UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ANA CRISTINA PUHL

**Caracterização de agonistas do PPAR γ através de
ensaios celulares e biologia estrutural**

São Carlos
2012

ANA CRISTINA PUHL

**Caracterização de agonistas do PPAR γ através de
ensaaios celulares e biologia estrutural**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração :Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Igor Polikarpov

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

**São Carlos
2012**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Puhl, Ana Cristina

Caracterização de agonistas do PPAR γ através de ensaios celulares e biologia estrutural / Ana Cristina Puhl; orientador Igor Polikarpov - versão corrigida -- São Carlos, 2012.
143 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

1. PPAR γ . 2. Cristalografia. 3. Flavonóides. 4. Antiinflamatórios. I. Polikarpov, Igor, orient. II. Título.

*À minha família,
por significar tudo pra mim...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo amor sem medida, carinho, dedicação, pelo imenso apoio, incentivo e suporte. Obrigada por tudo que vivemos e pelo que me tornei. Ao meu irmão Rodrigo e minha irmã Mariele. Amo vocês!

Ao Prof. Igor Polikarpov pela orientação, apoio, liberdade de trabalho e oportunidade de desenvolver este projeto.

Ao meu namorado Fer Coxildes, por estar sempre presente, pelo apoio, incentivo, paciência, compreensão e carinho e por tornar meus dias mais felizes, obrigada por tudo.

À minha grande amiga e colaboradora Amanda Bernardes. Obrigada pela amizade, pela imensa ajuda no meu projeto, pelo incentivo, discussões científicas, pela parceria e por todos os momentos compartilhados. Essa tese tem muito de você também ... obrigada!

À minha aluna de iniciação científica Jéssica Lóis pela enorme contribuição e dedicação à esse projeto.

Ao Marcelo Tavin, pelos primeiros ensinamentos sobre receptores nucleares.

Ao Dr. Paul Webb por me orientar durante estágio de doutorado no The Methodist Hospital Research Institute (EUA), por me incentivar e por estar sempre aberto à discussões. Aos amigos de Houston, Alex Martagón, Jan, Aleksandra, Cláudia Fonseca, Ana Luíza e Paula.

Ao Prof. Moacir Forim, pela colaboração no trabalho com nanopartículas de luteolina.

Às minhas queridas amigas Vivi Serpa e Fran Colussi por estarem presentes comigo desde o início do doutorado, formando o trio das meninas do Sul e com as quais tive o privilégio de morar e compartilhar bons momentos. Vocês são especiais pra mim.

Aos meus queridos amigos Flávio Rosseto, Malu Voltatódio, Renata Alves e Marisa Lima, com os quais dividi muitos momentos alegres, risadas, festas, devaneios e tudo mais, obrigada por nossa amizade.

À Dani Trivella, pelas divertidas idas ao Síncroton e pelos ensinamentos de cristalografia. Ao Jademilson, Fer Batista e Carol Figueira do grupo de receptores nucleares.

Ao enorme grupo de Cristalografia, em especial aos amigos Livia Faim, Daiana, André Godoy, Ju Torini, Lis, Fer Costa, Napo, Kelven, Lucas Bleicher, Mário, Udi, Evandro, Tonho, João e Gustavo.

Às amigas de longa data Fer Pedrini, Elaine Anton e Vanessa Fontana.

Ao IFSC, por toda a estrutura e suporte para minha formação. Aos professores, técnicos e funcionários. Ao LNLS.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos amigos antigos, novos e aos que virão ...

“ Be so strong that nothing can disturb your peace of mind. Talk health, happiness and prosperity to every person you meet. Make all your friends feel that is something in them. Look at the sunny side of everything. Think only of the best, work only for the best and expect only the best. Be as enthusiastic about success of others as you are about your own. Forget the mistakes of the past and press on the great achievements of the future. Give everyone a smile. Spend so much time improving yourself that you have no time left to criticize others. Be too big for worry and too noble for anger.”

Christian D. Larsen

RESUMO

PUHL, A.C. **Caracterização de agonistas do PPAR γ através de ensaios celulares e biologia estrutural**. 2012. 141 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Os receptores nucleares são uma família de fatores de transcrição que regulam a transcrição gênica em resposta a ligantes e estão envolvidos em vários processos fisiológicos e metabólicos do organismo. O receptor ativado por proliferadores peroxissomais γ (PPAR γ) está envolvido em vários processos fisiológicos incluindo adipogênese, homeostase da glicose, metabolismo de lipídios e inflamação e foi identificado como alvo molecular para o tratamento do diabetes tipo II. A importância desse receptor ficou ainda mais evidente pela descoberta de mutações que prejudicam sua função, causando a Síndrome de Resistência ao Ligante, na qual os pacientes apresentam um fenótipo de lipodistrofia parcial, profundas desordens metabólicas como severa resistência à insulina e início precoce de diabetes mellitus tipo II. O PPAR γ possui um amplo bolsão de ligação que permite que uma variedade de ligantes possa se ligar ao receptor. Essa variedade de ligantes pode induzir interações diferenciadas com correguladores, o que induzirá uma resposta biológica específica. Os agonistas totais, como as tiazolinedionas (TZDs) são eficientes sensibilizadores da insulina utilizados no tratamento do diabetes tipo II, porém seu uso têm sido limitado devido a efeitos adversos e novas abordagens terapêuticas são necessárias. Neste trabalho, o PPAR γ foi caracterizado na presença de ligantes naturais (luteolina, ácidos graxos) e sintéticos (anti-inflamatórios não esteroidais – AINEs) e também os mutantes envolvidos na Síndrome de Resistência aos Ligantes do PPAR γ através de ensaios funcionais e cristalografia de proteínas. A luteolina apresentou um comportamento de agonista parcial, com atividades anti-inflamatórias e com modo de ligação ao receptor diferente da rosiglitazona, resultando em uma diferenciação na expressão gênica em adipócitos. Os AINEs por sua vez, apresentaram diferentes perfis de ativação e modos de ligação ao receptor, além da capacidade de induzirem a diferenciação de adipócitos. Por fim, foi resolvida a estrutura cristalográfica do mutante V290M envolvido na Síndrome de Resistência ao Ligante, que mostrou que a mutação causa significativas alterações na estrutura do receptor, prejudicando sua função, o que representa uma importante passo no entendimento das bases moleculares dessa síndrome.

Palavras-chave: PPAR γ . Cristalografia. Flavonóides. Anti-inflamatórios.

ABSTRACT

PUHL, A.C. **Characterization of PPAR γ agonists using cell based assays and structural biology**. 2012. 141 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Nuclear receptors are a family of ligand activated transcription factors that regulate gene transcription in response to ligands and are involved in several aspects of human physiology and metabolism. Peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) is involved in a range of distinct physiological processes including the regulation of adipogenesis, glucose homeostasis, lipid metabolism and inflammatory responses and it has been identified as a molecular target in the treatment of several diseases as diabetes type II. The importance of this receptor became even more evident by the discovery of mutations that impair its function causing Ligand Resistance Syndrome, in which patients have a phenotype of partial lipodystrophy, profound metabolic disorders such as severe insulin resistance and early onset of diabetes mellitus type II. PPAR γ has a large binding pocket that permits that a wide range of ligands can bind to this receptor. This variety of ligands can induce differential interactions with coregulatory factors that will be translated into a specific biological response. PPAR γ full agonists, like thiazolidinediones (TZDs), are effective insulin sensitizers and anti-inflammatories but their use is limited by adverse side effects and new therapeutic approaches are needed. In this study, the PPAR γ , as well as their respective mutants involved in Ligand Resistance Syndrome, were characterized in the presence of natural (luteolin) and synthetic ligands (nonsteroidal anti-inflammatory drugs - NSAIDs) by functional assays and protein crystallography. Luteolin showed a partial agonist behaviour, with anti-inflammatory activity and a different binding mode in comparison with rosiglitazone, resulting in a different pattern of gene expression in adipocytes. NSAIDs showed different profiles of activation and binding modes, and they can promote adipocyte differentiation. Finally, we solved the crystal structure of the mutant V290M involved in the Ligand Resistance Syndrome, which showed that the mutation causes significant changes in the structure of the receptor, impairing its function. This structure represents an important step in understanding the molecular basis of this syndrome.

Keywords: PPAR γ . Crystallography. Flavonoids. Anti-inflammatories.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Organização estrutural e funcional dos receptores nucleares. (A) As seis regiões características (A-F) são divididas em três domínios: N-terminal, regiões A/B em laranja; domínio de ligação ao DNA (DBD), região C em azul; domínio de ligação ao ligante, região E em vermelho; dobradiça (*hinge*), região D em verde; região C-terminal F em cinza. A estrutura representada (PDB:3DZY) corresponde ao receptor PPAR γ complexado o receptor de ácido retinóico (RXR), sendo que a região N-terminal e região F não estão presentes nessa estrutura ⁷. O RXR está demonstrado em transparência e o peptídeo coativador em amarelo. Lado direito: após a ligação do ligante, o PPAR se associa ao RXR e coativadores. Esse complexo se liga a elementos responsivos no DNA e ativa a transcrição gênica. (B) LBD do PPAR γ mostrando que a ligação da rosiglitazona (*sticks* cinza) fecha a H12 na conformação ativa, criando o sítio de ligação ao coativador (amarelo). (C) Representação em superfície do LBD com a H12 (vermelho) (PDB: 2PRG⁸) na posição ativa e presença de peptídeo coativador e a H12 na posição inativa na presença de correpessor (PDB:1KKQ⁹).....32
- Figura 2** - Estrutura do PPAR γ _LBD (2PRG) complexado com a rosiglitazona (magenta) mostrando o bolsão de ligação ao ligante em formato de Y. Azul: braço I; verde: braço II, vermelho: entrada.....38
- Figura 3** – Mecanismo de ação das TZDs. A ativação do PPAR γ pelas TZDs no tecido adiposo promove a captação de lipídios e armazenamento de triglicerídeos. Os FFA são captados pelo tecido adiposo branco e sequestrados por outros tecidos (fígado, músculo esquelético), onde o seu acúmulo leva ao bloqueio da sinalização da insulina (“hipótese do roubo de lipídios”). O PPAR γ também controla a produção de moléculas sinalizadoras produzidas pelos adipócitos, chamadas de adipocinas, incluindo o hormônio sensibilizador da insulina, adiponectina. As TZDs também ativam diretamente o PPAR γ em macrófagos, levando a um fenótipo antiinflamatório M2 e diminuindo a infiltração de macrófagos no tecido adiposo branco. No fígado, as TZDs parecem ativar diretamente o PPAR γ nas células parenquimais do fígado esteatótico e/ou células de Kupfer ou estelares, reduzindo a inflamação e fibrose. As TZDs também reduzem a aterosclerose por interferirem com a ação do PPAR γ nos macrófagos, VSMCs e ECs. EC, célula endotelial; FFA, ácido graxo livre; IL-6, interleucina-6; MCP-1, proteína-1 quimioatraente de monócito; TG, triglicerídeos; TNF α , fator de necrose tumoral α ; VSMC, células vasculares de músculo liso (Adaptado de ⁸⁹).....43
- Figura 4** - Estrutura química da luteolina.54
- Figura 5-** Ensaio de transativação do PPAR γ /GAL4, realizado com diferentes concentrações de luteolina e modos de ativação com a rosiglitazona. (A) Gráfico mostrando a taxa de ativação da luciferase em função do aumento da concentração de luteolina. (B) Curva dose-resposta para o cálculo de EC50. Ambos os gráficos estão mostrando a ativação da luteolina e a competição de 1 μ M de rosiglitazona com a adição de luteolina. Todos os ensaios foram realizados em três replicatas e as diferenças nas eficiências de transfecções foram normalizados pela medida da atividade da luciferase de *Renilla* no mesmo lisado celular.62

- Figura 6** - PCR quantitativo e expressão relativa de RNAm dos genes (A) LPL; (B) ORL1; (C) CEBP α e (D) GLUT4. As células 3T3-L1 no 8º dia de diferenciação foram expostas aos seguintes tratamentos: controle, luteolina 10 μ M, luteolina 20 μ M, rosiglitazona 1 μ M, luteolina 20 μ M e rosiglitazona 1 μ M durante 24 h. Cada ponto representa a média dos experimentos realizados em triplicata $\pm$ desvio padrão (* P<0.05, ** P<0.01, ***P<0.001 em comparação com DMI). 63
- Figura 7** - Ensaio de diferenciação das células 3T3-L1. As células 3T3-L1 foram diferenciadas a adipócitos com diferentes ligantes durante 3 dias e mantidas em meio contendo insulina por 8 dias. Os tratamentos incluíram rosiglitazona 1 μ M, rosiglitazona 1 μ M e 5, 10, ou 20 μ M de luteolina. 64
- Figura 8** - Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 15% (SDS-PAGE) da purificação por afinidade do PPAR γ _LBD. 1: marcador de massa molecular, 2: sobrenadante do lisado celular após 16 h de indução com IPTG 1 mM a 18°C, 3: proteínas que não se ligaram na coluna de afinidade, 4 e 5: lavagens com 5 mM de imidazol, 6: lavagens com 10 mM de imidazol, 7: 30 mM de imidazol, 8: 60 mM de imidazol, 9:100 mM de imidazol, 10: 300 mM de imidazol. 11: marcador de massa molecular 12: proteína não clivada, 13: proteína clivada. 65
- Figura 9** - Purificação das proteínas recombinantes por gel filtração. Perfil cromatográfico do PPAR γ _LBD. Após a purificação por afinidade, as proteínas foram concentradas e injetadas em uma coluna preparativa Superdex 200 16/60. As frações referentes ao pico de PPAR γ foram coletadas, concentradas e analisadas por SDS-PAGE (15%) (figura inserida). 65
- Figura 10** - Cristais do PPAR γ complexado com a luteolina e padrão de difração dos cristais que cresceram na condição de Citrato de Sódio 0,90 M e Hepes 100 mM pH7,0..... 66
- Figura 11**- Estrutura cristalográfica do PPAR γ complexado com a luteolina e ácidos graxos. A luteolina (colorida em azul) está localizada entre a hélice H3 e a folha β . O ácido mirístico está colorido em amarelo e os ácidos graxos modelados na cadeia B com nove carbonos em laranja. A hélice 12 está colorida em rosa e a folha β está colorida em verde. 68
- Figura 12** - Mapas de densidade eletrônica da luteolina e ácidos graxos ligados ao PPAR γ . (A) Interações da luteolina com o PPAR γ LBD na cadeia B. (B) Interações do ácido mirístico na cadeia B. (C e D) Interações dos ácidos graxos modelados com nove carbonos na cadeia A. Os mapas de omissão dos átomos de interesse (*omit map*) 2Fo-Fc está mostrado a um contorno de 1,0 σ para a área em torno dos ligantes. A luteolina está colorida em azul, o ácido mirístico em amarelo, e os ácidos graxos de nove carbonos em laranja. Os aminoácidos que interagem com os ligantes estão nomeados e mostrados como *sticks*. H12 está mostrada em rosa e as fitas β em verde. 70
- Figura 13** - Sobreposição da estrutura do PPAR γ complexado com a luteolina (cinza) e do PPAR γ complexado com a rosiglitazona (PDB: 2PRG) (verde claro). A luteolina está mostrada em azul e a rosiglitazona em amarelo. A hélice 12 na conformação inativa na estrutura com a luteolina está colorida em rosa e a hélice 12 na conformação ativa na estrutura 2PRG está colorida em laranja. A Y473 interage com a rosiglitazona e que ajuda a manter a H12 na conformação ativa está mostrada como *sticks*. 71

Figura 14 - Estabilização da região do Ω -loop/folha β . (A) Ligações de hidrogênio envolvendo a luteolina e o ácido mirístico. A ligação de hidrogênio com o Glu291 é formada durante as simulações de DM. (B) B-fatores do PPAR γ LBD complexado com a rosiglitazona (PDB: 2PRG) e com a luteolina/ác. Mirístico. A largura da representação esquemática é proporcional aos fatores de temperatura da região. (C) O LBD está colorido de acordo com a mobilidade medida como o rmsd (*root mean square deviation*) dos carbonos α nas simulações de DM. As regiões em azul são as mais estabilizadas pela luteolina/ác. mirístico e as regiões em vermelho são as mais estabilizadas pela rosiglitazona. (D) Os resíduos Lys263 e Ser342 são mantidos em contato durante as simulações de DM e contribuem para a estabilização da região do Ω -loop. (E) Ligações de hidrogênio envolvendo a luteolina, ácido mirístico, Leu340, Ser342 e duas moléculas de água. Essas moléculas de água que unem os ligantes à folha β não são trocadas com o solvente durante a simulação de DM.72

Figura 15 - A luteolina reverte os aumento na IL-8 induzido por hipertonidade. (A) As células HCEC foram cultivadas por 24 h na presença e ausência de 5 μ M de luteolina. Quando a luteolina foi utilizada nos experimentos, as células foram pré-expostas a esse ligante por 30 min antes de substituir o meio isotônico (300 mOsm) por um meio hipertônico (450 mOsm). As concentrações de IL-8 liberadas no meio foram quantificadas com ELISA. (B) Luteolina reverte os aumentos na liberação de IL-8 induzido por GW9662: as células HCEC foram pré-expostas a 1 μ M GW9662 por 30 min antes de adicionar 1 ou 5 μ M de luteolina no meio isotônico. As concentrações de IL-8 liberadas no meio foram quantificadas com ELISA. Cada experimento foi realizado três vezes em triplicata.74

Figura 16 - Ensaios de transativação celular do PPAR γ pelos AINEs. O ensaio de ativação PPAR γ /GAL4 foi realizado com diluições seriadas de diclofenaco de sódio, ibuprofeno, indometacina e sulfeto de sulindaco (10^{-8} a 10^{-3} M). Todos os ensaios foram realizados em três replicatas e normalizados para as diferenças na eficiência de transfecção através da medida da atividade da luciferase de *Renilla* no mesmo lisado celular.83

Figura 17 - Ensaio de diferenciação das células 3T3-L1 com os AINEs. (A) Visão macroscópica, placa de cultura das células. (B) Visão microscópica com aumento de 40 x. As células foram coradas com o corante vermelho após diferenciação a adipócitos com diferentes ligantes por 3 dias e manutenção das células com meio contendo insulina por mais 8 dias. Os tratamentos incluíram controle – (DMI); controle + (rosiglitazona 1 μ M); diclofenaco de sódio 25 μ M; ibuprofeno 75 μ M; indometacina 10 μ M e sulfeto de sulindaco 50 μ M.85

Figura 18 - PCR quantitativo e expressão relativa de RNAm dos genes Adiponectina, GLUT4 e GLUT1. Após confluência, as células foram expostas aos seguintes tratamentos: DMEM, DMI, rosiglitazona 1 μ M, indometacina 10 μ M, ibuprofeno 75 μ M, diclofenaco 25 μ M, sulfeto de sulindaco 50 μ M durante 3 dias. Cada ponto representa a média dos experimentos realizados em triplicata $\pm$ desvio padrão (* P<0.05, ** P<0.01, ***P<0.001 em comparação com DMI).86

Figura 19 - Cristais do PPAR γ LBD com os AINEs.87

- Figura 20** - Estrutura cristalográfica do PPAR γ complexado com o diclofenaco. (A) Cadeia B do PPAR γ LBD com mapa de omissão dos átomos do diclofenaco (*omit map*) 2Fo-Fc mostrado a um contorno de 1,0 σ para a área em torno do diclofenaco. O diclofenaco (rosa pink) está localizado entre a hélice H3 a folha β . A H12 está colorida em azul. (B) Interações do diclofenaco com o PPAR γ LBD na cadeia B. Os aminoácidos mostrados como *dots* representam os raios de Wan der Walls. 89
- Figura 21** - Estrutura cristalográfica do PPAR γ complexado com a indometacina. (A) Duas moléculas de indometacina (azul, *stick ball*) estão presentes na cadeia A e apenas uma molécula na cadeia B. O mapa de densidade eletrônica (*omit map*) 2Fo-Fc está mostrado a um contorno de 1,0 σ para a área em torno da indometacina. (B) Interações das moléculas de indometacina com o PPAR γ LBD na cadeia A. 90
- Figura 22** - Estrutura cristalográfica do PPAR γ complexado com o sulfeto de sulindaco. (A) Duas moléculas de sulindaco (verde água, *stick ball*) estão presentes na cadeia A e duas moléculas na cadeia B. O mapa de densidade eletrônica (*omit map*) 2Fo-Fc está mostrado a um contorno de 1,0 σ para a área em torno do sulfeto de sulindaco. (B) Interações das moléculas do sulindaco com o PPAR γ LBD na cadeia A. (C) Interações das moléculas do sulfeto de sulindaco com o PPAR γ LBD na cadeia B. 91
- Figura 23** - Sobreposição do sulfeto de sulindaco, indometacina e diclofenaco. A indometacina e o sulfeto de sulindaco se ligam ao sítio 1, próximo a H12 de maneira conservada, fazendo ligações de hidrogênio com a Y473 (H12), H449, H323 e S289 na cadeia A. O sulfeto de sulindaco que adotou uma posição diferenciada em relação a cadeia A e deixou de fazer interações com a Y473 e S289. porque a H12 encontra-se em uma posição inativa. Os AINEs se ligam de maneira diferenciada ao sítio 2. Embora a indometacina adote a mesma conformação nesse sítio para as duas cadeias, o sulfeto de sulindaco adota uma posição bem diferente. 92
- Figura 24** – Síndrome de Resistência ao Ligante do PPAR γ . A figura mostra os sinais clínicos de uma mulher de 41 anos que é heterozigota para a mutação dominante negativa. Ela apresentou hipertensão severa e hipoglicemia recorrente aos 20 anos. Representações dos cortes de ressonância magnética de imagem mostram a lipodistrofia do fêmur e dos glúteos (adaptado de ¹⁸¹). 100
- Figura 25** - Ensaios de transativação celular do PPAR γ e dos mutantes F360L, P467L, R397C e V290M com rosiglitazona. (A) Curvas dose-resposta com diluições seriadas de rosiglitazona (10^{-9} a 10^{-4} M). (B) Atividade da luciferase normalizada obtida para a ativação dos mutantes com de 1 μ M de rosiglitazona. Todos os ensaios foram realizados em três replicatas e normalizados para as diferenças na eficiência de transfecção pela medida da atividade da luciferase de *Renilla* no mesmo lisado celular, pela atividade da luciferase obtida com o DMSO e também normalizadas para uma mesma escala para comparação entre os mutantes. 105
- Figura 26** - Cromatograma da gel filtração das proteína purificadas. A proteína eluiu da coluna de gel filtração no pico correspondente a 90 mL. A figura inserida mostra um gel SDS-PAGE após

gel filtração e concentração das proteínas, mostrando a pureza das amostras. 1: PPAR γ , 2: P467L, 3: R397C, 4: F360L, 5: V290M. MW: 66 kDa, 45 kDa, 31 kDa, 20 kDa, 15 kDa.....106

Figura 27 - Cristais dos mutantes do PPAR γ107

Figura 28 - Estrutura cristalográfica da estrutura do mutante V290M do PPAR γ LBD. O mapa omissão (*omit map*) 2Fo-Fc está mostrado a um contorno de 1,0 σ para a área em torno da metionina M290 (verde, *stick ball*). A H12 está colorida em azul e a folha β em laranja.....109

