem com correpressores, isto induz a inibição da transcrição dos genes alvos. Após a ligação com a molécula agonista pode ocorrer algumas possibilidades, a primeira é a ativação da proteína, ou seja, alterações conformacionais que induzem a interação com coativadores. Outra possibilidade é a ligação com alguns correpressores que atuam em NR competindo com os coativadores, alguns exemplos desses são o correpressor de receptor nuclear dependente de ligante

(LCoR), proteína de interação com os receptores nucleares 140 (RIP140) e repressor da atividade do receptor de estrogênio (REA). Além disso, esse ligante pode ser uma molécula antagonista, que ao invés de induzir a interação com coativadores induz interação com correpressores (HASHIMOTO; MIYACHI, 2005; PERISSI; ROSENFELD, 2005). Dependendo da ligação dessa proteína a coativadores ou correpressores ocorrerá a suprarregulação ou infrarregulação, ou seja, ocorrerá o aumento ou diminuição da expressão dos genes alvos (AZHAR, 2010).

O recrutamento de cofatores ocorre de modo altamente ordenado (MÉTIVIER *et al.*, 2003) e o mecanismo se mostra tão intrincado que até os próprios elementos responsivos influenciam na interação com os coreguladores. Podemos ver o exemplo dos receptores de estrogênio (ER), em que muitos dos genes regulados por ele apresentam elementos responsivos imperfeitos, o que leva a uma diminuição da atividade transcricional (KLINGE *et al.*, 2004). Além disso, observa-se na literatura que o NR se liga ao DNA e apresenta alguns ciclos de recrutamento e liberação, onde o receptor permanece por um tempo no promotor, mas é transiente, observando um comportamento muito mais dinâmico, e não estático, como se pensava anteriormente (NAGAICH *et al.*, 2004).

O processo de ativação de um NR ligado a correpressores para um em interação com coativadores possui importantes participantes, dentre estes podemos citar os fatores de troca de correpressores nucleares (NcoEx), como a beta transducina tipo 1 (TBL1) e a beta transducina tipo 1 relacionada a proteína 1 (*Transducin beta-like 1-related protein 1*) (TBLR1), relacionados a troca de complexos de correpressores por coativadores após alterações conformacionais no receptor induzidas por ligante. Eles também estão diretamente relacionados com o recrutamento da maquinaria de ubiquitinação e proteassoma, estes são responsáveis por controlar os níveis de vários correpressores. Além disso, mesmo que pareça contraintuitivo, observa-se na literatura que o proteassoma não realiza a degradação somente de correpressores, mas também de coativadores. Todavia, isto pode estar relacionado a mais um ponto de controle da expressão dos genes alvos, regulando os níveis desses ativadores (PERISSI *et al.*, 2004; PERISSI; ROSENFELD, 2005; YAN *et al.*, 2003). Um esquema sobre estas etapas pode ser observado na figura 2.

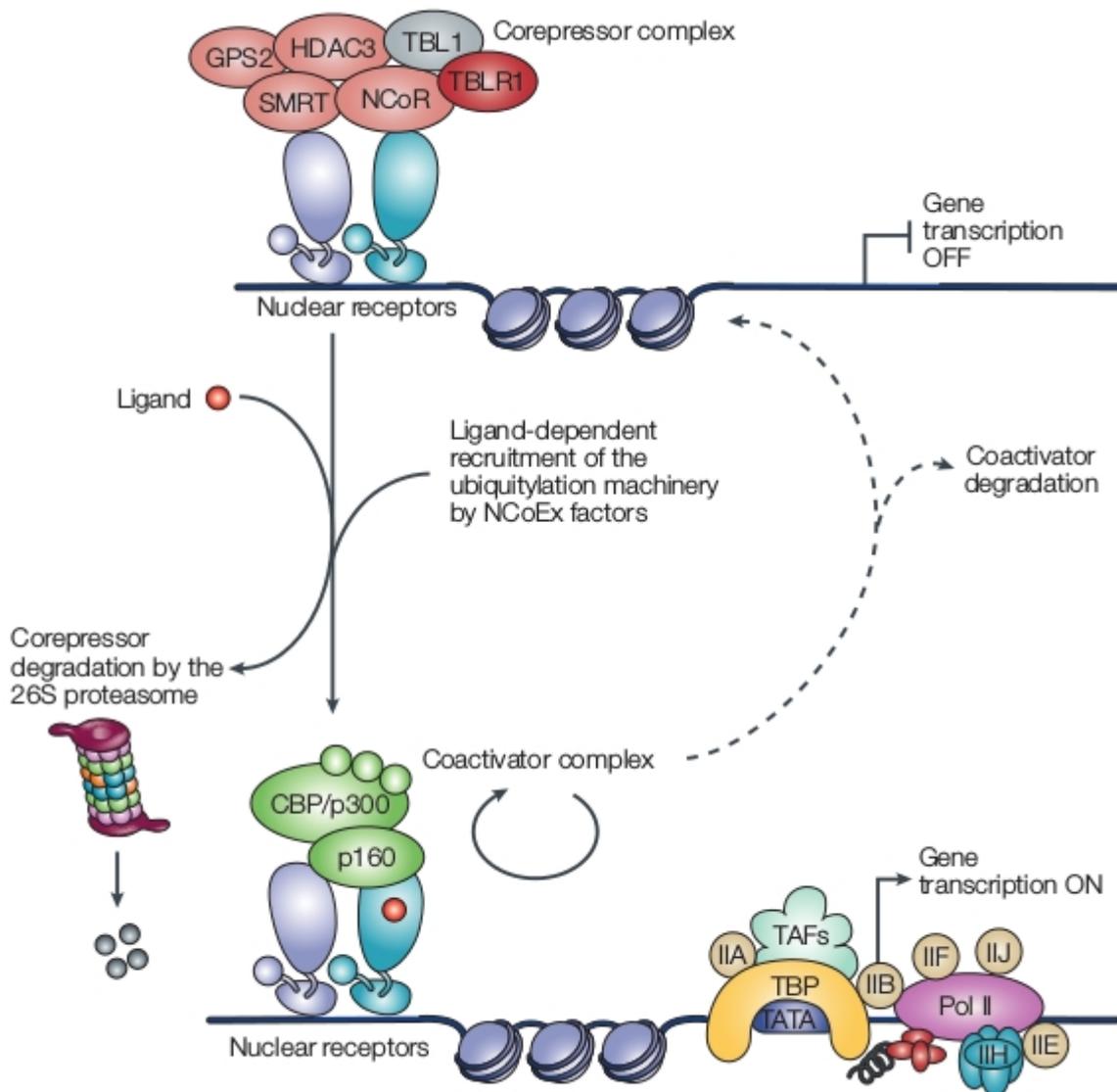


Figura 2- Processo de passagem de um NR dependente de ligante reprimido para ativo (PERISSI; ROSENFELD, 2005).

Os NR estão relacionados a importantes eventos celulares, sendo regulados por importantes proteínas quinases. Como exemplo disso, no domínio de AF-1 de NRs alguns resíduos de serina são conhecidos sítios de fosforilação de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e proteino-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Sendo assim, pode-se perceber que diversos sinais de importantes vias relacionadas à inflamação, ciclo celular (divisão celular e reparo do material genético), ativadas por proteína G dentre outras vias que são ativadas nas mais variadas condições fisiológicas se relacionam direta ou indiretamente com esses receptores (GIANNÌ *et al.*, 2002).

1.2. PPAR

Os receptores PPAR desempenham papel relevante nos mais diversos tecidos, em particular nos tecidos adiposo e muscular, por realizarem a regulação da expressão de genes relacionados ao metabolismo glicose e lipídeos. Dessa forma, sua alteração pode estar relacionada a vários tipos de doenças como: diabetes, aterosclerose, hipertensão, dislipidemia, câncer entre outras (CASIMIRO-GARCIA *et al.*, 2013; TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007). Em diabetes, por exemplo, esses receptores são capazes de aumentar a sensibilidade a insulina de um tecido e diminuir os níveis de ácidos graxos e glicose (LAGHEZZA *et al.*, 2013).

Estes NRs têm sido classificados em alguns subtipos, como: PPAR α (NRC1), PPAR β/δ (NUC1 ou NR1C2) e PPAR γ (NR1C3), onde cada um desses possuem funções específicas em diferentes tecidos. O PPAR α é principalmente expresso no fígado, coração, rins, intestino e tecido adiposo marrom (BAT). Este desempenha um importante papel na regulação de enzimas que realizam oxidação de ácidos graxos em peroxissomos. O PPAR β/δ está associado ao músculo esquelético, pele, fígado, placenta e coração, sendo este o menos estudado entre os PPAR. Por último, o PPAR γ apresenta três isoformas, PPAR γ 1, PPAR γ 2 e PPAR γ 4, o primeiro é mais expresso em cérebro e em células imunes e inflamatórias, e o segundo em tecidos adiposos brancos (WAT) e marrons (AHMADIAN *et al.*, 2013; WAHLI; MICHALIK, 2012). O PPAR γ 4, por sua vez, foi encontrado sendo expresso em macrófagos e no tecido adiposo (AZHAR, 2010). Além disso, a diferença das isoformas do PPAR γ está diretamente relacionada a um sítio de iniciação de transcrição diferente e splicing alternativo. Esta proteína apresenta um importante papel na indução de diferenciação celular de, por exemplo, adipócitos e macrófagos, e também um importante papel no metabolismo de ácidos graxos (BURNS; VANDEN HEUVEL, 2007).

A ativação dessas proteínas ocorre através da interação das mesmas com uma molécula agonista. Esta interação induz a formação de um heterodímero com a proteína homóloga RXR, que por sua vez é capaz de interagir com o ácido retinóico ou retinoides. Esta proteína, um receptor nuclear, que também é responsável por formar heterodímeros com um grande número de NRs, como o receptor de ácido retinóico, receptor de vitamina D3, receptores de hormônio da tireoide, todavia a interação com o ligante em somente uma das proteínas que compõe este heterodímero é suficiente para a ativação transcricional (KROKER; BRUNING, 2015; MARION-LETELLIER; SAVOYE; GHOSH,

2015; SHAO; HEYMAN; SCHULMAN, 2000). Após isso ocorre a ligação com proteínas coativadoras permitindo a interação com sequências conservadas no DNA em regiões promotoras dos genes alvos, essas são conhecidas como elementos responsivos a proliferadores de peroxissomos (PPRE). Isto induz a transcrição de genes relacionados, por exemplo, ao metabolismo de lipídeos, em forma de uma cascata de sinalização, como pode-se observar na figura 3. Além disso, a interação com diferentes ligantes pode levar a diferentes alterações conformacionais e a interação com diferentes coativadores ou correpressores, e, por conseguinte, a modulação do padrão de expressão dos genes alvos (AHMADIAN *et al.*, 2013; SAHEBKAR; CHEW; WATTS, 2014; WAHLI; MICHALIK, 2012).

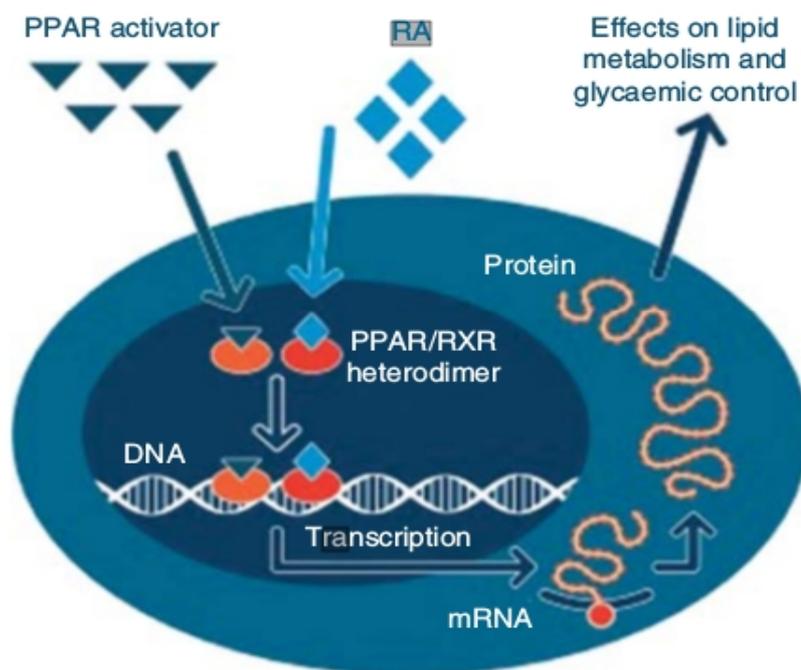


Figura 3- Ativação das proteínas PPAR e resultado desta na célula. RA é o ácido retinóico (SAHEBKAR; CHEW; WATTS, 2014).

Em relação à estrutura, os PPAR possuem alguns domínios diferenciados, como: domínio de transativação (AF-1), domínio de ligação ao DNA (DBD), um domínio de *hinge* (HD) e domínio de ligação ao ligante (LBD), figura 4. O AF-1 se localiza no N-terminal e é um domínio de transativação independente de ligante no qual proteínas quinases atuam realizando fosforilação. O DBD é um domínio altamente conservado, este possui dois

motivos chamados dedo de zinco, que são responsáveis por interagir com sequências conservadas nas regiões promotoras de alguns genes, os PPER. O domínio HD é uma região que se liga a alguns cofatores, sofrendo alterações conformacionais após interação com ligante. O LBD, por sua vez, localiza-se na porção C-terminal, e possui diversas funções, a interação com ligante, realizar a dimerização com a proteína RXR, possuindo, além disso, um subdomínio chamado AF-2, este por sua vez é um domínio de transativação dependente de ligante onde interagem cofatores, (AHMADIAN *et al.*, 2013; AZHAR, 2010; NOLTE *et al.*, 1998; USUDA, 2014), neste domínio é formado o bolsão de interação com o ligante (LBP) (BURNS; VANDEN HEUVEL, 2007).

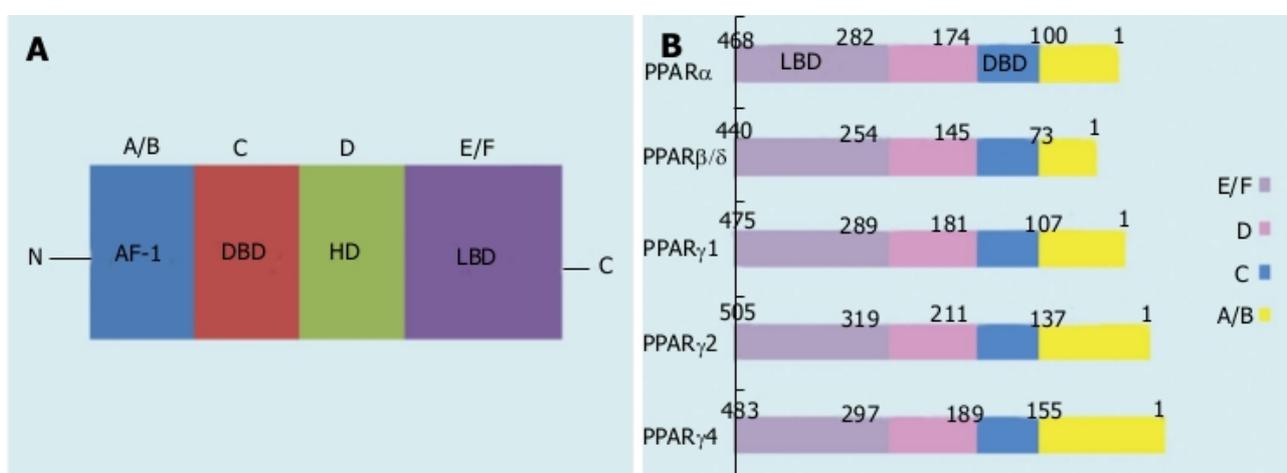


Figura 4- Estrutura dos PPAR. (A) Ordem dos domínios que compõe as proteínas PPAR. A primeira região “A/B” contém o domínio AF-1. A região “C” é a região relacionada ao domínio DBD. A “D” é uma região de *hinge* que esta relacionada a alteração conformacional após interação com o ligante. A “E/F” é a região LBD. (B) Comparação entre os domínios dos diferentes PPAR. Os valores acima de cada região estão se referindo ao número do resíduo de aminoácido onde começa e termina cada um dos diferentes domínios que compõe os PPAR (BURNS; VANDEN HEUVEL, 2007; USUDA, 2014).

1.3. PPAR γ

A proteína PPAR γ é um NR que atua como fator de transcrição ativado por ligantes relacionado à adipogênese e diferenciação de adipocitos, estando também relacionada ao metabolismo de glicose e sensibilidade a insulina, este último ocorre através do aumento da expressão de genes como a adiponectina (GARCIA-VALLVÉ *et al.*, 2015; SAHEBKAR;

CHEW; WATTS, 2014).

Essa importante proteína apresenta um gene com o total de 11 exons (A1, A2, B, C, D, 1, 2, 3, 4, 5 e 6), onde os *exons* de 1 a 6 estão presentes em todas as isoformas, e estão relacionados aos domínios AF-1, DBD, HD e LBD, onde se localiza o AF-2. Todavia, os demais *exons* foram encontrados variáveis nos diferentes cDNAs, como pode ser observado na figura 5 (AZHAR, 2010). Pode ser percebido que os diferentes processos de *splicing* geram um total de 7 transcritos diferentes de PPAR γ , mas estes geram somente três isoformas da proteína. Os transcritos 1, 3, 5 e 7 expressam a proteína na isoforma 1, sendo que somente os *exons* de 1 a 6 são traduzidos, o 2 na isoforma 2, com 30 resíduos do *exon* B traduzido, e o 4 e 6 na isoforma 4, com um pedaço do *exon* C traduzido. (CHEN; JIMENEZ; MEDH, 2006; FAJAS *et al.*, 1997; USUDA, 2014).

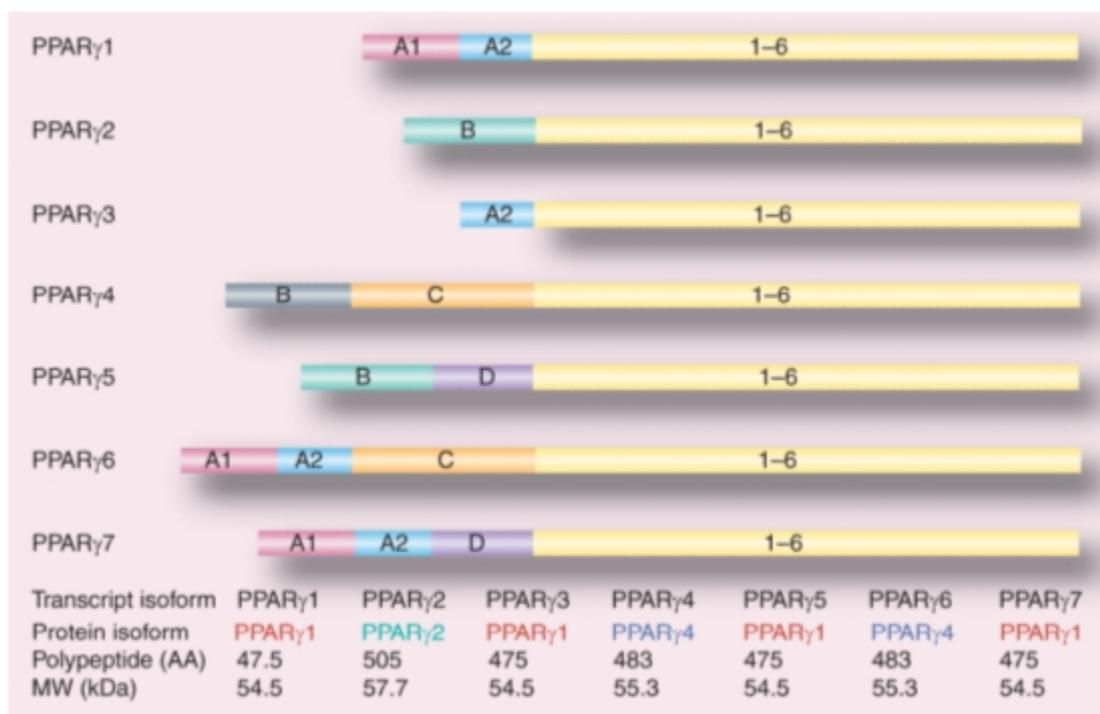


Figura 5- Sete isoformas de transcritos de PPAR γ e suas respectivas isoformas proteicas traduzidas com o tamanho da cadeia polipeptídica e massa (AZHAR, 2010).

Em se tratando da ativação e supressão da PPAR γ , esta proteína sofre uma série de modificações covalentes como fosforilação, ubiquitinação, sumoilação e acetilação, como pode ser visto na figura 6. A MAPK é uma das responsáveis por realizar fosforilação na Ser82 do domínio AF-1, pode-se observar na literatura que isto leva a diminuição da atividade transcricional da PPAR γ , a MAPK realiza essa inibição após ser ativada por

fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) ou fatores de crescimento derivados de plaqueta (PDGF), conhecidos inibidores da conversão de pré-adipócitos para adipócitos (CAMP; TAFURI, 1997; FLOYD; STEPHENS, 2012).

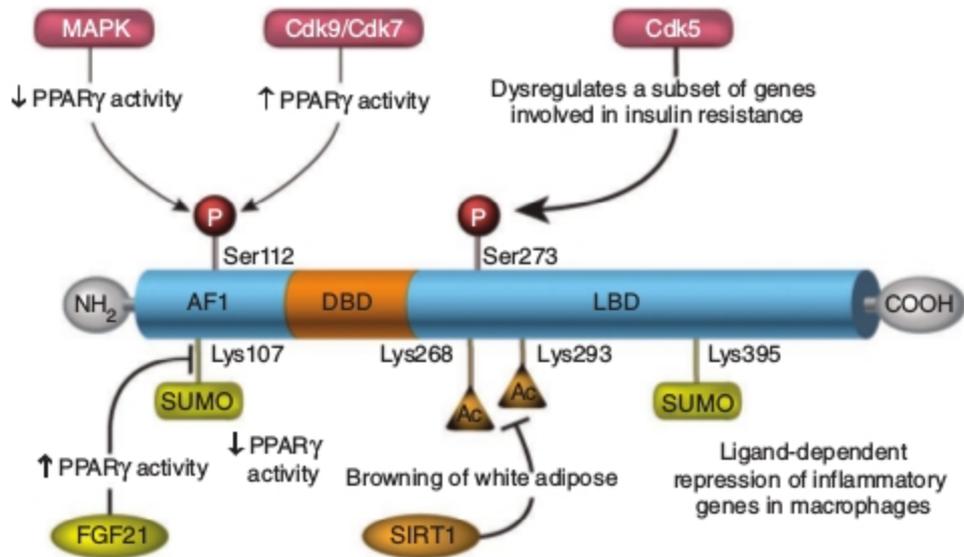


Figura 6- Sítios de modificações covalentes em PPARγ e os resultados das mesmas na atividade da proteína (AHMADIAN *et al.*, 2013).

Outro importante resíduo fosforilado é a Ser273, sendo esta realizada pela quinase dependente de ciclina 5 (CDK5). A fosforilação nesse caso leva a inibição da expressão de genes como adpsina e adiponectina, este primeiro gene se mostra muitas vezes alterado em pessoas obesas, estando relacionado à homeostase energética e também relacionada a vias alternativas de ativação do sistema complemento, e o segundo está relacionado à sensibilidade a insulina (CHOI *et al.*, 2011; LO *et al.*, 2014; ZHENG *et al.*, 2013). Além disso, outras importantes proteínas quinase como a proteína quinase A (PKA) e proteína quinase C (PKC), direta ou indiretamente, podem estar relacionadas a diminuição da atividade do PPARγ (BURNS; VANDEN HEUVEL, 2007).

A PPARγ sofre também glicosilação, na Thr54, onde ocorre a inserção de uma N-acetilglicosamina pelas enzimas O-GlcNAc transferase (OGT) e O-GlcNAcase (OGA), o que reduz a atividade transcricional servindo para regular a diferenciação de adipócitos (JI *et al.*, 2012). Outra modificação covalente sofrida por essa proteína é a sumoilação, esta ocorre na Lys107, sendo este um motivo de sumolilação dependente de fosforilação (HIETAKANGAS *et al.*, 2006). Em alguns receptores nucleares, como os de progesterona,

a fosforilação induz a inibição da sumoilação e aumenta a ubiquitinação, todavia na PPAR γ ambas reprimem a atividade transcricional, ou seja, a fosforilação da Ser112 regula sumoilação da Lys107, e a inibição desta aumenta a degradação por proteassoma (DANIEL; FAIVRE; LANGE, 2007; FLOYD; STEPHENS, 2012).

Além destas modificações covalentes, a acetilação, que consiste na transferência de um grupo acetil da acetil coenzima A (acetilCoA) para um grupamento amino seja este no N-terminal ou o da cadeia lateral da lisina, também parece apresentar grande importância em NR, e mais especificamente na PPAR γ (LI *et al.*, 2006). As enzimas que realizam a adição desse grupamento são as histonas acetiltransferases (HATs) e as histona deacetilases (HDCAs) realizam a retirada dos mesmos, sendo que a adição deste pode acontecer tanto nas histonas, o que geralmente conduz a um maior relaxamento da cromatina e aumento da transcrição, ou nos grupamentos amino das NR, o que pode ter diferentes funções nas diversas proteínas dessa família como: induzir ligação de coativadores, aumento ou diminuição da atividade transcricional, aumento da afinidade ao DNA, entre outras funções, como pode ser visto na figura 7 (WANG *et al.*, 2011). Na PPAR γ , pode ser visto na literatura que esta sofre acetilação pela HAT p300/CBP e é desacetilada pela HDCA SIRT1, e a acetilação desta proteína conduz a, por exemplo, indução da lipogênese (HAN *et al.*, 2010; TIAN *et al.*, 2014).

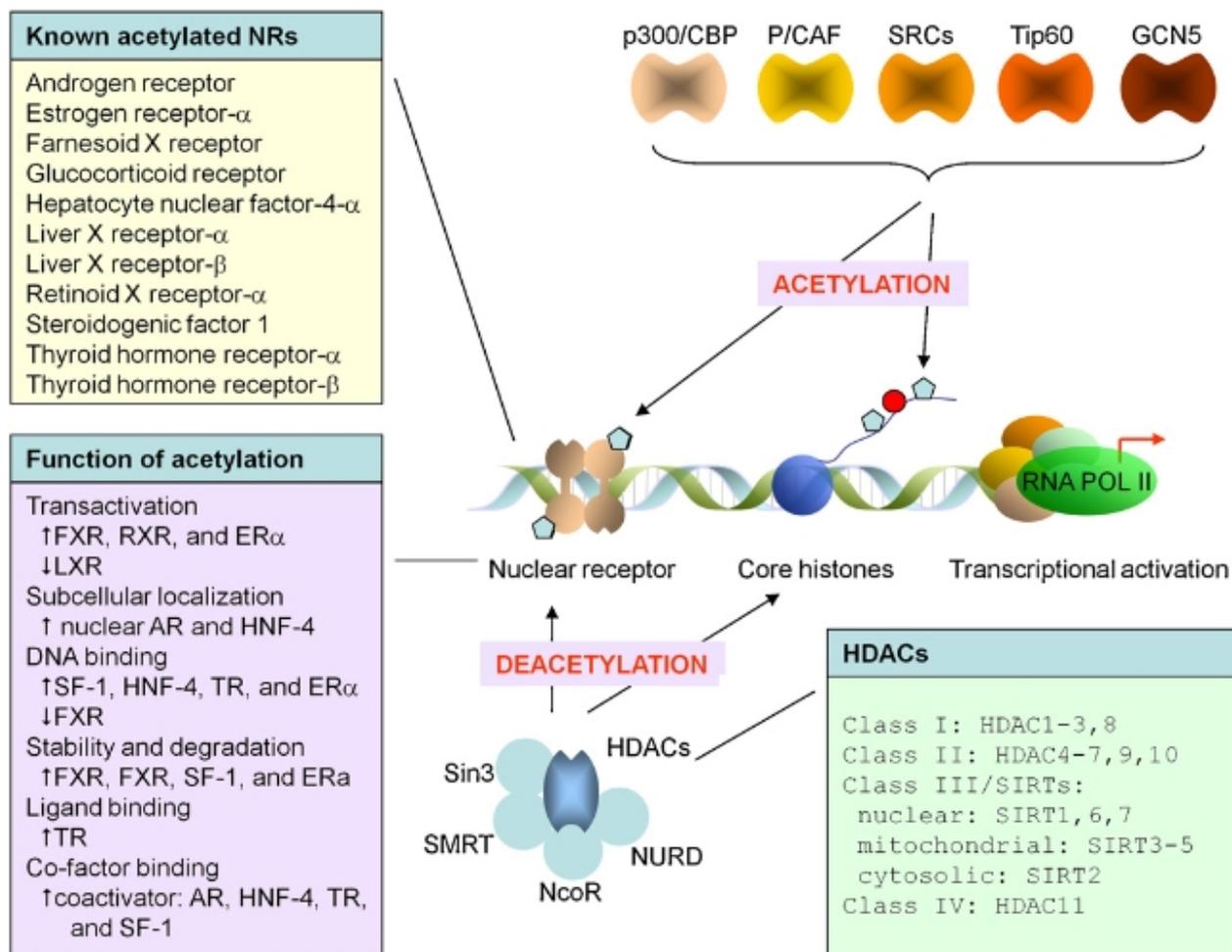


Figura 7- Esquema do resultado da acetilação em NR. Os NR são acetilados por algumas acetiltransferases (p300/CBP, P/CAF, SRCs, Tip60, GCN5) e desacetilados por HDACs (WANG *et al.*, 2011).

1.3.1. ESTRUTURA DO LBD

O domínio LBD da PPAR γ possui aproximadamente 270 aminoácidos e 32 kDa enovelados formando treze hélices α (H2', HAF e H1 até H11) e quatro fitas β curtas (S1 até S4) formando uma folha. Uma das diferenças desta proteína para as demais NR é uma hélice a mais, a hélice H2', entre a primeira fita β e a H3. Outras coisas que diferenciam das demais proteínas dessa família é o posicionamento da H2, que facilita o acesso dos ligantes, e o fato da hélice 10 e 11 formarem uma hélice contínua (KROKER; BRUNING, 2015; NOLTE *et al.*, 1998).

Quanto ao posicionamento da estrutura terciária da proteína em questão, pode-se observar que as hélices H4, H5 e H8 ficam empacotadas entre a H1, H3, H7 e H10/11, na

parte superior da proteína. A parte inferior da mesma é a região onde se encontra o LBP que se localiza entre H3, H7 e H10, isto pode ser observado na figura 8 (NOLTE *et al.*, 1998).

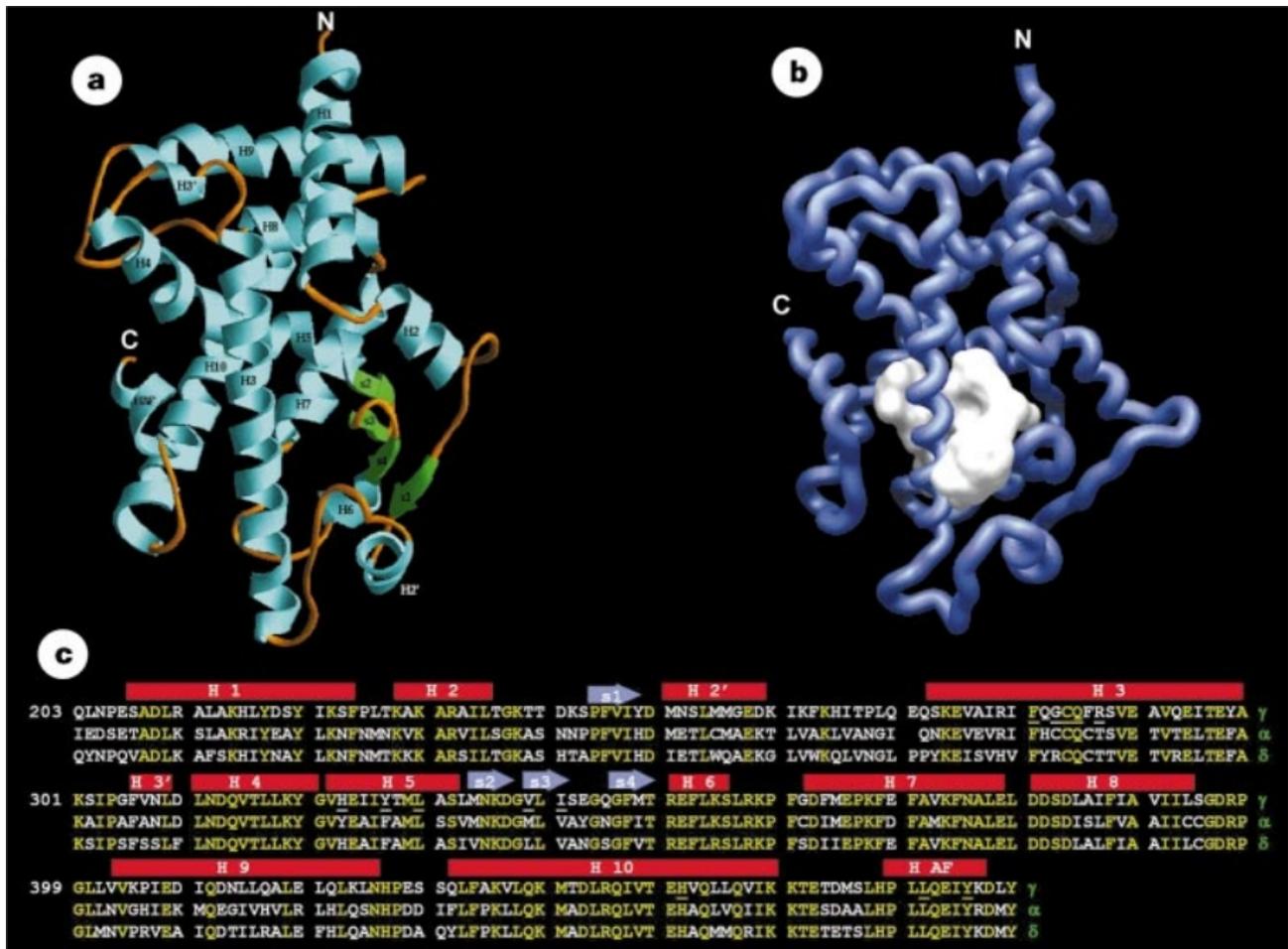


Figura 8- Estrutura do domínio LBD da apo-PPAR γ . (a) Estrutura terciária demonstrando o posicionamento das hélices α (ciano) e fitas β (verde). (b) Cadeia principal da PPAR γ (azul escuro) mostrando a área não ocupada do sítio de interação com o ligante, que apresenta um volume aproximado de 1300 Å³. (c) Alinhamento da região LBD das PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ , mostrando as regiões de hélices α (caixas vermelhas) e as fitas β (setas azuis) e os resíduos conservados em amarelo. Além disso, os resíduos que apresentam interação com a rosiglitazona estão sublinhados. A região descrita como H AF abrange a hélice 12 (NOLTE *et al.*, 1998).

O sítio de interação com o ligante é um bolsão em forma de T ou Y, que pode ser dividido em uma entrada que se ramifica para dois braços. O primeiro é um braço com alguns aminoácidos polares e se estende até a H12, e apresenta alguns resíduos

bastante conservados e importantes na interação nesta região, como: a Ser289, His323, His449 e Tyr473. O segundo é altamente hidrofóbico e vai da hélice 3 até as fitas β . A entrada do sítio, também conhecida como terceiro braço, apesar de apresentar alguns resíduos hidrofílicos na área acessível ao solvente (Asp243, Arg288, Glu290 e Glu295), também é bastante hidrofóbico, sendo que um loop entre a H2' e H3 na entrada permite que este seja bastante flexível, o que poderia permitir a entrada de ligantes grandes (NOLTE *et al.*, 1998; ZOETE; GROSDIDIER; MICHIELIN, 2007). A distribuição dos resíduos em cada um dos braços pode ser observado na figura 9.

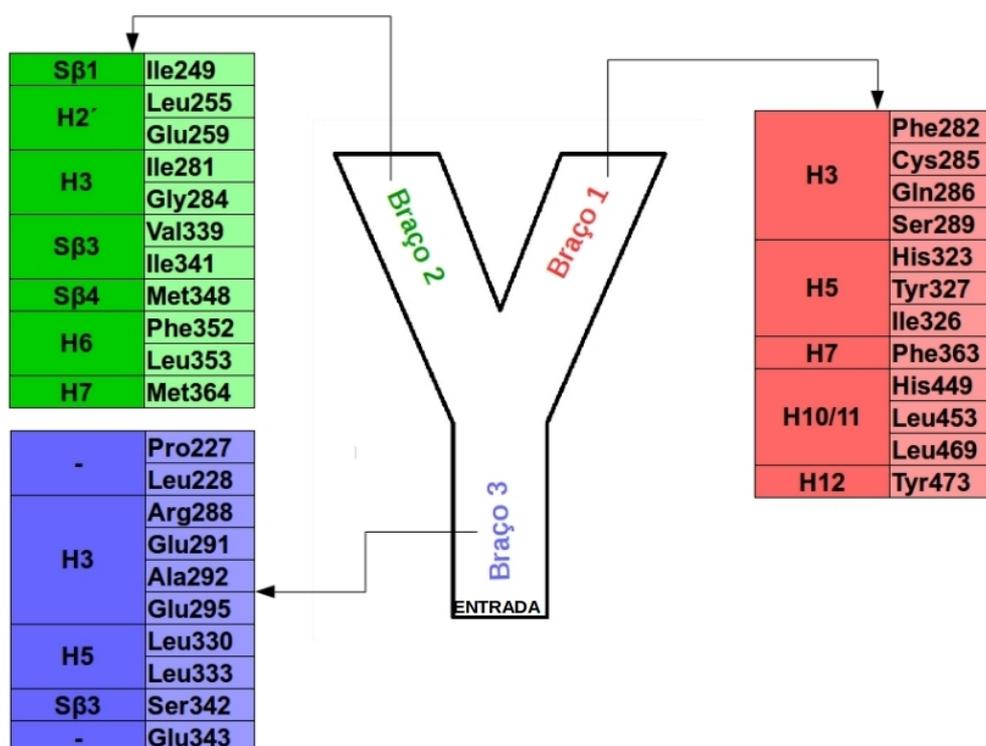


Figura 9- Distribuição dos resíduos em cada um dos braços do LBP da LBD da PPAR γ (ZOETE; GROSDIDIER; MICHIELIN, 2007).

Por sua vez, a RXR apresenta onze hélices α e duas fitas β curtas. A dimerização entre essas proteínas ocorre entre as H10 de ambas, localizadas no domínio LBD no C-terminal das proteínas, como pode ser visto na figura 10. Para que ocorra a formação deste dímero é necessário o contato entre os motivos $\Phi\Psi K\Psi\Psi K\Psi\Psi\Sigma\Psi R\Psi\Psi$ presentes em ambas H10, onde Φ resíduos aromáticos hidrofóbicos, Ψ hidrofóbicos alifáticos e Σ ácidos. Outras hélices α dos NR em questão também são de grande importância nesse processo, pontes salinas entre os resíduos Lys431 da H7 da RXR com a Tyr477 da AF-2

da PPAR γ ajudam na estabilização do dímero. (BRAMLETT; WU; BURRIS, 2001; GAMPE *et al.*, 2000).