Figura 29 - Comparação das estruturas cristalográficas do mutante V290M PPAR γ LBD e da estrutura 2PRG (A). A valina V290 é importante para o correto posicionamento da H12 e faz interações hidrofóbicas com os resíduos L458, L469 e H466. A Y473 da H12 faz uma ligação de hidrogênio com a rosiglitazona, estabilizando a hélice na conformação ativa (B). A metionina M290 é um resíduo mais volumoso que a valina e causa impedimentos estéricos com a L469, deslocando a H12 e impedindo o seu fechamento (C). A H12 da estrutura 2PRG com o ligante rosiglitazona (pink, *stick ball*) está mostrada em vermelho e a H12 da estrutura do mutante V290 em azul. Os aminoácidos L469 e M290 estão mostrados como *dots*, representando os raios de Van der Waals.....110

Figura 30 - Comparação das estruturas cristalográficas do mutante V290M PPAR γ LBD, 2PRG e 1KKQ. (A) Sobreposição da estrutura cristalográfica do mutante V290M (H12 em azul) com a estrutura 2PRG, na qual o PPAR γ está complexado com rosiglitazona (rosa, *stick balls*) e o peptídeo coativador SRC1 (amarelo), mostrando que a H12 na conformação ativa (vermelho) é necessária para o correto posicionamento do coativador (amarelo) pela interação com o E471 e K301 (*charge clamp*). (B) Sobreposição da estrutura cristalográfica do mutante V290M com a 1KKQ, na qual o PPAR α está complexado ao GW6471 (amarelo, *stick balls*) e o peptídeo correpessor SMRT (magenta), mostrando que a H12 adota uma conformação inativa (verde). (C) Análise do empacotamento cristalino do mutante V290M mostrando que a conformação adotada pela H12 ocorre devido a ligações de hidrogênio entre a Q470 e a Y473 com a H12 da molécula simétrica. As moléculas de cada unidade assimétrica estão representadas em *cartoon/superfície* e com cores diferentes para evidenciar o empacotamento entre as cadeias.....112

Figura 31 - Análise estrutural das mutações F360L, P467L, V290M 3 R397C. (A) Estrutura intacta do PPAR γ (PDB 3DZY), com LBD (azul) e o DBD (ciano) formando heterodímero com o RXR (rosa) e na presença do peptídeo coativador (laranja) e rosiglitazona (vermelho, *stick ball*). (B) PPAR γ LBD mostrando a localização das mutações (rosa, esferas). (C) A F360 faz interações hidrofóbicas com os resíduos I456 (H11), F282 (H7) e A278 (H3), ajudando a estabilizar essa região. (D) A R397 faz uma ponte salina com o E324 e o resíduo H323 situado no lado oposto dessa hélice que interage com a rosiglitazona. (E) A R397 interagindo com o E324 ajuda a posicionar o loop entre a H8 e H9 de tal forma que ajuda a formar a superfície de heterodimerização com RXR.....114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> utilizados para ensaios de expressão gênica por PCR em tempo real.....	61
Tabela 2 - Estatísticas cristalográficas: PPAR γ complexado com luteolina.....	67
Tabela 3 - Estatísticas cristalográficas do PPAR γ LBD com os AINEs	88
Tabela 4 - <i>Primers</i> construídos para a inserção de mutações em plasmídeos pBIND e PET28a	102
Tabela 5 - Estatísticas cristalográficas: V290M.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PPAR	Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais
TZD	tiazolinediona
LBP	bolsão de ligação ao ligante
SPPAR γ M,	modulador seletivo do PPAR γ
HCEC	célula epitelial da cornea humana
IL-8	interleucina 8
CEBP α	proteína α potenciadora da ligação a CCAT
LPL	lipoproteína lipase
ORL1	receptor de LDL oxidada 1
GLUT4	transportador de glicose tipo 4
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDB	Protein Data Bank
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
AINEs	anti-inflamatórios não esteroidais
RXR	receptor de ácido retinóico

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL: RECEPTORES NUCLEARES	29
1 INTRODUÇÃO	31
1.1 <i>Receptores nucleares</i>	<i>31</i>
1.2 <i>Os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs)</i>	<i>35</i>
1.3 <i>PPARγ</i>	<i>36</i>
1.4 <i>Mecanismos de ativação do PPARγ.....</i>	<i>37</i>
1.5 <i>Ações clínicas dos agonistas do PPARγ na homeostase de glicose</i>	<i>40</i>
1.6 <i>Ações antiinflamatórias do PPARγ.....</i>	<i>43</i>
1.7 <i>Novas abordagens terapêuticas</i>	<i>44</i>
OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	47
ESTUDOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DO PPARγ LBD COM A LUTEOLINA.....	51
3 INTRODUÇÃO	53
3.1 <i>Compostos naturais como fontes de ligantes de PPARγ.....</i>	<i>53</i>
3.2 METODOLOGIA	54
3.2.1 <i>Ensaio de transativação celular.....</i>	<i>54</i>
3.2.2 <i>Expressão do domínio LBD do PPARγ</i>	<i>55</i>
3.2.3 <i>Purificação do domínio LBD do PPARγ</i>	<i>56</i>
3.2.4 <i>Purificação por gel filtração</i>	<i>57</i>
3.2.5 <i>Ensaio de cristalização</i>	<i>57</i>
3.2.6 <i>Coleta e processamento dos dados de difração de raios-X</i>	<i>58</i>
3.2.7 <i>Determinação da estrutura cristalográfica e refinamento</i>	<i>58</i>
3.2.8 <i>Cultura de células e ensaio de diferenciação de adipócitos.....</i>	<i>59</i>
3.2.9 <i>PCR em tempo real quantitativo (RT-PCR)</i>	<i>60</i>
3.3 RESULTADOS	61
3.3.1 <i>Ensaio de transativação celular – Luteolina é um agonista parcial</i>	<i>61</i>
3.3.2 <i>Luteolina regula a expressão de genes alvo em células 3T3-L1 e inibe a diferenciação induzida pela rosiglitazona.....</i>	<i>62</i>
3.3.3 <i>Expressão e purificação do domínio LBD do PPARγ</i>	<i>64</i>
3.3.4 <i>Cristalização, coleta de dados e resolução da estrutura cristalográfica do PPARγ_LBD complexado com a luteolina</i>	<i>66</i>
3.3.5 <i>A luteolina se liga ao PPARγ de uma maneira diferente que as TZDs</i>	<i>70</i>
3.3.6 <i>A luteolina promove diminuição na produção de IL-8 induzida por hipertonidade</i>	<i>73</i>
3.4 DISCUSSÃO	74
ESTUDOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DO PPARγ LBD COM ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDIAIS	77
4 INTRODUÇÃO	79
4.1 <i>Antiinflamatórios não esteroideais</i>	<i>79</i>
4.2 METODOLOGIA	81
4.2.1 <i>Ensaio de transativação celular do PPARγ com os AINEs.....</i>	<i>81</i>
4.2.2 <i>Ensaio de diferenciação de adipócitos e ensaio de expressão gênica</i>	<i>81</i>
4.2.3 <i>Cristalização, coleta de dados e resolução das estruturas cristalográficas</i>	<i>82</i>
4.3 RESULTADOS	83

4.3.1 Os AINES são agonistas do PPAR γ	83
4.3.2 Alguns AINEs promovem a adipogênese em células 3T3-L1	84
4.4 DISCUSSÃO	93
SÍNDROME DE RESISTÊNCIA AOS LIGANTES DO PPARγ	97
5.1 INTRODUÇÃO	99
5.1.1 Síndrome de resistência ao ligante do PPAR γ	99
5.2 METODOLOGIA	102
5.2.1 Mutações sítio dirigidas	102
5.2.2 Ensaios de transativação celular dos mutantes com rosiglitazona	102
5.2.3 Expressão e purificação do PPAR γ , P467L, F360I, R397C, V290M	103
5.2.4 Ensaios de cristalização	103
5.2.5 Coleta de dados, resolução das estruturas cristalográficas e refinamento	104
5.3 RESULTADOS	104
5.3.1 Ensaios de transativação celular dos mutantes F360L, P467L, R397C e V290M	104
5.3.2 Expressão e purificação do PPAR γ , P467L, F360I, R397C, V290M	105
5.3.3 Ensaios de cristalização com os mutantes do PPAR γ	106
5.3.4 Análises estruturais dos mutantes	108
5.4 DISCUSSÃO	114
CONSIDERAÇÕES FINAIS	117
REFERÊNCIAS	121
ANEXOS	137

UM LIVRO CHAMADO TESE

Bom, por onde começar eu sempre quis escrever um livro....era um dos objetivos da minha vida!! Quando criança comecei a escrever um, falava sobre aventuras na floresta, com acampamentos, casas abandonadas, perigos e tudo mais que a imaginação pode inspirar !!!

Continuo com o sonho de escrever um grande livro algum dia, mas acabo de me dar conta do que acabei de fazer, essa tese não deixa de ser um livro, eu até dividi ela em capítulos... e o que ela conta? Bom, ela conta toda uma história, na verdade são duas histórias; uma delas é sobre um outro sonho de criança que eu tinha que era de ser cientista e a outra história, não está bem implícita assim no texto ... ela é uma história mais introspectiva, muito explícita e presente para o autor, e quem sabe, as pessoas mais próximas consigam ler as palavras que não estão contadas nessas linhas.

Essa segunda história fala muito mais do que as frases (ou outras histórias contadas nas próximas páginas) e talvez tenha muito mais valor do que essas linhas conseguem dizer. Essa história fala de sonhos, fala dos anseios mais profundos da alma, fala sobre a busca das coisas que não se sabe, fala sobre superação, esforço, determinação, concentração, foco, falta de foco, tristeza, recomeço, felicidade, sorriso, desânimo, desvalorização, incentivo, conquista e assim por diante num oscilar de sentimentos como se fosse uma função de ondas, talvez como essas , que o cientista usa para difratar seus cristais e chegar na tão sonhada estrutura cristalográfica de “sua” proteína, fruto de seu maior desejo.....

Mas sob outra perspectiva, não mais no espaço recíproco, mas no espaço real, ao invés de buscar interferências construtivas e negativas na periodicidade do cristal, não mais o cientista, mas a pessoa por trás dele talvez nessas ondas que seguem avançando, não busque mais os picos máximos e mínimos dos senos e cossenos, mas sim uma linha reta cortando as ondas com um olhar curioso e esperançoso em direção ao futuro em total serenidade.

Salvador Dalí

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL: RECEPTORES NUCLEARES

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL RECEPTORES NUCLEARES

1 INTRODUÇÃO

1.1 Receptores nucleares

Os receptores nucleares (RNs) são uma das classes mais importantes de sinalização intracelular porque respondem a sinais intracelulares e extracelulares regulando a expressão gênica relacionada a processos metabólicos essenciais. Eles agem através da regulação da transcrição de genes-alvo, respondendo a hormônios, sinais metabólicos e outras moléculas regulatórias, integrando muitas vias de sinalização ¹. Esta superfamília é formada pelos receptores de hormônios lipofílicos (esteróides, retinóides, vitamina D e tireóideos), de metabólitos endógenos (ácidos biliares e oxisterol) e, também, de alguns receptores de xenobióticos. Eles estão envolvidos em praticamente todas as funções fisiológicas do organismo, pois são potentes reguladores do desenvolvimento, divisão e diferenciação celular, metabolismo, homeostase e estão relacionados com diversas doenças metabólicas e vários tipos de câncer, sendo assim considerados alvos para novas alternativas de tratamento ². Os receptores nucleares têm atraído muita atenção devido à sua importância na regulação dos processos metabólicos, influenciando tanto o metabolismo de glicose e de lipídios ³ e por esse motivo, os agonistas e antagonistas que atuam nesses receptores são importantes alvos para o desenvolvimento de novos medicamentos.

A principal característica que difere os receptores nucleares dos outros fatores de transcrição é a sua capacidade de ligação a pequenas moléculas hidrofóbicas que constituem sinais regulatórios que modificam a atividade transcricional do receptor nuclear. Os receptores nucleares, cujo ligante natural ainda não foi identificado são conhecidos como “receptores órfãos” ^{4,5}. Os receptores nucleares são proteínas de 50 a 100 kDa formadas por 5-6 regiões conservadas (A-F) (Fig. 1) que codificam funções específicas ⁶ e podem ser organizados em três domínios funcionais.

Figura 1- Organização estrutural e funcional dos receptores nucleares. (A) As seis regiões características (A-F) são divididas em três domínios: N-terminal, regiões A/B em laranja; domínio de ligação ao DNA (DBD), região C em azul; domínio de ligação ao ligante, região E em vermelho; dobradiça (*hinge*), região D em verde; região C-terminal F em cinza. A estrutura representada (PDB:3DZY) corresponde ao receptor PPAR γ complexado o receptor de ácido retinóico (RXR), sendo que a região N-terminal e região F não estão presentes nessa estrutura⁷. O RXR está demonstrado em transparência e o peptídeo coativador em amarelo. Lado direito: após a ligação do ligante, o PPAR se associa ao RXR e coativadores. Esse complexo se liga a elementos responsivos no DNA e ativa a transcrição gênica. (B) LBD do PPAR γ mostrando que a ligação da rosiglitazona (*sticks* cinza) fecha a H12 na conformação ativa, criando o sítio de ligação ao coativador (amarelo). (C) Representação em superfície do LBD com a H12 (vermelho) (PDB: 2PRG⁸) na posição ativa e presença de peptídeo coativador e a H12 na posição inativa na presença de corepressor (PDB:1KKQ⁹).

A porção N-terminal, que compreende as regiões A/B (Fig. 1A, laranja) é a região mais variável em tamanho e sequência e possui uma propriedade comum de transativação denominada AF-1 (*Activation Function 1*) que apresenta especificidade para diferentes tipos celulares, domínios de ligação ao DNA, regiões promotoras e promove a ativação da transcrição na ausência do hormônio ¹. Esse domínio pode ser fosforilado por diferentes vias de sinalização celular e essa modificação pode afetar significativamente a atividade transcricional. No caso do Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais α (PPAR α), o domínio AF-1 pode ser fosforilado por proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), resultando em uma aumento da atividade transcricional, já para o PPAR γ , a fosforilação pela mesma quinase regula negativamente sua atividade transcricional. Essa modificação reduz a ligação do ligante, mostrando que essa ligação pode ser regulada por uma comunicação intramolecular entre o domínio A/B e o domínio de ligação ao ligante (*ligand binding domain*, LBD) na região carboxi terminal ¹.

O domínio de ligação ao DNA (*DNA binding domain*, DBD) está localizado na região C (Fig. 1A, azul) e é o domínio mais conservado entre os receptores nucleares e é formado por dois motivos de dedos de zinco (cada um formado por quatro cisteínas e um átomo de zinco) enovelados em uma estrutura globular que pode reconhecer sequências alvo específicas no DNA compostas por 6 nucleotídeos, chamados de elementos responsivos (*hormone responsive elements*, HRE) ¹. Na maioria dos casos, os receptores nucleares se ligam como dímeros à duas cópias desse motivo. O espaçamento entre os dois motivos e a sua relativa orientação (repetição direta, palíndromo ou palíndromo invertido) determinam qual receptor se ligará a determinado elemento responsivo. Alguns receptores, como os PPARs não se ligam como homodímeros nem como monômeros, mas dependem estritamente do Receptor do Ácido 9-cis Retinóico (RXR) como seu parceiro para se ligar ao DNA (descrito com mais detalhes adiante) ¹⁰.

A região D (Fig. 1A, verde) dos receptores nucleares é a menos conservada entre os diferentes membros da família, apresentando geralmente 20 a 30 aminoácidos. Essa região está localizada entre C e E, sendo também conhecida como dobradiça (do inglês *hinge*), pois permite que o DNA e os domínios de ligação aos ligantes adotem diferentes conformações sem ocorrer impedimentos estéricos ¹¹. A região C e E contribuem para a interface de dimerização permitindo que alguns receptores se acomodem a diferentes parceiros de heterodimerização e diferentes tipos de elementos responsivos.

O domínio de ligação ao ligante (*ligand binding domain*, LBD), está localizado na região E (Fig. 1A, vermelho) e é considerado a principal porção estrutural de um receptor nuclear. Essa região é responsável por uma variedade de funções reguladas pela ligação do

hormônio, tais como: servir de interface de dimerização com outros receptores, ligação de agonistas e antagonistas e função de ativação dependente de ligante AF-2 (*Activation function 2*)¹, o que favorece a ligação de complexos de proteínas coativadoras¹²⁻¹⁵ ou correpressoras da transcrição de genes^{16, 17}. Na ausência de ligantes, os receptores são referidos como estando na forma *apo* e na presença de ligantes são considerados na forma *holo*. O enovelamento geral para o LBD (~280 aminoácidos) está estruturado como um sanduíche de três camadas de α -hélices e mais quatro pequenas fitas β . As hélices são numeradas de H1 a H12, iniciando com a H1 N-terminal e a organização terciária das mesmas forma uma cavidade hidrofóbica que acomoda os ligantes, o bolsão de ligação (*ligand binding pocket*, LBP)^{18, 19}.

A habilidade dos receptores nucleares em promover ou suprimir a transcrição gênica depende da interação de um ligante com o LBD que irá alterar e estabilizar a conformação do receptor. Na ausência de ligantes, alguns receptores recrutam correpressores que formam complexos multiprotéicos contendo histona desacetilases, que desacetilam a cromatina e reprimem a transcrição gênica. Portanto, nesse caso ou presença de antagonistas, a H12 adota uma conformação inativa (Fig. 1C). Após a ligação do ligante, ocorre uma mudança conformacional que envolve basicamente a abertura e o fechamento da hélice C-terminal H12 para a entrada e posterior acomodação do ligante, sendo chamado de mecanismo de ratoeira. O fechamento da hélice H12 expõe uma cavidade hidrofóbica na superfície da proteína, o que proporciona a formação de uma região para a interação com proteínas coativadoras (Fig. 1B) e montagem dos complexos multiprotéicos que potencializam a ativação de genes alvo^{20, 21}. Esta nova interface, chamada de AF-2 ou domínio de ativação, é conservada em todos os receptores nucleares transcricionalmente ativos¹². A ligação do ligante leva ao recrutamento de coativadores que são responsáveis por descondensar a cromatina e favorecer o desligamento do complexo correpressor²².

Na presença de ligantes, alguns receptores como os PPARs, formam heterodímeros com o RXR e modulam a transcrição de genes alvos pela ligação aos elementos responsivos do PPAR (PPRE) na região promotora desses genes¹ (Fig. 1A), por um mecanismo chamado transativação. Os PPREs conhecidos para os PPARs contêm um sítio chamado DR1, que é uma repetição direta do elemento conservado AGGTCA e separado por um simples nucleotídeo. A estrutura do PPRE como um motivo de repetição direta impõe uma polaridade ao heterodímero ligado. O PPAR interage com o núcleo do hexâmero DR1 *upstream*, enquanto que o RXR ocupa o motivo *downstream*. Isso representa uma polaridade invertida comparado com outros receptores como o Receptor de Vitamina D (VDR:RXR) e Receptor de Hormônio Tireoidiano (TR:RXR) ligados ao DR3 e DR4, respectivamente, onde o RXR

ocupa o núcleo do hexâmero *upstream* da repetição direta¹⁰. Sendo assim, esse heterodímero pode ser ativado pelos ligantes de ambos os receptores independente e sinergicamente^{23, 24}. O LBD também é responsável pela formação de dímeros funcionais de maneira cooperativa com a porção DBD. Alguns receptores nucleares formam somente homodímeros (receptores de hormônios esteróides), enquanto outros podem formar homodímeros (RXR, TR) e heterodímeros com o RXR (TR:RXR, PPAR:RXR, etc.)¹.

A região F (Fig. 1A, cinza) não é muito conservada e apresenta uma função que não é bem conhecida. Somente alguns receptores apresentam a região F na porção C-terminal do LBD, como o receptor de progesterona (PR), estrógeno (ER) e de ácido retinóico (RXR). Foi sugerido que essa região possa estar envolvida no recrutamento de coativadores através de mudanças na superfície da proteína²⁵.

1.2 Os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs)

Os PPARs são fatores de transcrição ativados por ligantes que pertencem à superfamília dos receptores nucleares e foram descobertos em 1990 através da clonagem de um receptor órfão murino, o qual era ativado por compostos que proliferam os peroxissomos (como os fibratos), por isso esse nome²⁶. Os PPARs atuam como sensores moleculares e transativam genes em resposta à ligantes endógenos como os ácidos graxos saturados e insaturados, derivados do ácido araquidônico e agentes hipolipemiantes e anti-diabéticos¹⁰. Foram identificados três isotipos desse receptor, cada um codificado por um gene diferente: PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) e PPAR γ (NR1C3)^{27, 28}, os quais possuem distribuição nos tecidos e perfis farmacológicos distintos^{29, 30}.

O PPAR α é expresso principalmente em órgãos que exibem alta taxa de catabolismo de ácidos graxos como fígado, intestino e tecido adiposo marron e é o maior regulador da homeostase energética³¹. No fígado, o PPAR α é responsável pela oxidação de ácidos graxos e detoxificação de vários xenobióticos. Vários estudos demonstraram que muitos genes envolvidos nessas vias metabólicas, como β e ω -oxidação, apresentam um PPRE na sua região promotora e que está sob controle transcricional do PPAR α ^{32, 33}. O PPAR α é ativado por ácidos graxos, eicoisanóides derivados do ácido araquidônico pela via da lipoxigenase e também por fibratos, que são uma classe de fármacos hipolipemiantes sintéticos amplamente utilizada no tratamento de hipertrigliceridemia³⁴. Foi demonstrado que o aumento na

oxidação de ácidos graxos em resposta à ativação do PPAR α com o fibrato WY14643 resultou na diminuição dos níveis circulantes de triglicerídeos e na redução do armazenamento de lipídios no fígado, músculo e tecido adiposo ³⁵, o que está associado a um aumento na sensibilidade à insulina ^{36, 37}. Consequentemente, os fibratos (fenofibrato e benza-fibrato), que são agonistas do PPAR α , são amplamente utilizados clinicamente no tratamento de dislipidemias.

O PPAR β é expresso em todo o organismo e está envolvido na diferenciação epitelial, cicatrização ³⁸, implementação de blastocistos ³⁹ e regulação do catabolismo de ácidos graxos e homeostase energética ⁴⁰. Ainda não existem agonistas do PPAR β utilizados clinicamente, mas foi demonstrado que diferentes compostos sintéticos são capazes de ativar o PPAR β ⁴¹ e agonistas desse isotipo estão em desenvolvimento para o tratamento de dislipidemias, obesidade e resistência à insulina. Foi demonstrado que ácidos graxos, prostaciclina e ácido retinóico são ligantes endógenos do PPAR β ⁴¹⁻⁴⁴.

O PPAR γ é muito expresso nos adipócitos e macrófagos e está envolvido na diferenciação de adipócitos e armazenamento de lipídeos. Esse receptor também modula a sensibilidade à insulina e a homeostase de glicose ⁴⁵⁻⁴⁷ (mais detalhes serão dados a seguir).

1.3 PPAR γ

O PPAR γ possui um papel central na integração do controle energético, do metabolismo de lipídios e glicose ⁴⁸. Ele também está envolvido na inibição da produção de citocinas inflamatórias (interleucina-6 e o fator de necrose tumoral α) pelos monócitos e também atua na repressão de genes pró-inflamatórios ^{46, 49, 50}. Embora o PPAR γ seja transcrito pelo mesmo gene, apresenta quatro isoformas que diferem na região 5' por *splicing* alternativo ¹⁰. A isoforma PPAR γ 1 é expressa praticamente em todos os tecidos, incluindo coração, músculo, cólon, rim e pâncreas e a isoforma PPAR γ 2 é expressa principalmente no tecido adiposo. O PPAR γ 3 parece ser a isoforma predominante nos macrófagos ⁵¹ e a expressão do PPAR γ 4 não é muito conhecida, mas foi demonstrada a presença de seu RNAm no tecido adiposo ⁵². O PPAR γ 2 é composto de 28 aminoácidos adicionais na porção N-terminal, conferindo uma atividade transcricional 5-6 vezes maior no domínio de ativação AF-1, que é independente de ligante ⁵³.