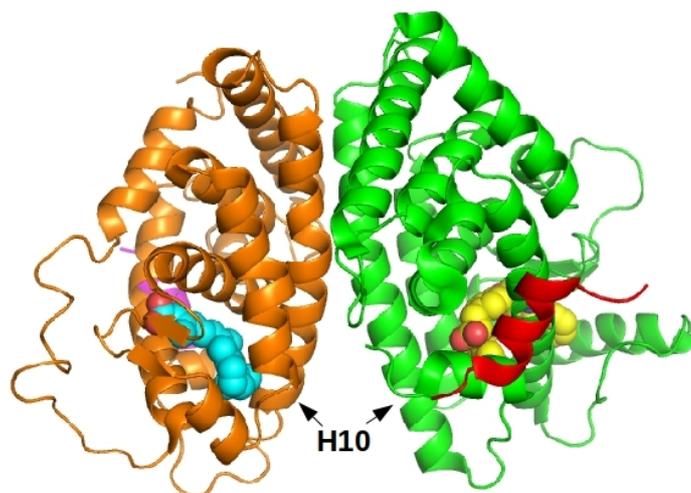


Figura 10- Estrutura do domínio LBD (PDB 1F9M) mostrando o heterodímero PPAR γ (verde):RXR(laranja) estabilizado por contatos das respectivas H10. Cada uma das proteínas apresenta um ligante em seu sítio, Gl262570 (amarelo) em PPAR γ e 9cRA (ciano) em RXR. Hélices da proteína coativadora SRC-1 são observadas em vermelho e magenta.

1.3.1.2. Hélice 12 (H12)

A H12 é uma parte bastante importante dessa proteína, e de acordo com diversas estruturas observadas na literatura esta apresenta uma variedade de conformações, indicando que esta apresentava maior motilidade que o restante da região LBD. Essa ideia foi corroborada devido a experimentos de anisotropia de fluorescência, onde um fluoróforo foi inserido a extremidade C-terminal (H12), indicando que uma maior mobilidade da mesma do que as outras regiões, e a interação com o ligante reduzia a movimentação dessa hélice, por posicionar esta na conformação ativa. Observou-se ainda redução da anisotropia quando esta proteína foi mutada nas posições Pro467Leu e Val290Met, mutações relacionadas à resistência a insulina e hipertensão (BARROSO *et al.*, 1999), o que indica que essas mutações impedem esta hélice de adotar a conformação ativa (KALLENBERGER *et al.*, 2003).

Dessa forma, essa hélice tem sido observada como uma espécie de *switch*, onde o

posicionamento desta é responsável pela interação com correpressores ou coativadores. Isso ocorre por meio de interação com ligantes que estabilizam a H12 por meio de contatos diretos com um resíduo presente nessa hélice, a Tyr473 (BRUNING *et al.*, 2007)

Sendo assim, foi estabelecido um mecanismo chamado de modelo de ratoeira (*mouse trap model*) onde a estrutura apo se apresentaria com a H12 estendida expondo o sítio de interação com ligante, como uma entrada para o LBP. Todavia, esse modelo tem sido bastante contestado, devido ao fato de que estruturas apo não se apresentam estendidas, apresentando semelhantes às holo. Apesar de uma maior motilidade da H12 em ausência de ligantes não quer dizer que esta necessariamente deve estar separada do restante da proteína, ou seja, esta hélice pode estar empacotada contra a proteína mesmo na ausência de ligantes (BATISTA; MARTÍNEZ, 2013).

1.3.2. TIPOS DE INTERAÇÃO COM PPAR γ

Diferentes tipos de ligantes são responsáveis por diferentes alterações conformacionais na estrutura desta proteína. Os ligantes ditos agonistas totais posicionam a H12 em uma conformação tal que fique favorecida a interação com proteínas coativadoras, isso ocorre devido a ligações de hidrogênio com a Tyr473. Antagonistas levam à interação com correpressores ou impedem os contatos com as proteínas coativadoras. Agonistas parciais ativam mais fracamente a transcrição de genes alvos, e atuam através de diferentes formas de interação com o receptor (BRUNING *et al.*, 2007; GARCIA-VALLVÉ *et al.*, 2015; KROKER; BRUNING, 2015).

Primeiramente, no caso dos agonistas totais, uma região de grande importância para a interação com o ligante, coativadores e correpressores é a hélice 12 (H12). Nesta hélice se encontra o domínio AF-2, que é um domínio de transativação dependente de ligante. Esta parece apresentar conformações variadas quando não esta em contato com ligantes, entretanto, quando em interação com estes, apresenta uma conformação ativa (KALLENBERGER *et al.*, 2003; PERISSI; ROSENFELD, 2005). Dessa forma, esta hélice tem sido vista como peça chave no mecanismo de ativação por ligante, sendo responsável por realizar a comunicação entre o ligante e os correguladores (BRUNING *et al.*, 2007).

Um exemplo de agonista total é a rosiglitazona, uma molécula do grupo das tiazolidinedionas (TZDs), é um composto grande que ocupa praticamente 40% do LBP, e se posiciona ao redor da H3 em forma de U. A interação ocorre com vários resíduos, os

grupos carbonila interagem com os resíduos de histidina 323 e 449, e um nitrogênio se localiza em posição em que a distância possibilita a realização de uma ligação de hidrogênio com a hidroxila presente na cadeia lateral da tirosina 473 localizada na região AF-2, como pode ser observado na figura 11. Além disso, outras importantes estruturas como o anel de piridina na outra extremidade da molécula se localiza no bolsão entre as fitas β e a H3 (BRUNING *et al.*, 2007; NOLTE *et al.*, 1998).

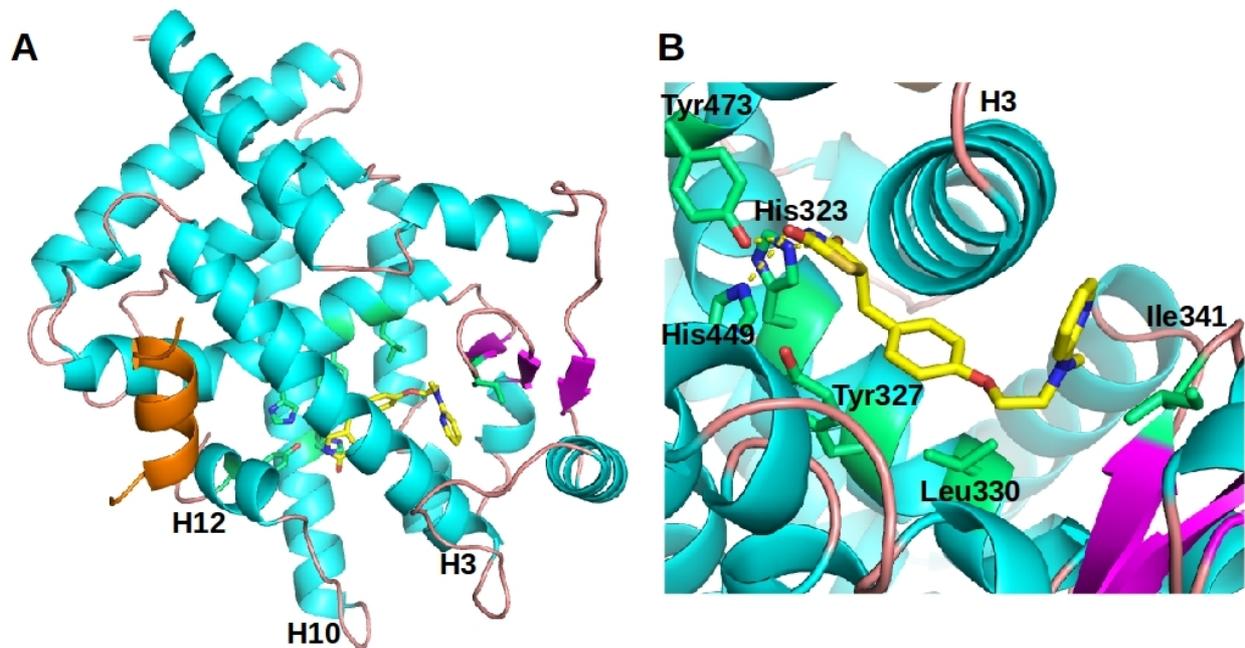


Figura 11- Estrutura região LBD de PPAR γ e SRC-1, coativador, em interação com o ligante rosiglitazona. Hélices α (ciano) e fitas β (magenta), mostrando resíduos em contato com o ligante (verde), e o motivo LXXLL de SRC-1 (laranja). (A) Estrutura em cartoon da interação. (B) Alguns dos resíduos que interagem diretamente com a rosiglitazona (PDB: 2PRG).

As interações com ligantes levam a alterações no domínio AF-2 que, por sua vez, cria um sulco hidrofóbico formado pelas hélices H3, H4, H5 e H12 (AF-2), nesta região ocorre o contato com domínios de interação das proteínas coativadoras, essas ocorrem através de um motivo em forma de hélice que contém uma sequência LXXLL, este é chamado de *NR box* (BRAMLETT; WU; BURRIS, 2001). Esta hélice entra neste bolsão entre dois resíduos carregados realizando interações com eles, sendo estes uma lisina (na H3) e um glutamato (na H12), estes dois resíduos formam uma estrutura definida como um *charge clamp*, relacionada a orientação do motivo em questão. As leucinas

presentes no *NR box* do coativador se empacotam neste bolso hidrofóbico específico, isto tem o objetivo de auxiliar na estabilização da ligação (ROSENFELD; LUNYAK; GLASS, 2006; WU *et al.*, 2003).

Na proteína PPAR γ , os resíduos que fazem parte do *charge clamp* são a Lys301 e o Glu471. Além disso, os aminoácidos presentes neste sulco e que fazem interação com o NR box são Thr297, Leu311, Gln314, Val315, Leu318 e Leu468, onde principalmente os dois últimos resíduos são responsáveis por realizar contatos hidrofóbicos com as leucinas desse motivo (NOLTE *et al.*, 1998). A interação com o *NR box* da SRC-1 pode ser visto na figura 12.

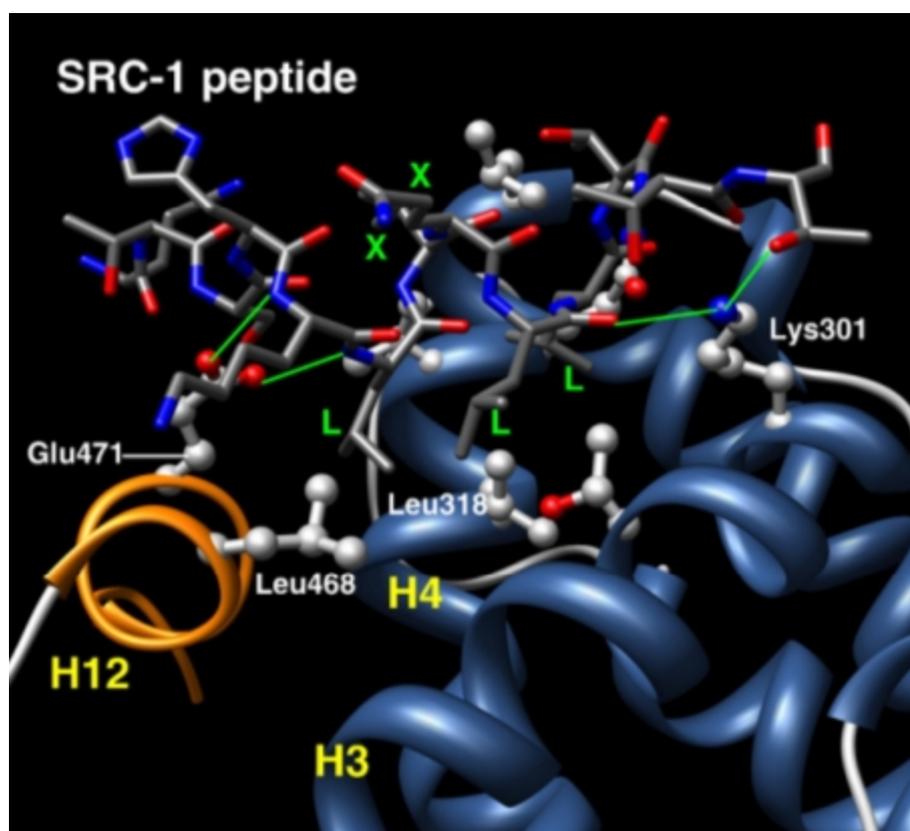


Figura 12- Interação entre o *NR box* do coativador SRC-1 e o LBD da PPAR γ (azul escuro). Os resíduos do *charge clamp*, Glu471 na H12 (laranja) e Lys301, podem ser vistos interagindo com o motivo, o que auxilia na estabilização da ligação. Além disso, a interação entre as Leu318 e 468 da PPAR γ com as Leu do motivo também estão mostradas (ZOETE; GROSDIDIER; MICHIELIN, 2007).

Muitos coativadores possuem múltiplos *NR box* no domínio de interação com o NR, e isso pode estar relacionado a uma forma de modular a ação do correolador. Como

exemplo pode-se observar a p160, esta proteína apresenta três desses motivos *in tandem* em seu domínio de interação (BRAMLETT; WU; BURRIS, 2001; ROSENFELD; LUNYAK; GLASS, 2006).

Além disso, resíduos que flanqueiam o *NR box* tem sido vistos como importantes para uma seleção preferencial de coativadores, e isso se deve a contatos realizados com a superfície do LBD (BRAMLETT; WU; BURRIS, 2001). Isso pode ser visto no PPAR γ , pois este faz interações mais fortes com o CBP e mais fracas com o SRC-1, todavia a RXR, proteína que com o qual forma heterodímero, possui a preferência contrária. Na NR RXR isso ocorre devido a três resíduos de aminoácidos próximos ao *NR box*, um resíduo hidrofóbico antes do motivo, que realiza contatos uma fenilalanina da H12, além dos dois resíduos não conservados entre as leucinas no *NR box*. Sendo assim, isso sugere que o modo de ligação desse motivo ao LBD é governado pelo LXXLL, todavia a ligação pode ser modulada pelos resíduos que flanqueiam essa região (KLEIN *et al.*, 2005; SHAO; HEYMAN; SCHULMAN, 2000).

Os ligantes antagonistas interagem no LBP da PPAR γ realizando alterações conformacionais na proteína que inibem a interação desta com coativadores e conduzindo o recrutamento de correpressores, por exemplo o NcoR e SMRT (OBERFIELD *et al.*, 1999). Alguns exemplos de antagonistas de PPAR γ são o GW9662, tem sido reportado que este faria uma ligação covalente com a Cys285, e a bexarotene, em experimentos de HDX esta não demonstrou efeito na H12, mas sim na H3 (MARCIANO *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2004).

Os correpressores, por sua vez, interagem com os NR por meio de outro motivo, LXXXIXXX[I/L], no mesmo bolsão que os coativadores. Estruturas de NR (PPAR α e ER α) em interação com antagonistas mostraram que esses ligantes não realizam interações diretamente com a H12, mas impedem que esta se posicione na conformação correta por modos diferentes, no caso da PPAR α o ligante empurra a H12, devido a um grupo volumoso, impedindo que ela fique em posição de interação com os coativadores, isto pode ser observado na figura 13. Já na ER α a H12 até conseguiria se posicionar de forma a interagir com coativadores, mas de uma forma altamente desfavorável, esta possui uma interação mais estável em outra região que mimetiza essa ligação (NAGY; SCHWABE, 2004; SHIAU *et al.*, 1998; XU *et al.*, 2002).

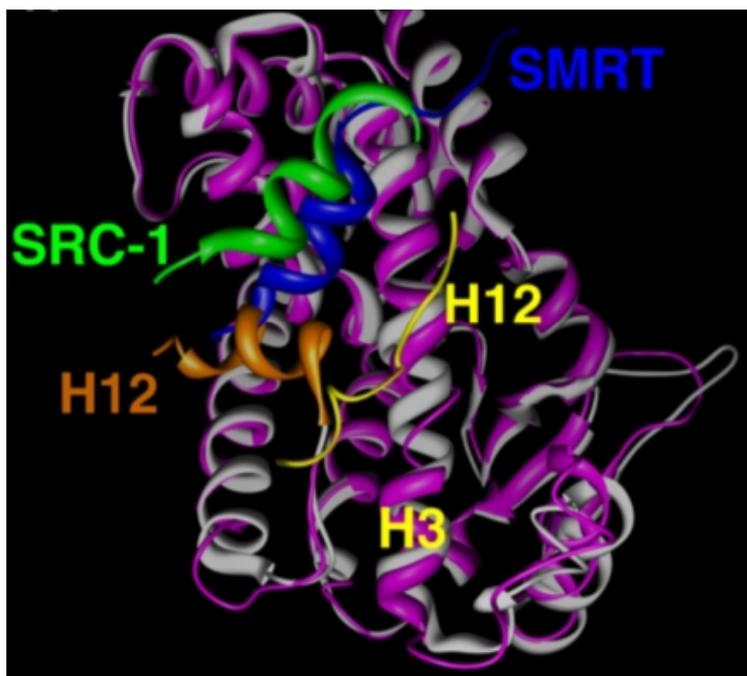


Figura 13- Sobreposição das estruturas de PPAR em interação com os motivos do SRC-1 e o SMRT (branco e magenta, respectivamente). A H12 (laranja) em interação com o coativador (verde) e a mesma (amarelo) em conformação diferente na interação com e o correpressor (azul) (ZOETE; GROSDIDIER; MICHIELIN, 2007).

Por sua vez, agonistas parciais ao interagirem com PPAR γ fazem que este assumam uma conformação distinta da interação com agonistas totais e antagonistas. Estes ligantes não interagem diretamente com a H12, apresentando muitas vezes um fraco recrutamento de alguns coativadores (ELBRECHT *et al.*, 1999; FUJIMURA *et al.*, 2005; OBERFIELD *et al.*, 1999). Estas moléculas interagem principalmente com resíduos na entrada e na região hidrofóbica do braço dois, o que pode conduzir a uma não estabilização da H12 (GARCIA-VALLVÉ *et al.*, 2015).

Uma das ideias observadas na literatura é que o grau de estabilização da H12 está diretamente relacionada ao grau de agonismo de uma molécula, ou seja, quanto mais um composto consegue manter esta hélice numa conformação que permite a interação com coativadores maior é seu grau de agonismo. Uma das formas que isso pode ocorrer é que apesar de não interagir diretamente com H12 agonistas parciais, através de interações com a hélice 11, podem controlar indiretamente a dinâmica da H12 (NETTLES *et al.*, 2004; NETTLES; GREENE, 2005), como pode ser visto na figura 14.

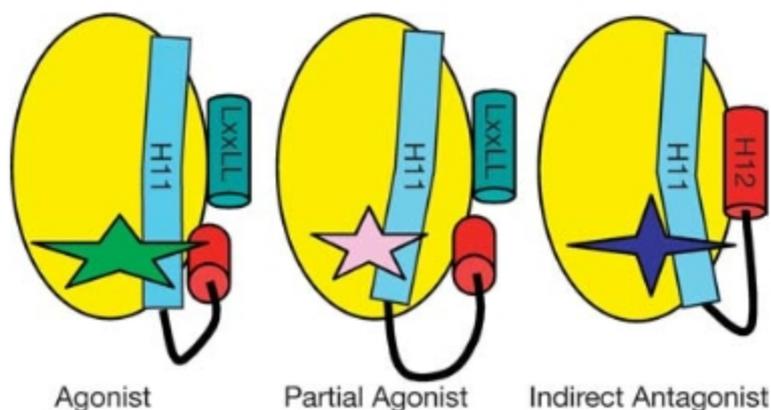


Figura 14- Controle da hélice 12 através da hélice 11. Diferentes tipos de agonistas (estrelas) controlam a dinâmica da hélice 12 de diferentes formas. Agonistas totais por interação direta, os parciais por deslocamento da hélice 11 e antagonistas indiretos por empurrarem a hélice 11 para o local da H12 (NETTLES; GREENE, 2005).

Alguns cristais da proteína PPAR γ em interação com ligantes trazem uma outra ideia sobre a estabilização da H12 por agonistas parciais. Um deles é da molécula INT131, onde este composto não aparece fazendo interações diretamente com os resíduos da AF-2, todavia duas moléculas de água faziam o papel de intermediar esses contatos. O tetrabromobisfenol A (TBBPA), outro agonista parcial, também apresenta essa mediação realizada por moléculas de água, como pode ser visto na figura 15. Sendo assim, a estabilização parcial da H12 pode estar relacionada a interações indiretas mediadas por moléculas de água entre o ligante e os resíduos da AF-2 (DELFOSSÉ *et al.*, 2014; MOTANI *et al.*, 2009).

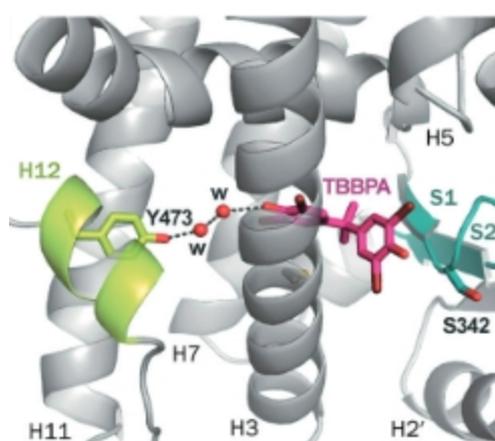


Figura 15- Interação indireta do TBBPA dentro do LBP da PPAR γ com o resíduo Tyr473 através de moléculas de água (DELFOSSÉ *et al.*, 2014).

Todavia, tem se observado dados na literatura que a estabilização de H12 não é o único mecanismo que permite uma resposta transcricional. Em experimentos de troca isotópica de hidrogênio/deutério (HDX) foi observado que vários ligantes parciais estabilizam a região de fitas β , o que pode indicar uma superfície de interação com coativadores distinta (BRUNING *et al.*, 2007).

Estruturalmente, os agonistas parciais de PPAR γ apresentam algumas características comuns, primeiramente a maioria deles ocupa o segundo e terceiro braço do bolsão de interação com ligante, estabilizando H3, interagindo especialmente com Cys285 e Arg288. Em se tratando das fitas β a estabilização ocorre por interação com o grupo amina da cadeia principal de resíduos como Ser342 ou por interações hidrofóbicas com a Ile341, por exemplo. Outros tipos possíveis são interação do tipo pi-pi com Phe264 (H2'), Phe282 (H3) e Phe363 (H7). Além disso, quando este tipo de agonista interage no braço I é de modo fraco com poucos dos resíduos importantes (His323, His449 e Tyr473), e algumas vezes realiza interações eletrostáticas com outros resíduos como Tyr327 ou Ser289 (KROKER; BRUNING, 2015), um exemplo dessa interação pode ser visto na figura 16.

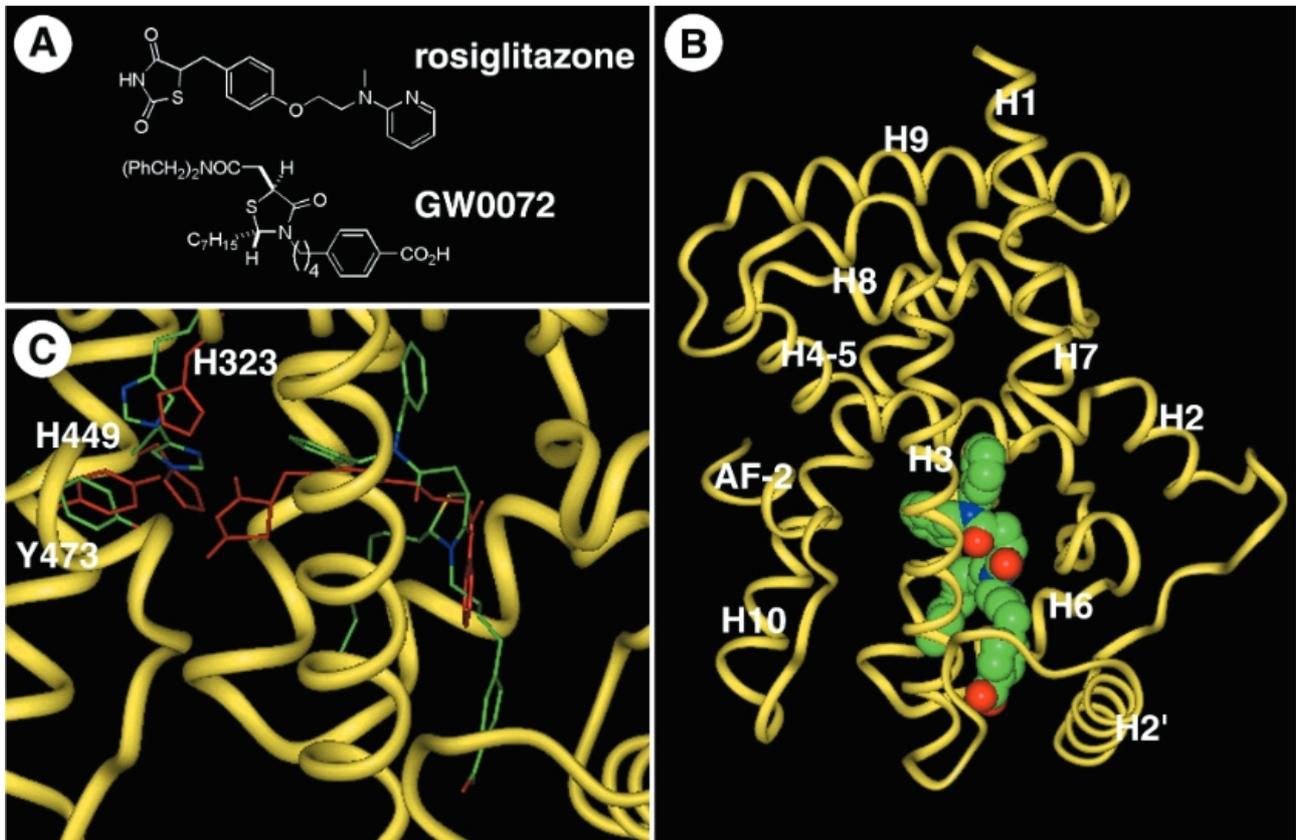


Figura 16- Interação entre o agonista parcial GW0072 e a PPAR γ . (A) Estruturas dos ligantes rosiglitazona e GW0072 e (B) modo de interação do segundo composto (esfera de van der waals) no domínio LBD (cadeia principal em amarelo). (C) Interação com resíduos His323, His449 e Tyr473 realizada pela rosiglitazona, todavia o GW0072 não realiza essas interações que estabilizam a H12 (OBERFIELD *et al.*, 1999).

Outro tipo de moléculas que interagem com PPAR γ são ácidos graxos. Na literatura pudemos ver que ácidos graxos com dez carbonos, ácido decanóico (DA), um ácido graxo de tamanho médio (MCFA), interagiram com o PPAR γ de modo parcial. Diferentemente de outros agonistas parciais essas moléculas interagem com a H12, por interações polares com os resíduos His323, His449 e Tyr473. Mas o modo de ligação varia entre essas moléculas, a cauda do DA interage em um bolso hidrofóbico estreito formado pelas hélices 1, 7, 10 e 12, posição que não é possível em caso de caudas maiores, todavia isso atrapalha a geometria das ligações hidrogênio nos resíduos do sítio de agonismo total. Em experimentos de HDX, esse ligante não demonstrou a mesma capacidade da rosiglitazona de estabilizar a H12 (MALAPAKA *et al.*, 2012).

Em outras estruturas de PPAR γ em interação com MCFA foram observados três ligantes, com nove carbonos, interagindo no LBP, os dados indicam estes compostos

como agonistas parciais. Estes ocupavam os três braços, interagindo também com os resíduos relacionados ao agonismo total, de modo mais fraco que os TZD, e dois deles realizavam ligação de hidrogênio com a Arg288. (LIBERATO *et al.*, 2012).

Quanto à interação com ácidos graxos oxidados, o ligante 9-HODE apresentou duas moléculas no LBP, uma também interagindo no braço um e o outro ocupando a região entre H3 e as fitas β , sendo que o ligante dessa região realiza pontes salinas importantes com a Arg288, como pode ser visto na figura 17. Essa última região também foi ocupada pela 13-HODE e por outros compostos que agem como agonistas parciais (ITOH *et al.*, 2008).

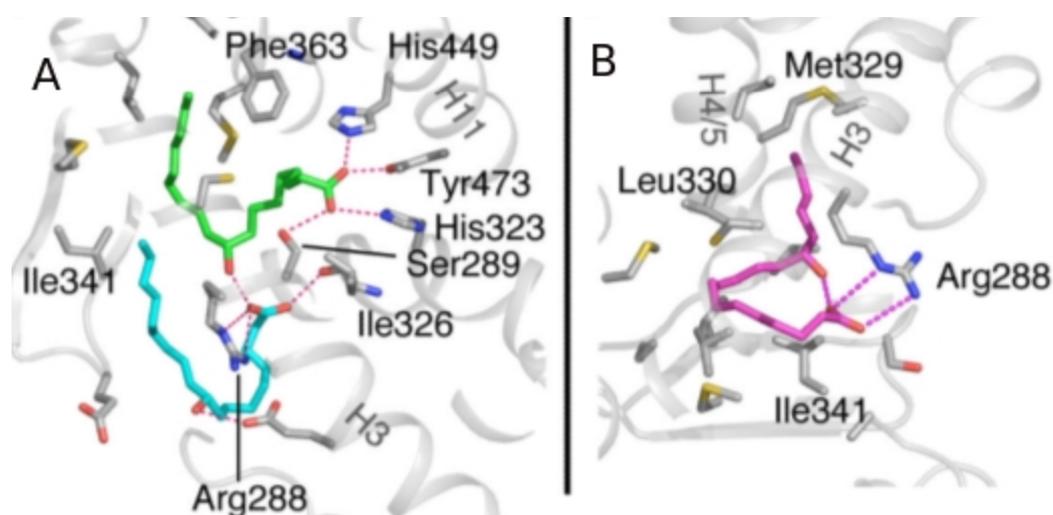


Figura 17- Interação das moléculas (A) 9-HODE (verde e ciano) e (B)13-HODE (magenta) no LBP da PPAR γ (ITOH *et al.*, 2008).

Derivados de ácido oléico tem sido apontados também como agonistas parciais de PPAR γ , estes realizam distintas interações com coreguladores em comparação a rosiglitazona, por exemplo esta molécula induz um recrutamento mais fraco de CBP-1 e PGC1-ALFA. Esta molécula também realiza reação covalente com a Cys285 (SCHOPFER *et al.*, 2010). Derivados de ácido linoleico também apresentaram antagonismo a essa proteína. Grupos nitro de dois isômeros desse ligante realizam ligações de hidrogênio com os resíduos Arg288 e Glu343 respectivamente, e o grupo carboxila interage com o Gln286, na H3, His449 e Tyr473 (LI *et al.*, 2008).

Sendo assim o PPAR γ parece ser um receptor de uma grande quantidade de diferentes ácidos graxos, o que se deve ao seu LBP altamente promiscuo, permitindo que estas moléculas interajam em diferentes posições de acordo com suas variadas

estruturas. Além disso, o fato desses ácidos graxos se apresentarem como agonistas parciais sugere que este é um mecanismo usado por ligantes endógenos. Estas estruturas também indicam a possibilidade de múltiplos e diferentes ligantes conseguirem ocupar o LBP ao mesmo tempo (ITOH *et al.*, 2008; MALAPAKA *et al.*, 2012).

Um outro grupo de moléculas que tem sido testados são os não agonistas de PPAR γ . Estes compostos não tem o objetivo de realizar o agonismo clássico, todavia tem sido utilizado com o objetivo de gerar alterações conformacionais que interfiram na fosforilação na Ser273, que, por sua vez, leva a inibição da proteína em questão provavelmente por ligação de correpressores. Isto pode estar relacionado à estabilização da H2 e H2' através da interação com um grupo amida da Ser342, pois nessa região é que esta localizada a Ser273, ou seja, interações que reduzem a dinâmica dessa região desfavorecem a esta fosforilação, ou por estabilização de demais regiões próximas (CHOI *et al.*, 2010, 2011; GARCIA-VALLVÉ *et al.*, 2015).

Todavia, é observado na literatura que muitos agonistas parciais e também agonistas totais como os TZDs são capazes de inibir essa fosforilação (CORZO; GRIFFIN, 2013). Os MCFA são apresentados na literatura também como inibidores da fosforilação na posição 273, e isso pode ocorrer devido a estabilização das fitas β (LIBERATO *et al.*, 2012).

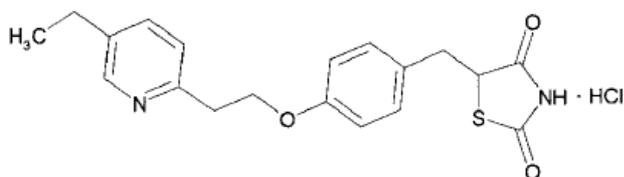
Os moduladores seletivos de PPAR (SPPARMs), moléculas que atuam aumentando a sensibilidade a insulina, todavia apresentam efeitos anti-adipogênese. Agonistas parciais demonstram resultados característicos de SPPARMs, e em outros NR como os receptores de esteroide esses moduladores foram responsáveis por reduzir bastante a toxicidade, com eficácias variadas (BERGER *et al.*, 2003; BRUNING *et al.*, 2007).

As bases estruturais dessa redução de toxicidade tem sido hipotetizada como um recrutamento seletivo de coativadores, ou seja, ligantes com características diferentes de interação irão induzir mudanças conformacionais diferentes na proteína alvo e, por conseguinte, recrutar diferentes coreguladores. Alguns dados tem corroborado esta hipótese, pois alguns agonistas parciais de PPAR γ tem recrutado com menor eficiência os coativadores CBP do que os agonistas totais, mas apresentam a mesma eficiência de recrutamento de PGC-1 α , relacionados a supraexpressão de genes envolvidos com o transporte de glicose e sensibilidade a insulina (FUJIMURA *et al.*, 2005).

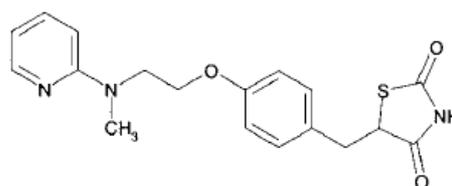
1.3.3. AGONISTAS DE PPAR γ

Muitas moléculas diferentes tem sido levantadas como agonistas naturais, ou seja, compostos endógenos capazes de interagir como PPAR γ e ativar processos biológicos, sendo essas moléculas pertencentes a grupos de ácidos graxos poliinsaturados e seus derivados, flavonoides, protanóides e eicosanoides (AGOSTINI *et al.*, 2004; MARION-LETELLIER; SAVOYE; GHOSH, 2015).

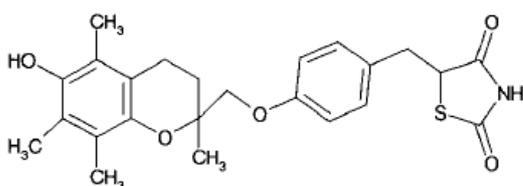
Em se tratando de compostos sintéticos, o principal grupo de moléculas agonistas de PPAR γ são TZDs, estas são utilizadas para tratamento de diabetes do tipo 2, tendo como membros desse grupo de compostos a troglitazona, rosiglitazona (Figura 18) e pioglitazona. Estas moléculas tem interação de modo agonista total com a proteína, sendo responsáveis por aumentar a sensibilidade a insulina, levando a redução de dos níveis de ácido graxo e triglicerídeos, e aumento do lipoproteínas de alta densidade (*HDL*) (ENCINAR *et al.*, 2015; SAKAMOTO *et al.*, 2000).



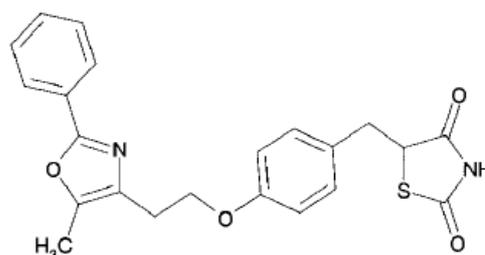
Pioglitazone HCl



Rosiglitazone



Troglitazone



AD-5061

Figura 18- Estrutura de moléculas derivadas de TZD (SAKAMOTO *et al.*, 2000).

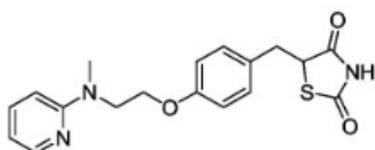
Estas moléculas eram utilizadas no tratamento de hiperglicemia, por exemplo, tendo como alvo de atuação o PPAR γ e apresentaram efeitos colaterais muito fortes quando utilizados por longos períodos, como: edemas, ganhos de peso, hepatotoxicidade,

entre outros, e apresenta seu uso restringido nos Estados Unidos e Europa para moléculas como a rosiglitazona. Apesar disso, se discute casos onde o benefício do uso dessas drogas, aumento a sensibilidade a insulina e preservação das células β , façam com que o uso valha a pena mesmo com chances de malefícios tão pesados (KOFFARNUS; WARGO; PHILLIPPE, 2013; SAHEBKAR; CHEW; WATTS, 2014).

Mesmo com os problemas relacionados a esse grupo de moléculas, ainda se buscam novos ligantes nessa categoria que apresentem resultados clínicos com efeitos colaterais menores e bons efeitos de aumento de sensibilidade a insulina. Uma dessas moléculas é a rivoglitazona, que tem apresentado efeitos adversos menores do que os demais do seu grupo (KOFFARNUS; WARGO; PHILLIPPE, 2013; MISHRA; SHARMA, 2015). Outra é a balaglitazona, que tem sido desenvolvida como um agonista parcial, a qual esta indo para a fase de teste III, e os resultados tem apontado também esta como mais segura, apesar de ainda apresentar retenção de fluidos (AGRAWAL; JAIN; DIKSHIT, 2012).

Outro grupo de moléculas que interagem com PPAR γ são chamados de agonistas baseados em tirosina (TA), tendo como exemplo de composto os glitazar, dentre eles o farglitazar e GW7845 (AGOSTINI *et al.*, 2004; GIAGINIS; TSANTILI-KAKOULIDOU; THEOCHARIS, 2008; GROMMES *et al.*, 2005). Os TA são compostos mais apresentam uma pontência maior que as glitazonas (GAMPE *et al.*, 2000). As estruturas do farglitazar e da rosiglitazona podem ser vistos lado a lado na figura 19.

A Rosiglitazone (BRL49653)



B Farglitazar (GI262570)

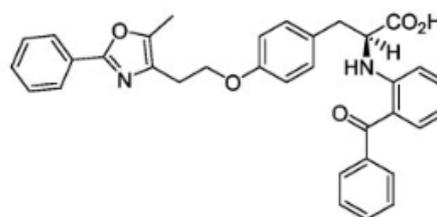


Figura 19- Desenho das estruturas dos agonistas sintéticos de PPAR γ (A) rosiglitazona e (B) farglitazar.

Entretanto, assim como os TZDs, os TA também apresentaram efeitos colaterais em pacientes, podemos ver isso no caso do farglitazar que na fase III dos experimentos clínicos, devido ao surgimento de edemas em pacientes, não foi aprovado (PETERSEN *et al.*, 2011).

O grupo de moléculas glitazars, tendo como representantes o muraglitazar, o tesaglitazar e, posteriormente, o alegliatazar, o farglitazar também está incluído nessa família (WEI *et al.*, 2012). Estes são agonistas tanto do PPAR γ quanto do PPAR α , e foram desenvolvidos com o objetivo para aumentar a sensibilidade a insulina e combater a hiperglicemia, como os TZDs e, além disso, reduzir os triglicérides (TG) e aumentar o HDL (SAHEBKAR; CHEW; WATTS, 2014).

Todavia, como os demais, várias moléculas apresentaram efeitos colaterais fortes, assim como o farglitazar, o muraglitazar levava a falhas cardíacas e o aumento da creatinina no sangue. O Aliglitazar foi proposto como um ligante com efeitos mais balanceado, entretanto, na fase III de testes apresentou danos cardíacos (SAHEBKAR; CHEW; WATTS, 2014).

Sendo assim, tem-se buscado novas moléculas capazes de interagir com essa proteína alvo com efeitos colaterais menores. Na literatura encontra-se muitos artigos buscando moléculas que seriam agonistas parciais da proteína PPAR γ , ou seja, estes atuariam, por exemplo, no aumento da sensibilidade a insulina sem levar a efeitos colaterais fortes como os gerados pelos agonistas totais (AGRAWAL; JAIN; DIKSHIT, 2012).

Várias empresas farmacêuticas, como Astellas e Roche, já tem buscado moléculas parciais (AGRAWAL; JAIN; DIKSHIT, 2012) e estes estudos parecem indicar que essas moléculas apresentam menos efeitos adversos. Moléculas com agonismo parcial, como a INT131, MCC-555, DRF-2539 e metaglidasen se encontram na fase II dos testes clínicos. Além disso, o telmisartan, um fármaco usado para combater hipertensão foi observado como tendo atividade de agonista parcial de PPAR γ (KROKER; BRUNING, 2015).

Estes agonistas parciais podem ser classificados dentro de alguns grupos como os baseados em indoles (nTZDpa, SPPAR γ M2, MRL24), em benzimidazoles (compostos 13 e Telmisartan), em cerocosporamidas (Cerco-A, composto 23 e 17) e em sulfonamidas (INT131 e T2384) (KROKER; BRUNING, 2015). Além disso, os ácidos graxos, que tem se mostrado como agonistas parciais, também estão nesta lista. Os DA tem apresentado aumento de resistência a insulina sem ganho de peso em estudos em animais (MALAPAKA *et al.*, 2012).

Moléculas derivadas de plantas realizam várias funções biológicas, por causa dessa promiscuidade servem como promissoras estruturas no descobrimento de novos fármacos e base para construção de diversas moléculas, sendo por isso selecionadas para design de drogas. A seleção de moléculas que são derivados de produtos naturais

também tem sido usada para obter agonistas parciais de PPAR γ (BARRAJÓN-CATALÁN *et al.*, 2014; ENCINAR *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2014). Muitos desses produtos naturais já tem sido observados como agonistas de PPAR γ , como amorfrutins (WEIDNER *et al.*, 2012) e formononetin (SHEN *et al.*, 2006). Outro exemplo é o uso de virtual screening contra bibliotecas de compostos naturais que selecionou a molécula do ácido oleanólico como agonista (PETERSEN *et al.*, 2011). O prof. Dr. Luiz Romeiro, do Laboratório de Desenvolvimento e Inovação Terapêutica

da Universidade de Brasília, desenvolveu diversos ligantes baseados em um produto natural obtido de fontes como o cajueiro, o ácido anacárdico (ALVES, 2015).

1.3.4. ÁCIDO ANACÁRDICO

O ácido anacárdico (AA), também conhecido como 6-Pentadecanoylsalicylic acid, figura 20, é encontrado principalmente em plantas pertencentes à família Anacardiaceae, dentre elas podemos citar em especial o cajueiro (*Anacardium occidentale*) e a cuachalate (*Amphipterygium adstringens*), onde a casca dessa árvore é utilizada para diversos tratamentos no México. Além disso, em fitas e frutos de *Ginkgo biloba* também apresentam este composto. Essa molécula está presente em grande quantidade no líquido da castanha do cajú (SUNG *et al.*, 2008; XIU *et al.*, 2014).

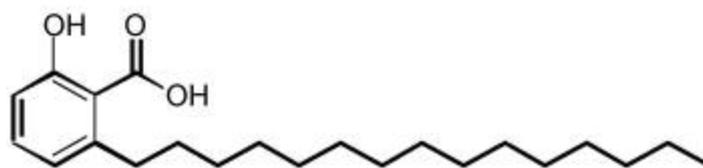


Figura 20- Estrutura do ácido anacárdico (SUNG *et al.*, 2008).

Essa molécula tem se mostrado um interessante alvo farmacológico por estar relacionado à inibição de espécies reativas de oxigênio (ROS), a atividade antimicrobiana, e inibição de acetiltransferases de histonas (HATs). Outra atividade bastante estudada do AA é sua ação anti-cancerígena em algumas linhagens celulares *in vitro*, o que pode ser devido à indução da auto-fosforilação da Aurora Kinase A ou inibição da p300 HAT (HEMSHEKHAR *et al.*, 2012).

Além disso, o AA tem apresentado resultados interessantes relacionados à proteína

NF- κ B, relacionada a tumorigênese, inflamação e apoptose. Esta molécula tem apresentado capacidade de suprimir NF- κ B através da inibição de IKK (SUNG *et al.*, 2008). Também está relacionada com a inibição da peroxidação do ácido linoleico realizada pela lipoxigenase-1 de soja, e também apresenta a capacidade de quelar metais (HA; KUBO, 2005). Sendo assim, a molécula do AA tem se mostrado um interessante alvo para teste como fármaco e também como arcabouço para design de drogas com variados fins.

O prof. Dr. Luiz Romeiro, da UnB, sintetizou diversos ligantes derivados do ácido anacárdico que foram utilizados em ensaios de gene repórter e ativação da luciferase demonstrando perfil de agonistas parciais de PPAR α e PPAR γ (ALVES, 2015). Além disso, a colaboradora profa. Dra. Kelly Magalhães, no Instituto de Ciências Biológicas da UnB, executou ensaios *in vitro* e observou que alguns desses ligantes induzem um aumento da expressão de PPAR γ (SAMPAIO, 2015). Neste trabalho formamos colaboração com estes dois professores para realizar estudos estruturais da interação destes compostos derivados de AA com o alvo proteico PPAR γ .

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo identificar os modos de interação entre moléculas derivadas do ácido anacárdico e o PPAR γ , por meio de estudos estruturais *in silico* (*docking* e dinâmica molecular, MD).

2.2. Objetivos específicos

- 1- Desenhar os ligantes utilizando o ChemBioDraw.
- 2- Preparar os ligantes e a proteína para o experimento de docking.
- 3- Usar o programa de docking AutoDock Vina para analisar a interação dos derivados do ácido anacárdico com o PPAR γ .
- 4- Analisar os resultados para seleção das melhores poses.
- 5- Realizar a dinâmica molecular da apo-PPAR γ .
- 6- Realizar a dinâmica molecular da holo-PPAR γ .
- 7- Analisar os resultados da dinâmica molecular.
- 8- Obter a construção do domínio LBD da PPAR γ .
- 9- Otimizar a expressão do domínio LBD da PPAR γ .
- 10- Purificar do domínio domínio LBD da PPAR γ .

3. JUSTIFICATIVAS

O PPAR γ tem se mostrado como uma proteína de grande importância por estar relacionado com vias importantes do metabolismo de ácidos graxos e carboidratos, e sendo estas biomoléculas cruciais para os organismos, é de extrema relevância entender como a proteína em questão interfere neste metabolismo e como esta atua para a manutenção da homeostase de um organismo. Dessa forma, estudos estruturais do PPAR γ são de grande importância para entender a função dessa proteína, sabendo que o entendimento estrutural e das interações que esta faz leva à compreensão da função realizada pela mesma.

Além disso, o PPAR γ tem como função atuar no controle da expressão de importantes genes, pois esta atua como um fator de transcrição, sendo assim alterações em seu funcionamento normal tem levado a uma série de doenças que tem atingido grande número de pessoas, como a diabetes, hipertensão e até mesmo câncer. Dessa forma, levantar conhecimento sobre esta proteína é importante e pode auxiliar numa melhor compreensão sobre seu papel nesses diversos tipos de doenças.

Sabe-se que as moléculas atualmente comercializadas que interagem com esse NR, como os TZDs, aumentando a sensibilidade a insulina em doenças como a diabetes, tem apresentado efeitos colaterais como retenção de líquidos, aumento do risco de problemas cardíacos, entre outros (SAHEBKAR; CHEW; WATTS, 2014). Por essa causa, tem-se buscado agonistas parciais para interação com o PPAR γ , pois estes poderiam interagir e aumentar a sensibilidade a insulina sem causar tantos efeitos colaterais. Sendo assim, se mostra de grande importância trabalhos que busquem novas moléculas que possam ser usadas como fármacos que atuem de forma mais segura, ou seja, sem tantos efeitos colaterais (AGRAWAL; JAIN; DIKSHIT, 2012).

A possibilidade do ácido anacárdico e seus derivados apresentarem atividade de agonistas de PPAR γ tem sido observada através de ensaios de gene repórter e ativação de luciferase (ALVES, 2015). Outras análises *in vitro* tem também observado a sua atividade em células cancerígenas e aumento da expressão da PPAR γ (SAMPAIO, 2015). Estes trabalhos tem sido desenvolvidos na Universidade de Brasília pelos colaboradores prof. Dr. Luiz Rumeiro e profa. Dra. Kelly Magalhães. No intuito de dar seguimento a esses estudos o presente trabalho objetiva a identificação dos modos de interação entre moléculas derivadas do ácido anacárdico e o PPAR γ , contribuindo com o entendimento da ação dos agonistas e seus efeitos na estrutura da proteína.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Docking

4.1.1 DESENHO DOS LIGANTES

Primeiramente, as estruturas dos ligantes foram obtidas por colaboração com o professor doutor Luiz Romeiro do Laboratório de Desenvolvimento e Inovação Terapêutica, Núcleo de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina na Universidade de Brasília. Obteve-se um total de nove ligantes (LDT11, LDT13, LDT15, LDT28, LDT29, LDT30, LDT208, LDT380 e LDT383), as estruturas desses podem ser vistos na figura 21.

As moléculas foram desenhadas utilizando os programas ChemBioDraw e ChemBio3D, que se encontram no pacote de programas ChemBioOffice. Realizou-se uma minimização de energia dessas moléculas utilizando o campo de força MMFF94 pelo programa ChemBio3D.

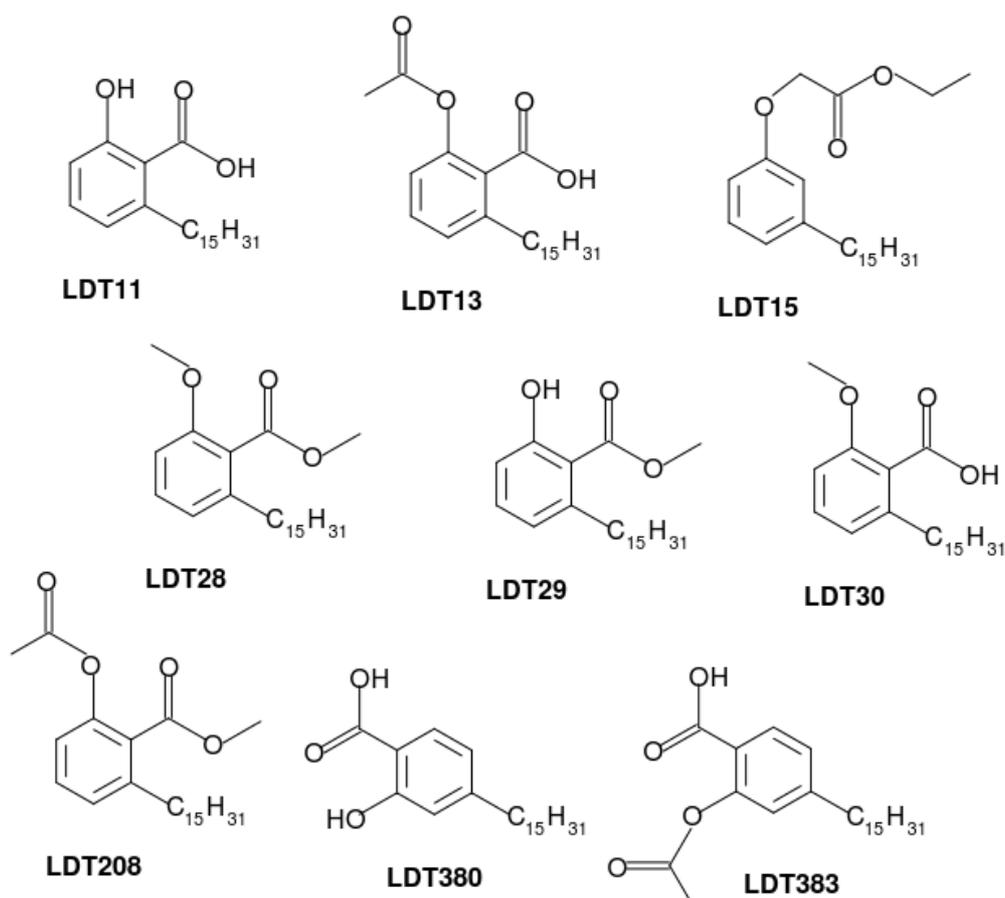


Figura 21- Ligantes derivados de ácido anacárdico utilizados no presente trabalho.

4.1.2. SELEÇÃO DA PROTEÍNA

A estrutura da proteína para se utilizar no *docking* e na dinâmica molecular (MD) foi selecionada entre as várias estruturas do domínio LBD da PPAR γ depositadas no banco de dados PDB. A estrutura selecionada para esse fim foi a 2VSR (ITOH *et al.*, 2008), com uma resolução de 2,05 Å, resolvida pela metodologia de difração de raios X. Esta apresentava um homodímero da proteína em interação com o ligante 9-(S)-HODE, um ácido graxo saturado, onde em uma das proteínas do dímero encontrava-se dois ligantes interagindo no LBP e na outra somente um. Dentre as duas selecionou-se a proteína com dois compostos no sítio de interação.

4.1.3. DOCKING

Dois tipos de *docking* foram feitos, primeiramente, realizou-se experimentos com o com a proteína rígida, ou seja, somente o ligante teve a possibilidade de fazer a rotação dos ângulos torcionais entre seus átomos. No segundo tipo, por sua vez, permitiu-se a flexibilidade de algumas cadeias laterais de alguns resíduos da proteína em uma região de contato da H3 (Arg288, Glu291 e Glu343), que denominamos como RH3, e da H12 (His323, His449 e Tyr473), que chamamos de RH12 (NETTLES, 2008).

O programa utilizado para as análises de *docking* foi o AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010). Antes de realizar este experimento *in silico* preparou-se tanto a proteína quanto o ligante para a corrida, para isso utilizou-se o pacote MGLTools. Para o *docking* rígido, primeiramente realizou-se a preparação da proteína que foi utilizada, sendo assim, retirou-se todas as moléculas de água da estrutura, e adicionou-se os hidrogênios polares (estes não se estão presentes no arquivo do PDB), e selecionou-se a área em que foi feita a procura das poses (*grid box*), a região em que o ligante interage (center_x = 17.102, center_y = 19.055, center_z = 16.176 , size_x = 28, size_y = 20 e size_z = 30), a qual compreende toda a região do LBP .

Para o *docking* onde alguns resíduos estavam flexíveis, além dos passos anteriormente citados, selecionou-se os resíduos desejados dando a estes capacidade de rotação dos seus ângulos torcionais. Após isso, realizou-se a preparação do ligante, ao carregar o composto no programa, automaticamente é detectada a carga do ligante, além disso, cada átomo presente na molécula é classificado e as ligações passíveis de rotação detectadas.

Devido ao fato da fenda onde se localiza o LBP desta proteína ser bem grande é possível observar na literatura dois (ITOH *et al.*, 2008), e até três ligantes (LIBERATO *et al.*, 2012), interagindo em posições diferentes, realizou-se *dockings* ocupando duas posições no bolsão de interação com o ligante, uma região de interação próximo a Arg288 a qual compreende também um pouco do braço dois do LBP (RH3), e outra próxima a Tyr473, localizada no braço um (RH12). Sendo assim, além do experimento com o LBP vazio, realizou-se outros dois *dockings* ocupando os sítios anteriormente citados com o ligante 9-(S)-HODE (ITOH *et al.*, 2008).

Para realização dos experimentos selecionou-se um valor de *exhaustiveness* fixa para cada tipo de *docking*, 256 para *docking* com a proteína rígida e 128 para o tipo onde as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos se encontram flexíveis. Os experimentos sempre foram realizados em duplicata e o valor do *num_modes*, relacionado ao número de poses selecionados no arquivo de saída, foi sempre 9 (valor padrão).

As análises foram feitas utilizando os programas Pymol para gerar as imagens, os cálculos do RMSD foram feitos utilizando o programa VMD e imagens com ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas usando o LigPlot+.

Os cálculos de afinidade de ligação entre a proteína e os ligantes foram feitos pelo próprio autodock vina. Este valor de energia livre de interação, com unidades de kcal/mol, é obtido usando somente os dados intermoleculares, conforme a equação (1).

$$s_1 = g(c_1 - c_{intra1}) = g(c_{inter1}) \quad (1)$$

Nesta equação, s é a afinidade (energia livre de interação), g uma função não linear, e c_{intra} e c_{inter} está relacionado as contribuições obtidas entre as próprias moléculas e entre as diferentes moléculas (ligante e proteína), respectivamente. O valor de c , soma dos valores das interações intermoleculares e intramoleculares, pode ser obtido pela equação (2).

$$c = \sum_{i < j} f_{tij}(r_{ij}) \quad (2)$$

Aqui, por sua vez, é observado a soma de um par de átomos i e j , sendo t o tipo do átomo, r as distâncias interatômicas e f um conjunto de funções de interação obtido a partir da equação (3).

$$f_{tij}(r_{ij}) \equiv h_{tij}(d_{ij}) \quad (3)$$

Nesta equação d está relacionado a distância entre as superfícies de dois átomos, i e j , onde r_{ij} é subtraído dos valores dos raios de van der Waals dos átomos i e j . Por sua vez, o h é a soma de determinados pesos de três diferentes interações, um termo hidrofóbico ($gauss_1$ com peso de -0.0356), um termo de ligação de hidrogênio ($gauss_2$ peso de -0.00516), e um de repulsão (0.840). Conforme as equações (4), (5) e (6).

$$gauss_1(d) = e^{-(d/0.5 \text{ \AA})^2} \quad (4)$$

$$gauss_2(d) = e^{-((d-3 \text{ \AA})/2 \text{ \AA})^2} \quad (5)$$

$$\begin{aligned} repulsion(d) &= d^2 \text{ if } d < 0 \\ repulsion(d) &= 0, \text{ if } d \geq 0 \end{aligned} \quad (6)$$

Na equação (4), quando $d < 0.5 \text{ \AA}$, o termo é 1, mas 0 quando $d < 1.5 \text{ \AA}$. A equação (5) quando $d < -0.7 \text{ \AA}$, o termo é 1, e 0 quando $d > 0$. Os contatos hidrofóbicos apresentam um peso de -0.0351 e as ligações de hidrogênio de -0.587. Todavia, o limite para a realização desses cálculos de interação é de 8 \AA de distância entre os átomos (r_{ij}). Além disso, os hidrogênios não são considerados nos cálculos de distância.

4.2. Dinâmica molecular

A dinâmica molecular foi realizada utilizando o programa Gromacs (PRONK *et al.*, 2013), versão 5.1, com o campo de força gromos 54A7 (SCHMID *et al.*, 2011). A estrutura utilizada foi mesma usada nos experimentos de docking, a 2VSR (ITOH *et al.*, 2008). Todavia, um loop que compreendia um total de doze resíduos (263 até 274) não estava presente na estrutura. Sendo assim, utilizou-se o programa Modeller para modelagem por homologia da região ausente (ESWAR *et al.*, 2007).

Executou-se algumas dinâmicas diferentes, primeiramente realizou-se um experimento com a PPAR γ retirando os ligantes (50 ns), seguidamente, o LDT11 foi testado na melhor pose de docking selecionada, tanto no sítio de interação da RH3 (50 ns) e RH12 (50 ns), e ocupando as duas posições simultaneamente (50 ns) (NETTLES, 2008).

Quanto à parametrização do ligante, a molécula foi enviada para o servidor

PRODRG que gerou as topologias (SCHÜTTELKOPF; AALTEN, VAN, 2004). Todavia, foram testadas duas opções variando somente as cargas do ligante (LEMKUL; ALLEN; BEVAN, 2010), sendo assim realizou-se duas MD (50 ns) em interação com a RH3, uma utilizando as cargas geradas pelo PRODRG e outra utilizando a combinação de dois conjuntos de carga, um para a cauda hidrofóbica, o anel e a hidroxila, calculado por métodos de química quântica semi-empíricos (SIWKO *et al.*, 2009), e outro para a carboxila ligado no anel, por cálculos de mecânica quântica (HENRIQUES; SOLOV'YOV, 2008). Após isso, foi montado o complexo com a estrutura da PPAR γ e do LDT11.

Após isso, definiu-se o a caixa, um dodecaedro com a distância de 0,7 nm entre o soluto as laterais da caixa, e foi feita a solvatação, usando o modelo de água spc216, variando em torno de 60000 moléculas de solvente por MD. Foi realizada a adição de íons, em geral oito íons de Na. Realizou-se a minimização de energia com o algoritmo *steepest descent*.

Duas fases de equilibração foram feitas, a primeira era relacionada à temperatura (200 ps), na qual o sistema alcançou o valor de 300 K e ficou estável. Em seguida foi feita a segunda etapa de equilibração, a de pressão (200 ps). A etapa da MD foi feita logo depois utilizando aceleradores de GPU.

Os gráficos de RMSD e RMSF foram gerados por programas internos do gromacs, gmx rms e gmx rmsf respectivamente, e os gráficos foram gerados pelo programa grace, utilizando o GUI xmgrace. Um script em perl foi usado para calcular a porcentagem do tempo de existência das ligações de hidrogênio entre a proteína e o LDT11 (“Scripts”, [S.d.]).

4.3. Expressão e purificação do PPAR γ

4.3.1. OBTENÇÃO DO GENE

Obteve-se o gene com o domínio LBD da PPAR γ em plasmídeo de expressão pET28a, através de colaboração com o professor doutor Igor Polikarpov, do Instituto de Física de São Carlos.

4.3.2. PREPARO DAS CÉLULAS COMPETENTES

Em fluxo laminar, adicionou-se 100 μ L da célula competente em um tubo falcon com 5 mL de meio LB líquido (peptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 10g/L ,

pH7), e esta foi incubada a 37°C, *overnight*, em shaker a 200 rpm. No dia seguinte, retirou-se 1 mL do pré-inóculo que foi adicionado em erlenmeyer (125 mL) com 25 mL de meio LB, e incubou-se a 37°C, 200 rpm, até atingir a O.D. (600nm) de 0,3.

Após isso, colocou-se as células em gelo por 15 minutos seguido de centrifugação a 5000 g por 10 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuscitado em 10 mL CaCl₂ 100mM (estéril) e seguiu-se de mais 15 minutos de incubação em gelo e centrifugação no mesmo modelo da anterior. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 1 mL de CaCl₂ com 15% de glicerol (estéril), e aliquotou-se 100 µL em tubos eppendorf (1,5 mL).

4.3.3. TRANSFORMAÇÃO

Realizou-se a transformação das células competentes em fluxo laminar, adicionou-se 100 ng/µL do plasmídeo em 100 µL destas células, que foram mantidas por quarenta minutos em gelo. Submeteu-se as células a um choque térmico ao coloca-las por noventa segundos a 42°C e, após isso, elas foram retornadas ao gelo. Adicionou-se 900 µL de meio LB líquido ao tubo e as mesmas foram deixadas em shaker, a 200 rpm, por um período de uma hora a 37°C.

Preparou-se uma placa de petri contendo meio LB sólido (peptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L e 10 g/L de Ágar, pH7) com o antibiótico canamicina 50 µg/mL para BL21 (DE3), e para BL21 (DE3) pLysE e BL21 (DE3) PlyS foi ainda adicionado 34 µg/mL de clorofenicol. Um total de 100 µL das células deixadas no shaker foram plaqueadas nas placas contendo LB sólido e antibiótico, e estas ficaram a 37°C *overnight*.

4.3.4. OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO

A expressão da proteína PPAR γ foi feita em três tipos de cepas de *E. coli*, BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysE e BL21 (DE3) PlyS. Foram feitos testes também em diferentes temperaturas (19°C, 25°C, 28°C e 37°C) e variando a concentração de IPTG (0,5 mM e 1 mM) para algumas dessas cepas e temperaturas.

Para a obtenção do pré-inóculo, selecionou-se uma colônia isolada das placas obtidas na transformação a qual foi inserida em um tubo falcon (15 mL) contendo 5mL de meio LB com canamicina 50 µg/mL para BL21 (DE3), e para BL21 (DE3) pLysE e BL21

(DE3) pLysS foi ainda adicionado 34 µg/mL de clorofenicol, estes ficaram *overnight* a 37°C a 200 rpm.

O volume de 1 mL do pré-inóculo foi transferido para um erlenmeyer (125 mL) com 25 mL de meio LB com canamicina 50 µg/mL para BL21 (DE3), e para BL21 (DE3) pLysE e BL21 (DE3) pLysS foi ainda adicionado 34 µg/mL de clorofenicol. Incubou-se as células a 37°C, 200 rpm, até atingir a O.D. (600nm) de 0,6.

Após atingir os valores de O.D. desejados a expressão era induzida adicionando 1mM de IPTG (em alguns testes com 0,5 mM de IPTG), todavia antes era retirado 1 mL para análise posterior em gel SDS-PAGE 12%. As amostras expressas a temperaturas inferiores a 37°C, antes da indução com IPTG as células transportadas para shakers com a temperatura da expressão desejada e lá eram mantidas por cerca de 20 minutos.

As amostras cuja temperatura desejada era 28°C e 37°C foram mantidas por um total de 6 horas de expressão, já amostras com temperaturas inferiores eram mantidas *overnight* (16 horas). Seguidamente, retirou-se 1 mL para análise em gel SDS-PAGE 12% e 1mL para testes de solubilidade.

A expressão para teste de purificação ocorreu em maior quantidade, 200 mL de meio LB líquido (erlenmeyer 1 L), e utilizou-se a BL21 (DE3) PlysS a 28°C com 1 mM de IPTG.

4.3.5. ANÁLISE EM GEL SDS-PAGE 12%

O gel SDS-PAGE 12% foi feito em duas partes, um gel separador e um concentrador. No primeiro utilizou-se, para cada gel, 2 mL uma solução de poliacrilamida (29% acrilamida e 1%bis-acrilamida), 1,7 mL de água destilada, 1,25 mL de tampão Tris-Hcl (pH 8,8), 50 uL de PSA 10%, 3 uL de TEMED e 150 uL de SDS10%. No segundo as quantidades de reagente foram 415 uL da solução da mesma solução de poliacrilamida, 1,75 mL de água destilada, 340 uL de tampão Tris-Hcl (pH 6.8), 25 uL de PSA 10%, 3 uL de TEMED e 75 uL de SDS 10%.

Quanto a preparação das amostras, estas foram centrifugadas, *mini spin plus* (Eppendorf), a 14500 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em tampão de amostra 1x (60 mM Tris-Hcl pH6.8, SDS 2%, B-mercaptotanol 5% e azul de bromofenol 0,01%), em seguida ferveu-se em banho maria por dez minutos. Realizou-se a corrida do gel na cuba de eletroforese *Mini-PROTEAN Tetra System* (BIO-RAD) com a fonte EPS 301 (GE healthcare) em tampão de corrida

(TrisHCl 25 mM, glicina 200 mM e SDS 0,1%). Nos primeiros vinte minutos, entrada da amostra no gel e passagem pelo concentrador, utilizou-se a amperagem de 25 mA e após isso 45 mA durante toda a corrida, com a voltagem de 200 V. Os géis foram corados com uma solução corante (50% etanol, 25% ácido acético, 24,5% água destilada e 0,5% comassie brilliant blue R-250) por duas horas para marcação das proteínas, e descorados em ácido acético 20%.

4.3.6. TESTE DE SOLUBILIDADE

As amostras foram centrifugadas a 14500 rpm por dois minutos, o sobrenadante descartado e as amostras ressuspendidas em 150 uL de água destilada. Sonicou-se as amostras utilizando o Branson Sonifier 450 por um minuto (duty cycle 50% e output control 5). Após isso, as amostras foram mais uma vez centrifugadas conforme os padrões anteriormente citados, o sobrenadante foi transferido para outro eppendorf (1,5 mL) e adicionou-se 50 uL de tampão de amostra 4x, e o pellet, por sua vez, foi ressuspendido em 200 uL de tampão de amostra 1x, em seguida ambas foram fervidas e analisadas em gel SDS-PAGE 12%.

4.3.7. PURIFICAÇÃO DA PPAR γ

Para a preparação das amostras de expressão, centrifugou-se utilizando o equipamento centrifuge 5430 R (Eppendorf), a 7830 rcf por dez minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 50 mL de tampão de ligação (fosfato de sódio 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, pH 7,4). Sonicou-se as amostras, em gelo, por dez minutos e centrifugou-se conforme os parâmetros supracitados separando o sobrenadante, guardou-se o pellet para análise em gel, e filtrou-se o sobrenadante utilizando um filtro de seringa de 0,45 um.

Água Mili-q, etanol 20%, tampão de ligação e tampão de eluição (fosfato de sódio 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 500 mM, pH 7,4) foram filtrados em filtro 0,22 um usando bomba à vácuo, TE-058 (Tecnal), e desaerados, banho ultrassom (Quimis), nesta última etapa também utilizou-se bomba à vácuo.

Utilizou-se o equipamento AKTAprime plus (GE healthcare) e a coluna HisTrap HP 1mL (GE Healthcare) para a cromatografia de afinidade metálica a níquel com objetivo de purificar proteínas com cauda de histidina. Passou-se na coluna um total de dez volumes

de água, etanol 20% e tampão de ligação, e em seguida foi injetada a amostra, coletou-se alíquotas da fração não adsorvida. Lavou-se a coluna, dez volumes de coluna, primeiramente com 10% do tampão de eluição (50 mM de imidazol) e em seguida com 20% (100 mM de imidazol), 50% (250 mM de imidazol) e 100% coletando alíquotas da fração eluída quando se observava picos de absorvância de UV. Durante toda a purificação mantevesse um fluxo de 1 mL por minuto, com um limite máximo de pressão de 0,3 MPa.

5. RESULTADOS

Antes da apresentação do resultado é necessário fazer algumas considerações. Em primeiro lugar, quanto ao cálculo de afinidade (energia livre de ligação) realizado pelo programa autodock vina, vale ressaltar que a fórmula não apresenta nenhum termo entrópico relacionado a solvatação e desolvatação do ligante ou dos graus de liberdade rotacionais e translacionais perdidos no interior do sítio de ligação. Estes parâmetros são de grande importância para obtenção de valores realistas. Sendo assim, sabemos que esses valores não podem ser tomados como valores absolutos de energia livre, mas somente de forma relativa, para comparação entre os diferentes ligantes que tiveram as afinidades calculadas da mesma forma pelo presente programa.

Em relação a dinâmica molecular, as cargas do LDT11 não foram calculadas através de métodos semi-empíricos, mas foram obtidas através de duas diferentes metodologias: no site do PRODRG e na literatura, em ligantes semelhantes. Os dois tipos de topologias apresentam limitações, contudo são empregados em vários estudos de dinâmica molecular disponíveis na literatura.

5.1. Docking

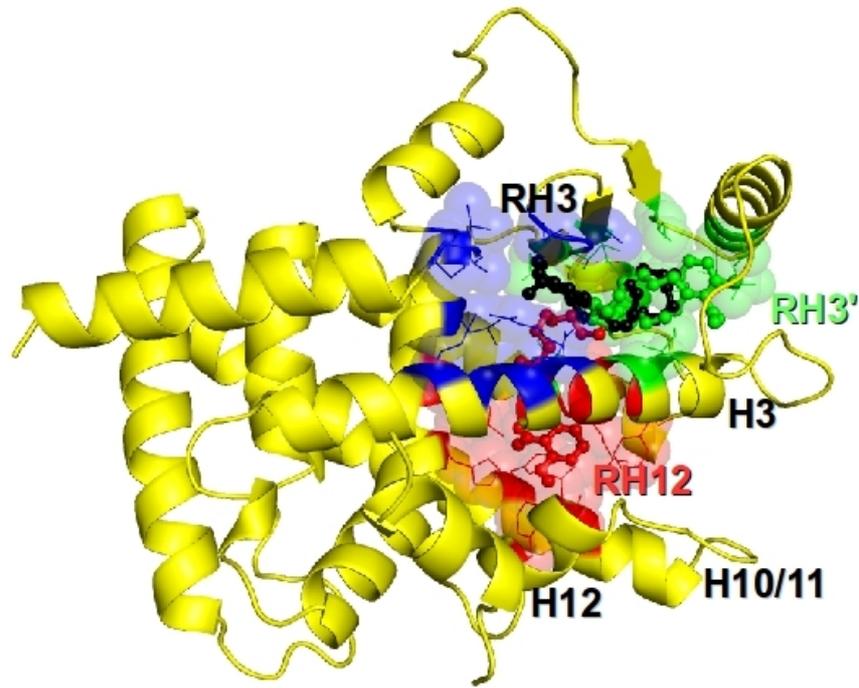
Os nove ligantes testados apresentaram resultados bastante variados em ambos tipos de *docking*, todavia entre as duplicatas se mantiveram próximos, ou seja, mantendo-se sempre na mesma região de interação. Todos experimentos de *docking* rígido analisados podem ser resumidos na tabela 1. Os ligantes interagiram em três regiões: no braço um em região próxima H12 (a), com a região próxima a H3 em especial com a Arg288 que se encontra no braço três, mas com a cauda hidrofóbica interagindo no braço dois (b), e também na RH3', interagindo com a Arg280 ou a Glu259 (c) e a cauda se manteve no braço dois, essas posições podem ser melhor observadas na figura 22. Todavia, nem todos conseguiram ocupar as três regiões.

Tabela 1 – Afinidade de ligação das melhores poses dos ligantes no *docking* rígido e os valores de RMSD. RH3 referisse a região próxima a H3 e as fitas β , e a RH12 a região próxima a H12. Os valores separados por barra se referem a afinidades das duas melhores poses (duplicata). Os dois valores de RMSD foram calculados entre as estruturas dos ligantes da duplicata antes de serem superpostos (primeiro número) e

depois da superposição (segundo número). A cor preta se refere a localização do ligante próximo a RH3, vermelho próximo a RH12 e verde interação com resíduos próximos a Arg280, no braço dois.

Ligante	Afinidade (kcal/mol)			RMSD (Å)		
	Sítio vazio	RH3 ocupado	RH12 ocupado	Sítio vazio	RH3 ocupado	RH12 ocupado
LDT11	-7.2/-7.4	-6.5/-6.6	-6.0/-6.0	0.34/0.18	0.12/0.03	0.51/0.43
LDT13	-6.5/-7.0	-7.8/-7.9	-6.1/-6.1	2.89/0.83	0.94/0.90	3.70/1.38
LDT15	-7.5/-6.9	-8.5/-8.2	-6.5/-6.9	1.26/1.09	0.19/0.15	0.22/0.04
LDT28	-6.7/-6.8	-6.8/-6.9	-6.2/-6.0	0.54/0.31	3.02/1.44	1.72/1.49
LDT29	-7.5/-6.8	-6.7/-6.7	-6.5/-6.1	0.55/0.42	0.93/0.52	0.48/0.43
LDT30	-7.0/-6.9	-6.8/-6.9	-6.3/-6.1	1.57/1.26	0.55/0.45	0.07/0.04
LDT208	-7.2/-7.1	-7.4/-7.4	-6.0/-6.5	6.95/1.26	0.39/0.24	1.85/1.54
LDT380	-6.8/-6.3	-7.5/-7.5	-6.2/-6.4	3.12/0.51	2.75/1.00	0.50/0.39
LDT383	-7.8/-7.9	-7.3/-7.3	-6.4/-6.7	0.18/0.13	0.13/0.07	1.12/1.04
Média	-7.07	-7.26	-6.28	1.93/0.66	1.00/0.53	1.13/0.75

A



B

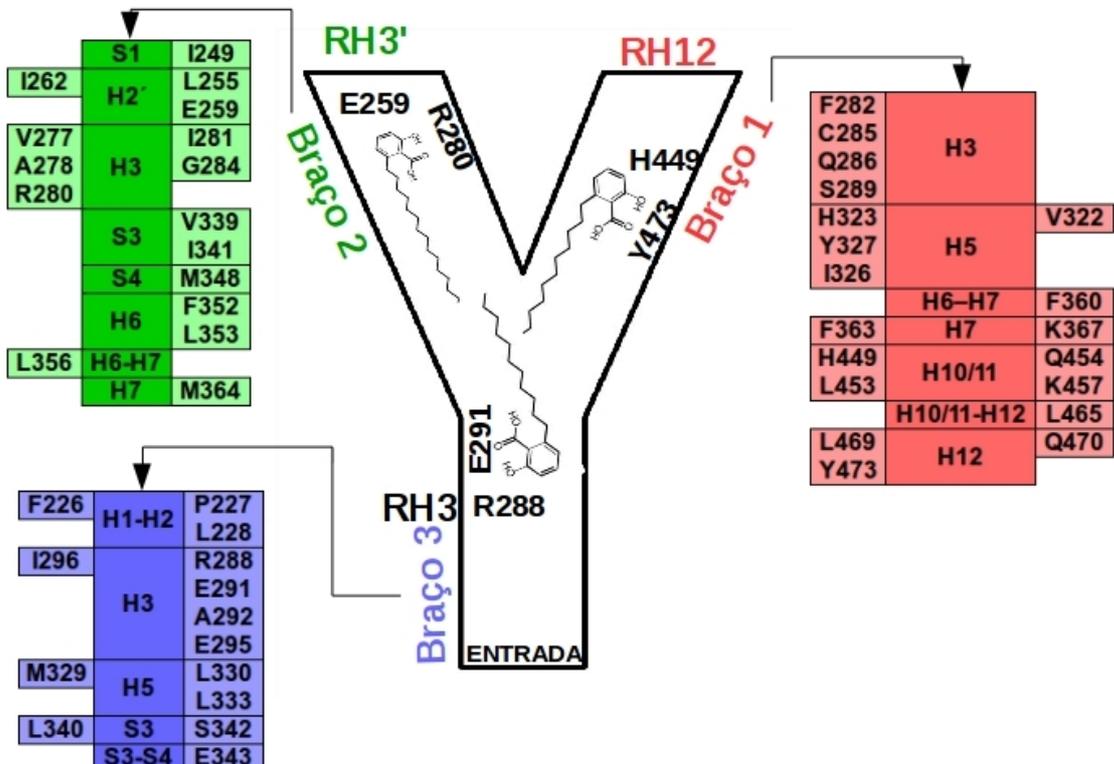


Figura 22- Posições principais obtidas pelos ligantes, RH3 (preto), RH3' (verde) e RH12 (vermelho) em interação no LBP do LBD da PPAR γ , braço um (vermelho), braço dois

(verde) e braço três (azul). (A) Estrutura do LBD da PPAR γ (2VSR) mostrando a posição de interação dos ligantes. (B) Esquema das interações, onde os resíduos nas tabelas são os que compõe cada um dos braços. Aminoácidos voltados para o interior já haviam sido anteriormente citados compondo cada um do braços (ZOETE; GROSDIDIER; MICHIELIN, 2007). No exterior estão resíduos que participaram das diferentes interações nas análises de docking.