O PPAR γ é o alvo farmacológico para uma classe de fármacos antidiabéticos chamadas tiazolinedionas⁵⁴. A maior expressão do PPAR γ ocorre no tecido adiposo, onde ele é considerado a chave para a cascata de transcrição, que leva a diferenciação de adipócitos⁵⁵. A ativação do PPAR γ favorece a formação de pequenos adipócitos que tendem a substituir os grandes adipócitos que normalmente constituem o tecido adiposo branco⁵⁷. O PPAR γ coopera com a família de fatores de transcrição proteína potenciadora da ligação a CCAT (C/EBP) para regular a adipogênese. A C/EBP β e a C/EBP δ estão presentes no início da adipogênese e induzem a expressão do PPAR γ ⁵⁸. A C/EBP α é expressa depois e, juntamente com o PPAR γ , governa o padrão de expressão gênica específico de adipócitos^{59,60}.

Foi demonstrado que a maior expressão do PPAR γ ocorre após as refeições e a sua ativação leva à expressão de genes que promovem a captação, armazenamento e metabolismo de ácidos graxos, como a lipoproteína lipase⁶¹, acetil coenzima A sintase (acetil-CoA)⁶², proteínas transportadoras de ácidos graxos e fosfoenol piruvato carboquinase⁶³. Ele também reprime genes que induzem a lipólise e a liberação de ácidos graxos livres em adipócitos^{32,64}. Além disso, o PPAR γ diminui a expressão de leptina, uma molécula sinalizadora produzida pelo adipócito, o que causa um aumento na ingestão e otimização do uso de energia, contribuindo para os efeitos adipogênicos do PPAR γ ⁶⁶.

1.4 Mecanismos de ativação do PPAR γ

A capacidade do PPAR γ , assim como outros receptores nucleares, em promover ou suprimir a transcrição de genes depende da sua interação com o ligante, a qual irá alterar e estabilizar a conformação do receptor. No caso da ligação de agonistas, ocorre um reposicionamento da H12 do receptor, formando o sítio de ligação a coativadores (Fig. 1B), acarretando assim a montagem de um complexo multiprotéico de fatores co-regulatórios que ativa a transcrição de genes alvos^{19,67}. O bolsão de ligação ao ligante do PPAR γ é uma cavidade hidrofóbica muito volumosa (1300-1400 Å³), em formato de Y^{8,68}, que é quase duas vezes o volume quando comparado com outros receptores nucleares. O bolsão de ligação é formado pelas hélices H2', H3, H4, H5, H7, H10/H11, H12 e as fitas β S3 e S4. A cavidade em formato de Y consiste em uma entrada se estendendo a partir da superfície que se ramifica em dois braços: o braço I, se estendendo em direção a H12 e o braço II, situado entre a H3 e a folha β (Fig. 2). Cada braço possui aproximadamente 12 Å de comprimento. O braço I é a

região mais polar do bolsão e o braço II e o interior da entrada do sítio ativo são principalmente hidrofóbicos. A parte acessível ao solvente da entrada é composta por resíduos polares, como por exemplo R288, E295, E343 para o PPAR γ ¹⁹.

O PPAR γ possui uma hélice adicional H2', que está localizada entre a primeira fita β e a H3 e juntamente com o posicionamento da H2, que difere das outras estruturas tridimensionais de receptores nucleares, fornece um acesso fácil dos ligantes ao bolsão hidrofóbico. A região entre a H2'e a H3, correspondendo à região do Ω -loop, é o loop termicamente mais móvel e que participa de mudanças conformacionais que ocorrem durante a ligação do ligante. O fácil acesso ao ligante fornecido pela hélice extra H2' e o posicionamento da H2 definem o PPAR como um receptor nuclear que evoluiu para se ligar a múltiplos ligantes naturais com relativa baixa afinidade ¹⁰.

Figura 2 - Estrutura do PPAR γ _LBD (2PRG) complexado com a rosiglitazona (magenta) mostrando o bolsão de ligação ao ligante em formato de Y. Azul: braço I; verde: braço II, vermelho: entrada.

Como descrito acima, o LBP do PPAR γ é uma grande cavidade hidrofóbica que permite que uma grande variedade de ligantes possam se ligar e ativar o receptor, incluindo ácidos graxos, metabólitos do ácido araquidônico ⁶⁹, fármacos antidiabéticos ⁷⁰ e anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) ⁵⁴. Devido ao seu grande volume, os ligantes podem se ligar a diferentes regiões desse bolsão e podem afetar de maneira diferente as interações com coativadores e correpessores e modular seletivamente a atividade do receptor ⁷¹.

Outros mecanismos de ação dos PPARs envolvem ações não genômicas, como por

exemplo, os PPARs podem mediar efeitos repressivos pela inibição de fatores de transcrição por um mecanismo chamado transrepressão⁷². A transrepressão pode ocorrer por uma inibição da ligação dos fatores de transcrição ao DNA através de interações diretas proteína-proteína ou pelo sequestro de cofatores necessários para a sua atividade. Algumas das ações anti-inflamatórias do PPAR γ , como inibição da produção de citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF α em macrófagos^{46, 49, 50} estão associadas a esse mecanismo.

A atividade do PPAR γ também é regulada por modificações pós-traducionais, incluindo fosforilação, ubiquitinação e sumoilação. As principais cascatas de sinalização celular, como as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinases) e a via das proteínas quinases A e C, integram sinais vindos da membrana plasmática e podem modular a atividade dos PPARs através da fosforilação⁷³. Foi reportado que a fosforilação do PPAR γ 2 na posição S112 por MAP quinases reprimiu sua atividade transcrricional pela inibição da ligação do ligante e alteração do recrutamento de coativadores^{74, 75}. A fosforilação do PPAR γ na posição S273 pela quinase 5 dependente de ciclina (CDK5) não altera sua capacidade adipogênica, mas desregula vários genes envolvidos na obesidade e alguns ligantes bloqueiam a obesidade ligada a essa fosforilação por induzirem mudanças conformacionais que interferem com a habilidade da CDK5 fosforilar a serina 273^{76, 77}.

A ubiquitinação geralmente ocorre em resíduos de lisina pela ligação covalente da ubiquitina (8 kDa) a proteínas alvo para sinalizá-las para degradação no proteassoma 26S. A ubiquitinação e degradação mediada por proteassoma estão ligadas à atividade transcrricional dos receptores nucleares através da regulação dos níveis celulares do receptor, mas também através do *crosstalk* entre a atividade do proteassoma e a transcrição. Foi demonstrado que a ligação do ligante e ativação do domínio AF2 aumenta a transcrição do PPAR γ , mas também induz a ubiquitinação e subsequente degradação desse receptor pelo proteassoma⁷⁸.

A sumoilação ocorre em resíduos de lisina localizado em motivos WKXE/D (sendo W um resíduo hidrofóbico volumoso e X qualquer resíduo) pela conjugação da proteína SUMO (11 kDa, homóloga da ubiquitina), através de ligações covalentes, regulando assim vários mecanismos moleculares incluindo a repressão transcrricional⁷³. Em células tratadas com lipopolissacarídeos (LPS) e ligantes, foi demonstrado que o ligante induz a conjugação da proteína SUMO ao PPAR γ e esse complexo se liga ao corepressor NCoR e interfere com a depuração do complexo corepressor por um mecanismo dependente de ubiquitinação, mantendo o promotor em um estado reprimido.

A sumoilação do PPAR γ pode explicar como uma fração do receptor com ligante ligado é convertido de um ativador dos genes contendo as sequências do PPRE para um

repressor de genes de resposta inflamatória que são ocupados em condições basais por complexos NCoR. Na estrutura cristalográfica sem ligante, a K365 encontra-se no interior da proteína e na presença de rosiglitazona essa lisina está exposta ao solvente, sugerindo que a K365 pode ser sumoilada de maneira dose dependente. A mudança alostérica que permite a sumoilação do PPAR γ dependente de ligante é distinta e aparentemente independente das mudanças alostéricas que medeiam o recrutamento de coativadores, sugerindo que pode ser possível separar quimicamente a transativação da transrepressão ⁴⁶.

Além das modificações pós-traducionais, a ativação/repressão dos genes alvo dos PPARs depende do padrão celular de expressão de coativadores e correpressores ⁷⁹, os quais futuramente podem oferecer possíveis abordagens farmacológicas através da modulação desses cofatores.

1.5 Ações clínicas dos agonistas do PPAR γ na homeostase de glicose

O diabetes tipo II é uma desordem metabólica complexa caracterizada por hiperglicemia e está associada com uma relativa deficiência da secreção de insulina e uma reduzida resposta de tecidos alvo para insulina (resistência à insulina). O diabetes tipo II representa uma pandemia em expansão que contribui significativamente para a morbidade e mortalidade mundial. Foi previsto uma prevalência de diabetes para adultos (idade 20-79 anos) de 6,4%, afetando 285 milhões de adultos em 2010 e um aumento de 7,7% resultando em 439 milhões de adultos em 2030. Entre 2010 e 2030 haverá um aumento de 69% no número de adultos com diabetes em países em desenvolvimento e 20 % de aumento em países desenvolvidos ⁸⁰.

O PPAR γ tem se tornado um receptor de grande interesse biomédico porque as tiazolidinedionas (TZDs), que são uma classe de fármacos melhoram a sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos e fígado através da ativação específica do PPAR γ ⁷⁰, são utilizadas no tratamento do diabetes tipo II. O diabetes tipo II é caracterizado pela hiperglicemia devido à resistência à insulina que não é compensada eficientemente pela secreção de insulina pelas células β -pancreáticas. O diabetes tipo II está associado a outros fatores de risco cardiovasculares e distúrbios metabólicos como obesidade, resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão, aterosclerose, estado pró-trombótico e disfunção endotelial que são coletivamente referidos como Síndrome Metabólica ⁸¹.

Muitos mecanismos moleculares podem explicar porque a ativação do PPAR γ melhora a sensibilidade à insulina em todo o organismo. Os benefícios das TZDs são atribuídos aos efeitos diretos no metabolismo de lipídios no tecido adiposo e a efeitos secundários no metabolismo de glicose e lipídios no fígado e músculo esquelético (Fig. 3). O tratamento com as TZDs leva a um remodelamento dos adipócitos como resultado de uma diferenciação seletiva dos pré-adipócitos nos depósitos subcutâneos e apoptose dos adipócitos viscerais maiores e insulino-resistentes⁸². Os novos adipócitos são pequenos e mais sensíveis à insulina⁸³. A ativação do PPAR γ pelas TZDs aumenta a lipólise dos triglicerídeos circulantes e seu armazenamento no tecido adiposo. Além disso, a ativação do PPAR γ modula a via de transdução de sinal da insulina, aumenta a expressão e translocação dos transportadores de glicose GLUT1 e GLUT4 para a superfície celular, aumentando a absorção de glicose nos adipócitos e células musculares, tendo como consequência a redução dos níveis plasmáticos de glicose^{84, 85}. O GLUT1 e o GLUT4 são os transportadores de glicose predominantes nas células adiposas, sendo que o GLUT1 se encontra na membrana plasmática das células e é responsável pelo transporte de glicose basal, enquanto que o GLUT4 contribui com o transporte de glicose estimulado pela insulina.

O diabetes tipo II é associado a um estado de inflamação crônica das células de gordura que secretam níveis elevados de citocinas. Estudos recentes têm demonstrado que a obesidade é acompanhada por um baixo nível de inflamação crônica no tecido adiposo e que essa inflamação é um dos potenciais mecanismos que desencadeiam a resistência à insulina^{86, 87}. Foi demonstrado que os agonistas do PPAR γ inibem a expressão de citocinas, como a resistina, fator de necrose tumoral α (TNF α) e interleucina 6 (IL-6), os quais promovem resistência à insulina⁸⁸. Essas citocinas estão alteradas durante a obesidade e resultam em um perfil de secreção mais pró-inflamatório e aterogênico.

Recentemente, surgiu um novo papel para o tecido adiposo branco residente e o recrutamento de células imuno-inflamatórias, incluindo macrófagos, na patogênese da resistência à insulina. Em consequência da obesidade, o acúmulo de macrófagos inflamatórios do tipo I (que produzem citocinas pró-inflamatórias e matam microorganismos) no tecido adiposo branco mantém a produção de citocinas inflamatórias (TNF α , IL-6), o que contribui para a deterioração da sensibilidade à insulina⁸⁹. O PPAR γ atua como um fator anti-inflamatório nos macrófagos M1 e promove a polarização dos monócitos humanos em macrófagos anti-inflamatórios M2 (que produzem citocinas anti-inflamatórias, promovem angiogênese, remodelamento de tecido e reparo) (Fig. 3)⁹⁰. Além disso, o PPAR γ diminui a inflamação nos macrófagos ativados por interferir com a via de sinalização do NF- κ B e

também influencia a expressão gênica por efeitos na morfologia dos adipócitos, porque os adipócitos menores secretam menos marcadores inflamatórios comparado com os adipócitos maiores ⁹¹.

Os agonistas do PPAR γ promovem um aumento nas concentrações plasmáticas de adiponectina, um hormônio secretado pelo tecido adiposo que aumenta a oxidação de ácidos graxos no fígado e músculo esquelético. No geral, a adiponectina aumenta a sensibilidade à insulina no fígado e músculo esquelético e diminui a produção de glicose no fígado, resultando na diminuição dos níveis circulantes de glicose, ácidos graxos livres e triglicerídeos ⁹² (Fig. 3).

Embora as TZDs sejam potentes sensibilizadores da insulina que melhoram eficientemente o controle glicêmico nos pacientes com diabetes mellitus tipo II, seu uso na prática clínica tem sido restrito devido à efeitos adversos que incluem risco aumentado de fraturas ósseas, ganho de peso, edema, hemodiluição e risco de falência cardíaca ⁸⁹. A troglitazona e a rosiglitazona foram retiradas do mercado devido a um aumento de incidentes hepatotóxicos ⁹³ e aumento de risco cardiovascular ⁹⁴, respectivamente. Somente a pioglitazona está disponível para uso clínico, mas seu risco-benefício está sendo reavaliado devido supostamente à um risco aumentado de desenvolver câncer de bexiga ⁹⁵. Com o intuito de minimizar os efeitos adversos causados pela ativação total de um isotipo, foram desenvolvidos alguns pan-agonistas do PPAR que ativam simultaneamente o PPAR α , PPAR β e PPAR γ , mas muitos desses compostos foram descontinuados devido à efeitos adversos como carcinogênese em roedores, aumentos de riscos cardiovasculares ou aumento na creatinina plasmática ⁹⁶.

Figura 3 – Mecanismo de ação das TZDs. A ativação do PPAR γ pelas TZDs no tecido adiposo promove a captação de lipídios e armazenamento de triglicerídeos. Os FFA são captados pelo tecido adiposo branco e sequestrados por outros tecidos (fígado, músculo esquelético), onde o seu acúmulo leva ao bloqueio da sinalização da insulina (“hipótese do roubo de lipídios”). O PPAR γ também controla a produção de moléculas sinalizadoras produzidas pelos adipócitos, chamadas de adipocinas, incluindo o hormônio sensibilizador da insulina, adiponectina. As TZDs também ativam diretamente o PPAR γ em macrófagos, levando a um fenótipo antiinflamatório M2 e diminuindo a infiltração de macrófagos no tecido adiposo branco. No fígado, as TZDs parecem ativar diretamente o PPAR γ nas células parenquimais do fígado esteatótico e/ou células de Kupfer ou estelares, reduzindo a inflamação e fibrose. As TZDs também reduzem a aterosclerose por interferirem com a ação do PPAR γ nos macrófagos, VSMCs e ECs. EC, célula endotelial; FFA, ácido graxo livre; IL-6, interleucina-6; MCP-1, proteína-1 quimioatraente de monócito; TG, triglicerídeos; TNF α , fator de necrose tumoral α ; VSMC, células vasculares de músculo liso (Adaptado de ⁸⁹).

1.6 Ações antiinflamatórias do PPAR γ

Além do seu valor terapêutico no tratamento do diabetes mellitus tipo II e devido as suas ações antiinflamatórias, os agonistas do PPAR γ estão sob investigação para o tratamento de outras condições, incluindo aterosclerose ⁹⁷, psoríase ⁹⁷, colite inflamatória ⁹⁸⁻¹⁰⁰, artrite ¹⁰¹ e doenças inflamatórias intestinais ¹⁰². Os efeitos inibitórios do PPAR γ na inflamação incluem redução da atividade transcricional do NF- κ B, redução da produção de moléculas pró-

inflamatórias nos linfócitos T, promoção da expressão de mediadores antiinflamatórios no sistema imune inato e inibição de genes codificadores de moléculas pró-inflamatórias em macrófagos ¹⁰³. Dentre os PPARs, o PPAR γ foi o primeiro reportado a sofrer sumoilação dependente de ligante, o que promove a ligação ao correpressor NCoR e estabiliza a sua associação com o promotor dos genes alvo do NF-kB, levando a transrepressão dos genes inflamatórios ⁴⁹.

Além disso, a redução da inflamação pode representar um importante objetivo para tratar doenças oculares como retinopatia diabética, doenças retinoproliferativas, doença do olho seco e neovascularização, as quais prejudicam a clareza visual. Na córnea, a expressão do PPAR γ é mais proeminentemente localizada nas camadas epiteliais e endoteliais ¹⁰⁴ e foi demonstrado que os ligantes do PPAR γ inibem a neovascularização coroidal ¹⁰⁵ e da córnea ^{106, 107} *in vivo*. Além disso, eles são potentes inibidores da angiogênese *in vitro* e *in vivo* ¹⁰⁶. A ativação do PPAR γ por metabólitos endógenos formados em resposta a severas injúrias na córnea em camundongos melhora a resposta à cicatrização, já que sua super-expressão reduz a inflamação e a ocorrência de fibrose ¹⁰⁸. Além de promover o controle da glicemia, os ligantes do PPAR γ podem ter valor terapêutico no tratamento da retinopatia diabética ^{109, 110}.

Alguns ligantes como AINEs, ácido araquidônico e seus metabólitos, podem ativar o PPAR α e PPAR γ ^{54, 111}, possuem atividade terapêutica em vários modelos murinos de doenças inflamatórias e autoimunes ⁴⁶. O PPAR γ possui ações antiinflamatórias por inibir a produção de citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF α em macrófagos ^{103, 112}, óxido nítrico sintase induzida e gelatinase B em resposta à ligantes sintéticos. Foi demonstrado que os ligantes do PPAR α inibem a sinalização da IL-1 como um resultado da repressão do NF-Kb, o que resulta na diminuição da produção da citocina inflamatória IL-6 e prostaglandinas em células de músculo liso ¹¹³.

1.7 Novas abordagens terapêuticas

O PPAR γ possui dois efeitos metabolicamente distintos: a promoção da adipogênese e a melhora na sensibilidade à insulina. A obesidade é um dos fatores de risco mais comuns para o diabetes tipo II. As observações de vários efeitos adversos associados ao uso de TZDs durante o tratamento do diabetes tipo II despertaram o interesse no desenvolvimento de novos

agonistas do PPAR γ desprovidos desses efeitos adversos, como agonistas parciais e moduladores seletivos.

O conceito de moduladores seletivos do PPAR γ (SPPAR γ M) é baseado nas interações do agonista, ou seja, é uma abordagem farmacológica baseada nas interações específicas do ligante-receptor/cofator e regulação de genes alvo com o potencial de induzir efeitos favoráveis no metabolismo de glicose sem os efeitos adversos, portanto, oferecem novas perspectivas terapêuticas na prevenção e tratamento do diabetes tipo II ^{114, 115}. Os compostos MBX-102 e INT131 são os compostos mais avançados nesse sentido, com dados promissores em modelos de roedores diabéticos. Tem sido demonstrado que o INT131 reduz a glicemia de jejum em pacientes diabéticos ¹¹⁶. A seletividade observada para alguns SPPARMs a nível fisiológico pode resultar não somente do recrutamento seletivo de cofatores, mas da ativação parcial do receptor devido à diminuição da afinidade por cofatores ⁷³. Os esforços intensos para descobrir SPPAR γ Ms com melhores perfis farmacológicos podem proporcionar o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de ativação do PPAR nos próximos anos.

Outras alternativas, como compostos que bloqueiam a fosforilação do PPAR γ mediada pela CDK5 do PPAR γ podem constituir uma nova classe de ligantes ^{77, 117}. A resistência à insulina relacionada à obesidade está associada com um aumento da taxa de fosforilação do PPAR γ na S273 pela CDK5. Essa fosforilação reduz a capacidade de sensibilização da insulina mediada pelo PPAR γ sem alterar sua capacidade adipogênica. O tratamento de ratos obesos com rosiglitazona reduziu a fosforilação do PPAR γ mediada pela CDK5 ¹¹⁷. Essas opções abrem perspectivas para o desenvolvimento de novas classes de sensibilizadores da insulina.

Salvador Dalí

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

O PPAR γ é um receptor nuclear de extrema importância farmacológica, envolvido em vários processos metabólicos no organismo, que abrangem desde diferenciação e proliferação celular, inflamação e controle do metabolismo energético. Sendo assim, ele representa um importante alvo terapêutico para o tratamento de diversas doenças metabólicas como diabetes tipo II, aterosclerose, doenças inflamatórias e câncer. No que se refere a farmacoterapia atual para o tratamento do diabetes tipo II com ação direta no PPAR γ , o surgimento de vários efeitos adversos relacionados aos agonistas totais desse receptor resultou na retirada do mercado do fármaco troglitazona, restringiu o uso da rosiglitazona, restando somente disponível para uso clínico o fármaco pioglitazona e a busca por novos agonistas é necessária.

Em termos estruturais, o bolsão de ligação do PPAR γ é uma ampla cavidade hidrofóbica, que permite que uma grande variedade de ligantes possam se ligar e ativar o receptor. Essa característica também abre a possibilidade de ser permissivo à ligação de fármacos desenvolvidos para outros alvos farmacológicos, como os AINEs, representando assim outro mecanismo de ação para esses compostos e por isso que mais estudos para esclarecer esses mecanismos são necessários.

O descobrimento de mutações genéticas no PPAR γ que prejudicam a função desse receptor nuclear causando profundas alterações metabólicas evidenciam a importância do PPAR γ para o organismo e são necessários mais estudos para esclarecer como as mutações prejudicam a função desse receptor.

Mediante o exposto, esta tese está dividida em capítulos, conforme descrito a seguir:

- **CAPÍTULO 3:** *Estudos funcionais e estruturais do PPAR γ complexado com a luteolina.* O objetivo deste trabalho foi estudar compostos naturais que possam ser utilizados como uma abordagem complementar ao tratamento do diabetes mellitus tipo II e estudá-los funcionalmente e estruturalmente. A determinação da estrutura cristalográfica permite que se determine a base estrutural de interação dos receptores com seus respectivos ligantes e, portanto, é crucial para desenvolvimento racional de agonistas do receptor, os quais possuem grande potencial farmacológico.