A tabela 1 apresenta as afinidades calculadas pelo programa autodock vina, observa-se que com o LBP vazio somente o LDT15 não interage no RH3, ao ocupar essa posição a maioria dos ligantes se direcionam para a RH12 (posição que apresentou as maiores médias de afinidade), somente o LDT28, 29 e 30 não se posicionam nessa região. Ao ocupar a RH12, os ligantes se conduzem para a RH3', que apresenta as menores médias de afinidade.

Outra informação que pode ser observada nessa tabela é os valores de RMSD entre os dois valores de duplicata, dos ligante internamente (após alinhamento) e as médias. Observa-se que a interação com o LBP vazio apresenta os maiores valores de RMSD, onde quase todos os ligante interagiram no RH3, demonstrando que essa posição é a que apresenta as maiores diferenças de posicionamento dos ligantes. A RH12, por sua vez, apresentou os menores valores.

Quanto ao *docking* com alguns resíduos flexíveis, observou-se que, com exceção do LDT15 e 383, os ligantes interagiram na RH3 quando o LBP se encontrava vazio. Com o RH3 ocupado todos realizaram interações no RH12. Todavia, quando a RH12 foi ocupada a grande maioria das interações se deu na RH3, somente o LDT29 e um dos dockings com alguns resíduos do LBP flexível do LDT380 apresentaram interação com a Arg280, o bem que se mostrou diferente do *docking* rígido. Quanto ao RMSD, ocorreu uma variação significativa nos resultados, apesar dos ligantes interagindo no RH12 apresentarem em geral valores menores, mostrando que neste tipo de docking o RH3 continua apresentando uma possibilidade de variações de posicionamento das moléculas muito superiores.

Tabela 2 – Afinidade de ligação das melhores poses dos ligantes no *docking* com alguns resíduos flexíveis e os valores de RMSD. RH3 referisse a região próxima a H3 e as fitas β , e a RH12 a região próxima a H12. Os valores separados por barra se referem a afinidades das duas melhores poses (duplicata). Os dois valores de RMSD foram

calculados entre as estruturas dos ligantes da duplicata antes de serem superpostos (primeiro número) e depois da superposição (segundo número). A cor preta se refere a localização do ligante próximo a RH3, vermelho próximo a RH12 e verde interação com resíduos próximos a Arg280 no braço dois.

Ligante	Afinidade (kcal/mol)			RMSD (Å)		
	Sítio vazio	RH3 ocupado	RH12 ocupado	Sítio vazio	RH3 ocupado	RH12 ocupado
LDT11	-7.1/-7.1	-7.8/-7.9	-6.1/-6.4	1.91/1.02	1.09/1.00	1.13/1.03
LDT13	-7.2/-8.0	-8.3/-8.2	-7.9/-8.1	3.07/0.95	0.92/0.90	11.61/0.95
LDT15	-7.4/-7.2	-7.5/-7.4	-7.4/-7.2	1.10/0.84	0.41/0.34	1.70/0.95
LDT28	-7.4/-7.3	-7.5/-7.7	-6.5/-7.3	0.10/0.02	4.13/1.36	8.50/0.46
LDT29	-7.9/-8.0	-8.4/-7.6	-7.4/-6.2	1.61/1.42	2.29/1.34	0.56/0.48
LDT30	-7.5/-7.2	-7.5/-7.8	-7.7/-7.8	2.54/1.06	0.23/0.01	0.29/0.04
LDT208	-7.1/-8.2	-8.3/-8.1	-6.7/-7.4	6.98/0.94	0.37/0.22	11.52/1.01
LDT380	-7.0/-7.0	-8.0/-8.0	-6.4/-7.4	2.20/0.66	0.29/0.15	15.96/0.99
LDT383	-8.0/-7.9	-8.0/-8.0	-6.9/-7.6	0.91/0.90	1.08/0.76	9.21/0.77
Média	-7.47	-7.89	-7.13	2.17/0.86	1.20/0.67	6.72/0.74

Além disso pode se observar a tabela com todos os resíduos que apresentaram interação com os ligantes derivados de ácido anacárdico em ambos os tipos de docking (tabela 3).

Tabela 3- Interações realizadas pelos ligantes derivados do ácido anacárdico com os resíduos do LBP no LBD da PPAR γ no docking rígido e com cadeias laterais flexíveis (Arg288, Glu291, His323, Glu343, His449 e Tyr473). Vermelho representa as ligações de hidrogênio. Verde no docking rígido indica os resíduos que realizam contatos hidrofóbicos reconhecidos pelo Ligplot. Verde no docking flexível indica os resíduos com distâncias inferiores a 4 Å de distância dos átomos do ligante.

Ligante	RÍGIDO			FLEXÍVEL		
	APO	H3 ocupado	H12 ocupado	APO	H3 ocupado	H12 ocupado
LDT11	R288, E343	S289, H323, Y327, Y473	-	E291	H323	R288
	I281, G284, C285, E291, I341, S342, M348,	C285, F282, Q286, R288, I326, L330, V339, I341, M345, F363, K367, M364, H449, L469	I249, E259, R280, G284, C285, I341, S342, M348,	F226, P227, L228, F282, R288, S289, A292, I326, Y327, M329, L330, E343, F363, H449,	F226, P227, L228, L255, E259, R280, G284, R288, A292, E295, I326, K457, F363, L469, Q470, Y473	Q286, F282, C285, R288, Y327, K367, M364, H449, L453, Q454, K457, L465, L469, Q470, Y473, K474
LDT13	R288	S289, H323, H449, Y473	-	R288	H323	R288
	I281, F282, C285, S289, A292, I326, M329, L330, L333, I341, M348, L353, L356, F360, F363, M364	A278, I281, F282, C285, I326, Y327, L330, V339, I341, M348, L353, L356, F360, F363, M364, K367	I249, L255, E259, I262, G284, C285, R280, I281, R288, I341, S342, M348,	F226, P227, L228, G284, S289, E291, A292, E295, I326, M329, L330, L333, I341, E343, M364	F282, C285, R288, S289, V322, I326, Y327, M364, L453, K457, F363, L469, Q470, Y473	L228, L255, E259, I262, R280, I281, G284, C285, A292, E295, I326, L333, I341,
LDT15	H323, Y473	S289, H323, Y473	E343	-	H323	-
	I281, F282, C285, Q286, R288, S289, I326, Y327, L330, I341, L353, L356, F360, F363, M364, K367, H449, L465, L469	A278, I281, F282, C285, R288, I326, Y327, L330, V339, L340, I341, L353, L356, F360, F363, M364, K367, H449, L469	L228, L255, E259, I262, R280, I281, G284, R288, L333, I341, S342, M348	F226, P227, C285, R288, S289, E291, A292, I326, Y327, M329, L330, I341, E343, F363, M364	F282, C285, Q286, R288, Y327, F360, F363, M364, L453, L469, Q470, Y473	L255, I262, R280, I281, G284, R288, I296, M329, L330, L333, I341, S342, E343, M348
LDT28	R288, E295	E259	-	R288	Y473	R288
	I281, F282, C285, R288, S289, I326, L330, L340, I341, S342, L353, L356, F360, F363, M364	I249, L255, E259, V277, R280, I281, R288, I326, Y327, L330, V339, L340, I341, M348, M364,	I249, L255, E259, V277, R280, I281, G284, C285, I341, S342, M348,	F226, P227, L228, C285, S289, E291, I296, I326, M329, L330, I341, S342, E343, M364	F282, C285, R288, S289, Y327, F363, M364, K367, H449, L453, K457, L465, L469, Q470, K474	L255, E259, I262, R280, I281, G284, C285, E291, I341, S342
LDT29	R288	-	-	H323, Y473	-	-
	F226, L228, C285, S289, A292, I326, M329, L330, L333, L340, I341, S342, E343,	L255, R280, I281, R288, S289, I326, L330, L340, I341, M348	I249, L255, E259, R280, I281, C285, R288, I341, S342, M348	L228, F282, R288, C285, S289, A292, E295, H323, I326, Y327, M329, L330, L333, I341, S342, E343, F363, K367, H449	F282, C285, R288, S289, H323, I326, Y327, M364, K367, H449, L453, L465, L469	P227, L228, L255, E259, R280, I281, G284, C285, R288, A292, E295, I341, S342, M348
LDT30	R288	-	-	E343	H323, Y473	R288
	A278, I281, F282, G284, C285, S289, I326, L330, L333, I341, M348, L353, L356, F360, F363, M364	L255, E259, R280, I281, C285, R288, I326, L330, V339, L340, I341, M348, M364	I249, L255, E259, I262, R280, I281, G284, C285, R288, I341, S342, M348,	F226, P227, L228, C285, R288, S289, E291, A292, I326, M329, I341, S342, M364	F282, C285, Q286, R288, S289, Y327, F363, M364, K367, H449, L453, Q454, K457, L465, L469, Q470, I472	L255, E259, I262, R280, I281, G284, C285, E291, A292, M329, L333, I341, S342, E343, M348
LDT208	S289	S289, H323, H449, Y473	-	R288	-	-
	A278, I281, F282, G284, C285, R288, A292, I326, L330, L333, I341, M348, L353, L356, F360, F363, M364	A278, I281, F282, C285, A292, I326, Y327, L330, V339, I341, L353, L356, F360, F363, M364, K367	I249, L255, E259, I262, R280, I281, G284, C285, R288, I341, S342, M348	F226, L228, C285, Q286, S289, E291, H323, I326, M329, L330, L333, I341, S342, E343, M364, H449, L453, L465, L469, Y473	F282, C285, Q286, R288, S289, H323, Y327, F363, H449, L453, Q454, K457, L469, Q470, Y473	F226, L228, L255, E259, R280, I281, G284, C285, R288, E291, A292, I296, I326, L330, L333, I341, S342, E343
LDT380	R288, I326	H323, Y473	R280	E291, E343	H323	R288, E343
	A278, I281, F282, C285, M329, L330, L333, I341, M348, L353, L356, F360, F363, M364	I281, F282, C285, R288, S289, I326, Y327, L330, V339, L340, I341, L353, F360, F363, M364, H449	L255, E259, I281, G284, C285, R288, I341, S342, M348	F226, P227, L228, C285, R288, S289, I326, M329, L330, L333, S342, M364	F282, C285, Q286, R288, S289, Y327, F363, H449, L453, Q454, K457, L469, Q470, Y473	F226, P227, L228, L255, R280, I281, G284, R291, A292, M329, L333, I341, S342
LDT383	-	H323, Y327, K367, H449, Y473	R280	-	-	E295, E343
	A278, I281, F282, C285, R288, A292, I326, M329, L228, L330, L333, I341, L353, L356, F360, F363, M364	A278, I281, C285, R288, S289, I326, L330, L333, V339, L340, I341, L353, L356, F360, F363, M364	L255, V277, I281, G284, R288, I341, S342, M348, I249	F226, P227, L228, F282, Q286, R288, S289, A292, H323, I326, Y327, M329, L330, L333, I341, S342, E343, F363, H449, Y473	F282, C285, Q286, R288, S289, H323, Y327, F363, H449, L453, Q454, K457, L469, Q470, Y473	F226, P227, L228, L255, I262, I281, G284, C285, R288, I341, S342, E343, M348,

5.1.1. LDT11

Na primeira análise de *docking*, onde não se colocou nenhuma molécula ocupando o ambiente do LBP, o LDT11 realizou ligações de hidrogênio com Arg288 e Glu343 e, como pode ser observado na figura 23C. Além disso, diversas interações hidrofóbicas com resíduos presentes no braço II (próximo a H3 e as fitas β) como a Ile281 e Ile341.

Quanto ao *docking* com a proteína rígida ocupando a LBP da PPAR γ , primeiramente foi colocado o ligante 9-(S)-HODE na posição de interação na região próxima a H3 e as fitas β (RH3). Pode-se observar na figura 23A e B que o LDT11 interage com os resíduos de aminoácido Ser289, His323, Tyr327 e Tyr473. Por sua vez, ao ocupar a posição de interação próxima a H12 (RH12), o LDT11 interage com resíduos da RH3, todavia apresenta interação com resíduos presentes na região RH3', como a Arg280, figura 23D.

O *docking* com algumas cadeias laterais flexíveis, por sua vez, apresentou um resultado semelhante. No caso da proteína apo, o ligante interagiu na mesma região, RH3, mas com a principal diferença da cauda hidrofóbica interagir mais fortemente com a Leu330 invés de interagir com a Ile281, todavia ambas estão presentes na H5. Semelhantemente ambas parecem interagir com a Ile341, presentes nas fitas β , mesmo que de modo mais fraco, figura 24A.

Quanto ao RH12 ocupado, ocorreram diferenças do rígido, o ligante não apresentou interação com a Arg280, e sim com a Arg288. Apesar de ambas terem

realizado contatos hidrofóbicos com a Ile341, essa também se encontrou próxima da Ile281, posicionada na H3, como pode ser visto na figura 24B. Os experimentos com cadeias laterais móveis e ocupando a RH3 apresentaram ligações de hidrogênio com a His323. As interações hidrofóbicas de ambas as caudas apresentaram proximidade com resíduos como Leu 330 e Ile341, figura 24C.

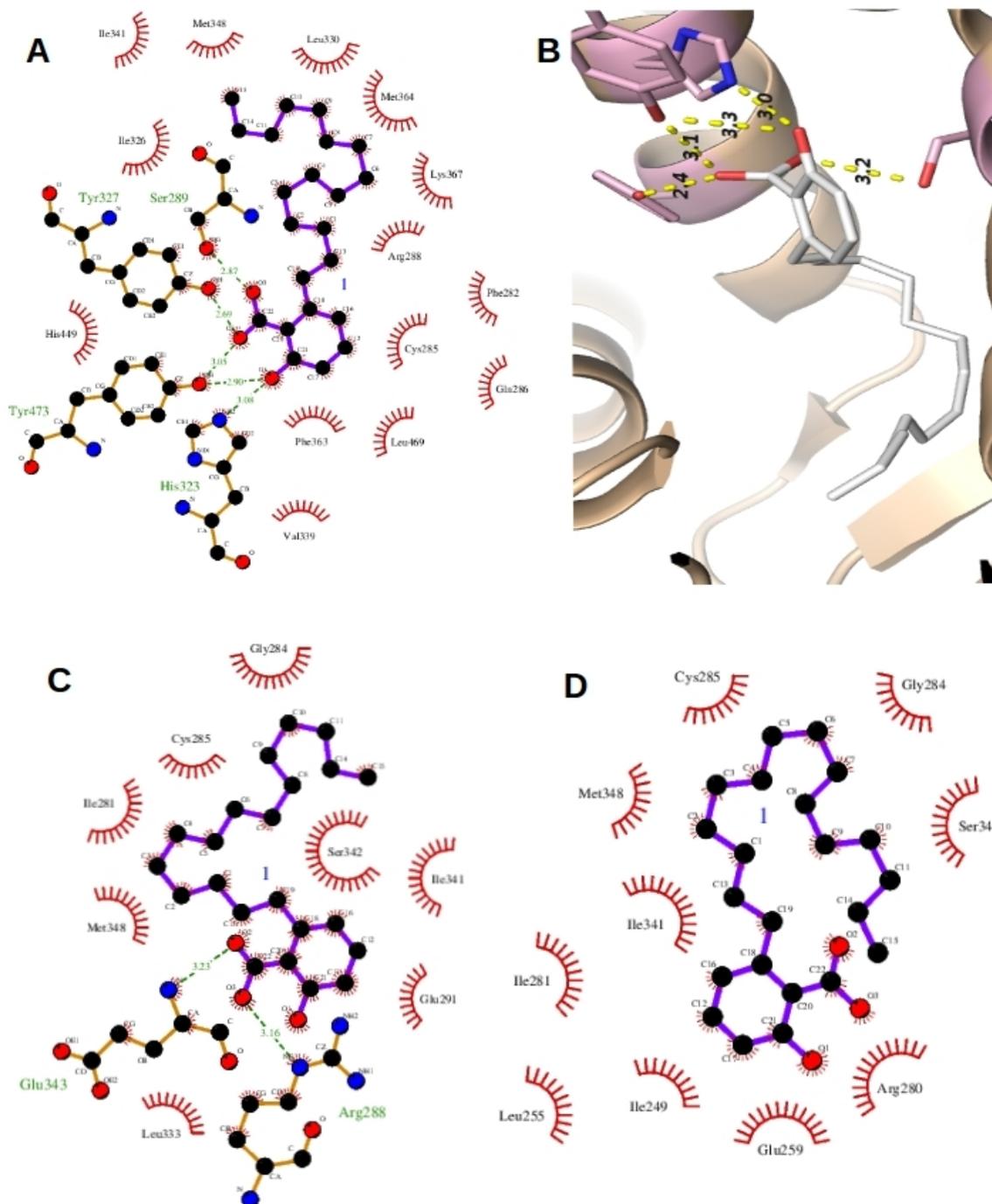


Figura 23- Interações entre a proteína PPAR γ (2VSR) e o LDT11. Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína: com o RH3 ocupado com o 9-(S)-

HODE (A), a proteína apo (C) e com o RH12 ocupado (D). (B) Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre o ligante LDT11 (branco) com os aminoácidos Ser289, His323, Tyr327 e Tyr473 (rosa) da proteína PPAR γ ocupando o RH3.

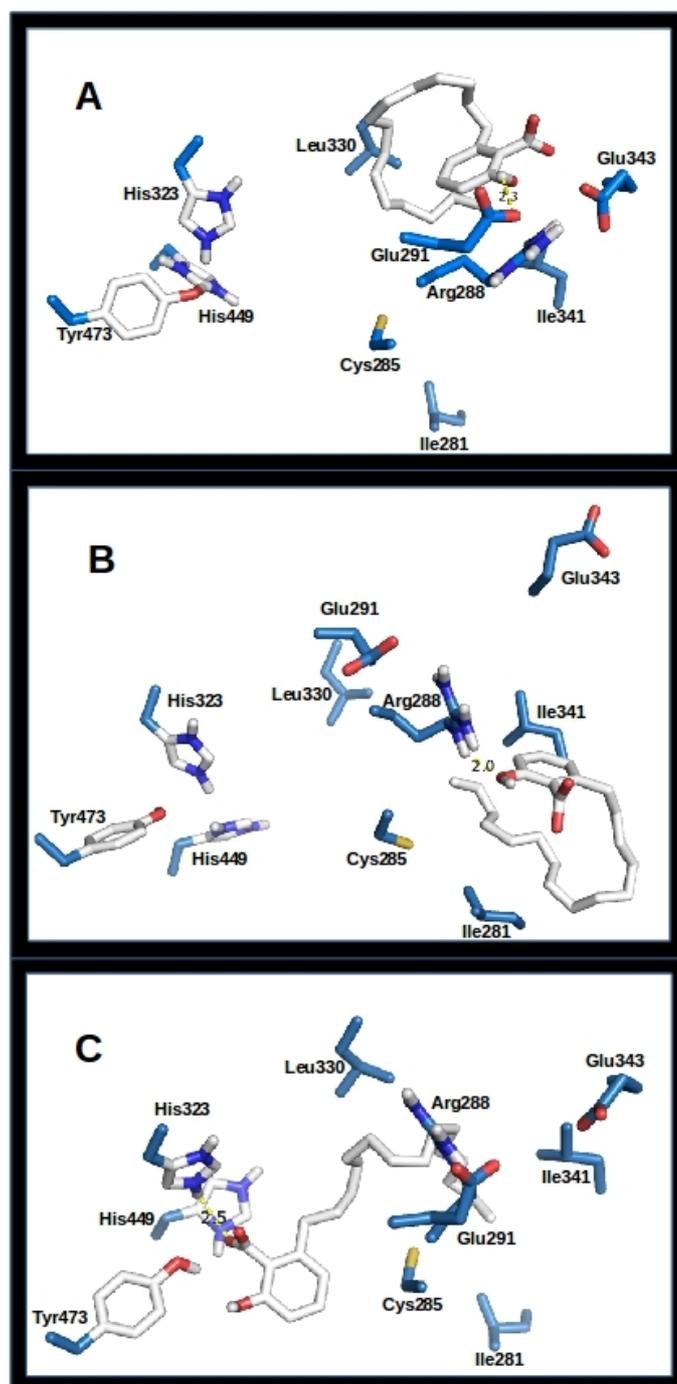


Figura 24- Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre (A) o ligante LDT11 (branco) com os aminoácidos Glu 291 (azul) da proteína PPAR γ (2VSR),

(B) com os resíduos de aminoácido Arg288 ao ocupar a RH12 com o 9-(S)-HODE (C) com os resíduos de aminoácido His323 ao ocupar a RH3 com o 9-(S)-HODE.

5.1.2. LDT13

O LDT13, de modo semelhante ao LDT11, no *docking* rígido sem nenhum ligante presente no LBP da PPAR γ apresentou interação com a Arg288, entretanto não interagiu com a Glu343. Em se tratando da cauda, esta além de interações com a Ile341 apresentou interação com a Ile281 e outros aminoácidos hidrofóbicos da RH3 (Figura 25A). Por sua vez, ao ocupar a RH12 com o 9-(S)-HODE o LDT13 passou a realizar interação com os aminoácidos como a Arg280 e também com hidrofóbicos como a Ile281 e Ile341, além da Arg288, não de forma polar com os nitrogênios, como pode ser visto na figura 25B. Novamente, ao ocupar o sítio da RH3 com o ligante o LDT13 interagiu de forma semelhante ao LDT11, ou seja, com os resíduos Ser289, His323, His449 e Tyr473, a cauda lipofílica dessa molécula, todavia, interagiu de forma um pouco diferente, pois esta se esticou paralelamente a H3 interagindo com resíduos naquela região, como a Ile281 e outros de outras hélices como a Phe363 da H7 e Leu 353 na H2' (Figura 25C e D).

O segundo tipo de *docking* apresentou diferenças, significativas em alguns casos. Em relação à proteína apo, a interação também ocorreu com a Arg288, Leu330 e Ile341 (Figura 26A). Mais uma vez, semelhantemente ao LDT11 flexível, ao ocupar o RH12, o ligante não apresentou interação com a Arg280 mas com a Arg288 (Figura 26B). Entretanto, com a ocupação do RH3 a pose foi bastante diferente em relação ao rígido, apesar de ocorrer interação com a His323, a cauda permaneceu dentro do braço um, não fazendo interações hidrofóbicas com o Leu330, figura 26C.

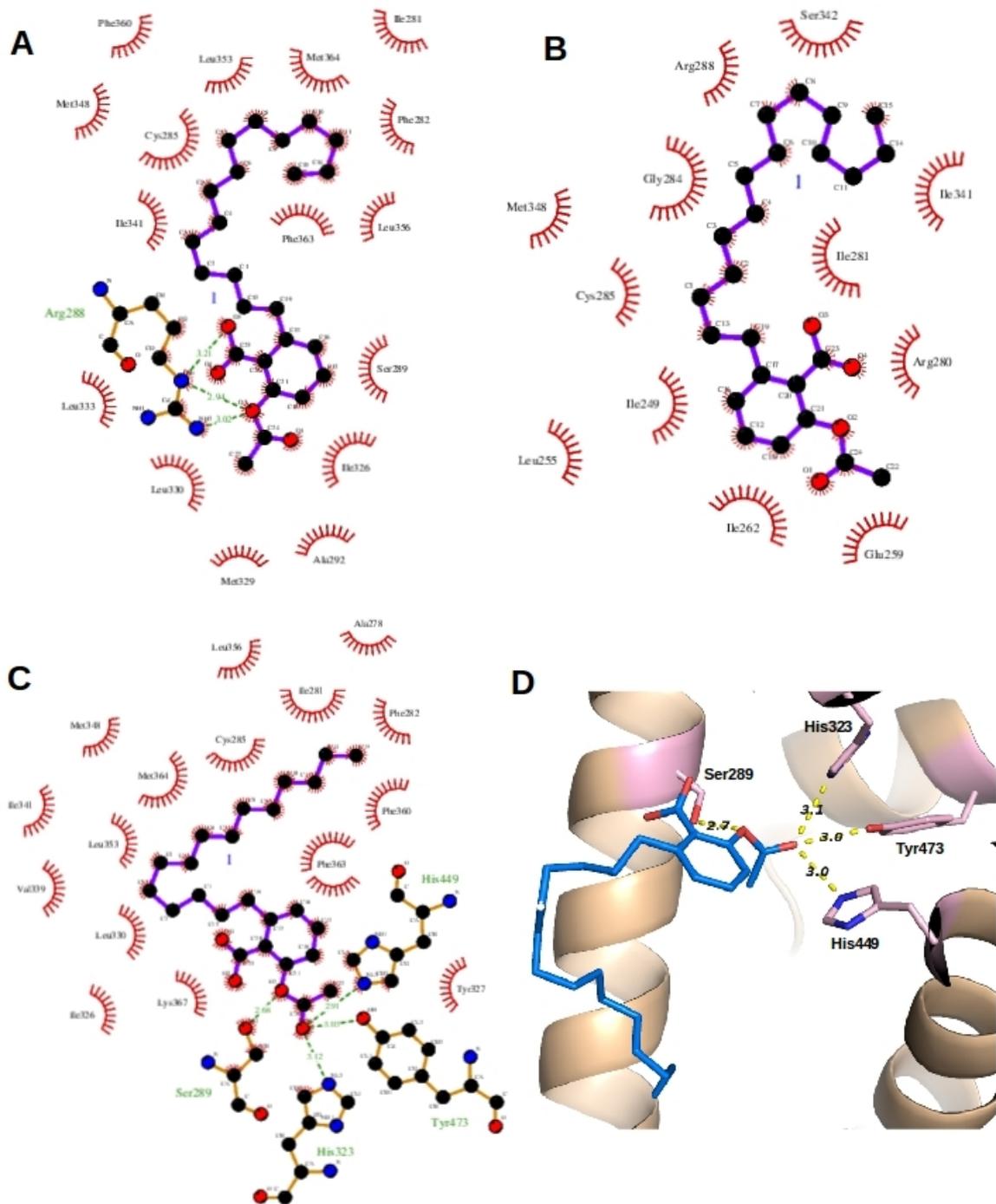


Figura 25- Interações entre a proteína PPAR γ (2VSR) e o LDT13. (A) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína apo (B) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH12 ocupado com o ligante 9-(S)-HODE. (C) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH3 ocupado. (D) Interações polares (pontilhado em amarelo e

o distância em Å) entre o ligante LDT13 (azul) com os aminoácidos Ser289, His323, Tyr327 e Tyr473 (rosa) da proteína PPAR γ ocupando o RH3.

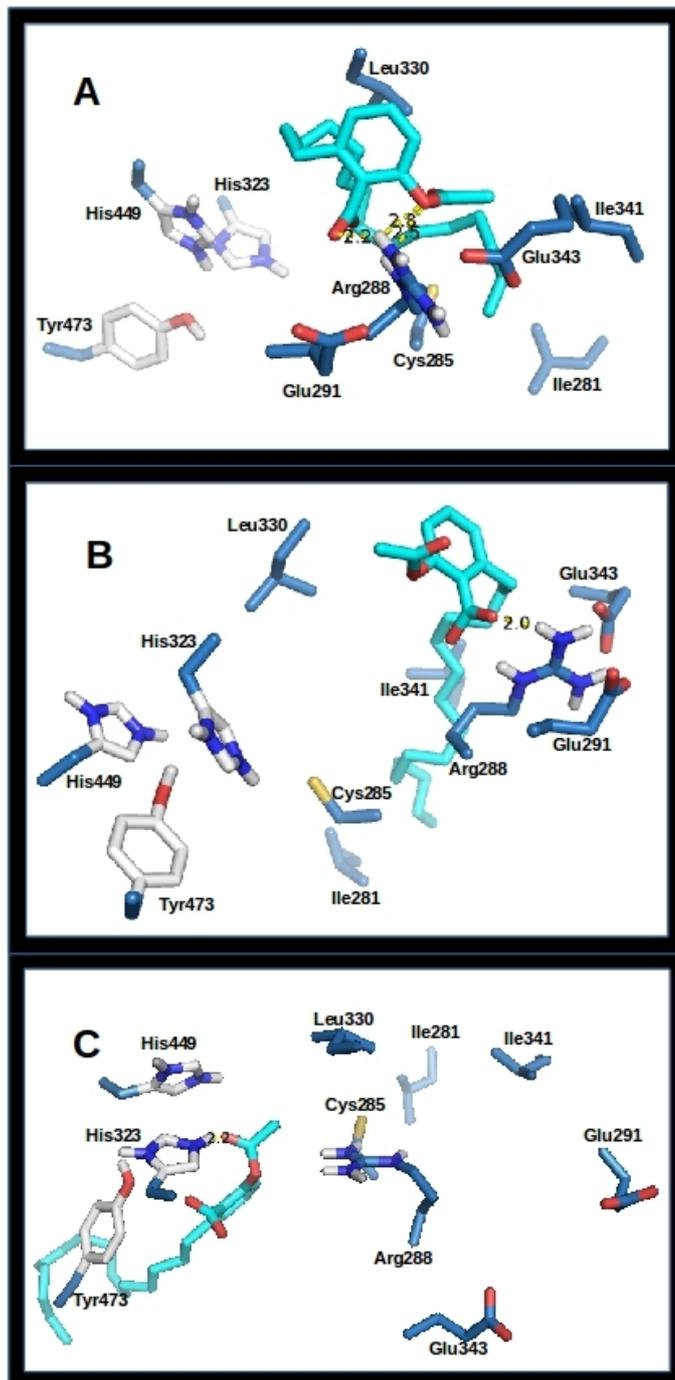


Figura 26- Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre (A) o ligante LDT13 (ciano) com o resíduo Arg288 (azul) da proteína PPAR γ (2VSR), (B) com os resíduos de aminoácido Arg288 ao ocupar a RH12 com o 9-(S)-HODE (C) com os resíduos de aminoácido His323 ao ocupar a RH3 com o 9-(S)-HODE.

5.1.3. LDT15

O LDT15, por sua vez, em relação ao *docking* rígido onde o LBP estava vazio, foi o único ligante a apresentar interação na RH12, realizando ligações de hidrogênio com a His323 e Tyr473, e também com a Ser289 (o pymol ainda detectou mais não o Ligplot+), e em se tratando da cauda lipofílica, devido a um longo filamento com grupos polares que sai do anel e faz interações na RH12, foi possível que ela interagisse com resíduos hidrofóbicos como a Ile281, Leu330, Ile341, Leu353 e Phe363, localizada mais profundamente no braço dois, como pode ser visto na figura 27A e B.

Por sua vez, quando a RH12 foi ocupada esse ligante realizou suas interações polares com a Glu343 e a cauda se aprofundou bastante no braço dois, interagindo com resíduos como a Ile262 e Leu255 (figura 27C). Com a ocupação da RH3 com outro ligante o LDT15 volta a fazer as mesmas ligações de hidrogênio e também mantém grande parte das hidrofóbicas (figura 27D).

Em se tratando do *docking* flexível com a apo-estrutura, o ligante continuou localizado no braço um, todavia a cauda não se direciona para o fundo do braço dois, mas mantém interagindo com a Leu330 e Ile341 (figura28A). Em se tratando da ocupação do RH12 (figura28B) e RH3 (figura28C), no primeiro o LDT15 mantevesse posicionado no braço dois e três, com o grupamento polar bem próximo a Arg288, e apolar da Ile281 e Ile341. No segundo o ligante volta a realizar pontes de hidrogênio com a His323 e a cauda interage com a Ile281, mas não se aproxima das regiões de fitas β .

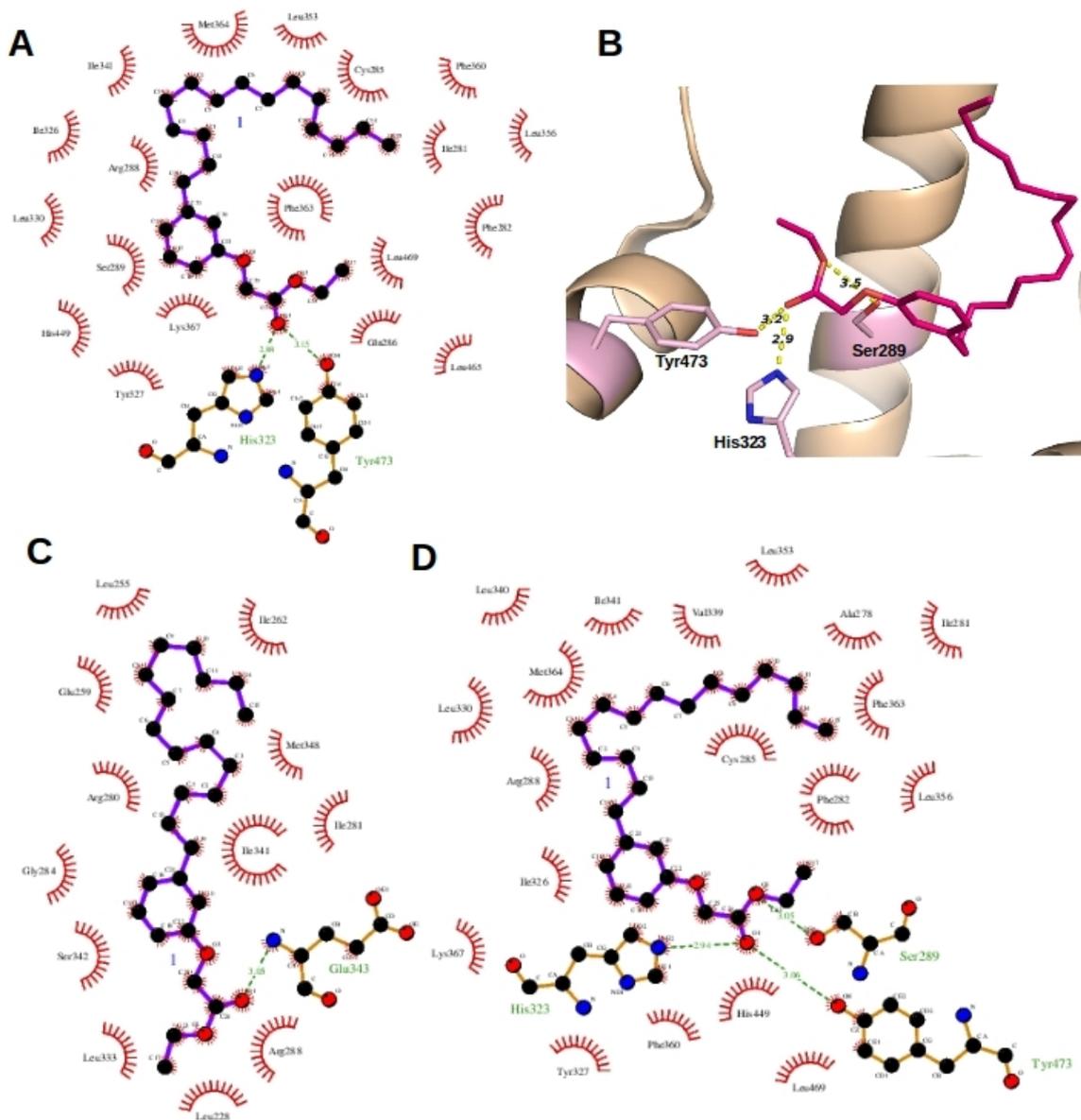


Figura 27- Interações entre a proteína PPAR γ (2VSR) e o LDT15. (A) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína apo. (B) Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre o ligante LDT15 (rosa) com os aminoácidos Ser289, His323 e Tyr473 (rosa) da proteína PPAR γ . (C) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH12 ocupado com o ligante 9-(S)-HODE. (D) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH3 ocupado.

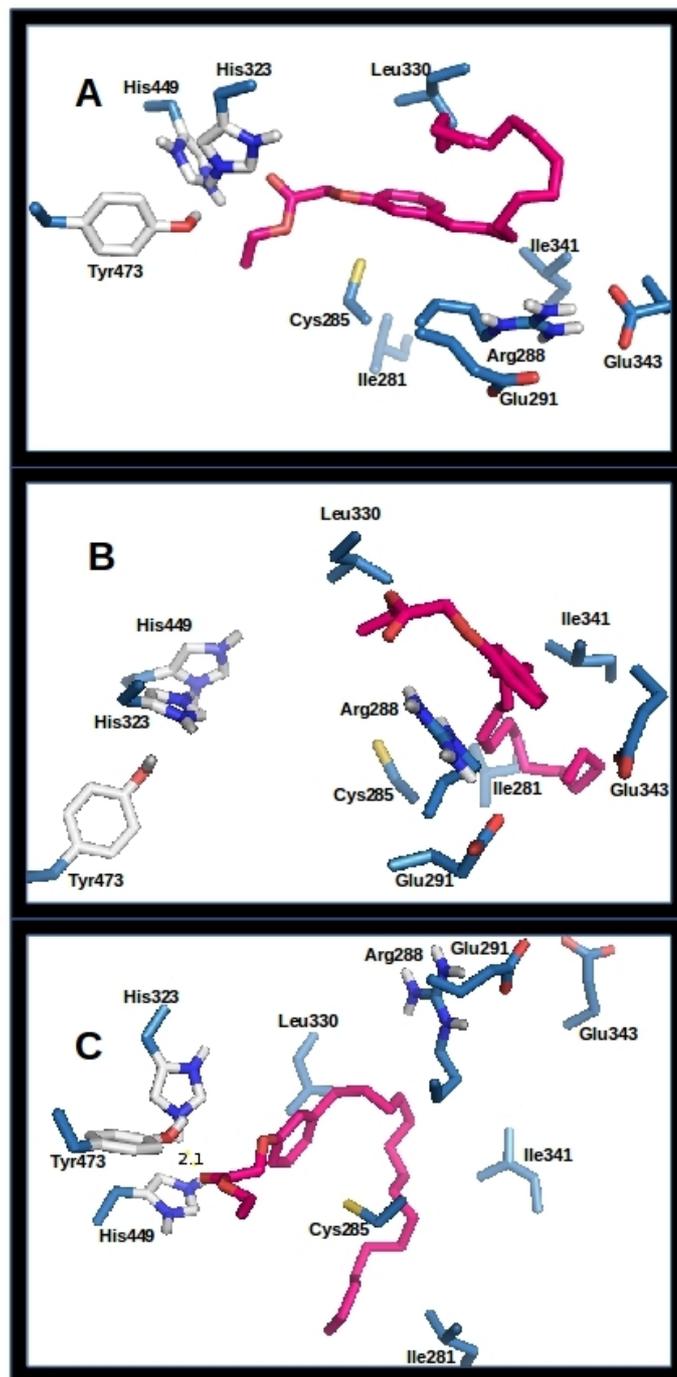


Figura 28- Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre (A) o ligante LDT15 (rosa) na RH12 da proteína PPAR γ (2VSR) (azul), (B) na RH3 ao ocupar a RH12 com o 9-(S)-HODE (C) com o resíduo de aminoácido His323 ao ocupar a RH3 com o 9-(S)-HODE.

5.1.4. LDT28

O LDT28, no *docking* rígido com o LBP vazio, interagiu no braço dois e três, demonstrando interações principalmente hidrofóbicas nessa região (figura 29A), somente pelo pymol foi reconhecida uma distância de interação polar fraca com a Arg288, como pode ser observado na figura 29B. Interações mais próximas a Arg280, que se localiza RH3' quando a RH3 e a RH12 foram ocupadas por ligantes, sendo que estes contatos eram primordialmente hidrofóbicos (figura 29C e D).

Quando se colocou flexibilidade em cadeias laterais de alguns resíduos do LBP, no caso da apo-PPAR γ , observou-se interação com a Arg288, mas as interações hidrofóbicas se alteraram, a cauda passou a interagir com a Leu330 ao invés de se aprofundar no braço dois (figura 30A). Todavia, quando ocorreu ocupação da RH12 e RH3, a posição do LDT28 se alterou bastante, pois em nenhum dos casos os grupamentos da cabeça polar se localizaram próximos ao Arg280, mas no primeiro caso fez interação com a Arg288 e no segundo com a Tyr473, figura 30B e C.

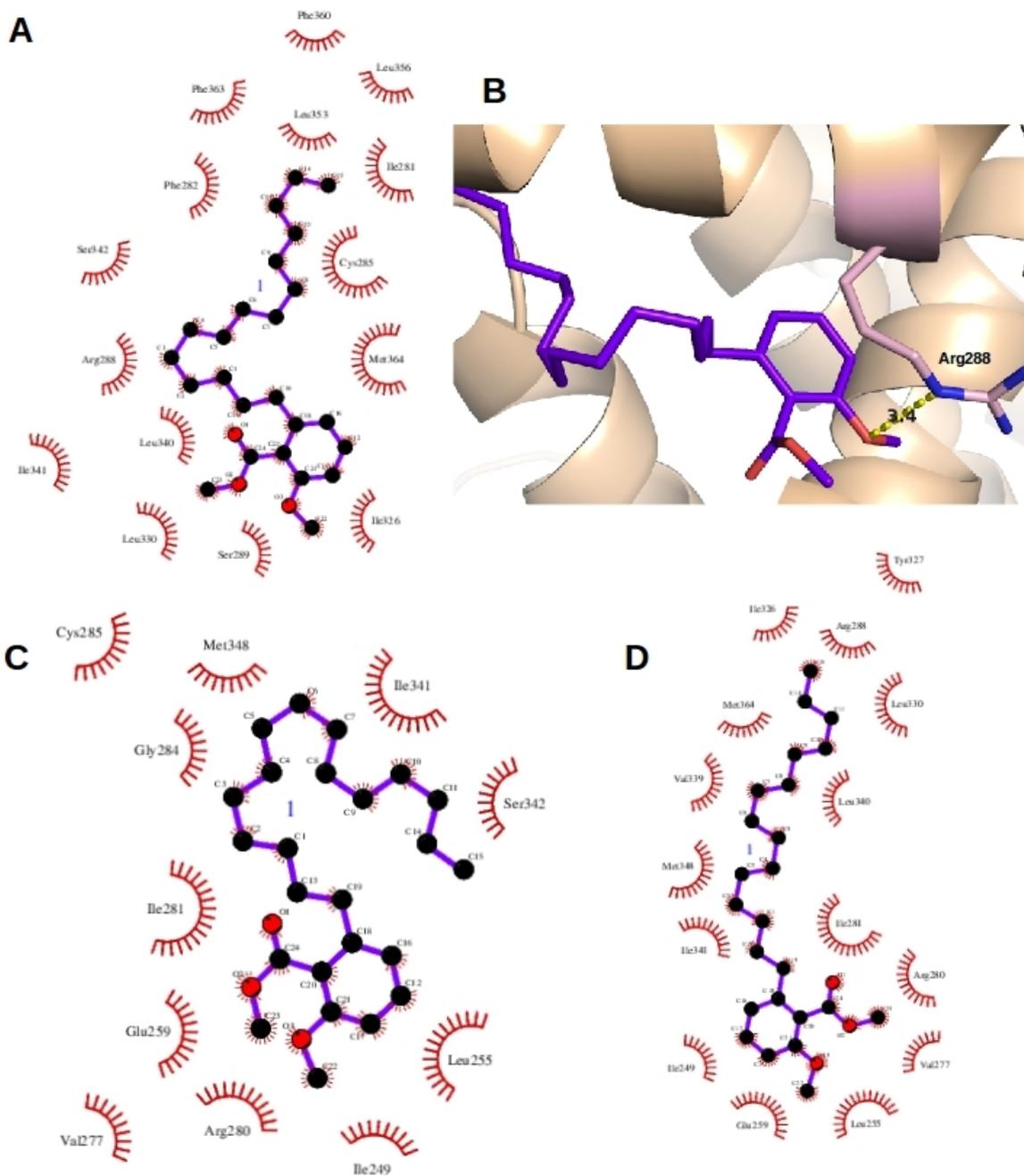


Figura 29- Interações entre a proteína PPAR γ (2VSR) e o LDT28. (A) Interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína apo. (B) Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre o ligante LDT28 (roxo) com o resíduo Arg288 (rosa) da proteína PPAR γ . (C) Interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH12 ocupado com o ligante 9-(S)-HODE. (D) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH3 ocupado.

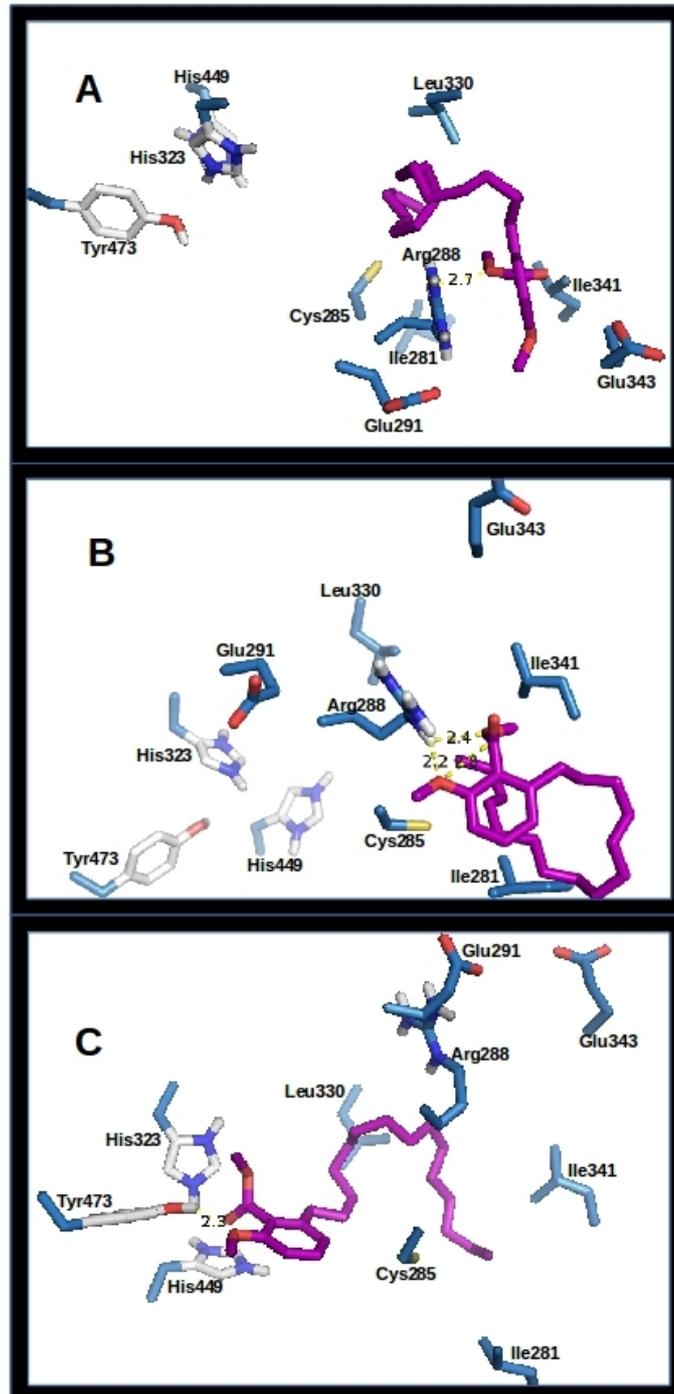


Figura 30- Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre (A) o ligante LDT28 (rosa) na RH3 da proteína PPAR γ (2VSR) (azul) com o resíduo Arg288, (B) na RH3 ao ocupar a RH12 com o 9-(S)-HODE (C) com o resíduo de aminoácido Tyr473 ao ocupar a RH3.

5.1.5. LDT29

Primeiramente quanto ao *docking* rígido, o LDT29 apresentou ligações de hidrogênio a Arg288 e Glu295 no docking com apo-PPAR γ (Figura 31A e B), além de interações hidrofóbicas com a Ile341, a Leu330, entre outros. Todavia, ao ocupar a RH12 o ligante interage com a Arg280, dessa forma a cauda fez diversas interações hidrofóbicas com resíduos do braço dois e três (Figura 31C). Por sua vez, ao ocupar o RH3 este ligante mostrou ligação de hidrogênio com a Glu259 e proximidade com a Arg280, com a cauda se esticando próximo a entrada do braço, interagindo, por exemplo com a Leu330 (Figura 31D).

No *docking* flexível, o ligante apresentou, no primeiro experimento, a interação no braço três, próximo a Arg288, com a cauda entrando para dentro da região do braço um (figura 32A). Ocupando a RH12, o ligante ocupou o braço dois se localizando na RH3' próximo a Arg280, apresentando diversas interações hidrofóbicas na H3 e nas fitas β , figura 32B. Ao ocupar a RH3, o ligante realizou interações no braço um, com a His323 e Tyr473, e a cauda lipofílica interagiu com resíduos como Leu 330, se dirigindo para os braços dois e três, figura 32C.

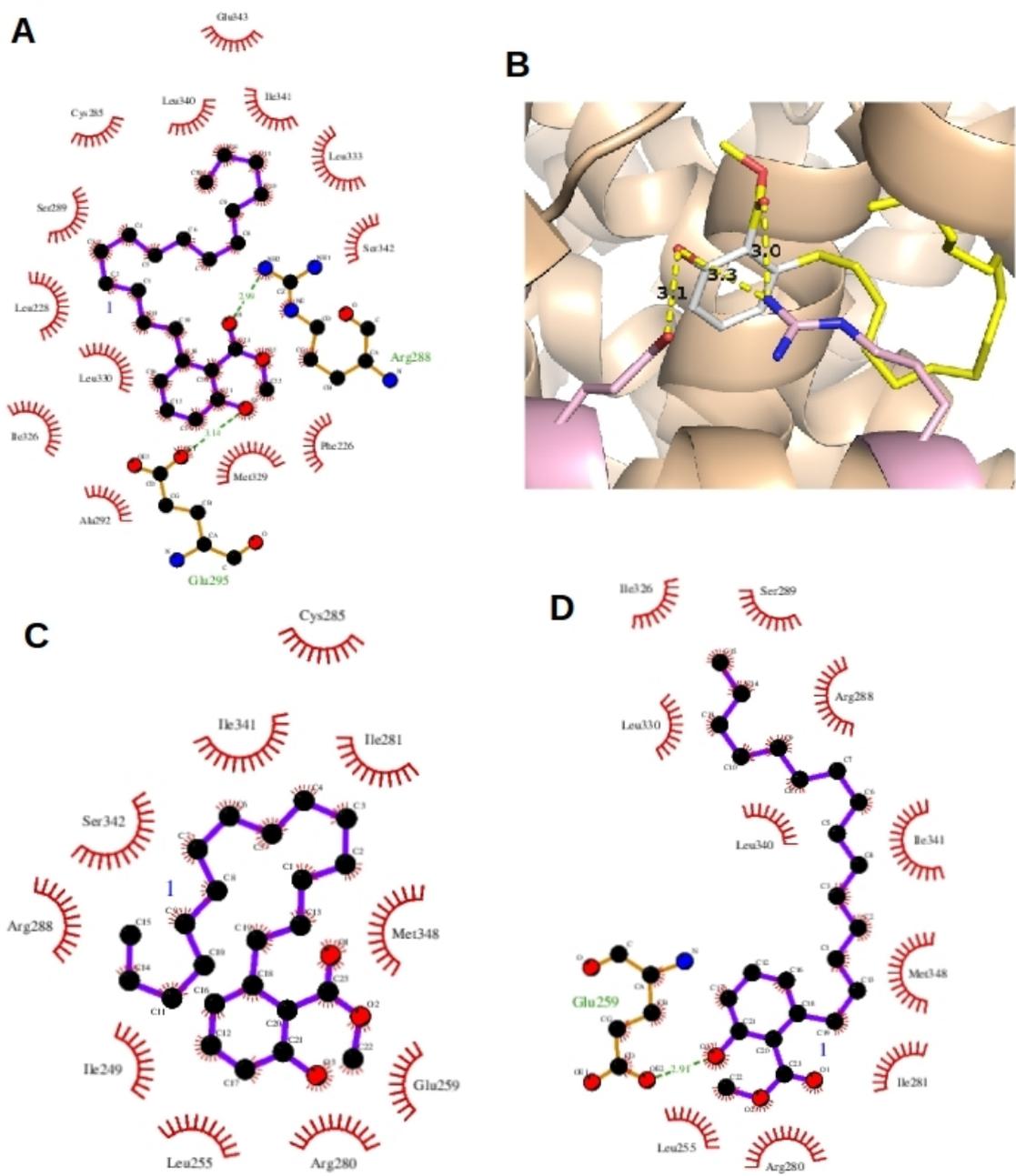


Figura 31- Interações entre a proteína PPAR γ (2VSR) e o LDT29. (A) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína apo. (B) Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre o ligante LDT29 (amarelo) com o resíduo Arg288 e Glu295 (rosa) da proteína PPAR γ . (C) Interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre o ligante e a proteína com o RH12 ocupado com o ligante 9-(S)-HODE. (D) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH3 ocupado.

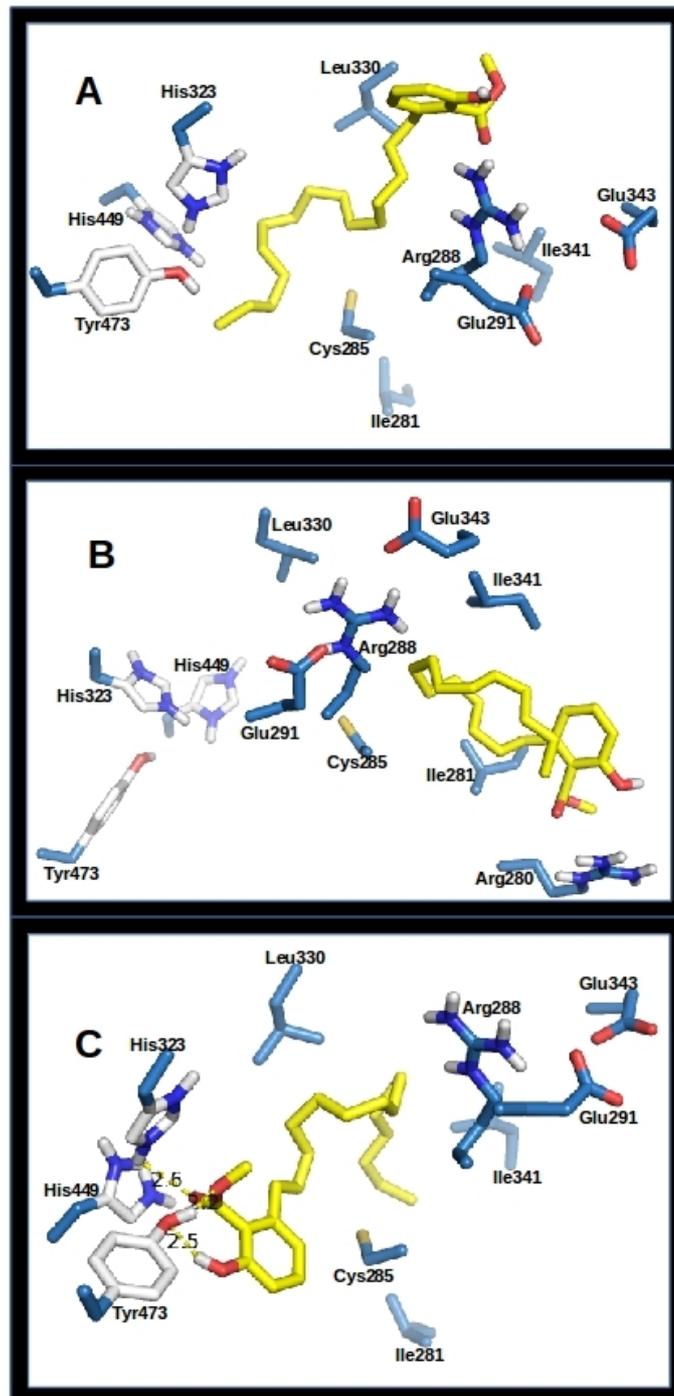


Figura 32- Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre (A) o ligante LDT29 (amarelo) na RH3 da proteína PPAR γ (2VSR) (azul), (B) na RH3 ao ocupar a RH12 com o 9-(S)-HODE e (C) ao ocupar a RH3.

5.1.6. LDT30

Este ligante, em se tratando do *docking* rígido com o LBP vazio, apresentou interações com o resíduo Arg288 (figura 33A e B), e realizou interações hidrofóbicas no braço dois. Nos seguintes tipos, RH12 e RH3 ocupados, este se posiciona no braço dois realizando diversas interações hidrofóbicas na região, e a cabeça polar se direciona para a Arg280 e Glu259 (figura 33C e D).

No *docking* com algumas cadeias laterais flexíveis, com a estrutura vazia, observou-se uma interação no braço dois, sem aprofundar a cauda dentro deste, e três, realizando ligações de hidrogênio com a Glu343, próxima da entrada (figura 34A). Ao ocupar a RH12, braço um, o ligante mantém a posição no RH3, em uma posição bem diferente, com a cauda hidrofóbica no interior do braço dois e a cabeça polar interagindo com a Arg288 (figura 34B). Todavia, quando a RH3 apresentou interação com o 9-(S)-HODE, o RH12 foi ocupado pelo LDT30, que interagiu com a His323 e a Tyr473 através do grupamento carboxila, e a cauda interagiu com a Leu330 e Ile341 (figura 34C).

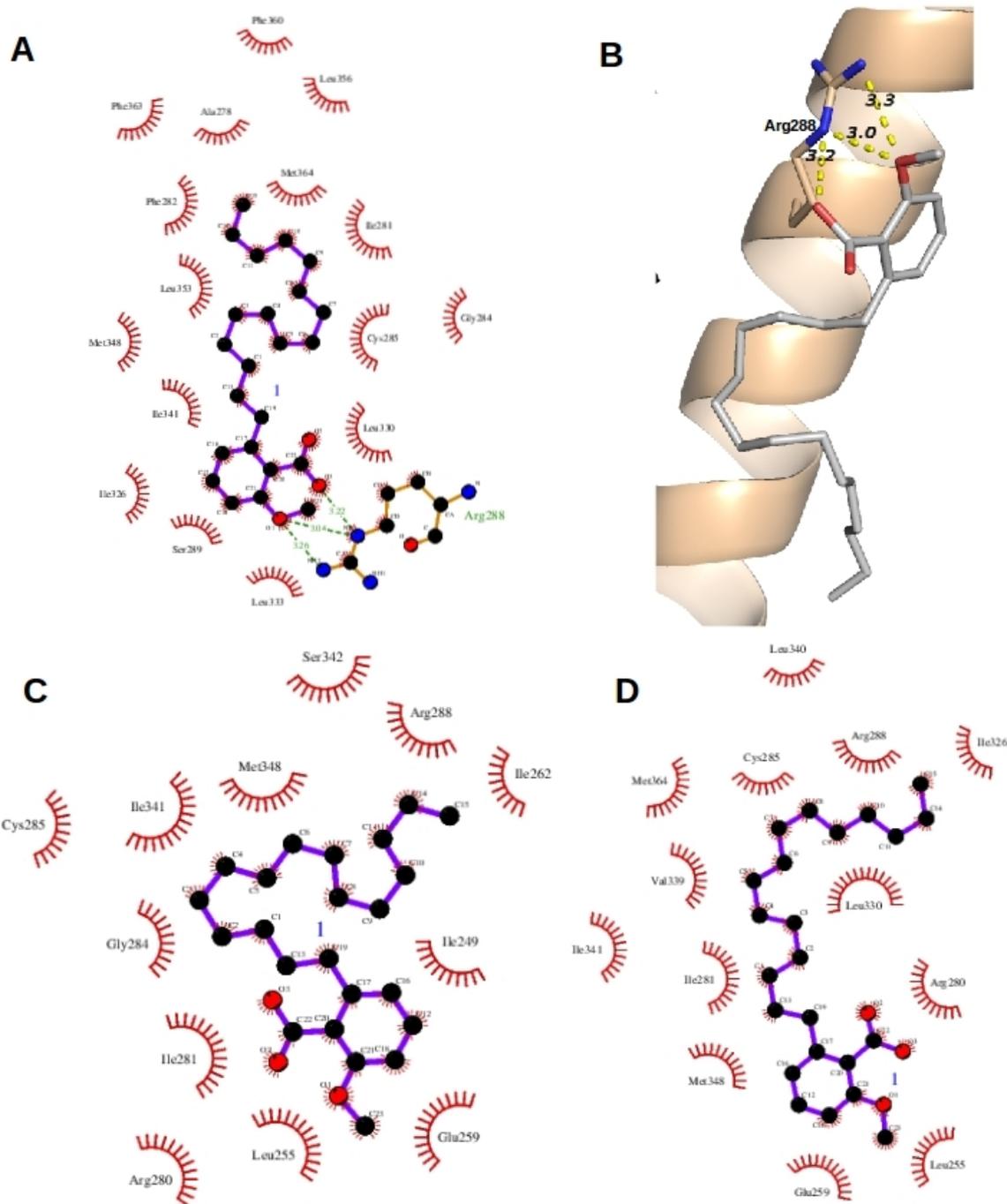


Figura 33- Interações entre a proteína PPAR γ (2VSR) e o LDT30. (A) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína apo. (B) Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre o ligante LDT29 (amarelo) com o resíduo Arg288 (rosa) da proteína PPAR γ . (C) Interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH12 ocupado com o ligante 9-(S)-HODE. (D) Interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH3 ocupado.

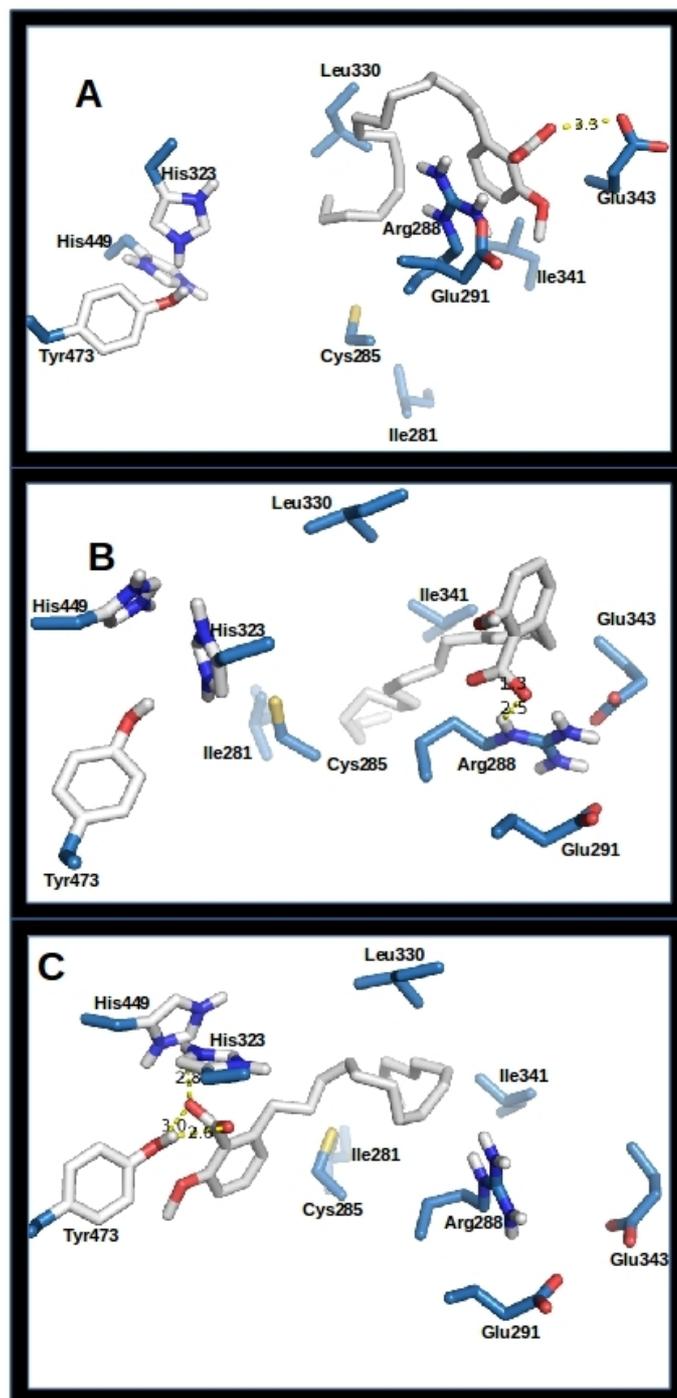


Figura 34- Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre (A) o ligante LDT30 (cinza) na RH3 da proteína PPAR γ (2VSR) (azul), (B) na RH3 ao ocupar a RH12 com o 9-(S)-HODE e (C) na RH12 ao ocupar a RH3.

5.1.7. LDT208

O LDT208 interagiu com a Ser289 e ficou bastante próxima da Arg288, além de resíduos hidrofóbicos como: Phe282, Ile341, Phe363, entre outros (figura 35A). Quando foi feito o experimento do LBP ocupado na RH12, foi observado contatos hidrofóbicos com resíduos da RH3, com o grupamento polar voltado para a Glu259 (figura 35B) e, ocupando a RH3, o ligante interagiu com os resíduos de aminoácidos Ser289, His323, His449 e Tyr473, com a cauda se direcionando para o braço dois (figura 35C e D).

Quanto ao *docking* flexível, no caso da apo-estrutura, o ligante realizou ligações de hidrogênio com a Arg288, mas a cauda se direcionou para o braço um em vez do braço dois (figura 36A). Ao posicionar uma molécula na RH12, o ligante se manteve na RH3, todavia apesar da cauda se direcionar para o braço dois realizando interações hidrofóbicas com a Ile281 e Ile341, a cabeça com grupamentos polares se localizou no braço três próximo a Glu295, como pode ser observado na figura 36B. Com a ocupação do RH3, o LDT208 se localizou no braço um, toda a molécula se localizou nessa região com a cauda se aprofundando neste braço. Além disso, a Arg288 torceu em direção ao ligante, que por sua vez não apresentou ligações de hidrogênio com os resíduos da região (figura 36C).

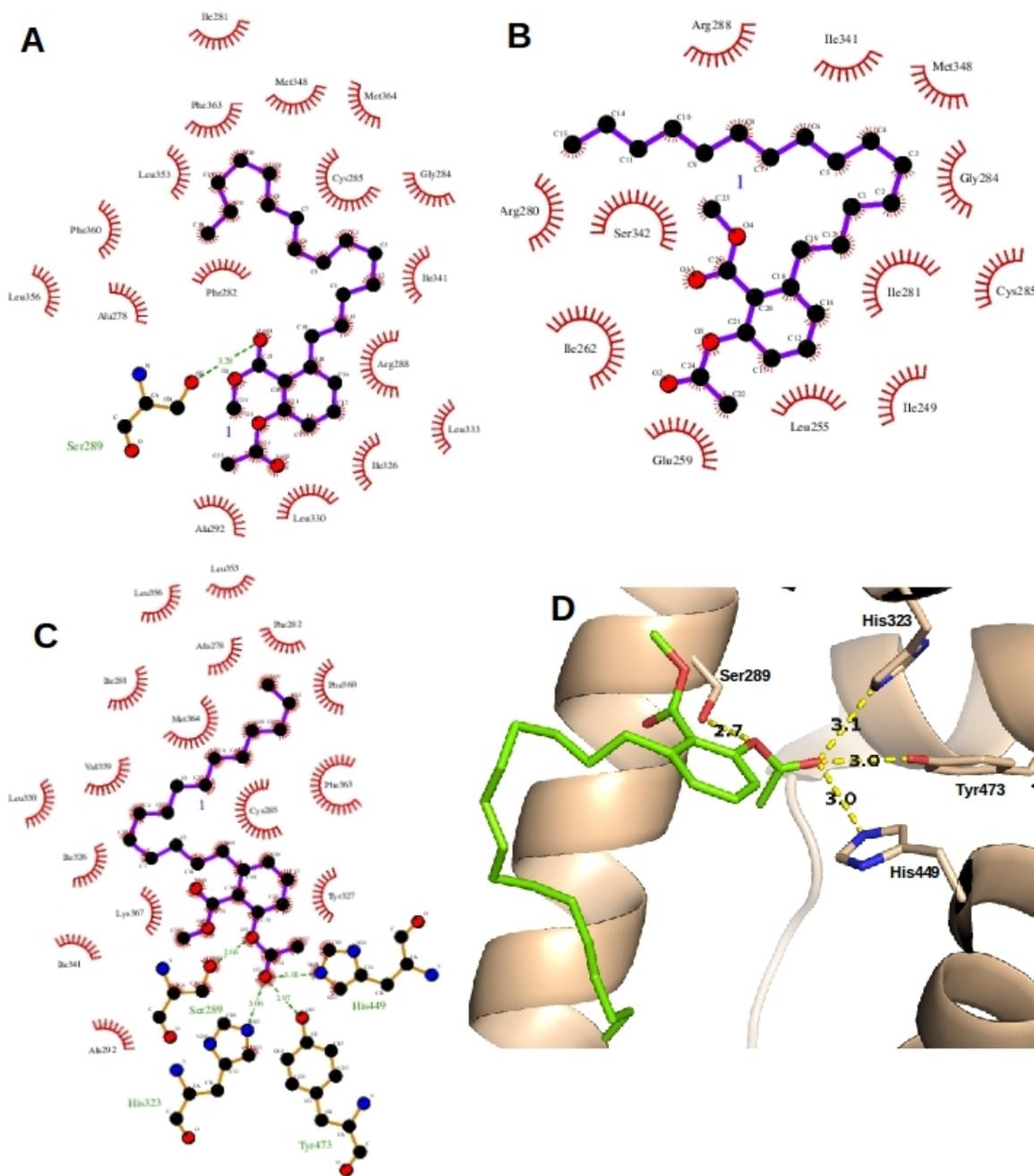


Figura 35- Interações entre a proteína PPAR γ (2VSR) e o LDT208. (A) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína apo. (B) Interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH12 ocupado com o ligante 9-(S)-HODE. (C) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH3 ocupado. (D) Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre o ligante LDT29 (amarelo) com o resíduo Arg288 (rosa) da proteína PPAR γ .

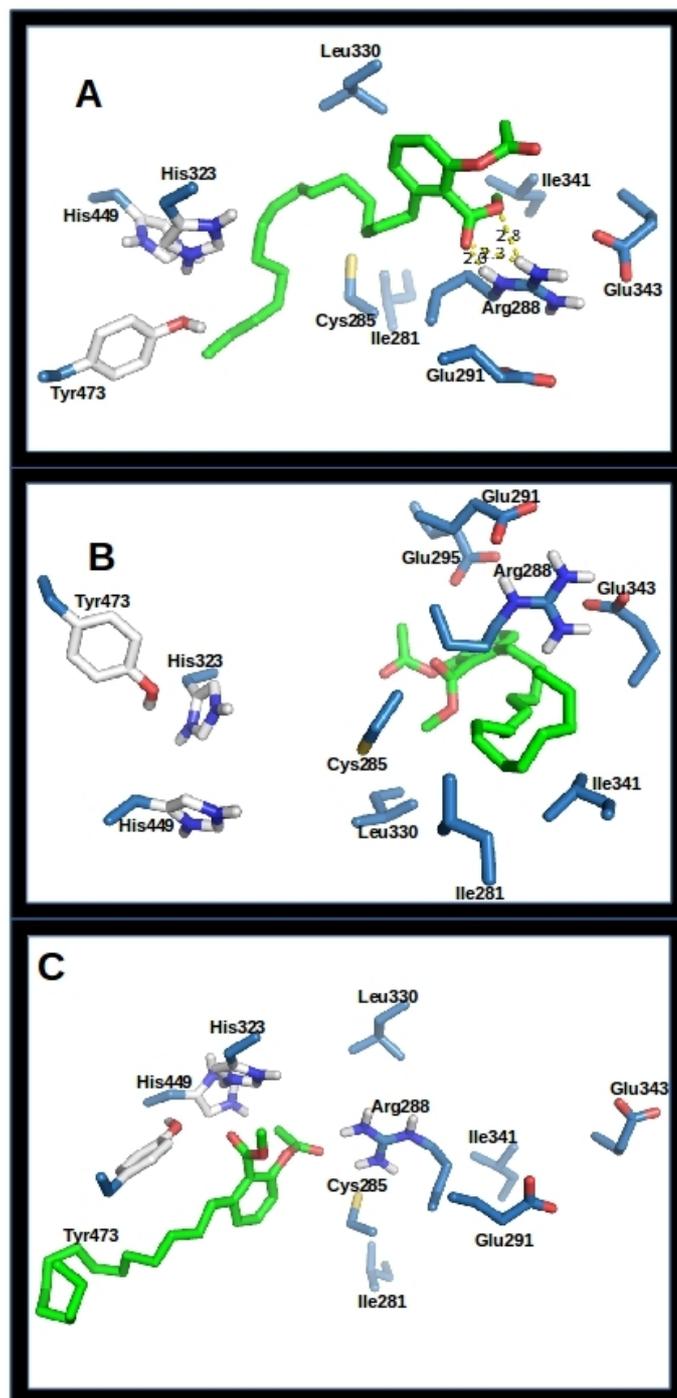


Figura 36- Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre (A) o ligante LDT208 (verde) na RH3 da proteína PPAR γ (2VSR) (azul), (B) na RH3 ao ocupar a RH12 com o 9-(S)-HODE e (C) na RH12 ao ocupar a RH3.

5.1.8. LDT380

Em se tratando do LDT380, no *docking* rígido com a apo-PPAR γ , este ligante apresentou interações com a Arg288 e a o oxigênio da carbonila da cadeia principal da Ile326, a cauda realizou contatos no braço dois (figura 37A). Por sua vez, ao ocupar RH12 com o 9-(S)-HODE o LDT380 apresentou interação com a Arg280 e de modo hidrofóbico com Leu255, Ile281, Ile341, Met348, entre outros, como se observa na figura 37B. Ao posicionar o ligante de modo a ocupar a RH3 o LDT380 apresenta interações com os resíduos do braço um (His323, His449 e Tyr473), figura 37C e D.

Quanto ao *docking* que permite a flexibilidade de algumas cadeias laterais, na proteína apo, o LDT380 interagiu na RH3, com resíduos como a Glu291, Leu330, Ile341 e Glu343, figura 38A. Essa posição não alterou muito quando um ligante estava ocupando a RH12, alterando principalmente a ligação de hidrogênio formada com a Arg288 e a Glu343, a cauda apesar de uma posição diferente interage com os mesmos resíduos (figura 38B). Em relação ao *docking* flexível ocupando a RH3, o ligante interage na RH12, com a cauda posicionada em direção ao interior do braço um, e a Arg288 curvando-se em direção a esse braço buscando interação com o ligante, como observado na figura 38C.

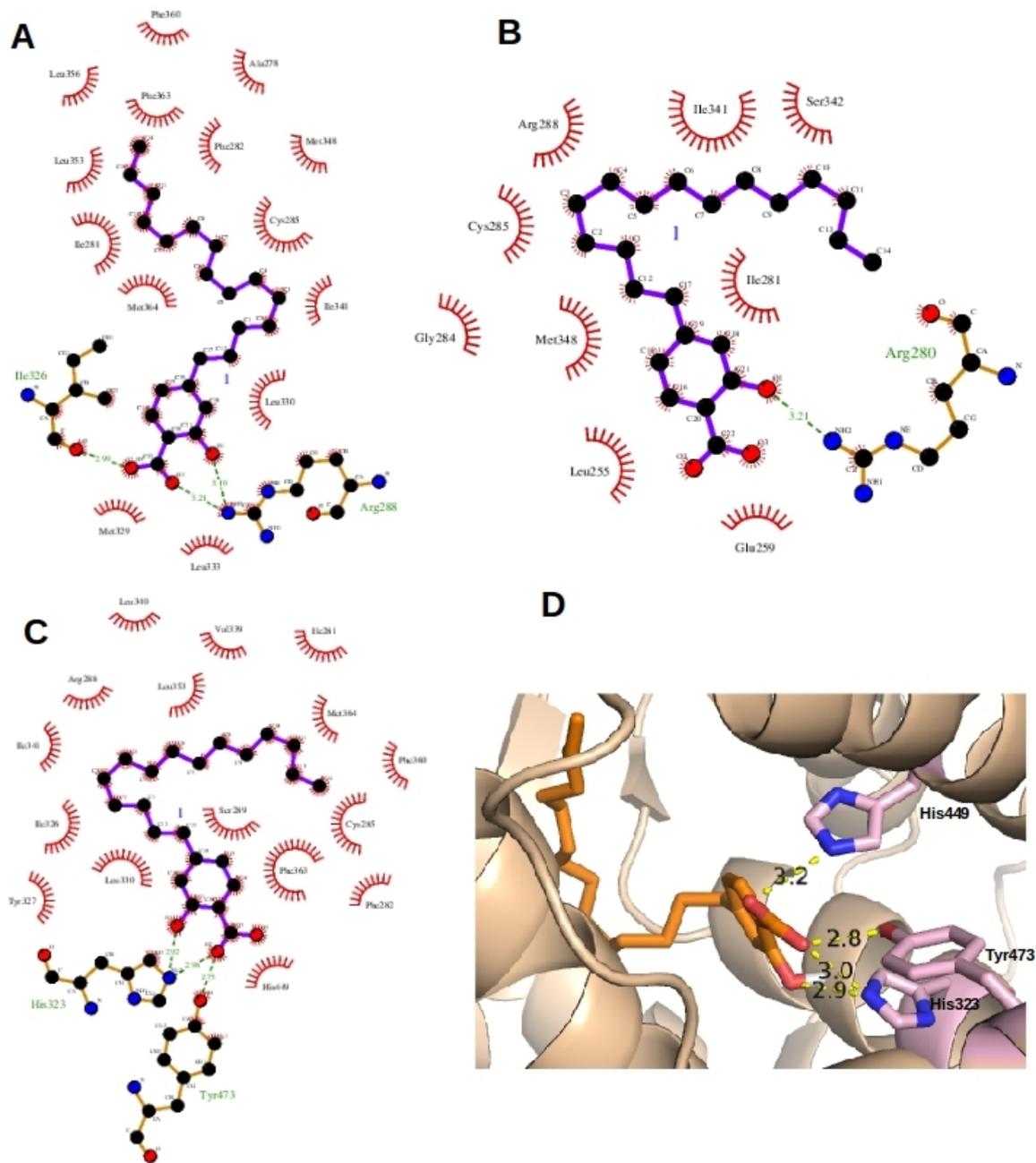


Figura 37- Interações entre a proteína PPAR γ (2VSR) e o LDT380. (A) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína apo. (B) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH12 ocupado com o ligante 9-(S)-HODE. (C) Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o ligante e a proteína com o RH3 ocupado. (D) Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre o ligante LDT380 (laranja) com os resíduos His323, His449 e Tyr473 (rosa) da proteína PPAR γ .