- CAPÍTULO 4: *Estudos funcionais e estruturais do PPAR γ com AINEs*. O objetivo deste trabalho foi realizar testes de transativação celular, ensaios de diferenciação de adipócitos e resolução das estruturas cristalográficas com os AINEs, para esclarecer seu modo de ligação e efeitos mediados pelo PPAR γ .
- CAPÍTULO 5: *Estudos funcionais e estruturais dos mutantes envolvidos na Síndrome de Resistência aos Ligantes do PPAR γ* . O objetivo desta parte do trabalho foi realizar ensaios funcionais e resolver as estruturas cristalográficas dos mutantes buscando compreender os mecanismos envolvidos nessa síndrome.

Os objetivos específicos foram:

- Conduzir ensaios de transativação celular PPAR γ pela luteolina e AINEs e dos mutantes F360L, P467L, V290M e R397C com a rosiglitazona
- Realizar ensaios de diferenciação de adipócitos com a luteolina e AINEs e ensaios de expressão gênica em adipócitos tratados com esses ligantes
- Expressar e purificar o LBD do PPAR γ e dos mutantes por cromatografia de afinidade e gel filtração
- Conduzir ensaios de co-cristalização do LBD do PPAR γ e dos mutantes com ligantes naturais e sintéticos
- Determinar a estrutura cristalográfica desses complexos
- Analisar o modo de ligação dos ligantes ao PPAR γ e a estrutura cristalográfica do mutante V290M

Salvador Dalí

CAPÍTULO 3

ESTUDOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DO PPAR γ LBD COM A LUTEOLINA

CAPÍTULO 3

ESTUDOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DO PPAR γ LBD COM A LUTEOLINA

3 INTRODUÇÃO

3.1 Compostos naturais como fontes de ligantes de PPAR γ

As observações clínicas de que o uso de TZDs estão associado a vários efeitos adversos, como por exemplo, ganho de peso, aumento da adipogênese, retenção renal de fluidos e expansão do volume plasmático e também possível aumento de incidência de problemas cardiovasculares^{94, 118}, levaram ao desenvolvimento de moduladores seletivos do PPAR γ (SPPARMs) que atuam como sensibilizadores da insulina, porém não promovem ou diminuem a adipogênese em modelos animais de diabetes tipo II^{114, 115, 119}. Ao contrário dos agonistas totais, os SPPARMs não se ligam e não estabilizam diretamente a hélice AF-2 que faz parte do bolsão de ligação de coativadores no LBD. Isso implica em uma diminuição da estabilidade conformacional, interações diferentes entre o receptor e o coativador, atenuação da atividade transcricional, resultando em uma melhor tolerabilidade observada em testes pré-clínicos com esses ligantes^{114, 120, 121}.

Novas abordagens terapêuticas, como o uso de nutracêuticos com a propriedade de melhorar a sensibilidade à insulina, têm sido consideradas como alternativas complementares para o tratamento do diabetes tipo II. Dentro desse contexto destacam-se os compostos naturais obtidos de plantas e ervas. Os flavonóides são um grupo de fenilbenzopironas encontrados em abundância em vegetais, frutas, sementes, flores, vinho tinto e chás. Os flavonóides possuem propriedades antiinflamatórias¹²², anticancerígenas¹²³ e antioxidantes¹²⁴. Alguns flavonóides (flavonas, flavonóis e isoflavonas) são capazes de ativar o PPAR γ , inibir a proliferação celular em cultura de células e possuem efeitos antiadipogênicos.

A luteolina (3',4',5,7-tetrahidroxiflavona) (Fig. 4) é um flavonóide que está presente em plantas medicinais e em algumas espécies vegetais geralmente na forma glicosilada e é encontrada em altas concentrações no aipo, pimenta verde e camomila. A luteolina possui atividade antioxidante^{125, 126}, anti-inflamatória¹²⁷, antimutagênica¹²⁸, antitumorigênica¹²⁹ e pode atuar na regulação dos níveis plasmáticos de glicose¹³⁰. Além disso, a luteolina

apresenta uma atividade antiinflamatória específica em concentrações micromolares, as quais são parcialmente explicadas por seu efeito antioxidante ¹³¹. Diferentes estudos sugeriram que a luteolina pode atuar tanto como um agonista do PPAR γ por aumentar a expressão de genes alvos em adipócitos, quanto como antagonista, por inibir a adipogênese e a expressão de genes alvos dependentes de PPAR γ em outros contextos.

O fato de que o modo de ação da luteolina não estar claro, nos levou a determinar o mecanismo de interação da luteolina com o PPAR γ e a relevância biológica de seus efeitos em um modelo de resposta inflamatório em células epiteliais da córnea (HCEC).

Figura 4 - Estrutura química da luteolina.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Ensaios de transativação celular

Os ensaios de transativação se baseiam no potencial dos receptores nucleares em ativar a transcrição em resposta à ligação de um ligante. Isso é alcançado pela transfecção de uma linhagem celular com um vetor contendo o gene do receptor a ser estudado, e um vetor contendo um gene repórter que possui um sítio de ligação para o receptor. Após a ligação do ligante ao receptor, o receptor irá se ligar a esse sítio de ligação e ativar a transcrição do gene repórter. O gene repórter codifica uma proteína, que quando é adicionada a seu substrato libera um produto que pode ser quantificado. Esses ensaios são muito utilizados na identificação de ligantes de receptores nucleares. Para realização dos ensaios de transfecção celular foram utilizadas células HepG2 cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) contendo 2 mM de glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 μ g de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino em placas para cultura de tecidos 25 cm². As

culturas foram mantidas em incubadoras a 37°C e com 5% de CO₂. Para os ensaios, foram utilizados os plasmídeos pBIND contendo o gene do PPAR γ -LBD e DBD-Gal4, o plasmídeo contendo o gene repórter da luciferase pGRE-LUC (*GAL4 responsive element, Firefly luciferase reporter vector*), os quais foram cedidos pelo Dr. Paul Webb (*The Methodist Hospital Research Institute, Houston, EUA*). Para o controle da transfecção, foi utilizado o plasmídeo pRL-TK, que contém a sequência gênica que codifica para a luciferase de *Renilla* (*Dual-Luciferase Report Assay system* Promega, Madison, WI). As células foram retiradas da garrafa de cultivo após a adição de tripsina, ressuspensas em meio DMEM e distribuídas em placas de 24 poços (1,2x10⁵ células/poço). Para a transfecção foi utilizada lipofectamina, porque ela forma micelas que englobam o DNA a ser transfectado, ajudando assim a penetrar na membrana celular. A lipofectamina (FuGENE 6, Roche) foi adicionada à 50 ng do plasmídeo pGRE-LUC, 100 ng do PPAR γ LBD-Gal4 e 1 ng do pRL contendo o gene da luciferase de *Renilla* na proporção de 1:3 de DNA (μ g) para lipofectamina (μ l) e essa suspensão foi mantida a temperatura ambiente por 20 min e posteriormente adicionada a cultura celular. As culturas foram mantidas a temperatura de 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas, e após esse período os ligantes foram adicionados nas concentrações de 10⁻⁹ a 10⁻⁵ M e a cultura mantida nas mesmas condições por mais 22 h. A porcentagem de DMSO não ultrapassou 0,01%. As células foram lavadas com tampão PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) e rompidas com tampão comercial de lise (*Dual-Luciferase Report Assay system* Promega, Madison, WI). As atividades das luciferases foram determinadas adicionando-se luciferina (*Luciferase Assay System*, Promega, Madison, EUA) e quantificadas em um contador luminescente (Tecan, Tecan US, NC, EUA). A atividade da luciferase de *Renilla* foi determinada utilizando-se o mesmo lisado e utilizada como um controle interno da transfecção para ajustar as variações causadas pelas diferentes eficiências de transfecção e número de células por poço. As curvas dose-resposta para cada ligante testado foram plotadas e foi calculado o valor de EC₅₀, que se refere à concentração do ligante necessária para alcançar 50% da ativação máxima do receptor, proporcionando assim uma medida de potência da molécula testada.

3.2.2 Expressão do domínio LBD do PPAR γ

O plasmídeo pET28a(+) (Novagen) contendo a sequência que codifica o PPAR γ LBD humano (aminoácidos L204 a Y477), fusionado a uma cauda de histidinas no C-terminal, foi

utilizado para transformar bactérias competentes *Escherichia coli* BL21 (DE3). As colônias foram semeadas e selecionadas em placas de petri contendo meio LB-ágar [Luria Broth; 1,6% (p/v) triptose, 1% (p/v) extrato de levedura, 0,5% (p/v) NaCl] adicionada de 50 µg/ml de canamicina e utilizadas para inocular culturas de meio LB suplementada com o mesmo antibiótico. Essas culturas foram crescidas a 37°C por 16 h e utilizadas para inocular 6 litros de LB contendo canamicina (50 µg/ml) a uma diluição de 1:200. O cultivo foi mantido a uma temperatura de 37°C sob agitação (200 rpm) até D.O.₆₀₀ (Densidade ótica medida à 600 nm) de 0.8-1.0 e a indução foi realizada adicionando-se 1 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) mantidos a 18°C por 16 h. Após esse período, os cultivos de bactérias foram centrifugados a 4300 g por 20 min a 4°C e os sobrenadantes descartados. O domínio LBD do PPARγ foi purificado a partir da fração solúvel do lisado celular.

3.2.3 Purificação do domínio LBD do PPARγ

As células frescas, obtidas de 6 L de cultivo, foram ressuspensas em tampão de lise [(20 mM Tris- HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 1 mM Fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) and 1 mM β-mercaptoetanol)] e a seguir foi adicionado 0,2 mg/mL de lisozima, mantidas em banho de gelo por 1 h e posteriormente rompidas por sonicação. A fração solúvel foi separada por centrifugação a 13000 g durante 60 min a 4°C e o PPARγ LBD foi purificado por cromatografia de afinidade. Para isso, o sobrenadante foi adicionado à uma resina *Talon Superflow* (Clontech) que apresenta íons de cobalto imobilizados, previamente equilibrada com tampão de lise. A resina foi lavada com tampão de lise contendo 5 mM e 10 mM de imidazol. A eluição da proteína da resina de afinidade foi realizada com um gradiente de imidazol (30 a 500 mM). As amostras obtidas foram analisadas em SDS-PAGE 15%, visualizado através de coloração com 0,25% *Coomassie Blue*. A cauda de histidina proveniente do vetor pET28a(+) foi removida utilizando a serino-protease trombina, de fonte bovina (Sigma-Aldrich), adicionada na razão de 10 U/mg de proteína por 12 horas a 8 °C, restando os aminoácidos GSH provenientes do vetor e a sequência do LBD aminoácido L204 a Y477.

3.2.4 Purificação por gel filtração

A proteína foi submetida a uma etapa adicional de purificação por cromatografia de exclusão molecular em sistema de purificação AKTA (AKTA Basic; General Electrics), utilizando-se a coluna preparativa Superdex 200 16/60 (GE Healthcare) previamente lavada e equilibrada com tampão contendo 20 mM TRIS-HCl pH 8.0, 1 mM DTT, 100 mM NaCl e 5% glicerol. Em cada corrida, foram injetados 5 ml de proteína e as amostras foram eluídas da coluna de gel filtração com um fluxo de 1 mL/min. As frações contendo o PPAR γ _LBD foram concentradas a 10 mg/mL em concentradores de corte de 10 kDa (Amicon Ultra 10 kDa MWCO, Millipore) e armazenadas a - 80°C. A pureza da proteína foi analisada por SDS-PAGE 15%, visualizado através de coloração com *Coomassie Blue*. A concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad) utilizando-se uma curva padrão de albumina bovina ¹³².

3.2.5 Ensaios de cristalização

A cristalização de proteínas é um processo de múltiplos parâmetros, que envolve os três passos clássicos da cristalização, que são: nucleação, crescimento e cessação de crescimento ¹³³. Para a realização dos experimentos de cristalização do PPAR γ com ligantes naturais e sintéticos foi utilizada a técnica de co-cristalização, na qual foi preparado inicialmente uma solução estoque de 100 mM dos ligantes dissolvidos em DMSO. Em seguida, dissolveu-se esses estoques para uma concentração final de 1 a 3 mM adicionados diretamente na proteína (322 μ M) e mantidos a 4°C durante 12 horas. Após esse período, a solução foi centrifugada por 2 min a 10000 g para eliminar eventuais precipitados. O complexo proteína-ligante foi submetido à cristalização pelo método da gota pendurada, utilizando-se como precipitante Citrato de sódio 0,75 – 1,3 mM, HEPES 100 mM, pH 7,0-8,0 e mantidos na temperatura de 18° C. Nessa técnica uma pequena gota de proteína é misturada com um volume igual ou similar de solução de cristalização (formada usualmente por tampão, sal e precipitante) e colocada sobre uma lamínula siliconizada. A lamínula é invertida e selada sobre um reservatório contendo uma solução de cristalização. A diferença de concentração entre a gota e o reservatório direciona o sistema no sentido de um equilíbrio de concentração entre a gota e a solução do reservatório ¹³³.

3.2.6 Coleta e processamento dos dados de difração de raios-X

Previamente à coleta de dados, os cristais foram colocados em uma solução crioprotetora, com a mesma composição da solução do reservatório na qual cresceram os cristais, adicionadas de 15% (v/v) de etilenoglicol e rapidamente resfriados em uma fluxo de nitrogênio gasoso a -180°C . Os dados de difração de raios-X foram coletados na linha de luz de cristalografia de proteínas MX2 ¹³⁴ no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil) com sistema de aquisição detector Marmosaic-225 CCD (MarUSA), utilizando-se um comprimento de onda de 1,4586 Å. As estratégias de coleta foram realizadas com o programa iMosflm ¹³⁵, sendo que nessa etapa foi realizada a indexação das imagens para determinar a orientação do cristal e os parâmetros de cela (as dimensões da cela unitária a , b , c e os ângulos α , β e γ) e a escolha do grupo espacial baseado no sistema de maior simetria e menor penalidade, além de estimar a mosaicidade. Esse passo é necessário para planejar uma estratégia eficiente de coleta de dados analisando-se o tempo de exposição, ângulo de oscilação, distância da placa ao detector e número de imagens coletadas para obter a completeza necessária de acordo com o grupo espacial.

O processamento do conjunto também foi realizado com o programa iMosflm ¹³⁵, sendo que nessa etapa foram realizados o refinamento da cela unitária e a integração das imagens de difração, que consiste em quantificar a intensidade de cada ponto de difração, resultando em uma lista de índices de Miller com a intensidade de cada reflexão individual medida. Após o processamento, a redução dos dados foi efetuada com o programa SCALA do pacote CCP4 ¹³⁶, que consiste em agrupar as intensidades das reflexões equivalentes relacionadas por simetria e escaloná-las buscando corrigir diferenças nas intensidades devido à variação da radiação incidente e absorção de raios difratados, por exemplo. Após o escalonamento, o número de moléculas na unidade assimétrica e o conteúdo de solvente foram estimados com o programa Matthews_coef ¹³⁶.

3.2.7 Determinação da estrutura cristalográfica e refinamento

As estruturas foram determinadas pela técnica de substituição molecular utilizando o programa PHASER do pacote CCP4 ¹³⁷ e a estrutura do PPAR γ _LBD depositado no PDB sob o código 1PRG ⁸ como modelo. Essa técnica baseia-se na utilização de um modelo estrutural

de uma proteína com identidade sequencial geralmente de 30% ou maior, que é rotacionado e transladado na cela unitária até que se encontre uma solução com o melhor ajuste entre os dados de difração calculados a partir do modelo inicial e os dados observados da estrutura desconhecida. Os programas PHENIX e COOT foram utilizados alternadamente para realizar ciclos de refinamento e construção do modelo¹³⁷⁻¹³⁹. O refinamento do modelo cristalográfico tem por objetivo buscar um modelo que se aproxime ao máximo da estrutura real e é acompanhado através da minimização da função $R = \sum_{hkl} |F_{obs} - F_{calc}| / \sum_{hkl} |F_{obs}|$, que busca uma concordância entre os fatores de estrutura observados experimentalmente (F_{obs}) e os fatores de estrutura calculados a partir do modelo contruído (F_{calc}) para cada reflexão hkl . Antes do refinamento, uma pequena porcentagem das reflexões (~ 5%) é separada e excluída dos refinamentos subsequentes e a concordância entre os dados experimentais e o modelo é calculado separadamente para o conjunto trabalho (R_{factor}) e o conjunto com reflexões excluídas do refinamento (R_{free}). A validação da estrutura cristalográfica foi realizada pelo programa Molprobit¹⁴⁰.

3.2.8 Cultura de células e ensaio de diferenciação de adipócitos

Para os ensaios de diferenciação de adipócitos foram utilizadas células murinas 3T3-L1, que possuem uma morfologia de fibroblastos, mas que em condições apropriadas são diferenciadas a adipócitos. As células foram cultivadas a 37 °C e 5% de CO₂ em meio DMEM, com alta concentração de glicose, HEPES pH 7,4, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram diferenciadas a adipócitos como descrito¹⁴¹. Brevemente, após confluência, as células foram mantidas em meio DMEM/Ham's F-12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, dexametasona 1 µM, 3-isobutil-1-metilxantina 0,5 mM e insulina 167 nM (DMI) e 1 µM de rosiglitazona durante 3 dias. Para avaliar os efeitos da luteolina sobre a diferenciação de adipócitos induzida pela rosiglitazona, foram adicionados 5 µM, 10 µM ou 20 µM concomitantemente com 1 µM de rosiglitazona de luteolina durante os 3 primeiros dias de diferenciação. Após 3 dias, o meio foi trocado e as células foram mantidas em meio DMEM/F12 suplementado com soro fetal bovino, insulina e dexametasona. No oitavo dia de diferenciação, as células foram coradas com o corante *Oil Red O* (Sigma Aldrich) para avaliar a adipogênese. Nesse procedimento, as células foram lavadas com

tampão PBS três vezes e fixadas com formalina a 10% (v/v) em tampão PBS durante 1 hora. Após a fixação, as células foram lavadas duas vezes com tampão PBS e coradas com solução de *Oil Red O* (0,3 % em isopropanol 60 %) durante 20 minutos. Após a coloração, foram lavadas três vezes com PBS e então fotografadas ¹⁴¹.

3.2.9 PCR em tempo real quantitativo (RT-PCR)

Para as análises de expressão gênica, as células foram diferenciadas conforme descrito no item anterior, utilizando-se o meio DMI sem adição de rosiglitazona e no oitavo dia de diferenciação as células foram submetidas aos seguintes tratamentos: (a) DMSO; (b) luteolina 10 μ M, (c) luteolina 20 μ M, (d) rosiglitazona 1 μ M, (e) luteolina 20 μ M e rosiglitazona 1 μ M durante 24 h. Após esse período, o RNA total foi extraído utilizando-se o *Aurum Total RNA Fatty and Fibrous Kit* (BioRad), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído (160 ng) foi utilizado como molde para a síntese de cDNA utilizando-se oligonucleotídeo iniciadores (*primers*) de hexâmeros randômicos e o *Kit SuperScript III First-Strand Synthesis System* para RT-PCR (Invitrogen). O RT-PCR foi realizado utilizando-se o fluoróforo *SYBR Green PCR Master Mix* (Roche) e os *primers* específicos para os β -actina, proteína α potenciadora da ligação a CCAT (CEBP α), lipoproteína lipase (LPL), receptor de LDL oxidada 1 (OLR1) descritos abaixo (Tabela 1). Para a análise de expressão do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4), as reações de RT-PCR foram realizadas com o *Kit TaqMan LightCycler 480 Probes Master Mix* (Roche) e *primers* padrão fornecidos pela *Applied Biosystems*. A expressão relativa do RNAm foi determinada pela normalização com os níveis de expressão da β -actina, utilizando-se o método $\Delta\Delta C_t$, que consiste na determinação do número de ciclos no qual o produto do PCR atinge um limite de fluorescência detectável (*Threshold Cycle*) ou ciclo de aparecimento de fluorescência ótima para medição ¹⁴². Esta normalização é feita com o objetivo de corrigir as flutuações de fluorescência causadas pelos erros de concentração no volume de amostra e é calculada pela divisão da intensidade de fluorescência obtida pela amplificação do gene alvo pela emissão obtida para o gene constitutivo β -actina. Os resultados foram considerados significativos se os valores de p foram menores que $p < 0,05$ pelo *Students-t-test*.

Tabela 1 - *Primers* utilizados para ensaios de expressão gênica por PCR em tempo real

Gene	Forward 5'- 3'	Reverse 5'- 3'
<i>β-actina</i>	GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	GCCGGACTCATCGTACTCC
<i>CEBPa</i>	GCGGGAACGCAACAACATC	GTCCTGGTCAACTCCAGCAC
<i>LPL</i>	GCTGGGCCTAACTTTGAGTAT	AAATCAGCGTCATCAGGAGAA
<i>OLRI</i>	CTGCACTCCTTCTTCCCTTT	GCCTGCACTTGAGGAGGATTT

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Ensaios de transativação celular – Luteolina é um agonista parcial

Foram realizados ensaios de transativação celular para avaliar a capacidade da luteolina ativar o PPAR γ em colaboração com a doutoranda Amanda Bernardes (Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo). Os ensaios de transativação baseiam-se no potencial dos receptores nucleares em ativar a transcrição em resposta à ligação de um ligante. Nos ensaios realizados nesse estudo utilizou-se um sistema de transativação que é composto pelo DBD do Gal4, o LBD do PPAR γ e o vetor do gene repórter contendo vários sítios de alta afinidade para o Gal4 (também chamados UAS, *upstream activating sequence*) na frente de um promotor potente ligado ao gene repórter. Esse tipo de sistema quimérico foi utilizado para minimizar as interferências de receptores endógenos. Para os ensaios, células HepG2 foram transfectadas com o plasmídeo contendo a construção PPAR γ /Gal4 e o plasmídeo contendo o elemento responsivo do Gal4 acoplado ao gene repórter da luciferase. As células foram tratadas com os ligantes de interesse e a potência relativa da luteolina foi determinada por uma curva dose-resposta calculando-se o EC50.

Através desses ensaios, observou-se que a luteolina ativa o PPAR γ de forma moderada e pode antagonizar a ativação da rosiglitazona de maneira dose-dependente. A luteolina é capaz de ativar o receptor 5 vezes em comparação com o veículo DMSO. Por outro lado, a luteolina diminui aproximadamente 4 vezes a ativação causada pela rosiglitazona nos ensaios de competição (Fig. 5A). A figura 5B mostra a curva dose-resposta para a luteolina em que a mesma é capaz de ativar o PPAR γ de maneira dose-dependente com EC50 de 15,6 μ M. Na presença de 1 μ M de rosiglitazona, a luteolina atua como um competidor e pode efetivamente antagonizar os efeitos da rosiglitazona, também de maneira dose-dependente e com IC50 de

21,8 μM (Fig. 5B). As concentrações maiores que 50 μM não puderam ser testadas porque começaram a ser tóxicas para as células, o que foi constatado pelo ensaio de viabilidade celular pelo método MTT ¹⁴³ (dados não mostrados). A atividade máxima alcançada pela luteolina foi de 35% da observada para o agonista total rosiglitazona, sendo considerado por esse motivo um agonista parcial.

Figura 5- Ensaio de transativação do PPAR γ /GAL4, realizado com diferentes concentrações de luteolina e modos de ativação com a rosiglitazona. (A) Gráfico mostrando a taxa de ativação da luciferase em função do aumento da concentração de luteolina. (B) Curva dose-resposta para o cálculo de EC50. Ambos os gráficos estão mostrando a ativação da luteolina e a competição de 1 μM de rosiglitazona com a adição de luteolina. Todos os ensaios foram realizados em três replicatas e as diferenças nas eficiências de transfecções foram normalizados pela medida da atividade da luciferase de *Renilla* no mesmo lisado celular.