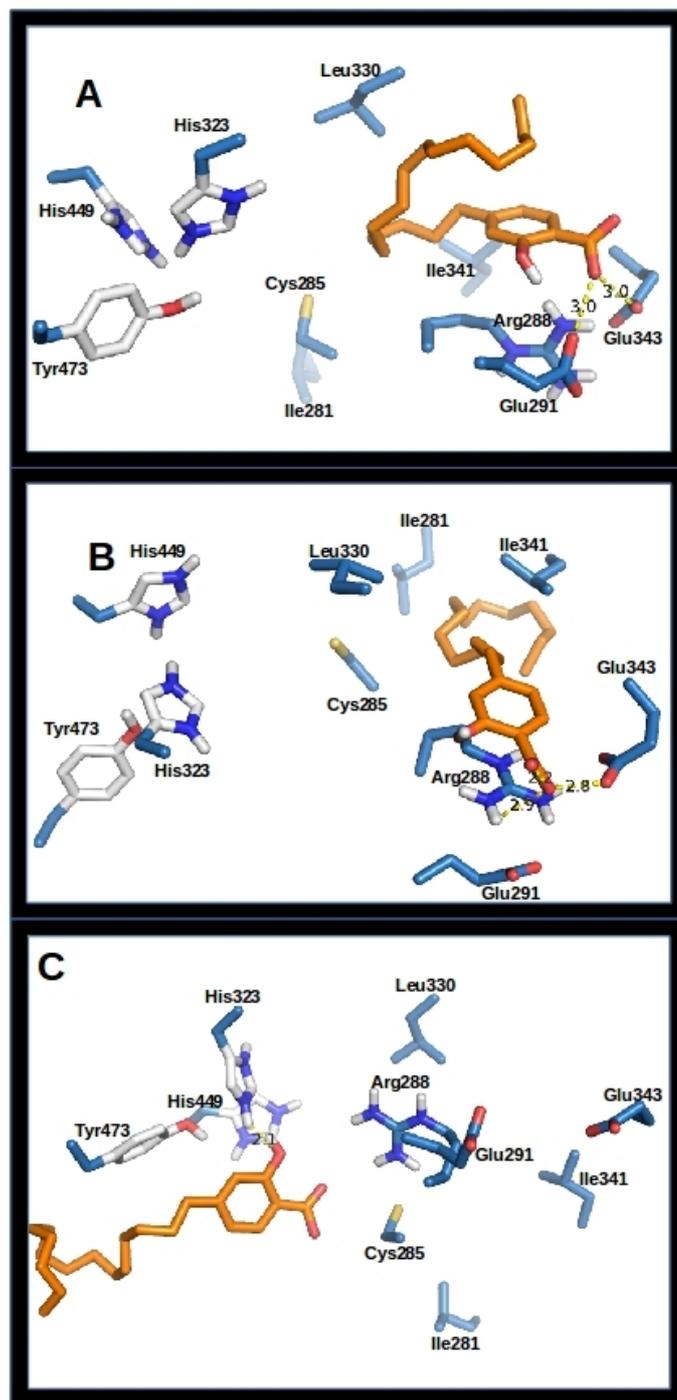


Figura 38- Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre (A) o ligante LDT380 (laranja) na RH3 da proteína PPAR γ (2VSR) (azul), (B) na RH3 ao ocupar a RH12 com o 9-(S)-HODE e (C) na RH12 ao ocupar a RH3.

5.1.9. LDT383

Quanto ao ligante LDT383 foi observada no experimento de *docking* rígido sem ligantes no LBP da proteína PPAR γ a localização dos grupos polares próximos ao resíduo Arg288, mas as interações hidrofóbicas aparecem em bem mais quantidade, figura 39A. Quando o RH12 esta ocupado, este ligante faz uma série de interações polares com a Arg280 e a cauda se mantém no braço dois (figura 39B). Quando a região ocupada é a RH3 o ligante apresenta um conjunto de possibilidades de ligações de hidrogênio no braço um com os resíduos His323, Tyr327, Lys367, His449 e Tyr473, isto pode ser visto na figura 39C e D.

Quando se adicionou flexibilidade a algumas cadeias laterais o *docking*, na estrutura vazia, apresentou interação na RH12, diferentemente do rígido (figura 40A). Ocupando o RH12, a molécula vai interagir no braços dois e três, com resíduos como Glu295, Ile341 e Glu343, figura 40B. Todavia, ao colocar o 9-(S)-HODE na RH3 o LDT383 voltasse novamente ao RH12, todavia a sua cauda se direciona para o fundo do braço um, como pode ser visto na figura 40C.

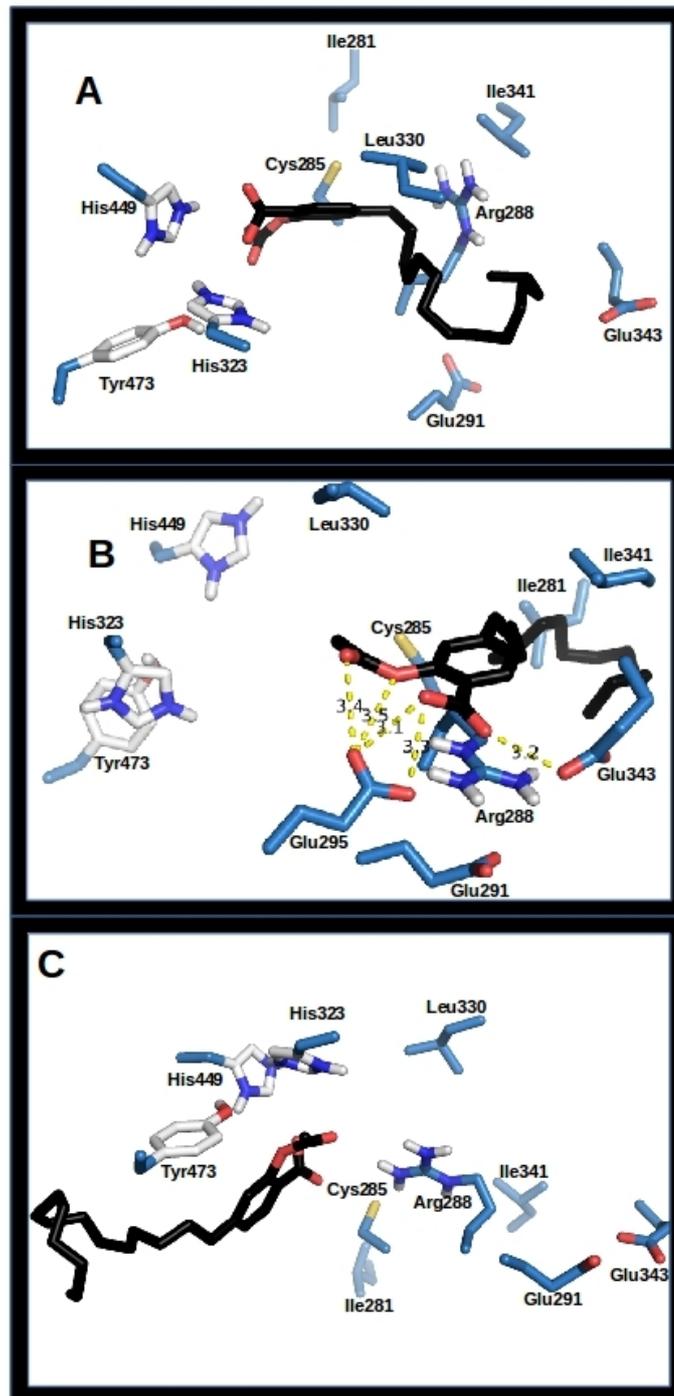


Figura 40- Interações polares (pontilhado em amarelo e o distância em Å) entre (A) o ligante LDT383 (preto) na RH12 da proteína PPAR γ (2VSR) (azul), (B) na RH3 ao ocupar a RH12 com o 9-(S)-HODE e (C) na RH12 ao ocupar a RH3.

5.2. Dinâmica molecular

Na MD selecionou-se o ligante LDT11 para a realização deste experimento. Essa seleção ocorreu devido a três fatores, (1) este foi uma das moléculas que apresentou os melhores resultados nos experimentos in vitro realizado pelos colaboradores (ALVES, 2015; SAMPAIO, 2015). (2) Este ligante apresentou bons resultados em ambos experimentos de docking, interagindo na RH3 e RH12, com grande número de pontes de hidrogênio. (3) Os valores das cargas obtidas na literatura para o experimento de MD se assemelhavam mais com este ligante do que com os demais.

Realizaram-se primeiramente experimentos para a seleção do padrão de cargas do ligante que seria utilizado: geradas pelo programa PRODRG ou cargas calculadas para ligantes semelhantes obtidas em artigos publicados. Os gráficos de RMSD das corridas podem ser observados na figura 41. Devido aos ligantes não apresentarem diferenças significativas nos resultados das análises de RMSD, principalmente no gráfico analisando os ligantes (figura 41B) e as cargas do PRODRG não apresentarem uma grande confiabilidade na literatura (LEMKUL; ALLEN; BEVAN, 2010), os demais experimentos de dinâmica foram realizados com as cargas de compostos semelhantes obtidos em artigos previamente citados.

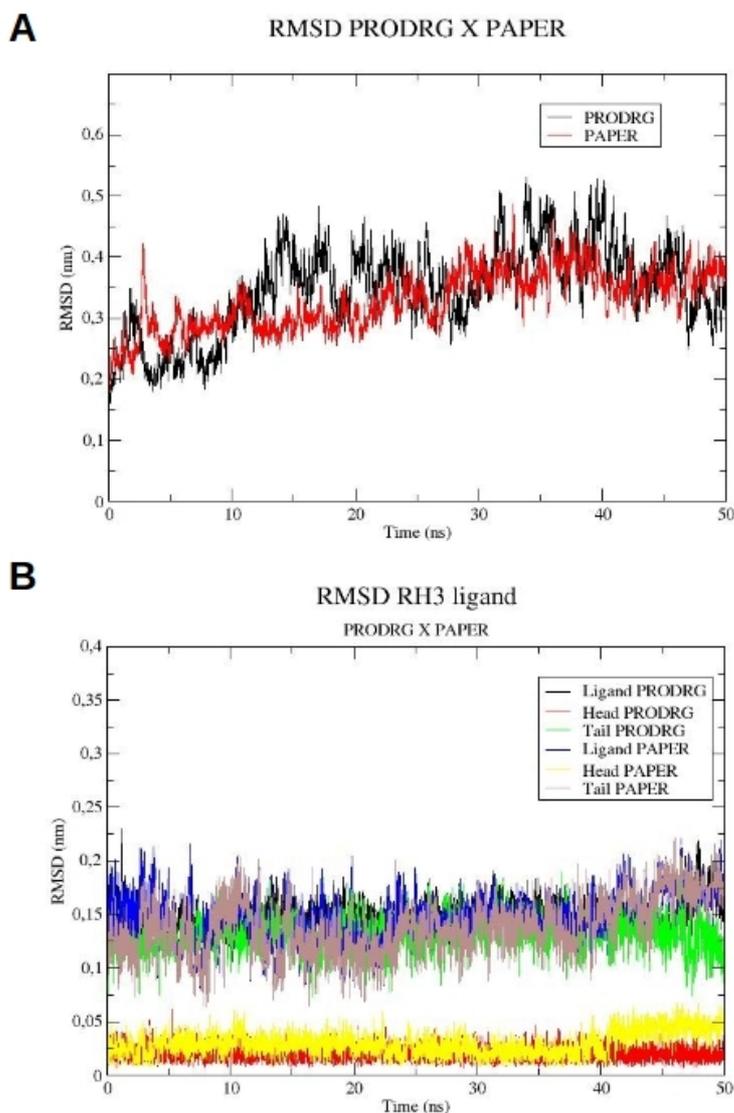


Figura 41- Análises dos experimentos com o ligante com diferentes tipos de carga, gerada pelo site do PRODRG e a junção de cargas de ligantes similares (PAPER). (A) RMSD da cadeia principal das diferentes MD. (B) RMSD dos ligantes em interação no LBP da PPAR γ com diferentes tipos de carga.

Os experimentos de RMSD das diferentes corridas, sem ligante (APO), ligante na RH3, na RH12 e em ambas, pode ser observado na figura 42A. Dentre todas as MD a APO, em torno de 40 ns, apresentou um pico, todavia os demais ligantes pareceram apresentar uma estabilização do RMSD.

Quanto as análises de RMSD da região das fitas β , não foi observado variações significativas nos valores, apesar da proteína sem ligante no LBP apresentar entre 10 e 20 ns e 30 e 40 ns números um pouco superiores. Em se tratando da hélice 3, a dinâmica com o ligante na RH3 foi o que apresentou os maiores valores, atingindo valores máximos de 0,3 nm, seguido da apo-estrutura, as outras duas apresentaram valores próximos, em torno de 0,2 nm. O RMSD da H12 foi que apresentou maior variação onde a apo-PPAR γ , rapidamente atingiu um valor de 0,4 nm, próximo de 15 ns as MD com ligante na RH3 e RH12 atingiram esse mesmo patamar e a com ligante em ambos os sítios se manteve estável até o final dos 50 ns em valores menores que 0,2 nm. Estes gráficos podem ser vistos na figura 42.

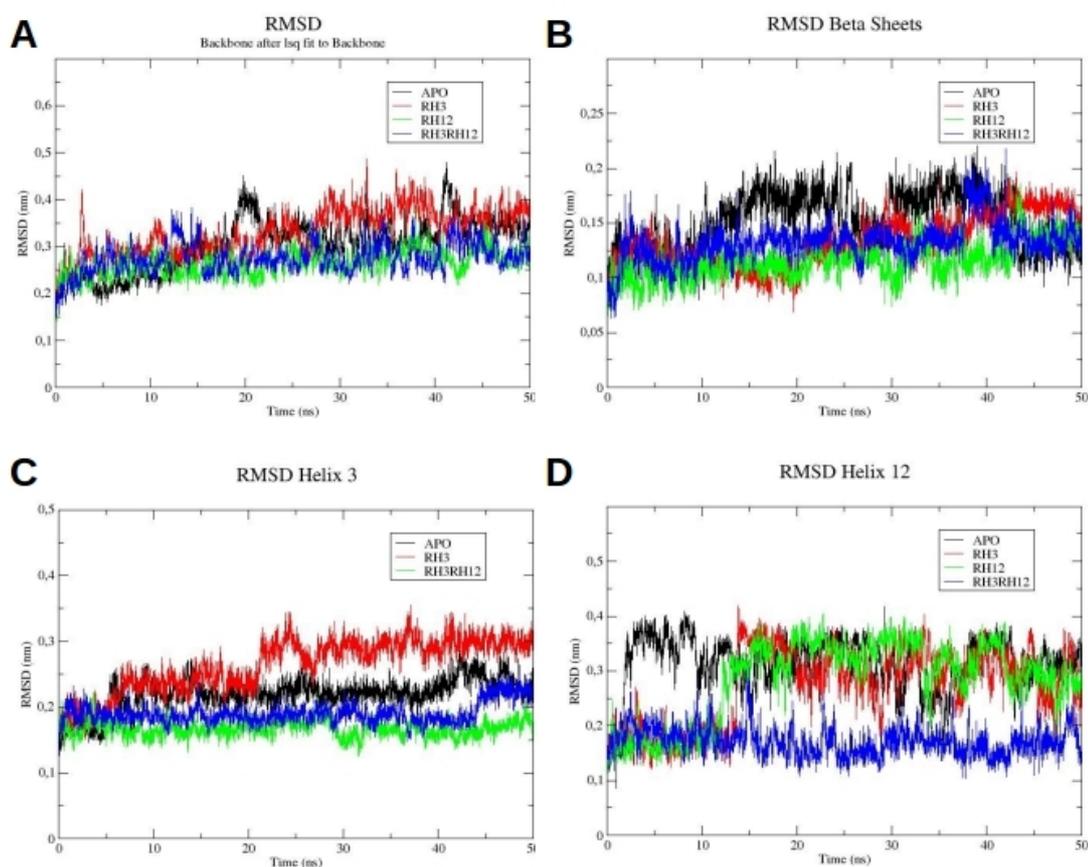


Figura 42- Gráficos de RMSD dos experimentos de MD (A) e fitas β de número 3 e 4(B), da H3 (C) e da H12 (D).

Outra análise realizada na dinâmica foi a de RMSF, figura 43. Não se observou alteração significativa entre os experimentos, mas sim regiões onde se via uma flutuação menor e maior, vales e picos (figura 43 A). As regiões de menor valor de flutuação são

entre os resíduos 385 a 390 (hélice 8) e 413 a 417 (hélice 9), com valores inferiores a 0.1 nm. Os picos, por sua vez, se encontram em torno dos resíduos 240, 272, 336 e 427.

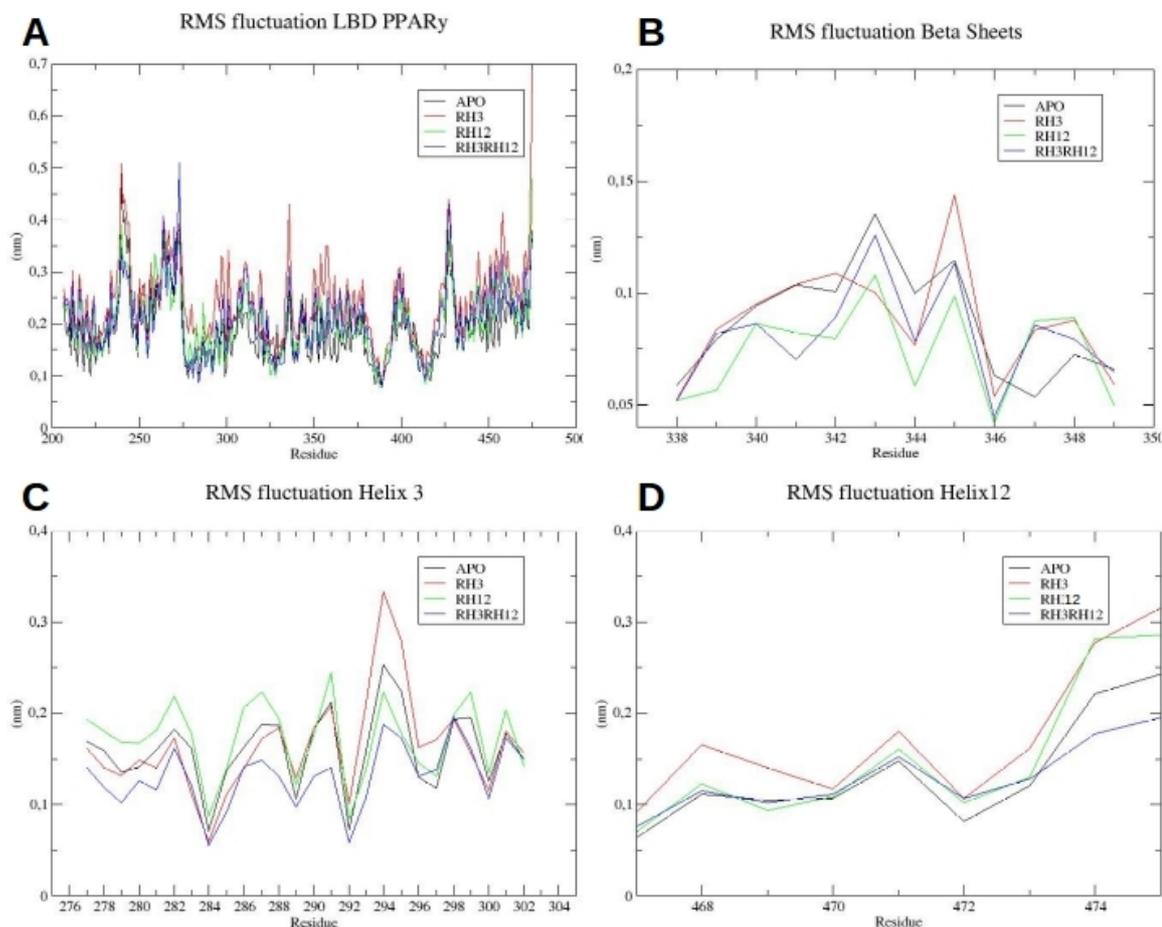


Figura 43- Gráficos de RMSF dos experimentos de MD (A) e da região de fitas β (B), da H3 (C) e da H12 (D).

Por sua vez, os ligantes apresentaram variação no RMSD durante o experimento. Primeiramente, o ligante quando localizado na RH3 apresentou durante toda a MD valores entre 0,1 e 0,2 nm. Todavia, grande parte desse valor se devia a movimentação da cauda, a cabeça apresentou constantemente valor de RMSD abaixo de 0,05 nm, demonstrando uma baixa motilidade, como pode ser visto na figura 41A. Este mesmo padrão da cabeça, onde se encontram os grupos polares, foi observado quando o LDT11 ocupava esta mesma região só que com outra molécula igual ocupando a RH12 simultaneamente, figura 44C.

No caso do LDT11 ocupando a RH12 também se observou um padrão diferente,

em se tratando da cabeça do ligante, tanto quando ele se encontrava sozinho na LBP da proteína quanto com a ocupação do RH3. Durante o experimento ocorreu momentos onde o RMSD se encontrava em torno de 0,05 nm durante alguns ns, todavia ocorria alterações que conduziam o RMSD para valores próximos a 0,1 nm, figura 44B e C. Por sua vez, as caudas hidrofóbicas apresentaram valores superiores a 0,1 nm em ambas as análises.

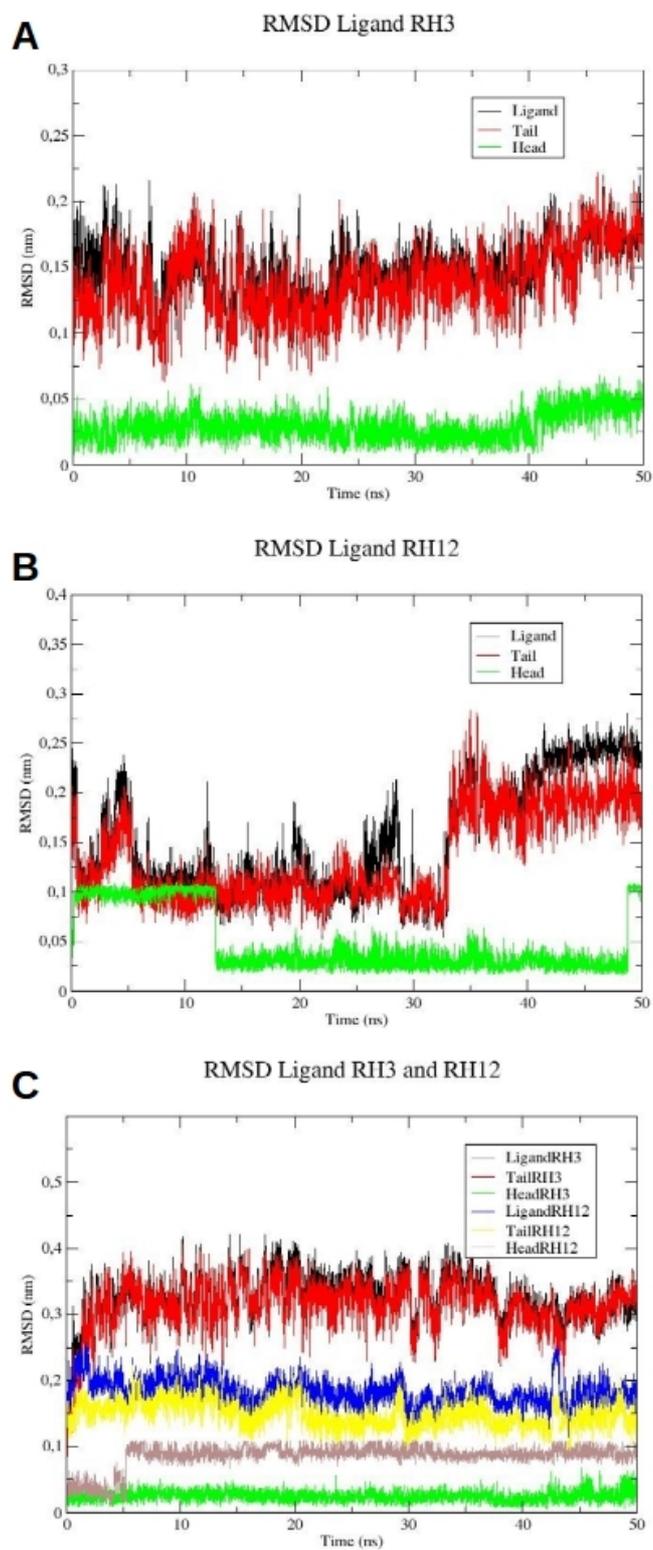


Figura 44- RMSD do ligante inteiro, cabeça e cauda durante os experimentos de MD. (A) Dinâmica apresentando o LDT11 somente na RH3. (B) Experimento com o ligante na RH12. (C) LDT11 em interação em ambos os sítios simultaneamente.

Além disso, observou-se que no experimento do LDT11 no RH3 do LBP algumas ligações de hidrogênio que se mantiveram por longos tempos na MD, por exemplo entre o oxigênio da Ser342 e os da carboxila do ligante que persistiram por mais de 50% do tempo e a Arg288, que durante todo o tempo da dinâmica o ligante realizava pelo menos uma ligação de hidrogênio com os nitrogênios da cadeia lateral deste resíduo. Além destes outros resíduos como a Leu228, Glu295 e Glu343 se apresentaram interações por grande parte do experimento com o LDT11, tabela 4.

Tabela 4- Tempo de existência das ligações de hidrogênio na MD com LDT11 posicionado na RH3.

Doador		RH3 Aceptor		Tempo (%)
LEU228	N	DRGC	OAX	0.1
LEU228	N	DRGC	OAY	36.7
LEU228	N	DRGC	OAW	14.7
ARG288	NE	DRGC	OAX	49.4
ARG288	NE	DRGC	OAY	3.8
ARG288	NE	DRGC	OAW	15.5
ARG288	NH1	DRGC	OAX	1.9
ARG288	NH1	DRGC	OAY	0.04
ARG288	NH1	DRGC	OAW	0.9
ARG288	NH2	DRGC	OAX	8.4
ARG288	NH2	DRGC	OAY	14.6
ARG288	NH2	DRGC	OAW	19
SER342	N	DRGC	OAX	0.08
SER342	OG	DRGC	OAX	44.4
SER342	OG	DRGC	OAY	6.2
GLU343	N	DRGC	OAX	7.7
GLU343	N	DRGC	OAY	42.2
DRGC	OAW	ARG288	O	0.04
DRGC	OAW	GLU295	OE1	21.2
DRGC	OAW	GLU295	OE2	23.2

Nota:

DRGC representa o LDT11 na RH3 do LBP.

OAX e OAY são os oxigênios que compõe a carboxila, e OAW a hidroxila do LDT11.

Quanto as análises do tempo de existência das ligações de hidrogênio entre o ligante posicionado na RH12, observou-se dois momentos distintos com valores de RMSD variados, sendo assim, observou-se o padrão dessas interações nesses dois momentos, como observado na tabela 5. Semelhantemente, ambos os tempos (0-12 ns e 15-45 ns) apresentam em torno de 95% de tempo de interação com a Ser289, entretanto pode ser observado que ocorre uma queda de quase 30% das interações com a Tyr473 e um

aumento de praticamente o mesmo valor com a His449. Demais resíduos não apresentaram valores significativos, o resultado de toda a corrida pode ser visto na tabela 6.

Tabela 5- Tempo de existência das ligações de hidrogênio na MD com LDT11 posicionado RH12 nos tempos de 0 a 12 ns e 15 a 45 ns.

Doador	RH12 (0 – 12 ns)				Tempo (%)	Doador	RH12 (15 – 45 ns)			Tempo (%)
	NE2	DRGC	OAW	OAX			OG	DRGC	OAX	
GLN286	NE2	DRGC	OAW	OAX	0.2	SER289	OG	DRGC	OAX	0.6
SER289	OG	DRGC	OAX	OAY	92.4	SER289	OG	DRGC	OAY	94.3
SER289	OG	DRGC	OAY	OAX	3.4	LYS367	NZ	DRGC	OAX	0.03
HIS323	NE2	DRGC	OAY	OAX	0.08	HIS449	NE2	DRGC	OAX	58.7
TYR327	OH	DRGC	OAY	OAX	0.1	HIS449	NE2	DRGC	OAY	0.1
LYS367	NZ	DRGC	OAY	OAX	0.2	HIS449	NE2	DRGC	OAW	7.9
HIS449	NE2	DRGC	OAX	OAY	0.4	LYS457	NZ	DRGC	OAW	0.1
HIS449	NE2	DRGC	OAY	OAX	28.2	TYR473	OH	DRGC	OAX	19.1
HIS449	NE2	DRGC	OAW	OAY	2.4	TYR473	OH	DRGC	OAY	37.4
TYR473	OH	DRGC	OAX	OAW	64.1	TYR473	OH	DRGC	OAW	0.06
TYR473	OH	DRGC	OAY	OAW	21.1	DRGC	OAW	SER289	OG	0.06
TYR473	OH	DRGC	OAW	O	0.5	DRGC	OAW	LEU469	O	0.03
DRGC	OAW	LEU469	O	O	0.08					

Nota:

DRGC representa o LDT11 na RH12 do LBP.

OAX e OAY são os oxigênios que compõe a carboxila, e OAW a hidroxila do LDT11.

Tabela 6- Tempo de existência das ligações de hidrogênio na MD com LDT11 posicionado na RH12.

Doador	RH12	Tempo (%)		
		Doador	Aceptor	
GLN286	NE2	DRGC	OAW	0.06
SER289	OG	DRGC	OAX	26
SER289	OG	DRGC	OAY	69.4
HIS323	NE2	DRGC	OAY	0.02
TYR327	OH	DRGC	OAY	0.04
LYS367	NZ	DRGC	OAX	0.02
LYS367	NZ	DRGC	OAY	0.06
HIS449	NE2	DRGC	OAX	38.6
HIS449	NE2	DRGC	OAY	7.7
HIS449	NE2	DRGC	OAW	12.2
LYS457	NZ	DRGC	OAW	0.1
TYR473	OH	DRGC	OAX	29.8
TYR473	OH	DRGC	OAY	30.9
TYR473	OH	DRGC	OAW	0.1
DRGC	OAW	SER289	OG	0.04
DRGC	OAW	LEU469	O	0.04

Notas:

DRGC representa o LDT11 na RH12 do LBP.

OAX e OAY são os oxigênios que compõe a carboxila, e OAW a hidroxila do LDT11.

Além disso, algumas imagens das interações entre o LDT11 e a PPAR γ durante diversos tempos da MD podem ser observados na figura 45. Nos tempos iniciais podemos observar interações com a Ser289 e a Tyr473, a His449 parece apresentar ligações de hidrogênio por menos tempo e com distâncias maiores. Todavia, após os 15 ns o ligante apresentou interações principalmente com os três resíduos Ser289 e His449, além de momentos de contatos com ambos e a Tyr473.

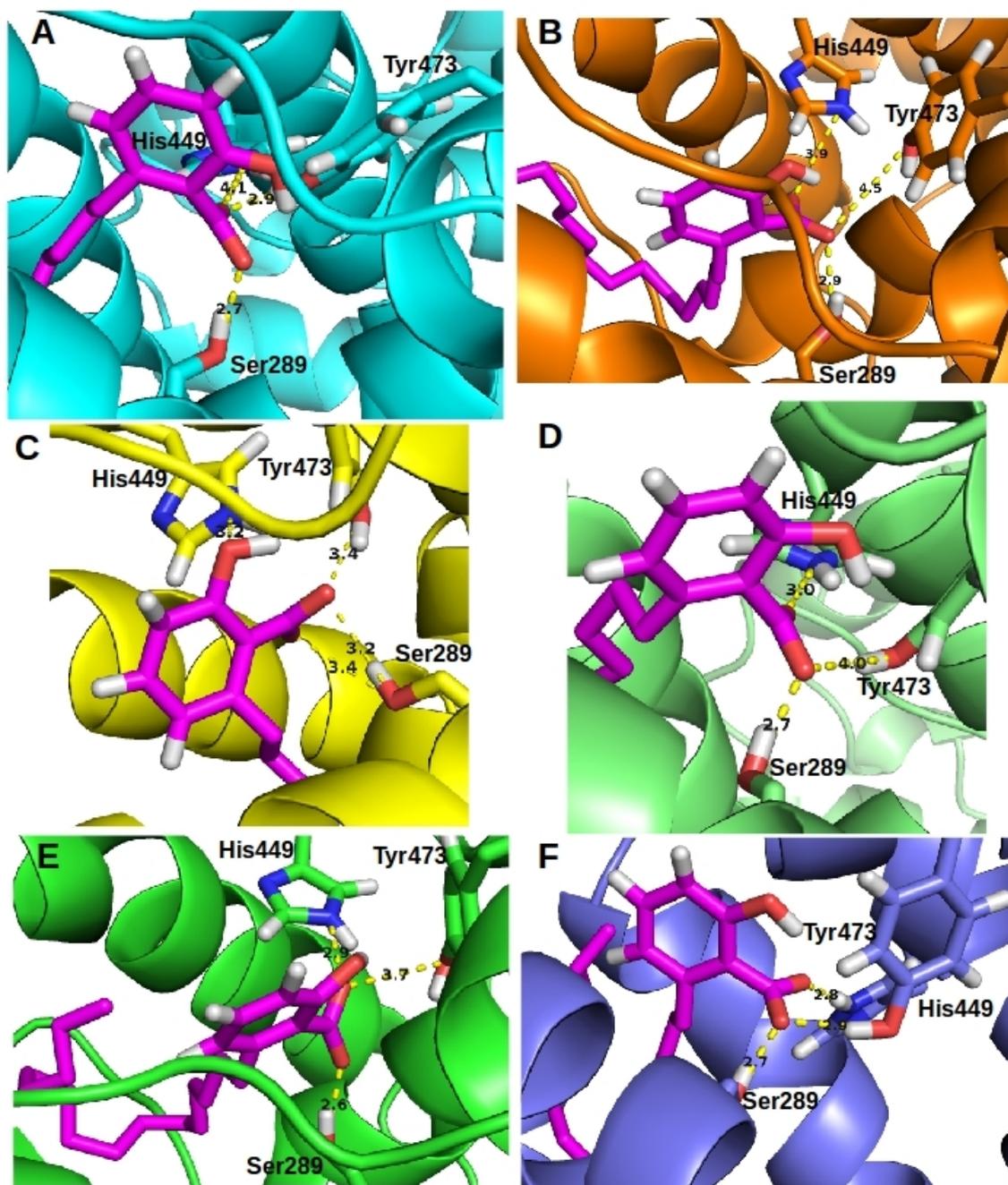


Figura 45- Interações entre o LDT11 e a PPAR γ durante a MD, com a RH12, ocupada nos tempos de (A) 2 ns (B) 3 ns (C) 4 ns (D) 15 ns (E) 20 ns e (F) 30 ns. As distâncias entre os átomos pesados (Å) das ligações de hidrogênio são mostrados em preto.

Nas MD onde dois ligantes ocupavam o LBP (RH3 e RH12), primeiramente no RH3, os resíduos com maior tempo foram semelhantes ao do RH3 sozinho (apesar de uma variação no tempo de existência das ligações em questão). Dentre essas podemos observar Arg288, Glu291 (esta principalmente com a hidroxila), Ser342 e Glu343, sendo

que os três últimos apresentaram mais tempo de ligação, como pode ser observado na tabela 7.

Tabela 7- Tempo de existência das ligações de hidrogênio na MD com duas moléculas de LDT11 posicionadas na RH3 e RH12 respectivamente.

Doador		RH3 Aceptor		Tempo (%)	Doador		RH12 Aceptor		Tempo (%)
LYS265	NZ	DRGC	OAX	6.1	GLN286	NE2	DRGD	OAW	15.9
LYS265	NZ	DRGC	OAY	0.08	SER289	OG	DRGD	OAX	73.2
LYS265	NZ	DRGC	OAW	4.4	SER289	OG	DRGD	OAY	0.4
HIS266	NE2	DRGC	OAX	0.5	HIS323	NE2	DRGD	OAX	0.06
ARG288	NE	DRGC	OAX	0.02	HIS323	NE2	DRGD	OAY	0.5
ARG288	NE	DRGC	OAY	12	TYR327	OH	DRGD	OAX	0.02
ARG288	NE	DRGC	OAW	5.3	TYR327	OH	DRGD	OAY	0.8
ARG288	NH1	DRGC	OAX	0.02	HIS449	NE2	DRGD	OAX	11.8
ARG288	NH1	DRGC	OAY	0.8	HIS449	NE2	DRGD	OAY	25.3
ARG288	NH1	DRGC	OAW	9.8	LYS457	NZ	DRGD	OAW	0.02
ARG288	NH2	DRGC	OAX	0.1	HIS466	N	DRGD	OAW	0.7
ARG288	NH2	DRGC	OAY	1.5	GLN470	NE2	DRGD	OAW	0.1
ARG288	NH2	DRGC	OAW	1.6	TYR473	OH	DRGD	OAX	25
SER342	N	DRGC	OAX	8.7	TYR473	OH	DRGD	OAY	63.1
SER342	N	DRGC	OAY	72.8	TYR473	OH	DRGD	OAW	0.1
SER342	OG	DRGC	OAX	3.5	DRGD	OAW	GLN286	OE1	2.4
SER342	OG	DRGC	OAY	0.1	DRGD	OAW	SER289	OG	0.04
GLU343	N	DRGC	OAX	80.9	DRGD	OAW	LEU469	O	0.2
GLU343	N	DRGC	OAY	2.2	DRGD	OAW	GLN470	OE1	1.1
GLU343	N	DRGC	OAW	0.02					
DRGC	OAW	GLU291	OE1	56.2					
DRGC	OAW	GLU291	OE2	53.4					

Notas:

DRGC representa o LDT11 na RH3 do LBP e DRGD na RH12.

OAX e OAY são os oxigênios que compõe a carboxila, e OAW a hidroxila do LDT11.

Devido a dois padrões de RMSD da cabeça do ligante, assim como quando a RH12 foi ocupada sozinha, realizou-se análise do padrão de ligações de hidrogênio em ambos os tempos. Nos primeiros 5 ns a His449 e a Tyr473 apresentaram tempo muito superior aos dos demais resíduos, todavia, nos 45 ns restantes a Ser289 apresentou muito mais tempo de ligações de hidrogênio com o ligante e a His449 sofreu uma redução significativa, e a Tyr473 manteve-se constante, tabelas 8 e 9. A tabela 7 apresenta por sua vez o tempo de existência das ligações de hidrogênio durante todo o tempo da dinâmica. Tabela 8- Tempo de existência das ligações de hidrogênio na MD com LDT11 posicionado na RH3 e RH12 no tempo de 0 a 5 ns.

		RH3					RH12		
Doador		Aceptor		Tempo (%)	Doador		Aceptor		Tempo (%)
LYS265	NZ	DRGC	OAX	4.5	SER289	OG	DRGD	OAY	0.5
LYS265	NZ	DRGC	OAW	0.9	HIS323	NE2	DRGD	OAX	0.3
HIS266	NE2	DRGC	OAX	5.3	HIS323	NE2	DRGD	OAY	5.3
ARG288	NE	DRGC	OAY	3.9	TYR327	OH	DRGD	OAX	0.2
ARG288	NE	DRGC	OAW	1.5	HIS449	NE2	DRGD	OAX	69
ARG288	NH1	DRGC	OAY	4.5	HIS449	NE2	DRGD	OAY	28.1
ARG288	NH1	DRGC	OAW	38.5	HIS466	N	DRGD	OAW	5.1
ARG288	NH2	DRGC	OAY	0.2	TYR473	OH	DRGD	OAX	47.5
ARG288	NH2	DRGC	OAW	0.2	TYR473	OH	DRGD	OAY	57.6
SER342	N	DRGC	OAX	2.5	TYR473	OH	DRGD	OAW	0.2
SER342	N	DRGC	OAY	59.4	DRGD	OAW	LEU469	O	1.9
SER342	OG	DRGC	OAX	2.9	DRGD	OAW	GLN470	OE1	11.7
GLU343	N	DRGC	OAX	87.6					
GLU343	N	DRGC	OAY	8.5					
GLU343	N	DRGC	OAW	0.2					
DRGC	OAW	GLU291	OE1	35.1					
DRGC	OAW	GLU291	OE2	67					

Notas:

DRGC representa o LDT11 na RH3 do LBP e o DRGD na RH12.

OAX e OAY são os oxigênios que compõe a carboxila, e OAW a hidroxila do LDT11.

Tabela 9- Tempo de existência das ligações de hidrogênio na MD com LDT11 posicionado na RH3 e RH12 no tempo de 5 a 50 ns.

		RH3					RH12		
Doador		Aceptor		Tempo (%)	Doador		Aceptor		Tempo (%)
LYS265	NZ	DRGC	OAX	6.3	GLN286	NE2	DRGD	OAW	17.7
LYS265	NZ	DRGC	OAY	0.08	SER289	OG	DRGD	OAX	81.3
LYS265	NZ	DRGC	OAW	4.7	SER289	OG	DRGD	OAY	0.4
ARG288	NE	DRGC	OAX	0.02	HIS323	NE2	DRGD	OAX	0.02
ARG288	NE	DRGC	OAY	12.9	HIS323	NE2	DRGD	OAY	0.02
ARG288	NE	DRGC	OAW	5.7	TYR327	OH	DRGD	OAY	0.9
ARG288	NH1	DRGC	OAX	0.02	HIS449	NE2	DRGD	OAX	5.5
ARG288	NH1	DRGC	OAY	0.4	HIS449	NE2	DRGD	OAY	24.9
ARG288	NH1	DRGC	OAW	6.6	LYS457	NZ	DRGD	OAW	0.02
ARG288	NH2	DRGC	OAX	0.1	HIS466	N	DRGD	OAW	0.2
ARG288	NH2	DRGC	OAY	1.7	GLN470	NE2	DRGD	OAW	0.1
ARG288	NH2	DRGC	OAW	1.8	TYR473	OH	DRGD	OAX	22.5
SER342	N	DRGC	OAX	9.4	TYR473	OH	DRGD	OAY	63.7
SER342	N	DRGC	OAY	74.3	TYR473	OH	DRGD	OAW	0.1
SER342	OG	DRGC	OAX	3.5	DRGD	OAW	GLN286	OE1	2.7
SER342	OG	DRGC	OAY	0.1	DRGD	OAW	SER289	OG	0.04
GLU343	N	DRGC	OAX	80.1	DRGD	OAW	LEU469	O	0.04
GLU343	N	DRGC	OAY	1.5					
DRGC	OAW	GLU291	OE1	58.5					
DRGC	OAW	GLU291	OE2	51.9					

Notas:

DRGC representa o LDT11 na RH3 do LBP e a DRGD na RH12.

OAX e OAY são os oxigênios que compõe a carboxila, e OAW a hidroxila do LDT11.

Algumas figuras das interações em alguns tempos específicos podem ser observados na figura 46. Nos primeiros 5 ns as interações ocorrem com a His449 e

Tyr473 simultaneamente. Após isso, reduziu-se as interações com His449 e aumentou-se a quantidade de ligações com a Ser289 de forma bastante significativa.

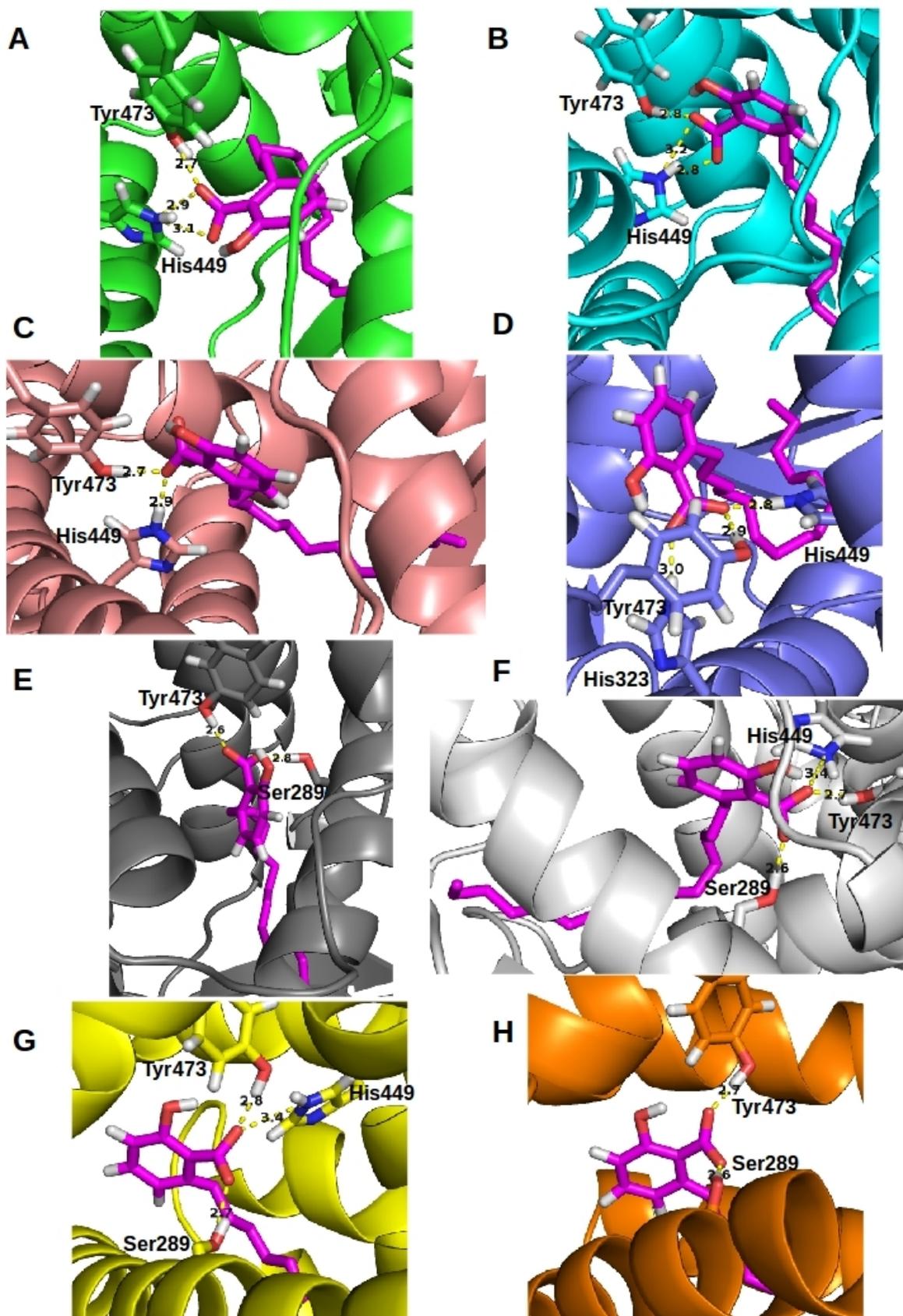


Figura 46- Interações entre o LDT11 e a PPAR γ durante a MD, com a RH3 e RH12 ocupadas, nos tempos de (A) 1 ns (B) 2 ns (C) 3 ns (D) 3,5 ns (E) 25 ns (F) 35 ns (G) 40

ns (H) 45 ns. As distâncias entre os átomos pesados (Å) das ligações de hidrogênio são mostrados em preto.

5.3. Expressão heteróloga e purificação da proteína

O domínio LBD proteína PPAR γ apresentou expressão nas variadas cepas de *E. coli*. Primeiramente, a BL21(DE3) apresentou expressão significativa seis horas após a indução com 1 mM de IPTG, neste experimento testou-se duas colônias transformadas tanto a 28°C quanto a 37°C, como pode ser observado na figura 47A. Esse mesmo padrão também foi observado nas cepas BL21(DE3) pLysE (figura 47B) e BL21(DE3C) pLysS (figura 47C), todavia as bandas nestas cepas se apresentaram menores que na primeira.

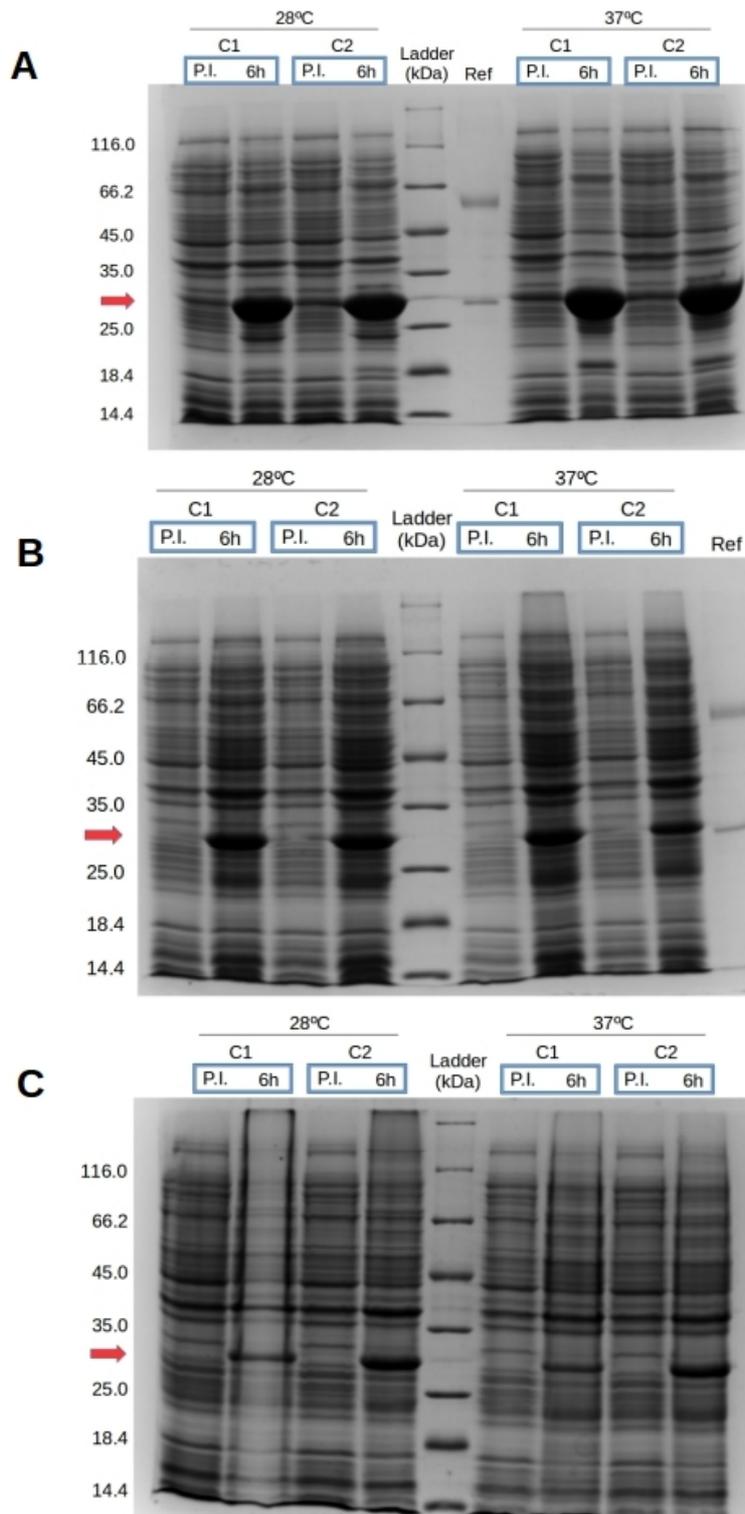


Figura 47- Gel SDS-PAGE 12% da expressão da PPAR γ (LBD) a 28°C e 37°C com a cepa (A) BL21(DE3) (B) BL21(DE3) pLysE e (C) BL21(DE3) pLysS. C1 e C2 referissem a duas colônias escolhidas na etapa da transformação. O P.I. está relacionado ao padrão de expressão da célula antes da indução com IPTG. O Ref são proteínas de tamanho

conhecido usados como padrão: albumina bovina (66 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). A seta vermelha indica a posição da banda da aproximada da proteína no gel (aproximadamente 30 kDa).

Após a confirmação da expressão foi realizado testes de solubilidade da proteína expressão nas diversas cepas. Observou-se que a grande maioria da proteína expressa nas três cepas a 37°C não estavam solúveis, estas se apresentaram em corpos de inclusão. Todavia, na expressão a 28°C observou-se no gel que uma parcela da expressão podia ser encontrada na forma solúvel, nessa temperatura a BL21(DE3) pLysS foi a que apresentou banda mais significativa nessa fração, as demais apresentaram bandas menores, essa diferença pode ser vista na figura 48.

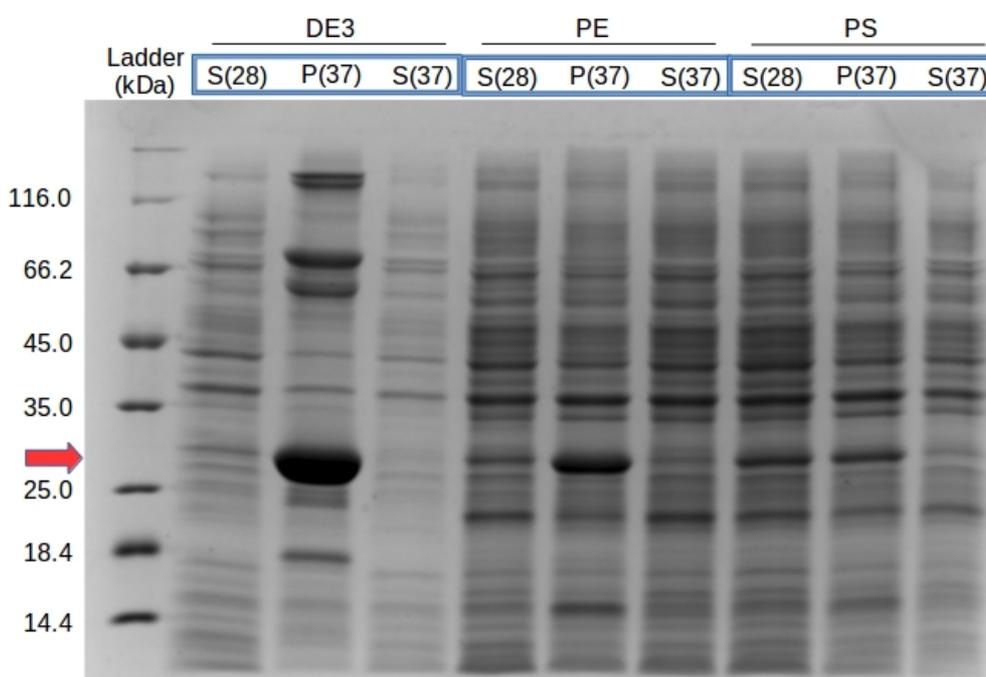


Figura 48- Gel SDS-PAGE 12% do teste de solubilidade da PPAR γ (LBD). DE3 referisse a cepa BL21(DE3), PE BL21(DE3) pLysE e PS BL21(DE3) pLysS. S28 indica o poço onde foi aplicada a fração solúvel a 28°C, P37 a insolúvel a 37°C e S37 a solúvel a 37°C. A seta vermelha indica a posição da banda da aproximada da proteína no gel (aproximadamente 30 kDa).

Tentando obter um maior padrão de expressão na fração solúvel das cepas BL21(DE3) e BL21(DE3) pLysE realizou-se expressão em temperaturas mais baixas, a 19°C e a 25°C. Além disso, variando a concentração de IPTG na temperatura mais baixa.

Todavia, a 19°C as bandas de expressão se mostraram muito delgadas ou até inexistentes e a variação da quantidade de IPTG nessa temperatura não se mostrou também eficiente na modulação da expressão, isso ocorreu para as duas cepas (figura 49).

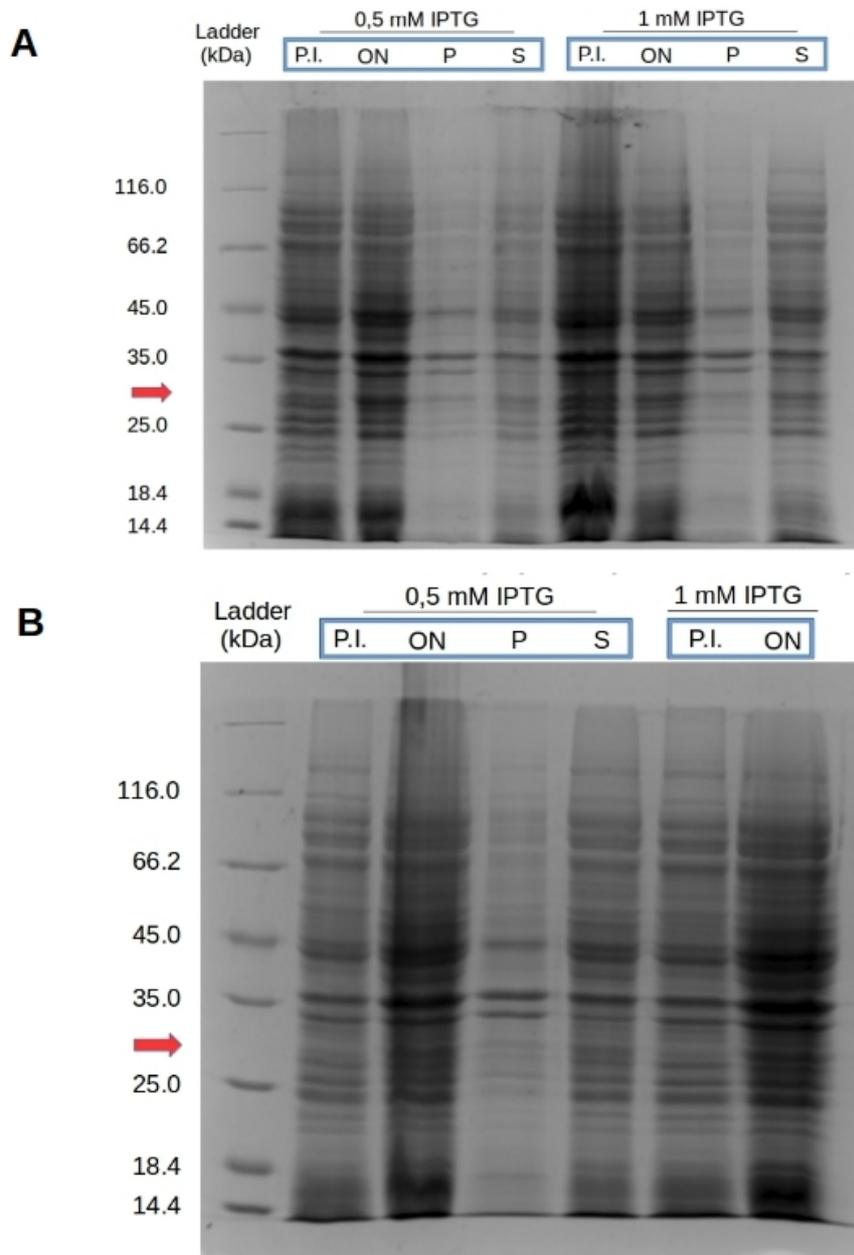


Figura 49- Gel SDS-PAGE 12% da expressão e teste de solubilidade da PPAR γ (LBD) a 19°C com a cepa (A) BL21(DE3) e a (B) BL21(DE3) pLysE. O P.I. esta relacionado ao padrão de expressão da célula antes da indução com IPTG e ON (*overnight*) 16 horas após a indução. O P referisse a fração insolúvel e o S a solúvel. A seta vermelha indica a posição da banda da aproximada da proteína no gel (aproximadamente 30kDa).

A 25°C, todavia, tanto para BL21(DE3) quanto para BL21(DE3) pLysE as bandas apresentadas na fração solúvel se mostraram maiores, esse padrão pode ser observado na figura 50.

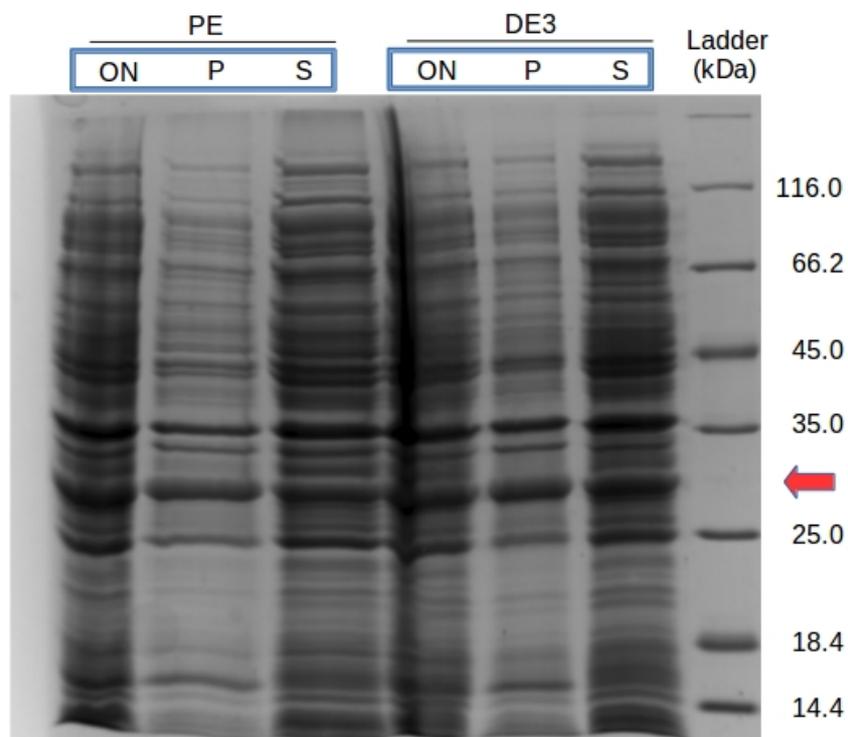


Figura 50- Gel SDS-PAGE 12% da expressão e teste de solubilidade da PPAR γ (LBD) com as cepas BL21(DE3), no gel indicada por DE3, e BL21(DE3) pLysE, PE, a 25°C. ON (*overnight*) esta relacionado ao padrão de expressão da célula 16 horas após a indução. O P referisse a fração insolúvel e o S a solúvel. A seta vermelha indica a posição da banda da aproximada da proteína no gel (aproximadamente 30 kDa).

Foi realizado um teste de purificação da expressão da BL21(DE3) pLysS a 28°C. A fração solúvel, após ficar armazenada a -2°C durante vinte e quatro horas, foi centrifugada e a fração apresentou uma significativa quantidade de proteína na fração insolúvel. O solúvel foi levado a cromatografia de afinidade metálica a níquel com objetivo de purificar proteínas com cauda de histidina. Quando a amostra foi injetada percebeu-se que uma parte da proteína heteróloga não se ligou à coluna, pois elas apareceram no gel juntamente com a fração não adsorvida. Além disso, um pouco da amostra apareceu no pellet da etapa de centrifugação antes da injeção na coluna. As amostras adsorvidas foram eluídas da coluna com uma lavagem contendo 250 mM de imidazol e não apareceram traços da proteína em lavagens anteriores. Mas na purificação foram observados três picos pequenos na mesma concentração de tampão de eluição, sendo

que todos pareceram apresentar a proteína heteróloga. O gel desta etapa pode ser visto na figura 51.

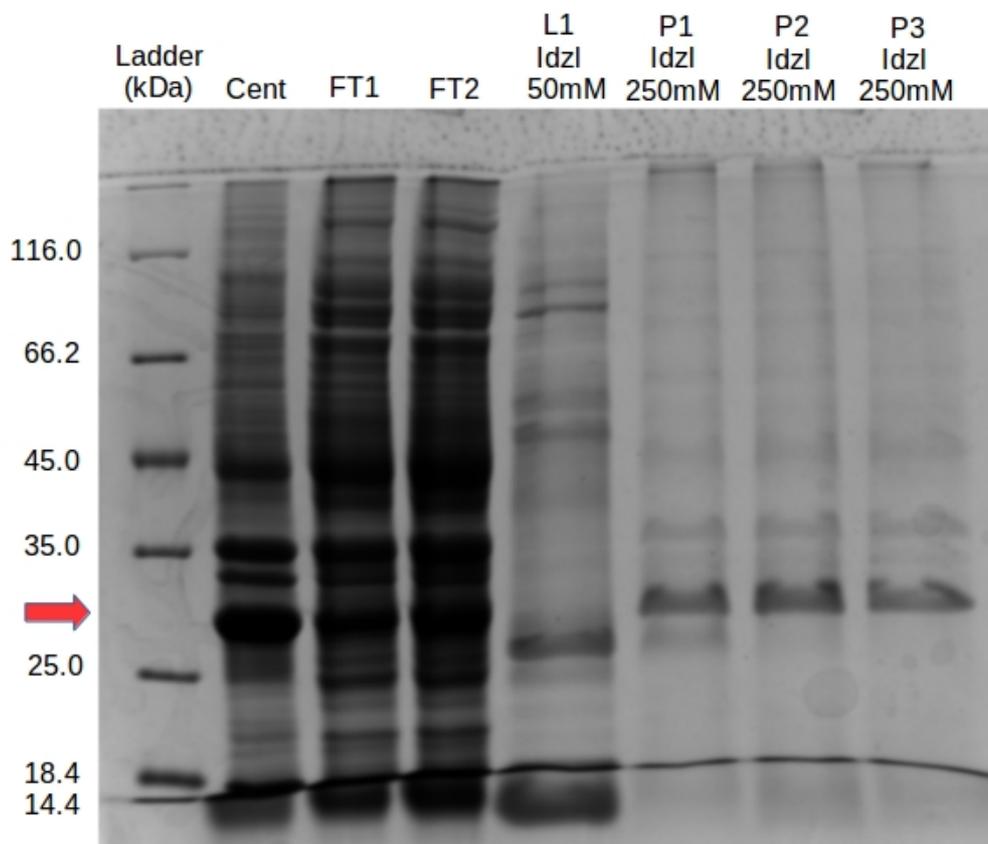


Figura 51- Purificação da PPAR γ (LBD). Cent se refere ao pellet formado após centrifugação antes da injeção na coluna. FT1 e FT2 indicam o *flow through* coletado em dois momentos. O L1 refere-se a primeira lavagem, onde foi passado na coluna tampão fosfato com 50 mM de imidazol. O P1, P2 e P3 representa os três picos coletados com a passagem de tampão fosfato com 250 mM de imidazol. A seta vermelha indica a posição da banda aproximada da proteína no gel (aproximadamente 30 kDa).

6. DISCUSSÃO

No *docking* pôde-se observar em geral a interação em três tipos de posições, duas na região RH3 (hélice 3 e fitas β), compreendendo alguns aminoácidos do braço dois e três da proteína, sendo uma com ligações de hidrogênio com a Arg288 e outra com a Arg280 (resíduo voltado para o exterior da proteína). A terceira posição é na RH12 no braço um, tendo como resíduos importantes para a interação, Ser289, His323, His449 e Tyr473. No *docking* rígido os ligantes LDT11, LDT13, LDT208, LDT380 e LDT383 apresentaram interação em todas estas três posições, o LDT15 não foi encontrado realizando interações polares com a Arg280, na segunda posição, e o LDT28, LDT29 e LDT30 não interagiram com a RH12.

A interação na região RH12 com a His323, His449 e Tyr473 é feita por moléculas consideradas agonistas totais, que diretamente estabilizam a H12, ocupando principalmente o braço um e parcialmente o dois e três, assim levando a grandes índices de transativação da PPAR γ (GARCIA-VALLVÉ *et al.*, 2015; NETTLES, 2008). Além disso, alguns agonistas parciais também interagem nessa região, mas o fazem de forma fraca, por meio de ligações de hidrogênio mais longas e com menos resíduos (KROKER; BRUNING, 2015). Ácidos graxos, por sua vez, também apresentam interação com os resíduos supracitados, além da Ser289, através do seu grupo carboxílico (ITOH *et al.*, 2008).

Entre os ligantes que foram testados o LDT15, 28, 29 e 208 não apresentam o grupo carboxila em sua composição, e no primeiro tipo de *docking* nem o LDT28 e nem 29 apresentaram interações na RH12. Este grupo funcional também se mostra importante para interação nessa região para outros ligantes, como o indeglitazar, um pan-agonista (interage com todas as PPAR, de modo parcial com PPAR γ , mas total com o PPAR α) (ARTIS *et al.*, 2009; CHESSARI; WOODHEAD, 2009), e o agonista total chamado S-(1) (MONTANARI *et al.*, 2008). Esses dados podem indicar esta parte da molécula como uma peça chave para a interação com a AF-2 do receptor.

A importância desse grupamento para a interação também foi corroborado na MD, pois este foi responsável pelos maiores tempos de ligação de hidrogênio entre LDT11 e o receptor. A carboxila interagiu neste experimento, na RH12, principalmente com os resíduos Ser289, His449 e Tyr473. A interação com estes resíduos é observada em ligantes tipo ácidos graxos como 9-HODE, este também apresenta contatos com a His323, o que também foi observado no presente ligante mas durante um tempo

insignificante da dinâmica. Outros ácidos graxos que também interagem com os resíduos supracitados são o 5-HEPA, 4-HDHA, 4-oxoDHA e 6-oxoOTE (nestes últimos casos interações com a Ser289 não foram observadas) (ITOH *et al.*, 2008).

O LDT11 apresenta uma interação um pouco diferenciada no docking rígido, não interagindo com a His449, todavia, apresenta interações com a Tyr327. Este resíduo juntamente com a His323, His449 e Tyr473 está relacionado a contatos com moléculas do tipo agonistas totais, por exemplo todos estes interagem com a rosiglitazona, e além disso, este é um dos resíduos que está em posição de interagir com a Tyr473 da H12 e auxiliar na estabilização da AF-2 (GUASCH *et al.*, 2012). Todavia, alguns agonistas parciais tem apresentado interação com a Tyr327, por exemplo, o indeglitazar e GSK1997132, ambos ligantes reduzem as ligações de hidrogênio que estabilizam a H12 (ARTIS *et al.*, 2009; SIME *et al.*, 2011). Estruturas de ácidos graxos oxidados, como o 5-HEPA e o 4-oxoDHA, também são vistos na literatura interagindo com este resíduo realizando ligações com o grupo hidroxila da Tyr327, sendo importante também para determinar a especificidade da interação ligante e receptor em mecanismos de ligação covalente de alguns ácidos graxos oxidados (ITOH *et al.*, 2008). Todavia, na MD, essa ligação entre o LDT11 e a Tyr327 ocorreu por um tempo bastante curto, o que indica que esta poderia não ser de grande relevância para a interação.

Quanto a estabilização da H12 foi observada algumas diferenças entre os valores de RMSD dos experimentos de MD. A proteína sem ligante no LBP rapidamente atingiu valores de 4 Å e se manteve constante até o final do experimento nesse patamar mais alto. Isso ocorreu conforme ao esperado, pois é observado na literatura que esta hélice apresenta maior mobilidade que o restante da proteína em proteínas sem ligante (KALLENBERGER *et al.*, 2003).

Os dois experimentos com um ligante só, na RH3 ou na RH12, mantiveram a H12 com uma movimentação menor até próximo dos 15 ns, após isso alcançaram os mesmos números da apo-PPAR γ . Em se tratando do experimento com o ligantes na RH3, apesar de não ocorrer interações diretas com a H12, alguns agonistas parciais realizam estabilizações parciais por contatos indiretos mediados por moléculas de água, por exemplo (DELFOSSÉ *et al.*, 2014). Sendo assim, esperava-se valores de RMSD menores de 4 Å para essa região devido a uma possível estabilização parcial, apesar de que alguns artigos mostram que certos agonistas parciais podem não estabilizar esta hélice (GARCIA-VALLVÉ *et al.*, 2015).

Todavia, a H12 com o LDT11 na região RH12 apresentar o mesmo comportamento

que o ligante na RH3 foi contrário ao que se supunha inicialmente, mesmo com dados mostrando que o movimento da H12 não é tão grande quanto era previsto pelo mecanismo de ratoeira, onde há um destacamento dessa hélice do corpo da proteína, e estruturas apo com o posicionamento da H12 similar ao da holo (UPPENBERG *et al.*, 1998), observa-se uma maior motilidade da hélice em questão na ausência de ligantes (BATISTA; MARTÍNEZ, 2013). Mas, um dos fatores que pode ajudar a entender esse comportamento é o fato do aumento do RMSD da H12 coincidir com a diminuição do RMSD da cabeça do ligante, onde observou-se menos tempo de ligações de hidrogênio com a Tyr473, que esta presente nessa hélice, ou seja, o aumento da motilidade da AF-2 poderia ter como um dos fatores uma diminuição das interações do LDT11 com os resíduos da H12.

Quando realizou-se a MD com duas moléculas do ligante interagindo nos dois sítios, o RMSD da H12 se manteve praticamente constante em um valor abaixo dos demais. Isso ocorreu conforme o esperado, pois a interação do LDT11 na RH12 deveria levar a uma estabilização de mesma, onde interações com agonistas deveriam reduzir a mobilidade da hélice (KALLENBERGER *et al.*, 2003). Neste caso, a variação do RMSD da cabeça do ligante não pareceu interferir no RMSD da H12, isso pode estar relacionado ao fato de não haver ocorrido diminuição no tempo de interação com a Tyr473 na AF-2. Outro fator a ser considerado é a presença do ligante na RH3 que deve ajudar a estabilizar a outra molécula na RH12. Mas, apesar dessa ideia ser intuitiva, não houve variações no RMSD do ligante total ao se comparar com a dinâmica do LDT11 na RH12, sozinho no LBP, ambos se mantiveram entre 0,15 e 0,2 nm, sendo que no início o ligante sozinho apresenta valores até mesmo menores. Outra possibilidade é que a presença do ligante em RH3 estabilize de forma indireta a H12 sem estabilizar o ligante presente em RH12.

A variação do RMSD da cabeça do ligante, onde se encontra os grupamentos polares da molécula, parece ter ocorrido por motivos diferentes. No experimentos com dois ligantes no LBP, nos primeiros 5 ns as interações com a Ser289 ocorreram em praticamente 0,6% do tempo, no momento em que houve o aumento do RMSD, que se manteve constante até o final do experimento, os contatos com o resíduo em questão aumentaram para mais de 81%, levando a uma redução de quase 60% com a His449. Sendo assim, a primeira posição (His449 e Tyr473) de interação parece deixar a cabeça do ligante mais estável, com menor RMSD.

No caso do LDT11 somente na RH12 a diminuição do contato com a Tyr473 e o aumento das ligações com His449 levam a uma diminuição do RMSD da cabeça do

ligante. Isso pode ocorrer pois o tempo de interação com os três resíduos, Ser289, His449 e Tyr473, simultaneamente, aumentou. Então, a soma das várias ligações de hidrogênio ao longo do tempo podem levar a uma motilidade menor dessa região do ligante.

Todavia, quanto as análises de RMSF não se observou alterações significativas nos diferentes tipos de dinâmica, até mesmo a H12 que apresentou diferenças nos valores de RMSD com e sem ligante não foi vista alteração nesta análise. Em geral é possível perceber um menor valor de flutuação das fitas β em comparação com as hélices 3 e 12. Além disso, os vales, menor valor de flutuação, entre os resíduos 385 a 390 (hélice 8) e 413 a 417 (hélice 9), estão localizados numa região que não compreende o LBP, empacotadas entre outras hélices (NOLTE *et al.*, 1998), o que explica a flutuação menor em todos os experimentos de dinâmica. Os picos, por sua vez, se encontram em torno dos resíduos 240, 272, 336 e 427, nos quais todos se encontram em região de loop, que apresentam maior flutuação do que as estruturas secundárias. Todavia, não se esperava um valor tão alto em torno da Ser273 nos experimentos com ligantes interagindo na RH3, pois estes deveriam diminuir a dinâmica dessa região, ou seja, estabilizar essa região (GARCIA-VALLVÉ *et al.*, 2015).

A região RH3, apresentou duas poses de *docking* principais. Na primeira os grupos polares na cabeça do ligante realizavam interações com a Arg288 e outros resíduos próximos, como a Glu291 e Glu343. Esta arginina tem sido vista como importante para os agonistas parciais, realizando interações eletrostáticas, hidrofóbicas ou de van der Waals com essas moléculas, por exemplo, agonistas como a amorfrutin 1 interagiram com a cadeia lateral através de pontes salinas (WEIDNER *et al.*, 2012), e em amorfrutin 2, uma rede de ligações de hidrogênio com moléculas de água media essa interação, além de contatos hidrofóbicos entre este ligante e átomos de carbono da cadeia lateral deste resíduo (GROOT, DE *et al.*, 2013). Além disso, as estruturas baseadas em indoles realizam interações hidrofóbicas e de van der Waals com esta arginina (KROKER; BRUNING, 2015). Quanto aos ácidos graxos, podemos citar o ácido mirístico, que apresenta uma cadeia longa, que realiza pontes salinas com a Arg288 (PUHL *et al.*, 2012).

Todos os ligantes do presente trabalho apresentaram interação nessa região, nos dois tipos de *docking* realizados, sendo esta região ligada a moléculas com agonismo parcial indicando assim que os ligantes em questão poderiam atuar como agonistas parciais de PPAR γ . Especificamente, nos experimentos com docking flexível, dos 9 ligantes testados em duplicata com o sítio vazio ou com RH12 ocupado, apenas 7 casos

se ligaram em regiões distintas de RH3, enquanto 29 foram observadas em RH3.

Essa ideia é corroborada pelos experimentos de MD onde as ligações de hidrogênio com a Arg288 foram mantidas durante longos tempos. No caso do ligante sozinho na RH3 durante todo o tempo da dinâmica e juntamente com a outra molécula na RH12 durante mais de 30%.

Outros resíduos deste sítio também apresentaram longos tempos de duração em se tratando de ligações de hidrogênio, como exemplo podemos citar o Glu291 e o Glu343. Ambos tem sido mostrados como resíduos de grande significância para a interação nessa região (NETTLES, 2008). Além disso, a interação da carboxila da cadeia lateral do Glu291 com a hidroxila do LDT11 pode ter sido importante para os valores menores de RMSD da cabeça desse ligante em comparação aos que estavam localizados na RH12, pois nestes, esse grupamento apresentou pouco tempo de interação.