3.3.2 Luteolina regula a expressão de genes alvos em células 3T3-L1 e inibe a diferenciação induzida pela rosiglitazona

Foram realizados experimentos de PCR em tempo real para determinar se a luteolina regula a expressão de genes alvos do PPAR γ em células 3T3-L1 diferenciadas a adipócitos. No 8º dia de diferenciação, as células foram tratadas com DMSO, luteolina (10 μM e 20 μM), rosiglitazona (1 μM) ou a combinação dois dois ligantes (rosiglitazona 1 μM + luteolina 20 μM). Como controle negativo, foram utilizadas células tratadas somente com meio DMEM. Após 24 h do tratamento com os ligantes, o RNAm foi extraído e utilizado para sintetizar o cDNA e a expressão dos genes LPL, ORL1 CEBP α and GLUT4 foram determinados por PCR em tempo real.

Como esperado, nas células tratadas com rosiglitazona houve a indução de genes que regulam a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos, diferenciação

celular e transportadores de glicose, como o LPL, ORL1, CEBP α and GLUT4¹⁴⁴⁻¹⁴⁷ (Fig. 6), enquanto a luteolina reprimiu ativamente a expressão dos genes LPL e ORL1 (Fig. 6A, 6B) e não afetou a expressão do gene CEBP α (Fig. 6C). Entretanto, a luteolina aumentou a expressão do transportador de glicose GLUT4 de modo similar a rosiglitazona (Fig. 6D). Quando a expressão desses genes foram avaliados na presença dos dois ligantes, foi observado que 20 μ M de luteolina foi capaz de inibir parcialmente os efeitos da rosiglitazona na expressão dos genes LPL, ORL1 e CEBP α , enquanto que o nível de expressão do GLUT4 foi similar ao encontrado para rosiglitazona ou luteolina separadas (Fig. 6). Portanto, a luteolina modula a expressão gênica de maneira diferente da rosiglitazona, inibindo a expressão de genes relacionados à diferenciação de adipócitos e metabolismo de lipídios, mas apresenta uma característica importante desejável para os SPPARMs, que é o aumento da expressão do transportador de glicose GLUT4 de maneira semelhante à rosiglitazona.

Figura 6 - PCR quantitativo e expressão relativa de RNAm dos genes (A) LPL; (B) ORL1; (C) CEBP α e (D) GLUT4. As células 3T3-L1 no 8º dia de diferenciação foram expostas aos seguintes tratamentos: controle, luteolina 10 μ M, luteolina 20 μ M, rosiglitazona 1 μ M, luteolina 20 μ M e rosiglitazona 1 μ M durante 24 h. Cada ponto representa a média dos experimentos realizados em triplicata $\pm$ desvio padrão (* P<0.05, ** P<0.01, ***P<0.001 em comparação com DMI).

Além dos efeitos da luteolina sobre a expressão gênica em adipócitos, também foi testado se ela era capaz de inibir os efeitos causados pela rosiglitazona na diferenciação de adipócitos. Para isso, as células 3T3-L1 foram tratadas com rosiglitazona 1 μM na ausência e presença de 5 μM , 10 μM e 20 μM de luteolina durante 3 dias após as células terem atingido a confluência. No 8º dia de diferenciação, as células foram coradas com o corante vermelho (*Oil Red*) para verificar o acúmulo de lipídeos. Como esperado¹⁴⁸, a rosiglitazona desencadeia uma diferenciação eficiente das células a adipócitos (Fig. 7) e esse efeito foi revertido pela luteolina de maneira dose-dependente.

Figura 7 - Ensaio de diferenciação das células 3T3-L1. As células 3T3-L1 foram diferenciadas a adipócitos com diferentes ligantes durante 3 dias e mantidas em meio contendo insulina por 8 dias. Os tratamentos incluíram rosiglitazona 1 μM , rosiglitazona 1 μM e 5, 10, ou 20 μM de luteolina.

3.3.3 Expressão e purificação do domínio LBD do PPAR γ

O PPAR γ LBD foi expresso em bactérias *E. coli* conforme descrito no item 3.2.2 e as proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade utilizando-se um gradiente de imidazol (Fig. 8). Após a purificação, as proteínas foram submetidas à clivagem da cauda de histidina com a enzima trombina por 14 h a 8°C. (Fig 8.)

Observou-se que as proteínas eluídas da coluna de afinidade apresentavam alguns contaminantes e para melhorar a purificação, as proteínas foram submetidas à uma etapa

adicional de gel filtração, na qual são separadas por tamanho (massa molecular). Para isso, foi utilizada uma coluna Superdex 200 16/60 em um sistema HPLC para a análise de quantidades preparativas de proteína.

Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 15% (SDS-PAGE) da purificação por afinidade do PPAR γ _LBD. 1: marcador de massa molecular, 2: sobrenadante do lisado celular após 16 h de indução com IPTG 1 mM a 18°C, 3: proteínas que não se ligaram na coluna de afinidade, 4 e 5: lavagens com 5 mM de imidazol, 6: lavagens com 10 mM de imidazol, 7: 30 mM de imidazol, 8: 60 mM de imidazol, 9: 100 mM de imidazol, 10: 300 mM de imidazol. 11: marcador de massa molecular 12: proteína não clivada, 13: proteína clivada.

A figura 9 mostra o perfil cromatográfico das proteínas purificadas por gel filtração, na qual o PPAR γ eluiu da coluna em um volume de 90 mL que corresponde à proteínas de massa de aproximadamente 30 kDa segundo a calibração da coluna com proteínas de massa molecular conhecidas (dados não mostrados). A pureza das amostras foi confirmada por SDS-PAGE 15% (Fig. 9 inserto). O rendimento da purificação foi de 35 mg/L de cultivo do PPAR γ . As proteínas foram concentradas até 10 mg/mL e armazenadas a -80°C para posterior utilização em ensaios de cristalização.

Figura 9 - Purificação das proteínas recombinantes por gel filtração. Perfil cromatográfico do PPAR γ _LBD. Após a purificação por afinidade, as proteínas foram concentradas e injetadas em uma coluna preparativa Superdex 200 16/60. As frações referentes ao pico de PPAR γ foram coletadas, concentradas e analisadas por SDS-PAGE (15%) (figura inserida).

3.3.4. Cristalização, coleta de dados e resolução da estrutura cristalográfica do PPAR γ LBD complexado com a luteolina

Para compreender as bases moleculares da ligação da luteolina ao PPAR γ , foram realizados ensaios de co-cristalização adicionando-se 1-3 mM de luteolina a 322 μ M do PPAR γ LBD e manteve-se esse complexo a 4°C por 12 h. Após esse período, o complexo foi centrifugado para eliminar eventuais precipitados e foi submetido à cristalização pelo método da gota pendurada utilizando-se como precipitante o Citrato de Sódio (0,75-1,3 M) e tampão Hepes 100 mM (pH 7,0, 7,5 e 8,0), que se trata de uma condição de cristalização bem descrita para PPAR γ ^{8, 149, 150}. Os cristais do PPAR γ complexado com a luteolina visivelmente melhor formados apareceram na condição de Citrato de Sódio 0,9 M e Hepes 100 mM pH 7,0 (Fig. 10) e foram submetidos a experimentos de difração de raios-X no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-Campinas).

Figura 10 - Cristais do PPAR γ complexado com a luteolina e padrão de difração dos cristais que cresceram na condição de Citrato de Sódio 0,90 M e Hepes 100 mM pH7,0.

Previamente à coleta de dados, os cristais foram colocados em uma solução crioprotetora com a mesma composição da solução em que houve o crescimento do cristal contendo 15% de glicerol. A coleta de dados foi realizada na linha MX-2 do LNLS utilizando-se um comprimento de onda de 1,4586 Å. A estratégia da coleta, indexação e integração dos dados foram realizadas utilizando o programa iMosflm¹³⁵ e a redução dos dados com o programa SCALA¹³⁷. As fases iniciais foram determinadas pela técnica de substituição molecular utilizando-se como modelo a estrutura 1PRG⁸ através do programa

PHASER, ambos os programas pertencentes ao pacote CCP4¹³⁷. Os refinamentos foram realizados alternando-se ciclos de refinamento no programa PHENIX¹³⁹ e a visualização e construção do modelo com o programa COOT¹³⁸. Os ligantes e as moléculas de água só foram incluídos nas etapas finais do refinamento e foram modelados com ocupância 1,0. As imagens da estrutura cristalográfica foram produzidas utilizando-se o programa Pymol (*The PyMOL Molecular Graphics System*, Versão 1.3 Schrödinger, LLC). A tabela 2 mostra os parâmetros referentes às estatísticas de coleta, processamento e refinamento dos dados de difração de raios-X do PPAR γ complexado com a luteolina.

Tabela 2 - Estatísticas cristalográficas: PPAR γ complexado com luteolina

Fonte	Síncrotron -1,4586 Å
Grupo Espacial	C2
Parâmetros da cela unitária (Å)	
a	92,26
b	62,15
c	119,13
β	101,67
Moléculas na unidade assimétrica	2
Resolução (Å)	31,08-2,3 (2,42-2,30)
Número de reflexões únicas	29570
R_{sym}	0,079 (0,474)
Multiplicidade	7,2 (7,1)
Completeza (%)	100 (100)
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	14,3 (3,7)
R_{factor} (%)	20,82
R_{free} (%)	22,54
B-fator médio(Å²)	44
rmsd comprimento de ligação (Å)	0,018
rmsd ângulos de ligação (°)	1,637
Ramachandran outliers	0
PDB	3SZ1

^a $R_{sym} = \sum_{hkl} \sum_j (|I_{hkl} - \langle I_{hkl} \rangle| / \sum_{hkl} \sum_j I_{hkl})$, onde I_{hkl} é o valor da intensidade para uma única reflexão dentro de um conjunto de reflexões simetricamente relacionadas, e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a média das intensidades para um conjunto j de reflexões simetricamente relacionadas. ^b $R_{factor}/R_{free} = \sum_{hkl} |F_{obs} - F_{calc}| / \sum_{hkl} |F_{obs}|$, onde F_{obs} e F_{calc} correspondem aos fatores de estrutura observados e calculados, respectivamente. Para o cálculo do R_{free} , foram utilizadas somente 5 % das reflexões omitidas do refinamento. Os valores entre parênteses se referem a camada mais externa das faixas de resolução.

A estrutura tridimensional do PPAR γ LBD complexado com a luteolina foi determinada a uma resolução de 2,3 Å e consiste de 12 α -hélices que formam um sanduíche de três camadas antiparalelas de α -hélices com 4 pequenas fitas β , como descrito anteriormente para outras estruturas do PPAR γ ^{8, 71, 151} (Fig. 6). A estrutura do PPAR γ com a luteolina apresentou boa geometria e nenhum resíduo foi observado nas regiões não permitidas do diagrama de Ramachandran (Tabela 2). A completeza obtida foi de 100% e obteve-se boa multiplicidade. O conjunto foi refinado a valores de R_{factor} 0,2082 e R_{free} 0,2254. O complexo cristalizou no grupo espacial monoclinico C2 e apresentou duas

moléculas na unidade assimétrica. Foi observado que a luteolina se liga ao bolsão de ligação da cadeia B do PPAR γ e também foi observado um segundo ligante, um ácido graxo de cadeia longa simultaneamente ligado a cadeia B, consistente com prévias demonstrações que o PPAR γ pode acomodar mais de um ligante em seu bolsão de ligação^{152, 153}. Na cadeia A também foram encontradas densidades eletrônicas para ácidos graxos. Os ácidos graxos não foram adicionados durante a co-cristalização e nós assumimos que eles foram co-purificados com a proteína, sendo provenientes das bactérias em que as proteínas foram expressas.

Para a identificação dos ácidos graxos ligados ao PPAR γ foram realizados experimentos de espectrometria de massas das gotas contendo cristais de luteolina em colaboração com o Dr. Daniel Saidenberg e o Prof. Mario Palma (Instituto de Biociências de Rio Claro, UNESP, Rio Claro-SP). As análises mostraram que as gotas contendo cristais continham o ácido mirístico (14:0), ácido palmítico (16:0) e o ácido esteárico (18:0) (dados não mostrados). A densidade eletrônica encontrada na cadeia B foi modelada com o ácido mirístico. Na cadeia A, embora tenha se observado densidades eletrônicas para dois ácidos graxos, elas não são bem definidas como na cadeia B. Portanto, embora a espectrometria de massas tenha mostrado que ácidos graxos de cadeia longa estão presentes nas amostras, só foi possível modelar somente ácidos graxos de até nove carbonos na cadeia A (Fig. 11).

Figura 11- Estrutura cristalográfica do PPAR γ complexado com a luteolina e ácidos graxos. A luteolina (colorida em azul) está localizada entre a hélice H3 a folha β . O ácido mirístico está colorido em amarelo e os ácidos graxos modelados na cadeia B com nove carbonos em laranja. A hélice 12 está colorida em rosa e a folha β está colorida em verde.

A estrutura do PPAR γ no grupo espacial C2 apresenta a hélice H12 em uma conformação fechada (ativa) na cadeia A e aberta na cadeia B (inativa) devido à um empacotamento cristalino da H12 que faz contato com os resíduos E471 e K301 da molécula simétrica, que são os resíduos de ancoragem (*charge clamp*), envolvidos na ligação do coativador⁸. A luteolina interage com o PPAR γ por ligações de hidrogênio entre a 3'OH do anel B e a cadeia lateral da H266 e com o grupo carbonila da cadeia principal da K265 e também pela 4'OH e a cadeia principal da K265 (Fig. 12A). Além disso, ela é estabilizada por contatos apolares com F264, G284, F287, C285, R288, L330, S342, I341, M364, V339 e também por contatos com o ácido graxo (Fig. 12A). O ácido mirístico interage com o PPAR γ por contatos polares entre o grupo carboxílico e a cadeia lateral da R288 e também por interações apolares com os resíduos S289, C285, L330, L333, M364, F363 e H449 (Fig. 12B). Na cadeia A, o ácido graxo localizado entre a H3 e a H5 faz contatos hidrofóbicos com E295, A292, R288, S289, C285, F226, M329, I326 e L330 (Fig. 12C), enquanto que o ácido graxo localizado entre a H3 e a fita β faz interações hidrofóbicas com G259, R280, I281, R288, S342 e I341 (Fig. 12D).

A cadeia A e a cadeia B foram sobrepostas para observar as diferenças causadas pela ligação da luteolina na cadeia B. Foi observado que a interação da luteolina com a K265 e a H266 estabiliza uma porção do Ω -loop (aminoácidos 260-268), para os quais não é observada densidade eletrônica na cadeia A. O Ω -loop está localizado na entrada do sítio ativo entre as hélices H2' e H3 e é uma região muito flexível e dinâmica do LBD. Essa região aparece desordenada em algumas estruturas do PPAR, sugerindo que a entrada do sítio ativo pode se adaptar permitindo que ligantes volumosos possam entrar no bolsão de ligação sem mudar significativamente a estrutura do LBD^{154, 155}. As interações da luteolina com a K265 e H266 são importantes para estabilizar essa parte da estrutura. A luteolina está localizada entre a hélice H3 e as fitas β (Fig. 11) e tem sido demonstrado que essa região é ocupada por agonistas parciais sintéticos¹⁴⁹. Neste trabalho foi obtida a estrutura do PPAR γ complexado com um ácido graxo e com o flavonóide luteolina, demonstrando que o bolsão de ligação do PPAR γ pode ser ocupado por ligantes diferentes ao mesmo tempo. O fato de dois ligantes diferentes poderem se ligar ao bolsão de ligação havia sido demonstrado anteriormente¹⁵³.

Figura 12 - Mapas de densidade eletrônica da luteolina e ácidos graxos ligados ao PPAR γ . (A) Interações da luteolina com o PPAR γ LBD na cadeia B. (B) Interações do ácido mirístico na cadeia B. (C e D) Interações dos ácidos graxos modelados com nove carbonos na cadeia A. Os mapas de omissão dos átomos de interesse (*omit map*) 2Fo-Fc está mostrado a um contorno de 1,0 σ para a área em torno dos ligantes. A luteolina está colorida em azul, o ácido mirístico em amarelos, e os ácidos graxos de nove carbonos em laranja. Os aminoácidos que interagem com os ligantes estão nomeados e mostrados como *sticks*. H12 está mostrada em rosa e as fitas β em verde.

3.3.5 A luteolina se liga ao PPAR γ de uma maneira diferente que as TZDs

Os agonistas totais como a rosiglitazona se ligam em uma conformação em forma de U com a cabeça polar se estendendo em direção a hélice AF-2 para formar uma ligação de hidrogênio com o grupo hidroxila da cadeia lateral da Y473 e dessa forma fechar a H12 em

uma conformação ativa na qual os coativadores podem se ligar e ativar a maquinaria transcricional. Além da Y473, duas histidinas H323 e H449 participam na fixação da TZD⁸.

A luteolina se liga ao PPAR γ de uma maneira diferente da rosiglitazona pois ela ocupa uma região delimitada pela H3 e fitas β (Fig. 11) e está localizada a uma considerável distância da H12, não interagindo com os resíduos da H12 que estabilizam o receptor na conformação ativa, que é característico dos agonistas como as TZDs. Nos ensaios de transativação celular do PPAR γ verificou-se que a luteolina pode competir com 1 μ M de rosiglitazona de uma maneira dose-dependente com IC₅₀ de 21,8 μ M. Embora a luteolina possua um modo de ligação diferente da rosiglitazona, observou-se que ocorre um impedimento estérico entre a rosiglitazona e o anel A e B da luteolina quando a estrutura cristalográfica foi sobreposta com a estrutura PDB: 2PRG (Fig. 13), demonstrando que não é possível a acomodação dos dois ligantes simultaneamente.

Figura 13 - Sobreposição da estrutura do PPAR γ complexado com a luteolina (cinza) e do PPAR γ complexado com a rosiglitazona (PDB: 2PRG) (verde claro). A luteolina está mostrada em azul e a rosiglitazona em amarelo. A hélice 12 na conformação inativa na estrutura com a luteolina está colorido em rosa e a hélice 12 na conformação ativa na estrutura 2PRG está colorida em laranja. A Y473 interage com a rosiglitazona e que ajuda a manter a H12 na conformação ativa está mostrada como *sticks*.

Foram realizadas simulações de dinâmica molecular (DM) em colaboração com o doutorando Rodrigo Oliveira e o Prof. Munir Skaf da UNICAMP para analisar melhor o modo de ligação da luteolina. As simulações de dinâmica molecular com a estrutura do

PPAR γ LBD complexado com a luteolina demonstraram que o modo de ligação da luteolina é bastante estável e que pode ocorrer uma ligação de hidrogênio adicional entre a luteolina e o resíduo E291 (H3), que pode ajudar a luteolina a se ancorar no Ω -loop. As simulações também mostraram que uma molécula de água, presente na estrutura cristalográfica e que liga a luteolina ao grupo carboxílico do ácido mirístico através de outra ligação de hidrogênio (Fig 14A), parece ser importante para ancorar a luteolina no LBD. Além disso, a ligação dos dois ligantes parece ser cooperativa, já que eles interagem com uma energia de -11 ± 4 kcal/mol, em grande parte de origem eletrostática. Analisando-se em conjunto, a estrutura cristalográfica e as simulações de DM sugerem que o amplo bolsão de ligação do LBD do PPAR γ permite que ocorra a ligação simultânea da luteolina e do ácido mirístico e que uma molécula de água está envolvida no reconhecimento desses ligantes.

Figura 14 - Estabilização da região do Ω -loop/folha β . (A) Ligações de hidrogênio envolvendo a luteolina e o ácido mirístico. A ligação de hidrogênio com o Glu291 é formada durante as simulações de DM. (B) B-fatores do PPAR γ LBD complexado com a rosiglitazona (PDB: 2PRG) e com a luteolina/ác. Mirístico. A largura da representação esquemática é proporcional aos fatores de temperatura da região. (C) O LBD está colorido de acordo com a mobilidade medida como o rmsd (*root mean square deviation*) dos carbonos α nas simulações de DM. As regiões em azul são as mais estabilizadas pela luteolina/ác. mirístico e as regiões em vermelho são as mais estabilizadas pela rosiglitazona. (D) Os resíduos Lys263 e Ser342 são mantidos em contato durante as simulações de DM e contribuem para a estabilização da região do Ω -loop. (E) Ligações de hidrogênio envolvendo a luteolina, ácido mirístico, Leu340, Ser342 e duas moléculas de água. Essas moléculas de água que unem os ligantes à folha β não são trocadas com o solvente durante a simulação de DM.

O fato de a luteolina/ácido mirístico se ligarem ao LBD de maneira distinta da rosiglitazona indica que a dinâmica do receptor pode ser afetada diferentemente pelo modo de ligação particular de cada ligante ^{156, 157}. As comparações dos B-fatores das estruturas cristalográficas com a luteolina e com a rosiglitazona (PDB: 2PRG), os quais fornecem uma indicação da mobilidade, demonstraram que esses ligantes estabilizam diferentes regiões do receptor. A luteolina estabiliza o Ω -loop, enquanto que a rosiglitazona estabiliza a H12 (Fig. 14B). De acordo com as análises dos B-fatores da estrutura cristalográfica, as simulações de dinâmica molecular demonstraram que a região da folha β , o Ω -loop e a H2', são preferencialmente estabilizadas pela luteolina/ácido mirístico, enquanto que a rosiglitazona estabiliza preferencialmente a H11 e H12 (Fig. 14C). A estabilização da H12 induzida pela rosiglitazona é explicada pela forte interação com a Y473 (H12), que é a base estrutural para o seu comportamento agonista ⁸.

As regiões estabilizadas pela luteolina/ácido mirístico podem ser explicadas por três razões: a H266 (Ω -loop) é mantida rígida devido a ligação de hidrogênio com a luteolina e é livre para se mover para o solvente na presença de rosiglitazona; os resíduos S342 (folha β 3) e K263 (H2') estão ligados por ligações de hidrogênio durante quase todo o tempo de simulação e resultam na estabilização da H2'/ Ω -loop (Fig. 14D, 14E) (na presença de rosiglitazona essa configuração nunca é estabelecida); a luteolina e o ácido mirístico coordenam moléculas de água que estão ligadas a cadeia principal da L340 e S342, ambos na folha β (Fig. 14E). Portanto, a luteolina adota um modo diferente de ligação das TZDs e estabiliza seletivamente diferentes regiões do LBD.

3.3.6 A luteolina promove diminuição na produção de IL-8 induzida por hipertonicidade

Foram utilizadas células epiteliais humanas da córnea (HCEC) para testar se a luteolina pode suprimir a lesão induzida por estresse hipertônico, o que frequentemente ocorre na doença do olho seco e pode desencadear aumentos na liberação de IL-8 pelas células residentes no epitélio da córnea e no estroma ^{158, 159}. Esse experimento foi realizado pelo colaborador Dr. Peter Reinach e Jing Yan da *State University of New York* (Nova Iorque, EUA). Brevemente, as células HCEC foram expostas a um desafio hipertônico (450 mOsm), simulando a condição da doença do olho seco e os efeitos da luteolina foram avaliados através do aumento da liberação de IL-8 induzido por hipertonicidade através de um teste de ELISA. A figura 15A mostra que a hipertonicidade induziu um aumento de 3,1 vezes na liberação de

IL-8 durante 24 h. Esse aumento foi suprimido pela pré-exposição das células durante 30 min à 5 μ M de luteolina posterior ensaio durante 24 h. O efeito foi parcialmente revertido quando as células foram pré-expostas a 1 μ M de luteolina. Foi constatado também que a produção de IL-8 aumentou com a adição de 1 μ M do antagonista do PPAR γ , GW9662, sob condições isotônicas (Fig. 15B) e que a pré incubação com a 5 μ M de luteolina reverteu esse efeito. Portanto, os efeitos individuais da luteolina e do GW9662 na liberação de IL-8 são atribuídos respectivamente à ativação parcial e supressão da atividade do PPAR γ .