Na segunda pose a cabeça com os grupos polares do ligante interagem com a Arg280 (H3), este resíduo se encontra na parte externa, ou com o Glu259 (H2'), presente no braço dois, todavia a cauda faz interações hidrofóbicas principalmente no braço dois. O composto 23, derivado de Cercosporamides, um agonista parcial realiza interações eletrostáticas com a Arg280 (FURUKAWA *et al.*, 2010; KROKER; BRUNING, 2015). Quanto a Glu259, outros agonistas parciais (nTZDpa e BVT.13) que fazem interações bem profundas no braço dois apresentam contatos hidrofóbicos nessas regiões, inclusive com a Arg280 (BRUNING *et al.*, 2007). Todavia, apesar de somente o LDT15 não ter feito interação nessa região no *docking* rígido, quando se permitiu que algumas das cadeias laterais no LBP se tornassem flexíveis somente o LDT29 e o 380 ainda realizaram interações polares nessas regiões, adicionando-se o fato destas poses não serem comuns entre agonistas de PPAR γ , sendo assim parece indicar que essas são posições possíveis mas não as mais energeticamente favoráveis para a maioria dos ligantes. Isso também pode ser visto pela média das afinidades dos ligantes quando interagem nessa região no *docking* rígido, em torno de 6.28 (somente o LDT15 dentre os valores usados para calcular essa média não apresentou contatos nessa posição), bem inferior as demais médias, onde não haviam casos de contatos nessa região.

As caudas hidrofóbicas das moléculas interagindo na RH3 são de extrema importância. Interações hidrofóbicas no braço dois são de grande importância devido a estabilização das fitas β e de regiões da H3. Temos como exemplo o SR2067, esta molécula apresenta um grupo naftaleno que interage por meio de contatos hidrofóbicos e de van der Waals com a cadeia lateral de alguns resíduos como Ile341 e Met348, nas fitas

β , e a Ile281 e Cys285, na H3 (MARREWIJK, VAN *et al.*, 2016). Outro agonista parcial é o SPPAR γ M2, esta molécula faz ligações de hidrogênio com a amina da cadeia principal da Ser342, além de interações hidrofóbicas com Arg288, Leu330, Leu333, Ile341, entre outras (EINSTEIN *et al.*, 2008). Os MCFA realizaram importantes interações hidrofóbicas, duas moléculas simultaneamente apresentavam contatos com Cys285, Ile296, Met329, Leu330, Ile341, e além de interações entre seu grupo carboxílico e a Arg288. Esses contatos se mostraram presentes em todos os ligantes, mostrando que essas caudas lipofílicas poderiam ajudar na estabilização das fitas β e de regiões da H3 (LIBERATO *et al.*, 2012).

Isto parece estar sendo corroborado pelos experimentos de MD, onde ligações de hidrogênio com a Ser342 estavam presentes em mais de 50% do tempo nos experimentos com o ligante na RH3. Esta poderia estar relacionada a inibição da fosforilação da Ser273 e/ou interação com diferentes coreguladores por uma superfície de contato diferenciada (KLEIN *et al.*, 2005; LIBERATO *et al.*, 2012). Todavia as análises de RMSD dessas regiões durante as diversas dinâmicas não mostraram diferenças significativas na mobilidade das fitas β e apresentaram uma movimentação maior da H3 quando interagindo com o LDT11 na RH3, o que ocorreu de forma não esperada. Mas os valores foram mais baixos quando os dois ligantes estavam presentes.

Outro fato importante de ser analisado são algumas posições encontradas em alguns *docking* flexíveis que se mostram inesperadas. Primeiramente, o LDT29 e 208 apresentaram posições onde os grupos polares apresentavam interação com a Arg288, mas a cauda se voltava para dentro do braço um. Apesar de existirem resíduos hidrofóbicos naquela região, como: Phe282, Ile326, Phe363, Leu453 e Leu469, essa não parece ser a pose mais termodinamicamente favorável, devido ao braço dois apresentar-se altamente hidrofóbico. Além disso, essa pose poderia ter sérias implicações para o recrutamento dos coreguladores devido a não estabilização das fitas β e da H12.

Outra posição que deve ser discutida foi observada nos ligantes LDT13, 208, 380 e 383, onde a cauda lipofílica se voltava para regiões mais profundas do braço um, em vez de se direcionar para entrada ou braço dois, realizando contatos hidrofóbicos com a Leu453 e Leu465, e se dirigindo ao exterior por um espaço entre a H12 e o corpo da proteína. Podemos ver na literatura que os MCFA, com uma cauda de nove carbonos, e os DA, dez carbonos, se posicionaram dentro deste braço em um estreito bolso localizado entre a H3 e H7, interagindo com a Ile281, Phe282, Leu353, Phe363, Met364 e Leu453. Diferentemente, os ligantes do presente trabalho adotaram uma conformação onde as

caudas não se dirigiam para esse bolso e sim para o lado externo. Essa posição também parece não favorável, podendo ter ocorrido devido ao tipo de *docking* que não considera as moléculas do solvente. Além disso, foi levantado pelos autores dos artigos que ácidos graxos maiores possivelmente seriam incapazes de adotar essa conformação devido ao tamanho do bolso, sendo assim, como os ligantes em questão apresentam caudas com quinze carbonos esta não parece uma pose ideal (LIBERATO *et al.*, 2012; MALAPAKA *et al.*, 2012). DM com estes ligantes e envolvendo moléculas de água podem trazer novas informações sobre estes posicionamentos não esperados.

Colaboradores realizaram diversos experimentos *in vitro* com objetivo de observar a ação dos ligantes aqui estudados em células de tumor de mama (MCF-7 e MDA MB-231). O LDT11, 13, 380 e 383 apresentaram diversos resultados positivos como: redução da viabilidade celular e proliferação, aumento da apoptose e fragmentação nuclear, redução da migração celular, entre outros resultados. Todavia, os demais ligantes não apresentaram esses bons resultados (SAMPAIO, 2015).

Entretanto, nos resultados obtidos no presente trabalho, observa-se que todas as moléculas, nos dois tipos de *docking*, conseguiram interagir em ambas as regiões, RH3 e RH12, dessa forma, inicialmente, parece que os resultados aqui não corroboram os obtidos *in vitro*. Mas, uma possibilidade é que os ligantes que atuaram eficazmente sejam agonistas de PPAR γ e consigam estabilizar a H12 melhor que os demais que não apresentaram resultados positivos. Essa melhor estabilização pode estar relacionada com o número de ligações de hidrogênio com a RH12, o que poderia deixar o ligante mais estável na região e em consequência estabilizar mais fortemente a AF-2. O LDT11 apresentou cinco interações com quatro resíduos diferentes no *docking* rígido, o LDT13 quatro com quatro resíduos, o LDT380 quatro com três resíduos e o LDT383 cinco com cinco resíduos. As moléculas que não apresentaram resultados significativos, por sua vez, obtiveram só seguintes números: LDT15 três com três resíduos, o LDT28 uma com um resíduo, o LDT29 duas com dois resíduos e o LDT30 três com dois resíduos. Somente o LDT208 que não se enquadra na referida hipótese, realizando quatro interações com quatro resíduos. Todavia, essa ideia necessita de estudos mais aprofundados.

Ainda sobre as ligações a região RH12, os ligantes apresentaram diversas interações com resíduos dessa região, os mesmos realizados por ligantes do tipo agonista total, sendo assim porque esta poderia apresentar agonismo parcial? Na literatura podemos observar, através de experimentos de HDX, que ácidos graxos, como o DA, não apresentou as mesmas capacidades de agonistas totais, como a rosiglitazona,

de estabilizar a H12 (MALAPAKA *et al.*, 2012). Além disso, MCFA apresentaram menor capacidade de induzir a transcrição do que a rosiglitazona, todavia a mesma capacidade de inibir a fosforilação por cdk5 (LIBERATO *et al.*, 2012). Um dos motivos para isso pode ser a distância e angulação das ligações de hidrogênio, um agonista total de PPAR γ , como a rosiglitazona, apresenta distâncias de 2,6 Å com a Tyr473, 2,7 Å com a His449 e 2,9 Å com a His323 (KROKER; BRUNING, 2015), entretanto os ligantes como a LDT13 apresentam distâncias de 3,0 Å, 3,0 Å e 3,1 Å para os mesmos resíduos, respectivamente. Os demais ligantes que apresentaram bons resultados nos testes *in vitro* apresentaram o mesmo padrão, somente o LDT11, que apesar de interagir mais próximo da Tyr473, apresenta interações mais distantes com os demais resíduos. As interações de Van der Waals devem poder possuir grande importância na definição mais precisa do grau de ativação da PPAR γ . As sutilezas do nível de ação desta proteína parecem ser definidos com pequenas variações que podem ser originadas nas baixas energias de interação presentes naquelas classificadas como Van der Waals.

Em relação a expressão heteróloga do domínio LBD da PPAR γ , observou-se que em todas as cepas de *E. coli* testadas na otimização da expressão da presente proteína nenhuma expressou a proteína solúvel em grandes quantidades na temperatura de 37°C. Todavia, observa-se casos da expressão dessa proteína nessa temperatura, mas utilizando-se 0,2 mM de IPTG e a proteína foi expressa por somente três horas (KLEIN *et al.*, 2005).

Esse problema ocorre devido ao dobramento incorreto de proteínas heterólogas, este erro conduz a interações entre essas proteínas em regiões expostas formando um agregado insolúvel, também chamado de corpo de inclusão. Temperaturas menores apresentam a formação de corpos de inclusão de tamanhos menores, que se solubilizam mais facilmente, menos estáveis, ou seja, a temperatura esta diretamente relacionada com a formação de corpos de inclusão (GROOT, DE; VENTURA, 2006). Além disso, uma rápida produção proteica pode exceder a capacidade celular de dobrar a proteína corretamente (HOFFMANN *et al.*, 2004).

Sendo assim, é observável nos resultados do presente trabalho que temperaturas maiores conduziam a expressões mais significativas da proteína, mas também um maior número de proteínas insolúveis. Reduções de temperatura, de 37° para 28°C em algumas cepas e 25°C em outras, pareceram aumentar significativamente o nível de proteína solúvel. Todavia, expressões a 19°C não apresentaram quantidade significativa de proteína, o que parece ir de encontro ao observado na literatura, onde a PPAR γ é

expressa nessas condições (PUHL *et al.*, 2012).

Quanto ao uso de diferentes concentrações de IPTG, menores concentrações deste composto tem sido relacionadas a formação de corpos de inclusão com tamanhos menores (SRIUBOLMAS *et al.*, 1997). No presente trabalho a redução das concentrações de IPTG não pareceram apresentar o efeito desejado, todavia é necessário concluir a otimização da expressão também em temperaturas maiores, pois como visto anteriormente (KLEIN *et al.*, 2005) a redução nas quantidades de IPTG e tempo de expressão apresentaram produção de PPAR γ solúvel.

Em se tratando da purificação desta proteína, esta já é bastante detalhada na literatura, dessa forma esperava-se que a PPAR γ fosse eluída até 300 mM de imidazol (PUHL *et al.*, 2012), e como previsto esta apresentou pico de concentração de proteína na lavagem de 250 mM, mas em vez de um três picos foram observados. Todavia, uma porcentagem significativa da proteína também não se ligou a coluna, saindo na porção não adsorvida. Apesar disso, foi observado uma banda no tamanho esperado da proteína no gel SDS-PAGE 12% nas colunas referentes aos três picos, o que indica a purificação da proteína em questão, mas em relação ao múltiplos picos não foram encontradas na literatura resultados semelhantes. Todavia, é necessária a otimização dessa etapa e realização de testes de purificação dessa proteína.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho conclui que todos os ligantes em questão parecem se apresentar como agonistas parciais de PPAR γ , estabilizando regiões da H3 e das fitas β , sendo esta possivelmente a posição preferencial de interação dessas moléculas derivadas de ácido anacárdico. Todos também parecem apresentar a capacidade de interagirem no braço um da LBD, todavia os ligantes LDT11, 13, 208, 380 e 383, em alguns experimentos de *docking*, mostraram a capacidade de formar maior número de ligações de hidrogênio nessa região, o que pode indicar uma capacidade maior de estabilizá-la. Isto pode auxiliar no entendimento dos melhores resultados dos testes *in vitro* de alguns desses ligantes. Além disso, a maior distância entre as ligações de hidrogênio dos ligantes em questão em comparação com moléculas agonistas totais (KROKER; BRUNING, 2015) podem indicar uma menor estabilização da H12, o que pode levar ao pensamento de que essas moléculas seriam agonistas parciais com menor capacidade de transativação e, em consequência, menor expressão dos genes alvos.

As análises do RMSD nos experimentos de MD indicaram que a interação do LDT11 na RH12, com a Tyr473 em especial, mas auxiliados por contatos com Ser289 e His449, parece conduzir a estabilização dessa hélice, o que pode levar a um aumento da interação com coativadores e consequentemente a transativação dos genes alvo. Por essa mesma análise aplicada ao ligante LDT11, observa-se uma mobilidade menor da cabeça polar (anel benzênico, mais hidroxila e carboxila), possivelmente devido ao número de ligações de hidrogênio realizadas, e significativamente maior da cauda hidrofóbica com quinze carbonos. Além disso, as ligações de hidrogênio durante um longo período de tempo com importantes resíduos do braço dois como a Ser342 e contatos hidrofóbicos como a Ile341, indicam que estes ligantes podem estar relacionados com estabilização das fitas β e possível inibição da fosforilação da Ser273.

A região LBD da PPAR γ foi expressa em grande porcentagem solúvel nas cepas de *E. coli* BL21 (DE3) e BL21 (DE3) pLysE a 25°C e na BL21 (DE3) pLysS a 28°C. Quanto a purificação, a proteína foi eluída a 250 mM de imidazol após diversas lavagens.

Todavia, são necessários mais experimentos que corroborem muitos dos dados levantados no presente trabalho.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Realizar um experimento de dinâmica molecular com o tempo maior (200 ns) da apo-estrutura, com o objetivo de selecionar diferentes conformações da proteína em diferentes tempos. Essas serão utilizadas como alvos em novas análises de *docking* com maior número de repetições, usando os variados ligantes, para obtenção de poses estatisticamente mais fundamentadas.
2. Parametrização de ligantes para aumento da confiabilidade dos resultados de MD e aumento do tempo do experimento.
3. Otimização da expressão do domínio LBD da PPAR γ , testando a expressão da região LBD da PPAR γ em diferentes temperaturas (19°C, 25°C, 28°C e 37°C), concentrações de IPTG (0.2 mM, 0.5 mM e 1.0 mM), tempo de expressão (3 h, 6 h e 16 h) e outras cepas de *E. coli* (Lemo21 e Rosetta).
4. Co-cristalização da proteína em interação com os derivados do ácido anacárdico conforme metodologia anteriormente descrita (HEPES 100 mM, pH 7.0 e citrato de sódio 1.3 M) (PUHL *et al.*, 2012). Seguidamente, difração dos cristais e resolução da estrutura tridimensional por substituição molecular (MR).

9. REFERÊNCIAS

AGOSTINI, M. *et al.* Tyrosine agonists reverse the molecular defects associated with dominant-negative mutations in human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. PMID: 14657011: **Endocrinology**, abr. 2004. v. 145, n. 4, p. 1527–1538.

AGRAWAL, R.; JAIN, P.; DIKSHIT, S. N. Balaglitazone: a second generation peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma (γ) agonist. PMID: 22372600: **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, fev. 2012. v. 12, n. 2, p. 87–97.

AHMADIAN, M. *et al.* PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. **Nature Medicine**, 7 maio. 2013. v. 99, n. 5, p. 557–566.

ARTIS, D. R. *et al.* Scaffold-based discovery of indeglitazar, a PPAR pan-active anti-diabetic agent. PMID: 19116277PMCID: PMC2629228: **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 6 jan. 2009. v. 106, n. 1, p. 262–267.

AZHAR, S. Peroxisome proliferator-activated receptors, metabolic syndrome and cardiovascular disease. PMID: 20932114PMCID: PMC3246744: **Future Cardiology**, set. 2010. v. 6, n. 5, p. 657–691.

BARRAJÓN-CATALÁN, E. *et al.* Molecular promiscuity of plant polyphenols in the management of age-related diseases: far beyond their antioxidant properties. PMID: 25038998: **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 2014. v. 824, p. 141–159.

BARROSO, I. *et al.* Dominant negative mutations in human PPAR γ associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. **Nature**, 23 dez. 1999. v. 402, n. 6764, p. 880–883.

BATISTA, M. R. B.; MARTÍNEZ, L. Dynamics of Nuclear Receptor Helix-12 Switch of Transcription Activation by Modeling Time-Resolved Fluorescence Anisotropy Decays. PMID: 24094408PMCID: PMC3791304: **Biophysical Journal**, 1 out. 2013. v. 105, n. 7, p. 1670–1680.

BERGER, J. P. *et al.* Distinct properties and advantages of a novel peroxisome proliferator-activated protein [gamma] selective modulator. PMID: 12554792: **Molecular**

Endocrinology (Baltimore, Md.), abr. 2003. v. 17, n. 4, p. 662–676.

BRAMLETT, K. S.; WU, Y.; BURRIS, T. P. Ligands specify coactivator nuclear receptor (NR) box affinity for estrogen receptor subtypes. PMID: 11376110: **Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)**, jun. 2001. v. 15, n. 6, p. 909–922.

BRUNING, J. B. *et al.* Partial Agonists Activate PPAR γ Using a Helix 12 Independent Mechanism. **Structure**, out. 2007. v. 15, n. 10, p. 1258–1271.

BURNS, K. A.; VANDEN HEUVEL, J. P. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. PMID: 17560826PMCID: PMC2712836: **Biochimica Et Biophysica Acta**, ago. 2007. v. 1771, n. 8, p. 952–960.

CAMP, H. S.; TAFURI, S. R. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. PMID: 9099735: **The Journal of Biological Chemistry**, 18 abr. 1997. v. 272, n. 16, p. 10811–10816.

CASIMIRO-GARCIA, A. *et al.* Design, synthesis, and evaluation of imidazo[4,5-c]pyridin-4-one derivatives with dual activity at angiotensin II type 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor- γ . PMID: 23265881: **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 1 fev. 2013. v. 23, n. 3, p. 767–772.

CHEN, Y.; JIMENEZ, A. R.; MEDH, J. D. Identification and regulation of novel PPAR- γ splice variants in human THP-1 macrophages. PMID: 16542739PMCID: PMC2765245: **Biochimica et biophysica acta**, 2006. v. 1759, n. 1-2, p. 32–43.

CHESSARI, G.; WOODHEAD, A. J. From fragment to clinical candidate—a historical perspective. **Drug Discovery Today**, jul. 2009. v. 14, n. 13-14, p. 668–675.

CHOI, J. H. *et al.* Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR γ by Cdk5. PMID: 20651683PMCID: PMC2987584: **Nature**, 22 jul. 2010. v. 466, n. 7305, p. 451–456.

CHOI, J. H. *et al.* Antidiabetic actions of a non-agonist PPAR γ ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. PMID: 21892191PMCID: PMC3179551: **Nature**, 22 set. 2011. v. 477, n. 7365, p. 477–481.

CORZO, C.; GRIFFIN, P. R. Targeting the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ to

Counter the Inflammatory Milieu in Obesity. PMID: 24404510PMCID: PMC3881323: **Diabetes & Metabolism Journal**, dez. 2013. v. 37, n. 6, p. 395–403.

DANIEL, A. R.; FAIVRE, E. J.; LANGE, C. A. Phosphorylation-dependent antagonism of sumoylation derepresses progesterone receptor action in breast cancer cells. PMID: 17717077: **Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)**, dez. 2007. v. 21, n. 12, p. 2890–2906.

DELFOSSÉ, V. *et al.* A structural perspective on nuclear receptors as targets of environmental compounds. PMID: 25500867PMCID: PMC4571321: **Acta Pharmacologica Sinica**, 15 dez. 2014.

EINSTEIN, M. *et al.* The differential interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands with Tyr473 is a physical basis for their unique biological activities. PMID: 17940191: **Molecular Pharmacology**, jan. 2008. v. 73, n. 1, p. 62–74.

ELBRECHT, A. *et al.* L-764406 is a partial agonist of human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. The role of Cys313 in ligand binding. PMID: 10075686: **The Journal of Biological Chemistry**, 19 mar. 1999. v. 274, n. 12, p. 7913–7922.

ENCINAR, J. A. *et al.* In silico approach for the discovery of new PPARγ modulators among plant-derived polyphenols. **Drug Design, Development and Therapy**, nov. 2015. p. 5877.

FAJAS, L. *et al.* The Organization, Promoter Analysis, and Expression of the Human PPAR Gene. **Journal of Biological Chemistry**, 25 jul. 1997. v. 272, n. 30, p. 18779–18789.

FLOYD, Z. E.; STEPHENS, J. M. Controlling a master switch of adipocyte development and insulin sensitivity: Covalent modifications of PPAR γ . **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, jul. 2012. v. 1822, n. 7, p. 1090–1095.

FUJIMURA, T. *et al.* FK614, a Novel Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Modulator, Induces Differential Transactivation Through a Unique Ligand-Specific Interaction With Transcriptional Coactivators. **Journal of Pharmacological Sciences**, 2005. v. 99, n. 4, p. 342–352.

FURUKAWA, A. *et al.* Discovery of a novel selective PPAR γ modulator from (-)-

Cercosporamide derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 1 abr. 2010. v. 20, n. 7, p. 2095–2098.

GAMPE, R. T. *et al.* Asymmetry in the PPAR γ /RXR α crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. PMID: 10882139: **Molecular Cell**, mar. 2000. v. 5, n. 3, p. 545–555.

GARCIA-VALLVÉ, S. *et al.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) and Ligand Choreography: Newcomers Take the Stage. PMID: 25734377: **Journal of Medicinal Chemistry**, 23 jul. 2015. v. 58, n. 14, p. 5381–5394.

GIAGINIS, C.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A.; THEOCHARIS, S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Ligands: Potential Pharmacological Agents for Targeting the Angiogenesis Signaling Cascade in Cancer. PMID: 18464916PMCID: PMC2366048: **PPAR Research**, 2008. v. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2366048/>>. Acesso em: 7 jan. 2016.

GIANNÌ, M. *et al.* Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR γ degradation and transactivation. PMID: 12110588PMCID: PMC126119: **The EMBO Journal**, 15 jul. 2002. v. 21, n. 14, p. 3760–3769.

GROMMES, C. *et al.* The nonthiazolidinedione tyrosine-based peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand GW7845 induces apoptosis and limits migration and invasion of rat and human glioma cells. PMID: 15665144: **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, maio. 2005. v. 313, n. 2, p. 806–813.

GROOT, J. C. DE *et al.* Structural characterization of amorfrutins bound to the peroxisome proliferator-activated receptor γ . PMID: 23286787: **Journal of Medicinal Chemistry**, 28 fev. 2013. v. 56, n. 4, p. 1535–1543.

GROOT, N. S. DE; VENTURA, S. Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. **FEBS Letters**, 27 nov. 2006. v. 580, n. 27, p. 6471–6476.

GUASCH, L. *et al.* Identification of PPAR γ Partial Agonists of Natural Origin (I): Development of a Virtual Screening Procedure and In Vitro Validation. **PLoS ONE**, 30 nov. 2012. v. 7, n. 11, p. e50816.

GUREVICH, I.; FLORES, A. M.; ANESKIEVICH, B. J. Corepressors of Agonist-Bound Nuclear Receptors. PMID: 17628626PMCID: PMC2148130: **Toxicology and applied pharmacology**, 15 set. 2007. v. 223, n. 3, p. 288–298.

HAN, L. *et al.* SIRT1 is regulated by a PPAR $\{\gamma\}$ -SIRT1 negative feedback loop associated with senescence. PMID: 20660480PMCID: PMC2995042: **Nucleic Acids Research**, nov. 2010. v. 38, n. 21, p. 7458–7471.

HASHIMOTO, Y.; MIYACHI, H. Nuclear receptor antagonists designed based on the helix-folding inhibition hypothesis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, set. 2005. v. 13, n. 17, p. 5080–5093.

HA, T. J.; KUBO, I. Lipoygenase inhibitory activity of anacardic acids. PMID: 15913294: **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1 jun. 2005. v. 53, n. 11, p. 4350–4354.

HEMSHEKHAR, M. *et al.* Emerging Roles of Anacardic Acid and Its Derivatives: A Pharmacological Overview. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 1 fev. 2012. v. 110, n. 2, p. 122–132.

HENRIQUES, E. S.; SOLOV'YOV, A. V. A rational method for probing macromolecules dissociation: the antibody-hapten system. **The European Physical Journal D**, 23 jan. 2008. v. 46, n. 3, p. 471–481.

HIETAKANGAS, V. *et al.* PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. PMID: 16371476PMCID: PMC1324973: **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 3 jan. 2006. v. 103, n. 1, p. 45–50.

HOFFMANN, F. *et al.* Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale. **Enzyme and Microbial Technology**, 1 mar. 2004. v. 34, n. 3–4, p. 235–241.

ITOH, T. *et al.* Structural basis for the activation of PPAR γ by oxidized fatty acids. PMID: 19172745PMCID: PMC2939985: **Nature Structural & Molecular Biology**, set. 2008. v. 15, n. 9, p. 924–931.

Jl, S. *et al.* O-GlcNAc modification of PPAR γ reduces its transcriptional activity. PMID:

22226965: **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 27 jan. 2012. v. 417, n. 4, p. 1158–1163.

KALLENBERGER, B. C. *et al.* A dynamic mechanism of nuclear receptor activation and its perturbation in a human disease. PMID: 12536206: **Nature Structural Biology**, fev. 2003. v. 10, n. 2, p. 136–140.

KLEIN, F. A. C. *et al.* Biochemical and NMR mapping of the interface between CREB-binding protein and ligand binding domains of nuclear receptor: beyond the LXXLL motif. PMID: 15542861: **The Journal of Biological Chemistry**, 18 fev. 2005. v. 280, n. 7, p. 5682–5692.

KLINGE, C. M. *et al.* Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors alpha and beta by coactivators and corepressors. PMID: 15525597: **Journal of Molecular Endocrinology**, out. 2004. v. 33, n. 2, p. 387–410.

KOFFARNUS, R. L.; WARGO, K. A.; PHILLIPPE, H. M. Rivoglitazone: a new thiazolidinedione for the treatment of type 2 diabetes mellitus. PMID: 23632280: **The Annals of Pharmacotherapy**, jun. 2013. v. 47, n. 6, p. 877–885.

KROKER, A. J.; BRUNING, J. B. Review of the Structural and Dynamic Mechanisms of PPAR γ Partial Agonism. PMID: 26435709PMCID: PMC4578752: **PPAR research**, 2015. v. 2015, p. 816856.

LAGHEZZA, A. *et al.* New 2-(Aryloxy)-3-phenylpropanoic Acids as Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α/γ Dual Agonists Able To Upregulate Mitochondrial Carnitine Shuttle System Gene Expression. **Journal of Medicinal Chemistry**, 10 jan. 2013. v. 56, n. 1, p. 60–72.

LEMKUL, J. A.; ALLEN, W. J.; BEVAN, D. R. Practical Considerations for Building GROMOS-Compatible Small-Molecule Topologies. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 27 dez. 2010. v. 50, n. 12, p. 2221–2235.

LI, A. *et al.* Prediction of Nepsilon-acetylation on internal lysines implemented in Bayesian Discriminant Method. PMID: 17045240PMCID: PMC2093955: **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1 dez. 2006. v. 350, n. 4, p. 818–824.

LIBERATO, M. V. *et al.* Medium chain fatty acids are selective peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) γ activators and pan-PPAR partial agonists. PMID: 22649490PMCID: PMC3359336: **PloS One**, 2012. v. 7, n. 5, p. e36297.

LI, Y. *et al.* Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR γ . PMID: 18604218PMCID: PMC2538624: **Nature structural & molecular biology**, ago. 2008. v. 15, n. 8, p. 865–867.

LO, J. C. *et al.* Adipsin is an adipokine that improves β cell function in diabetes. PMID: 24995977PMCID: PMC4128197: **Cell**, 3 jul. 2014. v. 158, n. 1, p. 41–53.

MALAPAKA, R. R. V. *et al.* Identification and mechanism of 10-carbon fatty acid as modulating ligand of peroxisome proliferator-activated receptors. PMID: 22039047PMCID: PMC3249069: **The Journal of Biological Chemistry**, 2 jan. 2012. v. 287, n. 1, p. 183–195.

MARCIANO, D. P. *et al.* Identification of Bexarotene as a PPAR Antagonist with HDX, Identification of Bexarotene as a PPAR Antagonist with HDX. **PPAR Research, PPAR Research**, 15 set. 2015. v. 2015, 2015, p. e254560.

MARION-LETELLIER, R.; SAVOYE, G.; GHOSH, S. Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma. PMID: 26632493: **European Journal of Pharmacology**, 26 nov. 2015.

MARREWIJK, L. M. VAN *et al.* SR2067 Reveals a Unique Kinetic and Structural Signature for PPAR γ Partial Agonism. **ACS Chemical Biology**, 15 jan. 2016. v. 11, n. 1, p. 273–283.

MÉTIVIER, R. *et al.* Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. PMID: 14675539: **Cell**, 12 dez. 2003. v. 115, n. 6, p. 751–763.

MISHRA, G. P.; SHARMA, R. Identification of Potential PPAR γ Agonists as Hypoglycemic Agents: Molecular Docking Approach. PMID: 26374652: **Interdisciplinary Sciences, Computational Life Sciences**, 15 set. 2015.

MONTANARI, R. *et al.* Crystal structure of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligand binding domain complexed with a novel partial agonist: a new region of the hydrophobic pocket could be exploited for drug design. PMID: 19053776: **Journal of Medicinal Chemistry**, 25 dez. 2008. v. 51, n. 24, p. 7768–7776.

MOTANI, A. *et al.* INT131: a selective modulator of PPAR gamma. PMID: 19452630: **Journal of Molecular Biology**, 13 mar. 2009. v. 386, n. 5, p. 1301–1311.

NAGAICH, A. K. *et al.* Rapid periodic binding and displacement of the glucocorticoid receptor during chromatin remodeling. PMID: 15099516: **Molecular Cell**, 23 abr. 2004. v. 14, n. 2, p. 163–174.

NAGY, L.; SCHWABE, J. W. R. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. PMID: 15276186: **Trends in Biochemical Sciences**, jun. 2004. v. 29, n. 6, p. 317–324.

NETTLES, K. W. *et al.* Allosteric control of ligand selectivity between estrogen receptors alpha and beta: implications for other nuclear receptors. PMID: 14967140: **Molecular Cell**, 13 fev. 2004. v. 13, n. 3, p. 317–327.

NETTLES, K. W. Insights into PPAR γ from structures with endogenous and covalently bound ligands. **Nature Structural & Molecular Biology**, set. 2008. v. 15, n. 9, p. 893–895.

NETTLES, K. W.; GREENE, G. L. Ligand control of coregulator recruitment to nuclear receptors. PMID: 15709961: **Annual Review of Physiology**, 2005. v. 67, p. 309–333.

NOLTE, R. T. *et al.* Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. PMID: 9744270: **Nature**, 10 set. 1998. v. 395, n. 6698, p. 137–143.

OBERFIELD, J. L. *et al.* A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation. PMID: 10339548PMCID: PMC26842: **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 25 maio. 1999. v. 96, n. 11, p. 6102–6106.

PERISSI, V. *et al.* A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. PMID: 14980219: **Cell**, 20 fev. 2004. v. 116, n. 4, p. 511–526.

PERISSI, V.; ROSENFELD, M. G. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, jul. 2005. v. 6, n. 7, p. 542–554.

PETERSEN, R. K. *et al.* Pharmacophore-driven identification of PPAR γ agonists from natural sources. PMID: 21069556: **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, fev. 2011. v. 25, n. 2, p. 107–116.

PRONK, S. *et al.* GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. PMID: 23407358PMCID: PMC3605599: **Bioinformatics (Oxford, England)**, 1 abr. 2013. v. 29, n. 7, p. 845–854.

PUHL, A. C. *et al.* Mode of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Activation by Luteolin. **Molecular Pharmacology**, 1 jun. 2012. v. 81, n. 6, p. 788–799.

ROSENFELD, M. G.; LUNYAK, V. V.; GLASS, C. K. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. PMID: 16751179: **Genes & Development**, 1 jun. 2006. v. 20, n. 11, p. 1405–1428.

SAHEBKAR, A.; CHEW, G. T.; WATTS, G. F. New peroxisome proliferator-activated receptor agonists: potential treatments for atherogenic dyslipidemia and non-alcoholic fatty liver disease. PMID: 24428677: **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, mar. 2014. v. 15, n. 4, p. 493–503.

SAKAMOTO, J. *et al.* Activation of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtypes by pioglitazone. PMID: 11095972: **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 30 nov. 2000. v. 278, n. 3, p. 704–711.

SAMPAIO, E. P. Caracterização dos efeitos anti-tumorais de novos agonistas de PPAR γ em linhagens celulares de adenocarcinoma de mama. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular. Universidade de Brasília. 2015.

SCHMID, N. *et al.* Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and

54B7. PMID: 21533652: **European biophysics journal: EBJ**, jul. 2011. v. 40, n. 7, p. 843–856.

SCHOPFER, F. J. *et al.* Covalent Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Adduction by Nitro-fatty Acids. PMID: 20097754PMCID: PMC2852971: **The Journal of Biological Chemistry**, 16 abr. 2010. v. 285, n. 16, p. 12321–12333.

SCHÜTTELKOPF, A. W.; AALTEN, D. M. F. VAN. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. PMID: 15272157: **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**, ago. 2004. v. 60, n. Pt 8, p. 1355–1363.

Scripts. [S.l.], [S.d.]. Disponível em: <<http://www.bevanlab.biochem.vt.edu/Pages/Personal/justin/scripts.html>>. Acesso em: 11 jan. 2016.

SHAO, G.; HEYMAN, R. A.; SCHULMAN, I. G. Three amino acids specify coactivator choice by retinoid X receptors. PMID: 10935544: **Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)**, ago. 2000. v. 14, n. 8, p. 1198–1209.

SHEN, P. *et al.* Differential effects of isoflavones, from *Astragalus membranaceus* and *Pueraria thomsonii*, on the activation of PPAR α , PPAR γ , and adipocyte differentiation in vitro. PMID: 16549448: **The Journal of Nutrition**, abr. 2006. v. 136, n. 4, p. 899–905.

SHIAU, A. K. *et al.* The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. PMID: 9875847: **Cell**, 23 dez. 1998. v. 95, n. 7, p. 927–937.

SIME, M. *et al.* Discovery of GSK1997132B a novel centrally penetrant benzimidazole PPAR γ partial agonist. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, set. 2011. v. 21, n. 18, p. 5568–5572.

SIWKO, M. E. *et al.* Disturb or Stabilize? A Molecular Dynamics Study of the Effects of Resorcinolic Lipids on Phospholipid Bilayers. PMID: 19383459PMCID: PMC2718312: **Biophysical Journal**, 22 abr. 2009. v. 96, n. 8, p. 3140–3153.

SLUDER, A. E. *et al.* The nuclear receptor superfamily has undergone extensive

proliferation and diversification in nematodes. PMID: 10022975: **Genome Research**, fev. 1999. v. 9, n. 2, p. 103–120.

SRIUBOLMAS, N. *et al.* Localization and characterization of inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli* cells overproducing penicillin G acylase. PMID: 9163951: **Applied Microbiology and Biotechnology**, abr. 1997. v. 47, n. 4, p. 373–378.

SUNG, B. *et al.* Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor- κ B–regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor- κ B α kinase, leading to potentiation of apoptosis. PMID: 18349320PMCID: PMC2384122: **Blood**, 15 maio. 2008. v. 111, n. 10, p. 4880–4891.

TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (Ppargama): estudo molecular na homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e abordagem terapêutica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, jun. 2007. v. 51, n. 4, p. 526–533.

TIAN, L. *et al.* Acetylation-defective mutants of Ppar γ are associated with decreased lipid synthesis in breast cancer cells. PMID: 25229978PMCID: PMC4202124: **Oncotarget**, 19 ago. 2014. v. 5, n. 17, p. 7303–7315.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. PMID: 19499576PMCID: PMC3041641: **Journal of Computational Chemistry**, 30 jan. 2010. v. 31, n. 2, p. 455–461.

UPPENBERG, J. *et al.* Crystal Structure of the Ligand Binding Domain of the Human Nuclear Receptor PPAR. **Journal of Biological Chemistry**, 20 nov. 1998. v. 273, n. 47, p. 31108–31112.

USUDA, D. Peroxisome proliferator-activated receptors for hypertension. **World Journal of Cardiology**, 2014. v. 6, n. 8, p. 744.

WAHLI, W.; MICHALIK, L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. PMID: 22704720: **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, jul. 2012. v. 23, n. 7, p. 351–363.

WANG, C. *et al.* Acetylation and nuclear receptor action. PMID: 21167281PMCID: PMC3056342: **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, fev. 2011. v. 123, n. 3-5, p. 91–100.

WANG, L. *et al.* Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review. PMID: 25083916PMCID: PMC4212005: **Biochemical Pharmacology**, 1 nov. 2014. v. 92, n. 1, p. 73–89.

WEIDNER, C. *et al.* Amorphutins are potent antidiabetic dietary natural products. PMID: 22509006PMCID: PMC3358853: **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 8 maio. 2012. v. 109, n. 19, p. 7257–7262.

WEI, J. *et al.* Regulation of Matrix Remodeling by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ : A Novel Link Between Metabolism and Fibrogenesis. PMID: 22802908PMCID: PMC3396343: **The Open Rheumatology Journal**, 15 jun. 2012. v. 6, p. 103–115.

WU, Y. *et al.* Ligand and coactivator identity determines the requirement of the charge clamp for coactivation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. PMID: 12502716: **The Journal of Biological Chemistry**, 7 mar. 2003. v. 278, n. 10, p. 8637–8644.

XIU, Y.-L. *et al.* Anacardic Acid Enhances the Proliferation of Human Ovarian Cancer Cells. PMID: 24921663PMCID: PMC4055655: **PLoS ONE**, 12 jun. 2014. v. 9, n. 6. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4055655/>>. Acesso em: 8 jan. 2016.

XU, H. E. *et al.* Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPAR α . PMID: 11845213: **Nature**, 14 fev. 2002. v. 415, n. 6873, p. 813–817.

YAN, F. *et al.* Specific ubiquitin-conjugating enzymes promote degradation of specific nuclear receptor coactivators. PMID: 12663742: **Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)**, jul. 2003. v. 17, n. 7, p. 1315–1331.

YU, C. *et al.* Binding analyses between Human PPAR γ -LBD and ligands. **European Journal of Biochemistry**, 1 jan. 2004. v. 271, n. 2, p. 386–397.

YU, X.; MERTZ, J. E. Critical Roles of Nuclear Receptor Response Elements in

Replication of Hepatitis B Virus. PMID: 11689616PMCID: PMC114721: **Journal of Virology**, dez. 2001. v. 75, n. 23, p. 11354–11364.

ZHENG, W. *et al.* Identification of the antibiotic ionomycin as an unexpected peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligand with a unique binding mode and effective glucose-lowering activity in a mouse model of diabetes. PMID: 23178929: **Diabetologia**, fev. 2013. v. 56, n. 2, p. 401–411.

ZOETE, V.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. PMID: 17317294: **Biochimica Et Biophysica Acta**, ago. 2007. v. 1771, n. 8, p. 915–925.