Figura 15 - A luteolina reverte os aumento na IL-8 induzido por hipertonicidade. (A) As células HCEC foram cultivadas por 24 h na presença e ausência de 5 μ M de luteolina. Quando a luteolina foi utilizada nos experimentos, as células foram pré-expostas a esse ligante por 30 min antes de substituir o meio isotônico (300 mOsm) por um meio hipertônico (450 mOsm). As concentrações de IL-8 liberadas no meio foram quantificadas com ELISA. (B) Luteolina reverte os aumentos na liberação de IL-8 induzido por GW9662: as células HCEC foram pré-expostas a 1 μ M GW9662 por 30 min antes de adicionar 1 ou 5 μ M de luteolina no meio isotônico. As concentrações de IL-8 liberadas no meio foram quantificadas com ELISA. Cada experimento foi realizado três vezes em triplicata.

3.4 DISCUSSÃO

Neste trabalho, nós investigamos o modo de ação da luteolina na ativação do PPAR γ através de ensaios funcionais, cristalografia e simulações de DM. Os ensaios de transativação celular revelaram que a luteolina exibe um comportamento de agonista parcial em relação ao agonista total rosiglitazona e que atua predominantemente como antagonista nos ensaios de expressão gênica e diferenciação de adipócitos. Nossos estudos revelaram que a luteolina exibe ações de agonista total em pelo menos um gene testado nas células 3T3-L1, o GLUT-4, e que exibe atividade anti-inflamatória mediada pelo PPAR γ nas células HCEC. Portanto, a luteolina exibe ações de um modulador seletivo do PPAR γ .

A estrutura cristalográfica também é consistente com a idéia de que a luteolina é um agonista parcial fraco com atividades antagonistas e também sugere similaridades entre o modo de ligação da luteolina e de outros SPPAR γ Ms. A luteolina se liga preferencialmente na cadeia B (inativa) do dímero cristalográfico. Além disso, a luteolina está distante da H12 e a análise de B-fatores da estrutura cristalográfica e as simulações de DM indicaram que a H12 é pouco estabilizada, sugerindo que a H12 pode ser muito dinâmica e capaz de adotar conformações ativas e inativas na presença de luteolina. A luteolina estabiliza fortemente a região H3/folha β do LBD, de forma similar a outros agonistas parciais do PPAR γ que agem preferencialmente como sensibilizadores da insulina¹⁴⁹, inibem a fosforilação dependente de CDK5 e exibem efeitos de sensibilizadores da insulina sem provocar severos efeitos colaterais em modelos animais^{77, 117}. A luteolina possui efeitos benéficos documentados na glicose sanguínea e sensibilidade à insulina, similar aos SPPAR γ Ms^{114, 121, 160} e inibe a atividade adipogênica do PPAR γ ¹⁶¹, enquanto potencializa a ação da insulina nos adipócitos¹⁶² e no endotélio¹⁶³. Portanto, é interessante sugerir que as propriedades desejáveis da luteolina podem estar relacionadas ao seu modo de ligação no bolsão de ligação.

Nossa estrutura também revela a presença do ácido mirístico, provavelmente de origem bacteriana, juntamente com a luteolina. Estudos anteriores demonstraram que o bolsão de ligação do PPAR γ pode acomodar mais de um ligante¹⁵³. A presença de dois ligantes pode modular de maneira diferenciada a atividade do receptor, porém não obtivemos evidências de que o ácido mirístico altera a atividade da luteolina nos ensaios de transativação celular (dados não mostrados).

As simulações de DM sugerem que a luteolina e o ácido mirístico cooperam para estabilizar o Ω -loop, favorecendo a ligação entre a H2' e a H3, o que explica o porquê desse loop ser visível em nossa estrutura e poucas vezes modelado em outras estruturas cristalográficas, independente do tipo de ligante. Além disso, a comparação dos B-fatores na presença de luteolina/ácido mirístico e rosiglitazona (PDB:2PRG) indica que a luteolina estabiliza preferencialmente o Ω -loop e a folha β , enquanto que a rosiglitazona estabiliza preferencialmente a H12 (Fig. 14B), devido a uma forte ligação de hidrogênio com o resíduo Y473 (H12) (Fig. 10B)⁸. As simulações de DM indicaram que a luteolina e o ácido mirístico estão envolvidos na estabilização da região inteira da folha β do LBD, incluindo o Ω -loop e a H2'. Isso está relacionado a: (1) uma forte ligação de hidrogênio com a H266 (Ω -loop), que é livre para mover-se para o solvente na presença da rosiglitazona; (2) os resíduos S342 (fita β 3) e a K263 (H2') permanecem ligados durante quase todo o tempo da simulação; (3) a luteolina e o ácido mirístico possuem a habilidade de coordenar duas moléculas de água

fortemente ligadas à cadeia principal dos resíduos L340 e S342, ambos localizados na folha- β (Fig. 14E), sendo que na estrutura cristalográfica somente a água próxima à cadeia principal da L340 está fazendo uma ligação de hidrogênio. Os anéis aromáticos da luteolina também fazem interações hidrofóbicas com os resíduos V339, I341 e S342 da folha- β e as simulações de DM também revelaram que uma molécula de água faz uma ligação de hidrogênio com a S342.

O significado da estabilização do Ω -loop não está claro. Existem alguns precedentes para a interação de ligantes com o Ω -loop; o ácido ajulêmico (AJA), um canabinóide sintético que não possui atividade alucinógena e que é um agonista parcial do PPAR γ , também faz interações polares com a cadeia principal da K265 e H266 e extensivos contatos hidrofóbicos com a cadeia lateral da F264¹⁶⁴. Estudos anteriores demonstraram que metabólitos de ácidos graxos podem ativar o PPAR γ através de rearranjos no Ω -loop e que os distintos graus de atividade do receptor nas células são derivados de diferenças estruturais nessa região¹⁵⁰. Embora a luteolina também pareça inefetiva em estabilizar a H12, provavelmente suas ações de agonista parcial e ações de agonista gene-específico podem ser derivadas de mecanismos distintos daqueles adotados por agonistas totais e que a folha- β e o Ω -loop possam estar participando desses efeitos observados para a luteolina¹⁴⁹.

Finalmente, embora a luteolina seja um agonista parcial fraco, ela exhibe forte potencial antiinflamatório nas camadas epiteliais e endoteliais da córnea, sugerindo que a luteolina pode ter valor terapêutico nas doenças oculares¹⁰⁴. Os flavonóides são conhecidos pelas suas atividades antiinflamatórias¹⁶⁵ e nós demonstramos que a luteolina reverte o aumento na IL-8 induzido por hipertonidade nas células HCEC através do PPAR γ , como indicado pela sua habilidade de reverter a produção de IL-8 induzida pelo antagonista do PPAR γ GW9662. Nós ainda não podemos explicar as ações antiinflamatórias em termos de efeitos na estrutura e dinâmica do PPAR γ , mas nosso modelo estrutural sugere que essas ações antiinflamatórias devem ser independentes da estabilização total da H12.

Dessa forma, os efeitos protetores da luteolina sobre os aumentos de IL-8 induzidos por hipertonidade nas células HCEC indicam que a luteolina é um agonista parcial fraco do PPAR γ , possivelmente com um perfil mais seguro que os agonistas totais do PPAR γ . A luteolina poderá então exhibir efeitos úteis no tratamento de doenças oculares e lesões induzidas por inflamação. Portanto, o PPAR γ pode ser um novo alvo terapêutico para tratar a doença do olho seco e o fato da luteolina exhibir um perfil e modo únicos de ligação em relação às TZDs, pode apresentar eficácia nesse sistema, o que sugere que pode ser possível obter tais ações com agonistas parciais seguros ou SPPAR γ M que não possuam atividade de agonistas totais.

Salvador Dalí

CAPÍTULO 4

**ESTUDOS ESTRUTURAIS E
FUNCIONAIS DO PPAR γ LBD
COM ANTIINFLAMATÓRIOS
NÃO ESTEROIDAIIS**

CAPÍTULO 4

ESTUDOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DO PPAR γ COM ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS

4 INTRODUÇÃO

4.1 Antiinflamatórios não esteroideais

Os antiinflamatórios não esteroideais (AINEs) possuem atividades antiinflamatórias, analgésicas e anti-piréticas, que são atribuídas à inibição das ciclooxygenases (COX-1 e COX-2) ¹⁶⁶ que são enzimas que catalisam os dois primeiros passos na biossíntese de prostaglandinas (PGs). As PGs são ácidos graxos insaturados contendo 20 átomos de carbono, incluindo um anel de 5 carbonos e são sintetizadas a partir do ácido araquidônico (AA), o qual é liberado dos fosfolípidos das membranas celulares pela ação da fosfolipase A2, através de um processo controlado por hormônios e outros estímulos ¹⁶⁷. As PGs estão particularmente associadas ao desenvolvimento da dor que acompanha lesão ou inflamação e o entendimento da biossíntese desta substância é fundamental para a compreensão da ação desses fármacos antiinflamatórios.

As isoenzimas da COX possuem diferentes funções e padrões de expressão. A COX-1 é constitutivamente expressa na maioria das células em nível constante e provavelmente está envolvida na produção de prostaglandinas envolvidas nas funções de limpeza celular (*housekeeping*) ¹⁶⁸, enquanto que a COX-2 é rapidamente induzida em células pró-inflamatórias após estímulo por citocinas e lipopolissacarídeos em monócitos e macrófagos ¹⁶⁹ e pode estar especificamente envolvida na diferenciação celular e proliferação ¹⁶⁸. Portanto, a COX-2 possui um papel chave no controle da inflamação e inibidores seletivos para a COX-2 mostraram-se mais efetivos no tratamento da inflamação e causam menos efeitos ulcerogênicos no trato gastrointestinal ¹⁷⁰.

As ciclooxygenases são propostas como sendo o alvo farmacológico da aspirina e outros AINEs ¹⁶⁶, entretanto, a inibição das isoenzimas COX pode não ser o único mecanismo das ações antiinflamatórias dessa classe de compostos. Recentemente, evidências sugerem que algumas das ações dos AINEs podem não ser somente mediadas pela inibição da COX, mas também pela ativação dos PPARs.

Além de ser ativado por ligantes sintéticos como as TZDs, o PPAR γ pode ser ativado por metabólitos naturais do ácido araquidônico derivados da via da ciclooxigenase, como a 15-deóxi-delta-12,14-prostaglandina J2 (15-deóxi-PGJ2) e também foi demonstrado que alguns AINEs são ligantes do PPAR α e PPAR γ ⁵⁴. Os efeitos antiinflamatórios dos AINEs são atribuídos principalmente à inibição da isoforma COX-2 e foi evidenciado que a concentração requerida para inibir a COX-2 é maior que a requerida para inibir a COX-1 ¹⁷¹. Além disso, ela está na mesma faixa de concentração requerida para ativar os PPARs, *in vitro*.

Há algumas hipóteses de que o efeito antiinflamatório dos AINEs pode ser devido à supressão da síntese de citocinas inflamatórias mediada por PPAR γ e, portanto, foi sugerido que os PPARs podem ser outros alvos celulares da ação dos AINEs e que os efeitos antiinflamatórios desses fármacos podem ser mediados pela inibição da COX e também pela ativação dos PPARs, especialmente o PPAR γ ^{54, 170}. Uma análise mais detalhada da atividade agonística de cada um desses AINEs deve ser realizada antes de uma conclusão geral, porque alguns desses compostos são ativadores tanto do PPAR α quanto do PPAR γ , enquanto outros não se ligam a PPARs e continuam tendo boas propriedades anti-inflamatórias.

A maioria dos efeitos colaterais dos fármacos advém de consequências previstas do mecanismo de ação conhecido do fármaco, mas outros podem ocorrer devido a ligação a outros alvos farmacológicos para os quais não foram desenhados ou desenvolvidos. Estudos de complexos proteína-ligante apontam que um único fármaco pode se ligar a alvos que possuem uma farmacologia distinta e em torno de 35% dos fármacos conhecidos possuem dois ou mais alvos ¹⁷². Não é de surpreender que as relações evolucionárias possam ter levado ao compartilhamento da capacidade de ligação a fármacos em proteínas parálogas encontradas em uma vasta gama de tipos celulares e vias biológicas. Entretanto, essas complexidades podem levar a novas oportunidades para estratégias terapêuticas envolvendo o uso de fármacos com múltiplos alvos para conseguir uma maior especificidade no efeito ¹⁷³.

A descoberta de ligação de uma mesma molécula a vários alvos, causando sinergismo de efeitos terapêuticos, ou mesmo efeitos adversos, pode causar uma reestruturação na descrição dos mecanismos de ação nas bulas medicamentosas e ampliar o nosso conhecimento farmacológico sobre ação dos fármacos. A habilidade de prever e até desenhar os efeitos de novos fármacos é crítico para a indústria farmacêutica. Trabalhos recentes têm se focado em relacionar fármacos a alvos por sua similaridade química, similaridade estrutural do alvo e também similaridade de efeitos colaterais. Em cada caso, os resultados têm ilustrado o poder de pensar sobre os efeitos dos fármacos no contexto de uma rede de interações e uma perspectiva de sistemas ¹⁷³.

Com o objetivo de estudar, avaliar a capacidade de ativação do PPAR γ pelos AINEs (diclofenaco de sódio, ibuprofeno, indometacina e sulfeto de sulindaco) e analisar o modo de ligação ao receptor, foram conduzidos ensaios de transativação celular, ensaios de cristalização e resolução de estruturas cristalográficas do PPAR γ complexado com os AINEs. Também foi avaliado se os AINEs podem promover a diferenciação de adipócitos em células 3T3-L1 e se regulam a expressão dos genes GLUT-1, GLUT-4 e adiponectina nessas células.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Ensaios de transativação celular do PPAR γ com os AINEs

Os ensaios de transativação celular foram realizados conforme o item 3.2.1 do Capítulo 3 com algumas modificações. Para esses ensaios foram utilizadas células HeLa, 100 ng do vetor pGRE-LUC, 10 ng do vetor PPAR γ -LBD GAL4-DBD e 2,5 ng do vetor pRL contendo o gene da luciferase de *Renilla*. As concentrações dos AINEs diclofenaco de sódio, indometacina, (RS) ibuprofeno e sulfeto de sulindaco testadas para a obtenção da curva de dose-resposta e cálculo do EC50 variaram de 10^{-8} até 10^{-3} M. Os ligantes foram comprados da empresa *Caymann Chemical*, exceto o sulfeto de sulindaco que foi comprado da *Sigma Aldrich*.

4.2.2 Ensaios de diferenciação de adipócitos e expressão gênica

Os ensaios de diferenciação de adipócitos foram realizados em colaboração com a Dra. Aleksandra Cvorovic e a doutoranda Flora Milton no *The Methodist Hospital Research Institute* (Houston, TX, EUA). A cultura das células 3T3-L1 e o ensaio de diferenciação de adipócitos foram realizados conforme descrito no item 3.2.8 do Capítulo 3. Para avaliar os efeitos dos antiinflamatórios na diferenciação das células 3T3-L1, após a confluência, as células foram mantidas em meio DMEM/Ham's F-12 / DMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e tratadas com: (1) somente meio DMI (controle -); (2) 1 μ M de rosiglitazona

(controle +); (3) 25 μ M de diclofenaco de sódio; (4) 75 μ M de ($\pm$) ibuprofeno; (5) 10 μ M de indometacina; e (6) 50 μ M de sulfeto de sulindaco. As células tratadas foram diferenciadas e coradas conforme item 3.2.8 do Capítulo 3.

Para avaliação da expressão gênica em pré-adipócitos, após a confluência, as células foram tratadas com os AINEs nas mesmas concentrações utilizadas para o ensaio de diferenciação de adipócitos, como descrito acima, durante 3 dias. No 3º dia, o RNAm foi extraído e a análise da expressão gênica realizada conforme descrito no item 3.2.9 do Capítulo 3, utilizando-se *primers* padrão fornecidos pelo fabricante (Applied Biosystems) para os genes GLUT-1, GLUT-4 e adiponectina.

4.2.3 Cristalização, coleta de dados e resolução das estruturas cristalográficas

Primeiramente, os testes de cristalização do PPAR γ LBD com o diclofenaco de sódio, indometacina, ibuprofeno e sulfeto de sulindaco foram realizados conforme procedimento descrito no item 3.2.5 do Capítulo 3, incluindo a cristalização por gota sentada e a utilização de Citrato de Sódio 1,0 M como precipitante, HEPES 100 mM pH 7,5 e a adição de aditivos (*Additive Screen* - Hampton Research), conforme recomendações do fabricante. Durante estágio de doutoramento no *The Methodist Hospital Research Institute* (Houston, TX, EUA) foram realizadas novas tentativas de cristalização pelo método da gota sentada com vários *kits* de cristalização comercial [PEG I e II (Qiagen), *Crystal Screen* e *Index HT* (Hampton Research)] e o robô *Mosquito* (TTP LABTech), utilizando-se 0,5 μ l do complexo de proteína-ligante e 0,5 μ l de precipitante equilibrados em um reservatório com 100 μ L de solução precipitante.

Previamente à coleta de dados, os cristais foram crioprotetidos em 15% (v/v) de etilenoglicol, rapidamente resfriados em um fluxo de nitrogênio gasoso a -180°C e os dados de difração de raios-X para o cristal contendo diclofenaco de sódio e indometacina foram coletados na linha de cristalografia de proteínas MX2 do LNLS (Campinas, Brazil) ¹³⁴. Os cristais contendo sulfeto de sulindaco foram coletados na linha 5.0.1. do *Advanced Light Source* (ALS) - *Lawrence Berkeley National Laboratory* (Berkeley, CA, EUA). As estratégias de coleta, o processamento e o refinamento dos dados foram realizados conforme descrito nos itens 3.2.6 e 3.2.7 do Capítulo 3, porém utilizou-se como modelo para substituição molecular, a estrutura cristalográfica resolvida neste trabalho e depositada no PDB: 3SZ1.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Os AINES são agonistas do PPAR γ

Foram realizados ensaios de transativação celular em células HeLa (item 4.2.1) para avaliar a capacidade do diclofenaco de sódio, indometacina, ibuprofeno e sulfeto de sulindaco em ativar o PPAR γ . Através desses ensaios observou-se que esses AINES ativam o receptor de maneira dose dependente com EC50 de 11,8 μ M para a indometacina, 33,7 μ M para o diclofenaco de sódio e 81,3 μ M para o ibuprofeno. Para o sulfeto de sulindaco não foi possível obter uma curva dose resposta que permitisse o cálculo do EC50, mas observou-se que ele ativa melhor o receptor quando altas doses são utilizadas nos ensaios celulares. Em concentrações acima de 100 μ M, observou-se que o sulfeto de sulindaco é tóxico para as células, pela diminuição da luminescência da luciferase de *Renilla*.

Figura 16 - Ensaio de transativação celular do PPAR γ pelos AINES. O ensaio de ativação PPAR γ /GAL4 foi realizado com diluições seriadas de diclofenaco de sódio, ibuprofeno, indometacina e sulfeto de sulindaco (10^{-8} a 10^{-3} M). Todos os ensaios foram realizados em três replicatas e normalizados para as diferenças na eficiência de transfecção através da medida da atividade da luciferase de *Renilla* no mesmo lisado celular.

Paralelamente aos ensaios com os AINES, foram realizadas curvas de ativação com o agonista total rosiglitazona e obteve-se o valor de EC50 de 1 μ M para esse fármaco (dados não mostrados). A ativação máxima alcançada pela rosiglitazona é superior à obtida com os AINES, aproximadamente 5 vezes maior que a obtida para a indometacina. Os diferentes

perfis de ativação desses antiinflamatórios nos ensaios celulares sugerem que eles podem possuir distintos modos de ligação ao PPAR γ .

4.3.2 Alguns AINEs promovem a adipogênese em células 3T3-L1

Foram realizados testes de diferenciação de adipócitos com o diclofenaco de sódio, indometacina, ibuprofeno e sulfeto de sulindaco para verificar se esses AINEs são capazes de promover a adipogênese. A diferenciação de adipócitos foi realizada com as células 3T3-L1 conforme descrito no item 4.2.2, utilizando-se uma concentração capaz de causar ativação do PPAR γ , próximas ao EC50. Dessa forma, após a confluência das células 3T3-L1, elas foram tratadas com meio DMI (controle -), rosiglitazona 1 μ M (controle +) e os antiinflamatórios diclofenaco de sódio 25 μ M, indometacina 10 μ M, ibuprofeno 75 μ M e sulfeto de sulindaco 50 μ M durante os 3 primeiros dias de diferenciação.

No 8º dia de diferenciação as células foram coradas com o *Oil Red O* para verificar o acúmulo de lipídios e observou-se que a indometacina, diclofenaco de sódio e ibuprofeno promovem a adipogênese em maior grau que as células tratadas somente com o meio DMI, sendo que a rosiglitazona, indometacina e diclofenaco apresentaram um grau de diferenciação similar e o ibuprofeno apresentou um menor grau de diferenciação em comparação com esses ligantes (Fig. 17). Com relação ao sulfeto de sulindaco observou-se que houve uma alteração da morfologia das células e um menor acúmulo de triglicerídeos em relação ao controle negativo com o meio DMI. Através desse experimento não é possível afirmar o que está acontecendo com as células e outras análises são necessárias.

Figura 17 - Ensaio de diferenciação das células 3T3-L1 com os AINEs. (A) Visão macroscópica, placa de cultura das células. (B) Visão microscópica com aumento de 40 x. As células foram coradas com o corante vermelho após diferenciação a adipócitos com diferentes ligantes por 3 dias e manutenção das células com meio contendo insulina por mais 8 dias. Os tratamentos incluíram controle – (DMI); controle + (rosiglitazona 1 μ M); diclofenaco de sódio 25 μ M; ibuprofeno 75 μ M; indometacina 10 μ M e sulfeto de sulindaco 50 μ M.

Foram realizados experimentos de PCR em tempo real para determinar se os AINEs regulam a expressão dos genes adiponectina, GLUT1 e GLUT4 em pré-adipócitos tratados durante 3 dias com indometacina 10 μ M, ibuprofeno 75 μ M, diclofenaco 25 μ M, sulfeto de sulindaco 50 μ M. Foram realizados controles com as células em meio DMEM, meio de indução de adipócitos (DMI) e as células também foram tratadas com rosiglitazona 1 μ M. Após 3 dias de tratamento com os ligantes, o RNAm foi extraído e utilizado para sintetizar o cDNA e a expressão dos genes adiponectina, GLUT1 e GLUT4 foram determinados por PCR em tempo real.

Nas células tratadas com rosiglitazona houve um aumento significativo da expressão dos genes dos transportadores de glicose GLUT1 e GLUT4 e também do hormônio protéico adiponectina, que aumenta a sensibilidade à insulina. Já para os AINEs, verificou-se que a indometacina e o diclofenaco não causam mudanças na expressão da adiponectina em comparação ao controle contendo o meio de diferenciação de adipócitos (DMI) e que o sulindaco e o ibuprofeno diminuem a expressão da adiponectina. Em relação a expressão dos transportadores de glicose, a indometacina, ibuprofeno e diclofenaco não aumentaram significativamente a expressão de GLUT1 em relação ao meio DMI e o sulindaco diminuiu a expressão. Já para o GLUT4, observou-se que o sulindaco aumentou significativamente a expressão desse gene.

Figura 18 - PCR quantitativo e expressão relativa de RNAm dos genes Adiponectina, GLUT4 e GLUT1. Após confluência, as células foram expostas aos seguintes tratamentos: DMEM, DMI, rosiglitazona 1 μM, indometacina 10 μM, ibuprofeno 75 μM, diclofenaco 25 μM, sulfeto de sulindaco 50 μM durante 3 dias. Cada ponto representa a média dos experimentos realizados em triplicata ± desvio padrão (* P<0.05, ** P<0.01, ***P<0.001 em comparação com DMI).

4.3.3 Os AINES possuem diferentes modos de ligação ao PPAR γ

Para entender melhor os diferentes perfis de transativação do PPAR γ pelos AINEs e obter a base estrutural para o agonismo desses compostos, foram realizados ensaios de cristalização com várias soluções de *kits* comerciais e de aditivos. Foram obtidos cristais do

PPAR γ complexado com o diclofenaco pelo método da gota sentada na condição contendo Citrato de Sódio 1 M, HEPES 0,1 M pH 7,5 e o aditivo MgCl₂ 10 mM e os cristais de ibuprofeno e indometacina foram obtidos pelo método da gota pendurada na condição de Citrato de Sódio 0,90 M, HEPES 0,1 M pH 7,0 e Citrato de Sódio 0,95 M, HEPES 0,1 M pH 8,0, respectivamente (Fig. 19). Os cristais foram submetidos à difração de raios-X na linha MX-2 do LNLS e foram obtidos conjuntos de dados para o cristal contendo diclofenaco e indometacina. Os cristais de ibuprofeno, formados por *clusters* de agulhas, difrataram a baixa resolução (em torno de 25 Å) e novas tentativas de cristalização, entre elas a técnica de *seeding*, estão sendo realizadas para a obtenção de cristais melhor formados.

A cristalização do complexo com sulfeto de sulindaco foi realizada no *The Methodist Hospital Research Institute* (Houston, TX, EUA). Os cristais do PPAR γ complexados com esse ligante foram inicialmente obtidos pelo método da gota sentada com o uso do robô de cristalização *Mosquito* (TTP LABTech) na condição contendo 25% (w/v) PEG 6000, Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 e foram reproduzidos pelo método da gota pendurada, no qual obteve-se cristais maiores e melhor formados. Os dados de difração do cristal com sulfeto de sulindaco foram coletados na linha 5.0.1. do *Advanced Light Source* (ALS) - *Lawrence Berkeley National Laboratory* (Berkeley, CA, EUA) (Fig. 19).

Figura 19 - Cristais do PPAR γ LBD com os AINEs.

As estruturas tridimensionais do PPAR γ LBD com o diclofenaco, indometacina e sulfeto de sulindaco foram resolvidas no grupo espacial monoclinico C2 e as estatísticas do processamento dos dados e refinamento das estruturas cristalográficas estão mostradas na tabela 4. A unidade assimétrica contém um homodímero que apresenta o monômero A com a

H12 fechada, que assemelha-se à conformação ativa do receptor, e o monômero B com a H12 deslocada devido ao empacotamento cristalino⁸. Após a substituição molecular e visualização do mapa de densidade eletrônica ficou evidente que os LBP continham ligantes e a descrição para cada ligante será dada a seguir.

Tabela 3 - Estatísticas cristalográficas do PPAR γ LBD com os AINEs

	Diclofenaco	Indometacina	Sulfeto de Sulindaco
Síncroton	LNLS	LNLS	ALS
λ	1,4586 Å	1,4586 Å	0,999 Å
Grupo Espacial	C2	C2	C2
Parâmetros da cela unitária			
a (Å)	92,38	93,04	91,77
b (Å)	62,21	62,14	63,63
c (Å)	116,77	118,54	119,65
β	101,04	102,13	102,38
Mol. na unidade assimétrica	2	2	2
Resolução (Å)	45,22 - 2,50 (2,64 - 2,50)	38,63 - 2,40 (2,53 - 2,40)	51,91 - 2,22 (2,34 - 2,22)
Número de reflexões únicas	22178 (3205)	26080 (3799)	33524 (4898)
Multiplicidade	3,0 (3,0)	4,5 (4,4)	6,9 (7,1)
Completeza (%)	97,9 (97,5)	99,8 (100)	100 (100)
R_{sym}^a	0,051 (0,503)	0,069 (0,502)	0,064 (0,471)
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	13,3 (2,1)	12,1 (2,8)	16,7 (4,2)
R_{factor}^b (%)	22,48	21,97	20,03
R_{free}^b (%)	27,34	24,89	23,70
B-fator médio(Å²)	67,7	55,4	39,4
rmsd distância de ligação (Å)	0,012	0,010	0,008
rmsd ângulos de ligação (°)	1,552	1,415	1,106
Ramachandran outliers	0	0	0

^a $R_{sym} = \sum_{hkl} \sum_j (|I_{hkl} - \langle I_{hkl} \rangle|) / \sum_{hkl} \sum_j I_{hkl}$, onde I_{hkl} é o valor da intensidade para uma única refexão dentro de um conjunto de reflexões simetricamente relacionadas, e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a média das intensidades para um conjunto j de reflexões simetricamente relacionadas. ^b $R_{factor}/R_{free} = \sum_{hkl} |F_{obs} - F_{calc}| / \sum_{hkl} |F_{obs}|$, onde F_{obs} e F_{calc} correspondem aos fatores de estrutura observados calculados. Para o cálculo do R_{free} , foram utilizadas somente 5 % das reflexões omitidas do refinamento. Os valores entre parênteses se referem a camada mais externa de resolução.

Na estrutura cristalográfica do PPAR γ complexado com diclofenaco, o ligante ocupa a cadeia B do LBP e está situado na região entre a H3 e a folha β e sua ligação ao LBD é mediada principalmente por interações hidrofóbicas com os resíduos L340, L333, L330, M364, C285, I281, R288, I341 e R288 (Fig. 20). Além disso, o grupo carboxílico do diclofenaco faz uma ligação de hidrogênio com a cadeia lateral do resíduo S342, situado na folha β . Essa estrutura apresentou um alto valor de B-fator médio (67,7 Å) em comparação com as outras estruturas obtidas neste trabalho e apresenta algumas regiões desordenadas onde não foi possível construir o modelo.

Figura 20 - Estrutura cristalográfica do PPAR γ complexado com o diclofenaco. (A) Cadeia B do PPAR γ LBD com mapa de omissão dos átomos do diclofenaco (*omit map*) 2Fo-Fc mostrado a um contorno de 1,0 σ para a área em torno do diclofenaco. O diclofenaco (rosa pink) está localizado entre a hélice H3 a folha β . A H12 está colorida em azul. (B) Interações do diclofenaco com o PPAR γ LBD na cadeia B. Os aminoácidos mostrados como *dots* representam os raios de Wan der Walls.

A estrutura do PPAR γ LBD complexado com a indometacina revelou que duas moléculas de ligante estão presentes na cadeia A, enquanto que só uma molécula está presente na cadeia B (Fig. 21A). Na cadeia A, uma das moléculas de indometacina se liga adjacente a H12 (sítio I) e faz ligações de hidrogênio com S289 (H3), H323 (H6), H449 (H11) e Y473 (H12), que são ligações encontradas também para os agonistas totais, como a rosilglitazona. Além dessas ligações de hidrogênio, esse ligante faz interações hidrofóbicas com o LBD (Fig 21B). A segunda molécula de indometacina está localizada entre a H3 e a folha β (sítio 2), distante da H12 e se liga ao receptor principalmente através de contatos hidrofóbicos e também por uma ligação de hidrogênio entre o seu grupo carboxílico e a cadeia principal da S242 (Fig. 21B). A indometacina presente na cadeia B ocupa uma posição similar à encontrada para a molécula no sítio 2 na cadeia A, estando situada entre a H3 e a folha β .

Figura 21 - Estrutura cristalográfica do PPAR γ complexado com a indometacina. (A) Duas moléculas de indometacina (azul, *stick ball*) estão presentes na cadeia A e apenas uma molécula na cadeia B. O mapa de densidade eletrônica (*omit map*) 2Fo-Fc está mostrado a um contorno de 1,0 σ para a área em torno da indometacina. (B) Interações das moléculas de indometacina com o PPAR γ LBD na cadeia A.

Da mesma forma que o complexo com a indometacina, a estrutura do PPAR γ LBD complexado com o sulfeto de sulindaco também revelou que duas moléculas de ligante estavam presentes na cadeia A e que duas moléculas estavam presentes na cadeia B (Fig. 22A). Na cadeia A, uma das moléculas de sulfeto de sulindaco também se liga adjacientemente a H12 (sítio I) e também faz as ligações de hidrogênio com S289 (H3), H323

(H6), H449 (H11) e Y473 (H12) (Fig. 22B) da mesma forma que a indometacina, estabilizando a H12 na posição ativa. Já na cadeia B, na mesma região do sítio 1, observa-se que o sulfeto de sulindaco ocupa uma posição diferente em relação a encontrada na cadeia A, e faz interações de hidrogênio somente com a H323 e a H449 (Fig 22B). A segunda molécula de sulfeto de sulindaco está localizada entre a H3 e a folha β (sítio 2), distante da H12 e se liga ao receptor principalmente através de contatos hidrofóbicos (Fig 22C). É interessante notar que as moléculas de sulfeto de sulindaco na região do sítio 2, ocupam orientações bem diferentes na cadeia A e na cadeia B, e que o ligante na cadeia B faz uma ligação de hidrogênio com a R288 que não ocorre na cadeia A.

Figura 22 - Estrutura cristalográfica do PPAR γ complexado com o sulfeto de sulindaco. (A) Duas moléculas de sulindaco (verde água, *stick ball*) estão presentes na cadeia A e duas moléculas na cadeia B. O mapa de densidade eletrônica (*omit map*) 2Fo-Fc está mostrado a um contorno de 1,0 σ para a área em torno do sulfeto de sulindaco. (B) Interações das moléculas do sulindaco com o PPAR γ LBD na cadeia A. (C) Interações das moléculas do sulfeto de sulindaco com o PPAR γ LBD na cadeia B.

A indometacina e o sulfeto de sulindaco se ligam ao sítio 1, próximo a H12 de maneira semelhante, fazendo ligações de hidrogênio com S289 (H3), H323 (H6), H449 (H11) e Y473 (H12) na cadeia A (Fig. 23), que são interações clássicas encontradas na ligação de agonistas totais como a rosiglitazona. Por interagir diretamente com a Y473, a indometacina e o sulfeto de sulindaco mantém a H12 na conformação ativa, que é importante para a formação do sítio de recrutamento de coativadores. Na cadeia B, a indometacina não estava presente no sítio 1, somente o sulfeto de sulindaco que adotou uma posição diferenciada em relação a cadeia A e deixou de fazer interações com a Y473, porque a H12 encontra-se em uma posição inativa.

É interessante notar que as moléculas presentes na região do sítio 2 ocupam orientações bem diferentes. Embora a indometacina adote a mesma conformação nesse sítio para as duas cadeias, o sulfeto de sulindaco adota uma posição bem diferente para a cadeia A e B. O grupo carboxílico do diclofenaco e da indometacina encontram-se na mesma orientação e ambas as moléculas fazem ligações de hidrogênio com a cadeia principal da S342 na cadeia B.

Figura 23 - Sobreposição do sulfeto de sulindaco, indometacina e diclofenaco. A indometacina e o sulfeto de sulindaco se ligam ao sítio 1, próximo a H12 de maneira conservada, fazendo ligações de hidrogênio com a Y473 (H12), H449, H323 e S289 na cadeia A. O sulfeto de sulindaco que adotou uma posição diferenciada em relação a cadeia A e deixou de fazer interações com a Y473 e S289, porque a H12 encontra-se em uma posição inativa. Os AINEs se ligam de maneira diferenciada ao sítio 2. Embora a indometacina adote a mesma conformação nesse sítio para as duas cadeias, o sulfeto de sulindaco adota uma posição bem diferente.

4.4 DISCUSSÃO

Os AINEs são usados clinicamente devido às suas propriedades antiinflamatórias, antipiréticas e analgésicas ¹⁶⁶. Muitas classes de AINEs quimicamente distintos são usadas clinicamente e incluem tiazinacarbóxiâmidas (ex: piroxicam), derivados indólicos (ex: indometacina), derivados do ácido acético (diclofenaco), ácidos aminoacilcarboxílicos (ácido flufenâmico), ácido arilpropiónico (ibuprofeno e fenoprofeno) e ácido acetilsalicílico (aspirina). Acredita-se que a base molecular dos efeitos terapêuticos dos AINEs é devido a inibição das ciclooxigenases e portanto, inibição da produção de prostaglandinas. A maioria dos AINEs inibe a COX-1 e a COX-2, porém já foram desenvolvidos também fármacos seletivos para a inibição da COX-2, os quais possuem menos efeitos ulcerogênicos ¹⁶⁷.

Os PPARs são ativados por uma ampla variedade de ligantes que diferem quimicamente, porém compartilham algumas características como um esqueleto lipofílico e uma porção ácida, geralmente um carboxilato. Muitos dos AINEs, como a indometacina, diclofenaco, sulindaco e ibuprofeno compartilham essas características gerais. Não são todas as classes de AINEs que podem ativar o PPAR γ . Lehmann e colaboradores ⁵⁴ demonstraram que alguns AINEs podem ativar o PPAR α e o PPAR γ , mas não ativam o PPAR β . Entretanto, a demonstração dessa ativação ficou limitada porque nesses experimentos foram utilizadas somente concentrações fixas desses AINEs. Em altas concentrações (100 μ M), o ácido flufenâmico, o fenoprofeno e ibuprofeno ativam o PPAR γ , porém com 10 μ M desses compostos não observou-se ativação; o piroxicam apresentou modesta ativação e o acetaminofeno e a aspirina ativaram pouco ou não ativaram o receptor ⁵⁴.

Neste trabalho, nós demonstramos a ativação do PPAR γ pelo ibuprofeno, indometacina, diclofenaco e sulfeto de sulindaco em diferentes concentrações e calculamos o EC50 de ativação para o ibuprofeno, indometacina e diclofenaco. Dessa forma, conseguimos demonstrar que eles possuem diferentes perfis de ativação seguindo a ordem de potência: indometacina, diclofenaco e ibuprofeno. Em relação ao sulfeto de sulindaco, não foi obtido um bom ajuste para a curva dose resposta e não foi calculado o EC50, mas observou-se que a taxa máxima de ativação foi semelhante a obtida para a indometacina para as mesmas concentrações testadas (75 μ M). Notou-se que os AINEs que ativaram o receptor eram todos ácidos anfipáticos, o que está de acordo com as características estruturais para os ligantes do PPAR.

A indometacina, a mistura racêmica (RS) do ibuprofeno, o diclofenaco de sódio e o

pró-fármaco sulindaco são utilizados clinicamente. Nossos resultados demonstram que eles ativam o PPAR γ de maneira dose dependente e que altas concentrações são necessárias para alcançar a ativação máxima. A indometacina, o ibuprofeno e fenoprofeno são fármacos antireumáticos muito importantes usados clinicamente ¹⁷¹, porém seu mecanismo de ação não é totalmente compreendido.

Os inibidores das ciclooxigenases aliviam a dor e inflamação causadas pelas prostaglandinas sintetizadas no foco da inflamação ¹⁷⁴. Entretanto, altas doses desses agentes são geralmente requeridos para alcançar um efeito paliativo dos sintomas da artrite reumatóide. Essas doses, levam em certos casos, a concentrações plasmáticas muito excedentes às necessárias para inibir a COX-1 e 2 e podem estar ativando o PPAR α e PPAR γ e contribuindo para a diminuição da inflamação. Foi demonstrado que suplementos à base de óleo de peixe, os quais são ricos em ácidos graxos insaturados, reduzem significativamente os sintomas da artrite reumatóide e que o ácido docosahexanóico, presente nesse óleo, é um agonista natural do PPAR γ ¹⁷⁴.

O fato desses antiinflamatórios não esteroidais serem ligantes do PPAR γ , além dos possíveis efeitos sinérgicos no combate à inflamação, podem causar outros efeitos colaterais em pacientes que tomam altas doses de antiinflamatórios, como no caso do tratamento de artrite. Como demonstrado neste estudo, a indometacina, diclofenaco e ibuprofeno são capazes de promover a diferenciação de adipócitos e portanto, poderiam causar aumento da adipogênese *in vivo* e ganho de peso.

A expressão gênica dos transportadores de glicose GLUT1 e GLUT4, e do hormônio sensibilizador da insulina adiponectina também foram avaliados neste trabalho em pré-adipócitos, induzidos à diferenciação com esses ligantes durante 3 dias, e ao contrário da rosiglitazona, constatou-se que eles não aumentam a expressão desses genes de forma significativa e talvez não possuam efeitos terapêuticos no tratamento do diabetes tipo II, mas novos ensaios de diferenciação de adipócitos (após 8^o dia de diferenciação) devem ser realizados para verificar se o perfil de expressão gênica pode estar modificado. Portanto, são necessários mais estudos para compreender os efeitos fisiológicos que a ligação dos AINEs ao PPAR γ pode causar.

A ligação do ligante ao LBD modula a estabilização da H12 de formas diferentes: (1) pode atuar diretamente, estabilizando sua conformação ativa; ou (2) indiretamente através de reposicionamentos da H11 ou conformações diferentes do *loop* 11/12. A estabilidade da H12 também pode ser promovida pela ação dos ligantes como estabilizadores globais do LBD. Os agonistas totais mudam o equilíbrio entre a conformação ativa e inativa da H12, levando ao

recrutamento de coativadores. Os agonistas parciais são incapazes de mudar o equilíbrio a favor da conformação ativa na mesma extensão que os agonistas totais, porque não são capazes de estabilizar a H12 na posição apropriada pela falta de interações chaves. Foi constatado que até mesmo um pequeno desvio do posicionamento da H12 pode resultar em uma resposta transcricional atenuada ¹⁷⁵.

Ao analisar-se o modo de ligação dos derivados indólicos indometacina e sulfeto de sulindaco, constatou-se que ambos fazem interações polares com a Y473 da hélice 12 e com a S289, H323 e H449, que são interações clássicas encontradas para os agonistas totais como as TZDs. Portanto, esses ligantes são capazes de estabilizar a H12 na conformação ativa. Entretanto, ao analisar-se o perfil de ativação desses AINEs e o perfil de expressão gênica, observou-se que a ativação do receptor pela rosiglitazona é cerca de 5 vezes maior que a ativação máxima encontrada para a indometacina e sulfeto de sulindaco, e que a rosiglitazona aumenta significativamente a expressão de GLUT1, GLUT4 e adiponectina, em comparação com os AINEs.

A rosiglitazona se liga ao PPAR γ em formato de U, como se estivesse abraçando a H3, o que não é observado para a indometacina e sulfeto de sulindaco. Os grupos carbonílicos das TZDs fazem interações com as histidinas H323 e H449 e o nitrogênio parcialmente carregado da cabeça da TZD faz uma ligação de hidrogênio com a hidroxila da cadeia lateral da Y473. O anel benzênico central da rosiglitazona também consegue ocupar parte o bolsão entre a H3 e folha β . Além disso, foi observado que a cadeia lateral do resíduo Q286 (H3) também pode fazer uma ligação com o grupo carbonila da cabeça da TZD, e essa interação não é observada para a indometacina e sulfeto de sulindaco.

Como dito anteriormente, até mesmo um pequeno desvio do posicionamento da H12 pode resultar em uma resposta transcricional atenuada e as ligações que a rosiglitazona faz com a região próxima à H12, por possuir grupos carbonílicos e um nitrogênio parcialmente carregado na cabeça da TZD, parecem interagir mais fortemente com essa região em comparação com somente o grupo carboxílico da indometacina e sulfeto de sulindaco, que fazem as interações polares nessa região.

As interações com os resíduos H323 e H449 podem ser importantes para a ligação de outros ácidos carboxílicos, incluindo ácidos graxos, lipídios oxidados e metabólitos da prostaglandina J2, os quais também podem ativar o PPAR γ em concentrações micromolares ^{69, 176}. Esses compostos podem se ligar através de interações chaves com os resíduos de histidina, enquanto que sua parte hidrofóbica pode ficar livre para interagir de maneira não

específica com o amplo bolsão de ligação do PPAR γ , resultando na variabilidade de ligantes que podem se ligar ao PPAR.

Enquanto estava sendo realizado o refinamento dessa estrutura com a indometacina, Waku e colaboradores ¹⁵³ publicaram um artigo no qual descreveram ligantes com o grupo indol que podem se ligar ao PPAR γ , constando também nesse artigo a estrutura do PPAR γ complexado com a indometacina. Comparando-se a estrutura desses autores (PDB: 3ADS) com a descrita neste trabalho, verificou-se que ambas as estruturas foram resolvidas no mesmo grupo espacial, apresentavam limites de resolução similares e a presença de duas moléculas de indometacina na cadeia A e uma na cadeia B. Esse grupo demonstrou através de análises de titulação isotérmica por calorimetria (ITC) que a constante de ligação do segundo ligante é muito maior que a do primeiro e que a região do bolsão AF-2 (região descrita neste trabalho como sítio 1, próximo a H12) é o sítio de ligação preferencial dos ligantes contendo grupos indol acetato, porque os ensaios de transativação celular demonstraram que a indometacina não ativa o mutante Y473F, que possui a tirosina da H12 mutada para fenilalanina, perdendo a interação com essa hélice.

Assim como a indometacina, o sulfeto de sulindaco também é um derivado indólico, ocupa a mesma posição de ligação ao sítio 1 (próximo a H12) encontrada para a indometacina e faz as mesmas interações polares. A comparação da indometacina e sulindaco no sítio 2 da cadeia A demonstrou que eles ocupam orientações diferentes (Fig. 23, cadeia A), mostrando que o grupo carboxilato dos ligantes está posicionado praticamente em lados opostos. Além disso, o sulfeto de sulindaco adota conformações diferentes para o mesmo sítio 2. Esses fatores sugerem que a ligação dos ligantes de derivados indólicos como indometacina e sulindaco não é muito conservada na região do sítio 2, e vai de acordo com o descrito por Waku e colaboradores de que este não é o sítio preferencial de ligação desses compostos, e que a afinidade por esse segundo sítio é baixa segundo dados de ativação celular e ITC ¹⁷⁷.

Os AINEs tradicionais inibem a atividade da COX, mas possuem outros alvos como o PPAR γ . Neste trabalho, nós realizamos ensaios de transativação celular, diferenciação de adipócitos e expressão gênica com os AINEs e o seu modo de ligação ao PPAR γ foi elucidado. Os antiinflamatórios não esteroidais são compostos muito atrativos para o redesenho de novos fármacos, porque sua farmacocinética tem sido extensamente estudada em humanos e a elucidação das estruturas cristalográficas apresentadas neste trabalho contribui para o entendimento de seu modo de ligação e abre a possibilidade de desenho de novos fármacos mais seletivos para o PPAR γ sem efeitos sobre a inibição da COX.

Salvador Dalí

CAPÍTULO 5

SÍNDROME DE RESISTÊNCIA AOS LIGANTES DO PPAR γ

CAPÍTULO 5

SÍNDROME DE RESISTÊNCIA AOS LIGANTES DO PPAR γ

5.1 INTRODUÇÃO

5.1.1 Síndrome de resistência ao ligante do PPAR γ

A perda seletiva do tecido adiposo (lipodistrofia) está frequentemente associada com a resistência à insulina e complicações como diabetes tipo II, dislipidemia e hipertensão ¹⁷⁸. Portanto, quantidades normais de tecido adiposo e de distribuição de gordura parecem ser críticos para a regulação ótima do metabolismo de lípidios e energia. A lipodistrofia parcial familiar (FPLD) é uma desordem autossômica dominante herdada e caracterizada pela perda gradual de gordura subcutânea das extremidades e acúmulo de gordura na região intra-abdominal ¹⁷⁹. Foram descritas mutações pontuais no PPAR γ em pacientes que sofrem de FPLD3, as quais estão localizadas no DBD [C142R, C159Y, C190S, C190W] ou no LBD [V318M, F388L, R425C, P495L e D396N (na nomenclatura do PPAR γ 2)], entre outras *nonsense* e *stop codon* ¹⁸⁰.

As mutações heterozigóticas raras no LBD do PPAR γ (F388L, P467L, R425C, V290M) foram descritas em oito indivíduos. Esses indivíduos apresentam um fenótipo clínico complexo chamado de Síndrome de Resistência aos Ligantes do PPAR γ (PRLS), caracterizada por lipodistrofia parcial, severa resistência à insulina, diabetes tipo II, dislipidemia (alta concentração de triglicerídeos e baixa concentração de HDL), hipertensão precoce e esteatose hepática ¹⁸¹ (Fig. 24). Os pacientes que apresentam essas mutações possuem um estereótipo de lipodistrofia parcial, na qual, ocorre perda de gordura subcutânea dos membros e região glútea, mas preservação de gordura na região abdominal. As descobertas de que a lipodistrofia está associada com as mutações no PPAR γ está de acordo com o papel chave que esse receptor possui na adipogênese e na perda de gordura, particularmente na região dos membros e glútea.

Os pacientes com a Síndrome de Resistência aos Ligante do PPAR γ apresentam início precoce de diabetes melitus tipo II (idade média de diagnóstico aos 31 anos, intervalo de 8-53

anos), e foi observado que as mulheres apresentam ovário policístico devido a resistência à insulina (Fig. 24) ¹⁸¹. Os estudos dessas mutações apontam um papel chave do PPAR γ na regulação, distribuição, função da massa do tecido adiposo e estabelecimento do princípio de que um defeito genético, em uma única molécula, pode recapitular todos os fatores salientes da Síndrome Metabólica, incluindo a resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão.

Os pacientes que apresentam as mutações P467L e V290M apresentaram hiperinsulinemia e hipertensão ¹⁸². Estudos funcionais dessas mutações mostraram que esses receptores mutantes conseguem se ligar ao DNA, porém a ativação transcricional e recrutamento de coativadores em resposta a diferentes ligantes encontram-se prejudicados ^{182, 183}. Já o fenótipo dos pacientes que apresentam as mutações heterozigóticas R425C e F388L, mostrou que além da resistência à insulina, eles possuem um estereótipo de lipodistrofia parcial ^{184, 185, 186}.

Alguns desses mutantes, como o P467L e V290M, exercem um efeito dominante negativo quando co-transfectados com o receptor nativo, e isso ocorre devido à alta afinidade com correpressores e baixo recrutamento de coativadores ¹⁸³. A mutação F388L e a R425C parecem não apresentar uma atividade dominante negativa, mas causam menor atividade basal transcricional e menor atividade transcricional com a rosiglitazona ^{185, 187}. Savage e colaboradores ¹⁸⁶ acreditam que as mutações dominantes negativas no PPAR γ representam um novo grupo de condições envolvidas no comprometimento das funções herdadas dos receptores nucleares, que incluem a síndrome de insensibilidade ao androgênio, resistência a estrogênio e raquitismo hereditário por resistência a vitamina D.

Figura 24 – Síndrome de Resistência ao Ligante do PPAR γ . A figura mostra os sinais clínicos de uma mulher de 41 anos que é heterozigota para a mutação dominante negativa. Ela apresentou hipertensão severa e hipoglicemia recorrente aos 20 anos. Representações dos cortes de ressonância magnética de imagem mostram a lipodistrofia do fêmur e dos glúteos (adaptado de ¹⁸¹).

Atualmente, o tratamento de pacientes com a Síndrome de Resistência aos Ligantes do PPAR γ , quando possível, é baseado no tratamento de cada componente individual dessa síndrome, como por exemplo, resistência à insulina, diabetes mellitus tipo II, hipertensão e dislipidemia. A disponibilidade de TZDs oferece, pelo menos à princípio, uma terapia específica para essa doença. Estudos realizados com um indivíduo de cada uma das mutações P467L e V290M tratados com rosiglitazona, demonstraram que o primeiro exibiu um grande aumento do controle da glicemia, o qual foi correlacionado com o aumento da sensibilidade à insulina e aumento do tecido adiposo. O indivíduo com a mutação V290M mostrou uma pequena resposta clínica. Esses achados parecem estar correlacionados com as propriedades desses receptores mutantes *in vitro*, já que o mutante V290M exibe uma atividade dominante negativa mesmo na presença de altas concentrações de rosiglitazona, sugerindo que há a necessidade de desenvolvimento de um ligante mais potente desse receptor para alcançar efeitos terapêuticos¹⁸⁸.

Conforme discutido anteriormente, a Síndrome de Resistência aos Ligantes do PPAR γ causa várias disfunções do organismo humano e a busca do conhecimento de sua biologia e de seus mecanismos de ação pode levar ao maior entendimento das bases moleculares dessa doença e a novas alternativas para o tratamento. A determinação de estruturas cristalográficas dos domínios de ligação dos receptores nucleares têm auxiliado na definição das bases estruturais para o conhecimento das funções destes receptores. Com a determinação das estruturas básicas dessas proteínas na presença e ausência de compostos específicos (ligantes, coativadores, corepressores, agonistas e antagonistas) tornou-se possível entender melhor como ocorre à ligação hormônio-receptor e saber quais são e onde estão localizados os aminoácidos mais importantes para que este processo ocorra. Os mecanismos envolvidos na Síndrome de Resistência aos Ligantes do PPAR γ necessitam ser esclarecidos e é necessário buscar mais informações sobre as estruturas e o funcionamento dos mutantes envolvidos nessa Síndrome.

O objetivo deste trabalho foi realizar estudos estruturais do LBD dos mutantes do PPAR γ envolvidos na Síndrome de Resistência ao Ligante do PPAR γ , buscando compreender os mecanismos envolvidos nessa síndrome. Para isso, foram construídos os mutantes F360L, P467L, V290M e R397C (nomenclatura PPAR γ 1) no vetor PET28a para expressão e purificação e no vetor pBIND para ensaios de transativação celular. Além disso foram realizados ensaios de co-cristalização e resolução de estruturas cristalográficas.

5.2 METODOLOGIA

5.2.1 Mutações sítio dirigidas

As mutações foram introduzidas através de uma reação de PCR nos vetores pBIND contendo a sequência do DBD-GAL4 e LBD-PPAR γ (para experimentos de transativação) e no plasmídeo PET28a contendo a sequência do PPAR γ LBD (para a expressão das proteínas recombinantes) com a sobreposição de *primers* contendo as mutações, usando técnicas padrão estabelecidas no kit *QuickChange site-directed mutagenesis* (Stratagene).

Os *primers* utilizados foram:

Tabela 4 - *Primers* construídos para a inserção de mutações em plasmídeos pBIND e PET28a

Mutante	Primer 5'-3' (base trocada em azul)
PPAR γ F360L	CTAAAGAGCCTGCGAAAGCCTTTGGGTGACTTTATGGAG
PPAR γ P467L	GACATGAGTCTTCACCTGCTCCTGCAGGAG ATCTACAAG
PPAR γ V290M	CATTATTCTCAGTGGAGACTGCCAGGTTTGCTGAATGTG
PPAR γ R397C	CTGCCAGTTTCGCTCCATGGAGGCTGTGCAGGAG

Todas as mutações foram verificadas através de sequenciamento. Depois de confirmada a mutação, os plasmídeos que codificavam a sequência gênica desses mutantes foram utilizados para os ensaios de transativação celular e expressão das proteínas.

5.2.2 Ensaios de transativação celular dos mutantes com rosiglitazona

Os ensaios de transativação celular foram realizados conforme o item 3.2.1 do Capítulo 3 com algumas modificações. Para esses ensaios foram utilizadas células HeLa e 100 ng do vetor pGRE-LUC, 10 ng do vetor pBIND contendo a sequência gênica do PPAR γ -LBD GAL4-DBD e das mutações F360L, P467L, R397C e V290M inseridas PPAR γ LBD e 2,5 ng do vetor pRL contendo o gene da luciferase de *Renilla*. As concentrações de rosiglitazona para a obtenção da curva dose-resposta e cálculo do EC50 variaram de 10^{-8} até 10^{-4} M.

5.2.3 Expressão e purificação do LBD do PPAR γ , P467L, F360I, R397C e V290M

Foram realizados vários testes de expressão dos mutantes em meio LB utilizando-se as temperaturas de 18, 30 e 37°C e concentrações de IPTG 0,5 e 1 mM, além de testes com meio de auto-indução¹⁸⁹. Após todos os testes verificou-se que a melhor condição de expressão foi a mesma utilizada para o PPAR γ e as proteínas foram expressas conforme descrito no item 3.2.2 e foram purificadas por cromatografia de afinidade e gel filtração conforme descrito no item 3.2.3 e 3.2.4 do Capítulo 3.

5.2.4 Ensaios de cristalização

Para os ensaios de cristalização dos mutantes, primeiramente, utilizou-se as condições e métodos de cristalização descritos para o PPAR γ nativo na ausência e presença de rosiglitazona, conforme descrito no item 3.2.5 do Capítulo 3. Como não foram obtidos cristais, foram utilizadas várias estratégias de cristalização, que incluíram diferentes concentrações de proteínas (5-18) mg/mL; temperaturas de cristalização que variavam de 4 e 18°C; adição de ligantes como ácidos graxos (ácido nonanóico), flavonóides (luteolina), TZDs (rosiglitazona e troglitazona) e AINEs (diclofenaco de sódio); ampla variedade de *kits* de cristalização comerciais; adição de aditivos e detergentes (*Additive Screen e Detergent Screen – Hampton Research*) e diferentes técnicas de cristalização (gota sentada, gota pendurada, *microbatch* e *seeding*).

Os ligantes foram adicionados com o objetivo de estabilizar melhor a proteína e favorecer a cristalização, os detergentes e alguns aditivos para favorecer interações entre as moléculas e outros aditivos para diminuir a constante dielétrica do meio e favorecer os contatos entre as moléculas. As diferentes técnicas de cristalização foram empregadas porque apresentam diferentes cinéticas de evaporação e podem influenciar no crescimento dos cristais. O *microbatch* é uma técnica na qual pequenas gotas de proteína e solução precipitante são adicionadas abaixo de uma camada de óleo, cujo princípio é que o reagente precipitante é instantaneamente adicionado à uma solução de proteína, deixando a solução rapidamente em um estado de supersaturação. As gotas ficam cobertas com uma camada de óleo que atua como um selante pra prevenir a evaporação. Outra técnica de cristalização utilizada foi o

seeding, que pode ser dividida em *microseeding* (*streakseeding*) e *macroseeding*. O *macroseeding* consiste em transferir um único, cristal pré-formado limpo. No *microseeding* são transferidos pequenos cristais que foram quebrados em vários fragmentos. E o *streakseeding* é um tipo de *microseeding* onde utiliza-se um pêlo contendo os pequenos cristais fragmentados para estriar a gota de cristalização. Esse pêlo com microcristais é passado sobre várias gotas, espalhando assim os núcleos, na tentativa de que novos e maiores cristais sejam formados.

5.2.5 Coleta de dados, resolução das estruturas cristalográficas e refinamento

Os cristais dos mutantes foram coletados na linha 5.0.1. do *Advanced Light Source* (ALS) - *Lawrence Berkeley National Laboratory* (Berkeley, CA, EUA). Previamente à coleta de dados, os cristais foram transferidos para uma solução crioprotetora, com a mesma composição do reservatório na qual cresceram os cristais, contendo 15% (v/v) de etilenoglicol e rapidamente resfriados em um fluxo de nitrogênio gasoso a -180°C. A estratégia de coleta e processamento foram realizados conforme descrito no item 3.2.6 do Capítulo 3. Na etapa seguinte, foram utilizados os programa Pointless do pacote CCP4¹⁴, que auxilia na determinação do grupo espacial e o *Xtriage* do pacote PHENIX¹⁵, para verificar a presença de *twinning* no cristal e também avaliar a qualidade do processamento realizado. As estruturas foram determinadas por substituição molecular utilizando-se o programa PHASER do pacote CCP4¹³⁶ e como modelo a estrutura do PPAR γ LBD resolvida neste trabalho e depositada no PDB sob o código 3SZ1. O refinamento, a construção do modelo e a validação da estrutura foram realizados conforme descrito em 3.2.7 do Capítulo 3.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Ensaios de transativação celular dos mutantes F360L, P467L, R397C e V290M

Foram realizados ensaios de transativação celular em células HeLa com os mutantes F360L, P467L, R397C e V290M com a rosiglitazona para verificar se as mutações

prejudicavam a ativação dos receptores por esse fármaco. As curvas dose resposta da rosiglitazona (10^{-8} a 10^{-4} M), foram normalizadas pela atividade da luciferase obtida com o DMSO e também normalizadas para uma mesma escala de ativação para comparação entre os mutantes. Observou-se que a rosiglitazona ativa o receptores de maneira dose-dependente com EC50 de 9,0 μ M para o PPAR γ , 4,2 μ M para o F360L, 12,5 μ M para o P467L e 27,4 μ M para o R397C e 14,8 μ M para o V290M (Fig. 25). Com os resultados obtidos, verificou-se que o EC50 para a rosiglitazona encontra-se em uma faixa muito próxima entre o receptor nativo e os mutantes, porém observou-se que o PPAR γ requer menores concentrações de rosiglitazona para começar a ser ativado em relação aos mutantes (Fig 25). Ao comparar-se a ativação dos receptores com 1 μ M de rosiglitazona, constatou-se que o PPAR γ possui a maior ativação, seguido pelo F360L com uma ativação similar ao nativo, V290M, R397C, sendo que o P467L apresenta a menor ativação nessa concentração (Fig 25B).

Figura 25 - Ensaios de transativação celular do PPAR γ e dos mutantes F360L, P467L, R397C e V290M com rosiglitazona. (A) Curvas dose-resposta com diluições seriadas de rosiglitazona (10^{-9} a 10^{-4} M). (B) Atividade da luciferase normalizada obtida para a ativação dos mutantes com de 1 μ M de rosiglitazona. Todos os ensaios foram realizados em três replicatas e normalizados para as diferenças na eficiência de transfecção pela medida da atividade da luciferase de *Renilla* no mesmo lisado celular, pela atividade da luciferase obtida com o DMSO e também normalizadas para uma mesma escala para comparação entre os mutantes.

5.3.2 Expressão e purificação do PPAR γ , P467L, F360L, R397C e V290M

As proteínas foram expressas e purificadas conforme descrito no item 5.2.3. A figura 26 mostra o perfil cromatográfico das proteínas após clivagem da cauda de histidinas e purificação por gel filtração, onde são eluídas da coluna em um volume de aproximadamente 90 mL, correspondente a proteínas de massa de aproximadamente 30 kDa. A pureza das

amostras foi confirmada por SDS-PAGE (Fig 26, inserto). O rendimento da purificação das proteínas foi 40 mg/L de cultivo para o PPAR γ , 30 mg/L para a P467L, 15 mg/L para a V290M, 10 mg/mL para a F360L e 3 mg/L para a R397C. As proteínas foram concentradas até 10 mg/mL e armazenadas a -80°C.

Figura 26 - Cromatograma da gel filtração das proteína purificadas. A proteína eluiu da coluna de gel filtração no pico correspondente a 90 mL. A figura inserida mostra um gel SDS-PAGE após gel filtração e concentração das proteínas, mostrando a pureza das amostras. 1: PPAR γ , 2: P467L, 3: R397C, 4: F360L, 5: V290M. MW: 66 kDa, 45 kDa, 31 kDa, 20 kDa, 15 kDa.

5.3.3 Ensaios de cristalização com os mutantes do PPAR γ

Previamente aos ensaios de cristalização, foram realizados experimentos de dicroísmo celular (CD) com os mutantes e verificou-se que apresentavam o mesmo perfil nos espectros de CD que a proteína nativa, portanto, as mutações provavelmente não causaram o desenovelamento das proteínas (dados não mostrados). Nos ensaios de cristalização, obteve-se pequenos cristais do mutante R397C cristalizado na presença de luteolina na condição de Citrato de Sódio 0,90 M e Hepes 100 mM pH 7,0 pelo método da gota pendurada (Fig. 27), porém esse cristais difrataram a baixa resolução (em torno de 25 Å) e não foi possível reproduzir essa condição de cristalização. Além dos cristais de R397C, foram obtidos cristais do mutante V290M na presença de ácido nonanóico na condição de Citrato de Sódio 1 M pH 7,5. Os cristais obtidos nessas condições apresentavam o formato de pequenas agulhas e em

alguns casos, formaram-se *clusters* de agulhas. Novas tentativas de cristalização foram realizadas com o objetivo de otimizar a morfologia dos cristais obtidos, variando-se concentração de proteína, precipitante e pH e também foi utilizada a técnica de *seeding* com as pequenas agulhas obtidas. Apesar da busca exaustiva, tal procedimento não foi capaz de produzir cristais de melhor qualidade que os obtidos previamente.

Outra estratégia utilizada foi a adição de detergentes à condição de cristalização. Para isso, utilizou-se a técnica da gota sentada fixando-se a concentração da solução do poço em Citrato de Sódio 1 M, Hepes 100 mM pH 7,5 e adicionando-se aditivos e detergentes conforme a proporção recomendada pelo fabricante (*Additive Screen e Detergent Screen – Hampton Research*). Com essa técnica obtiveram-se cristais melhores formados na condição contendo o detergente dodecil nonaetilenoglicol éter (C12E9). Os cristais obtidos foram submetidos a experimentos de difração de raios-X na linha MX2 do LNLS e difrataram a baixa resolução (em torno de 20 Å). Várias tentativas foram realizadas para melhorar esses cristais, porém não foram obtidos cristais com maior poder de difração e não foi possível reproduzir a condição com o detergente.

Figura 27 - Cristais dos mutantes do PPAR γ .

Durante estágio de doutoramento realizado no *The Methodist Hospital Research Institute* (Houston, Texas, EUA) além dos ensaios celulares, foram realizadas novas tentativas de cristalização dos receptores mutantes. Após um *screening* inicial utilizando-se o robô de cristalização *Mosquito* (TTP LABTech) e o *kit* de cristalização PEG II (Qiagen) e obtiveram-se cristais do mutante V290M complexado com diclofenaco de sódio (Fig. 27). A coleta de dados foi realizada linha 5.0.1. do *Advanced Light Source* (ALS) - *Lawrence Berkeley National Laboratory*, utilizando-se comprimento de onda de 0,999 Å. Dentre os cristais testados, foi possível coletar um conjunto de dados do mutante V290M complexado com

diclofenaco de sódio que cresceram na condição de Cloreto de Cálcio 200 mM, HEPES 100 mM pH 7,5, PEG 4000 30 % (Fig. 27).

O conjunto de dados foi processado com o programa iMosflm¹³⁵ e estimou-se que havia 1 molécula e aproximadamente 47% de solvente na unidade assimétrica com o programa Matthews_coef¹³⁶. As fases iniciais foram determinadas pela técnica de substituição molecular com o PHASER¹³⁶ utilizando-se como modelo a estrutura 3SZ1 (PDB), com o PDB editado deletando-se o resíduo V290. A tabela 5 mostra os parâmetros referentes às estatísticas de coleta, processamento dos dados de difração de raios-X e refinamento do mutante V290M.

Tabela 5 - Estatísticas cristalográficas: V290M

Fonte Síncroton	ALS 0,999 Å
Grupo Espacial	P4 ₃ 2 ₁ 2
Parâmetros da cela unitária	
a (Å)	60,01
b (Å)	60,01
c (Å)	160,74
Moléculas na unidade assimétrica	1
Resolução (Å)	53,58-2,30 (2,42-2,30)
Número de reflexões únicas	12899 (1950)
Multiplicidade	4,9 (5,1)
Completeza (%)	93,1 (100)
R_{sym}^a	0,119 (0,495)
<I>/<σ(I)>	7,4 (2,80)
R_{factor}^b (%)	25,50
R_{free}^b (%)	28,02
B-fator médio(Å²)	36,3
rmsd distância de ligação (Å)	0,09
rmsd ângulos de ligação (°)	1,211
Ramachandran outliers	0

^a $R_{sym} = \sum_{hkl} \sum_j (|I_{hkl} - \langle I_{hkl} \rangle| / \sum_{hkl} \sum_j I_{hkl})$, onde I_{hkl} é o valor da intensidade para uma única refexão dentro de um conjunto de reflexões simetricamente relacionadas, e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a média das intensidades para um conjunto j de reflexões simetricamente relacionadas. ^b $R_{factor}/R_{free} = \sum_{hkl} |F_{obs} - F_{calc}| / \sum_{hkl} |F_{obs}|$, onde F_{obs} e F_{calc} correspondem aos fatores de estrutura observados calculados. Para o cálculo do R_{free} , foram utilizadas somente 5 % das reflexões omitidas do refinamento. Os valores entre parênteses se referem a camada mais externa de resolução.

5.3.4 Análises estruturais dos mutantes

A estrutura tridimensional do mutante V290M foi determinada a uma resolução de 2,3 Å e também consiste de 12 α-hélices que formam um sanduíche de três camadas antiparalelas de α-hélices com 4 pequenas fitas β, como descrito anteriormente para outras estruturas do PPARγ⁸ (Fig. 28). Através da análise da densidade eletrônica, constatou-se a presença da mutação V290M.

Figura 28 - Estrutura cristalográfica da estrutura do mutante V290M do PPAR γ LBD. O mapa omissão (*omit map*) 2Fo-Fc está mostrado a um contorno de 1,0 σ para a área em torno da metionina M290 (verde, *stick ball*). A H12 está colorida em azul e a folha β em laranja.

Para obter mais informações sobre as bases moleculares dos efeitos deletérios que a mutação V290M pode causar à função do LBD, nós examinamos a estrutura cristalográfica desse mutante sobreposta à estrutura do PPAR γ ligado ao coativador SRC1 (PDB: 2PRG)⁸. O resíduo V290 está localizado na H3 e possui um papel importante no posicionamento da hélice H12 fazendo interações hidrofóbicas com H466, L468 e L469 (Fig. 29B). A mutação de um único resíduo V290M causou profundas mudanças estruturais no receptor. A substituição de uma valina por um resíduo mais volumoso (Fig. 29C) causou impedimentos estéricos com o resíduo L469, o que deslocou a H12 e impediu seu fechamento. A H12 é importante tanto para a ligação do ligante quanto para o recrutamento do coativador. A L469 contribui com interações hidrofóbicas para a acomodação da cabeça polar das TZDs e a Y473 faz uma ligação de hidrogênio com o nitrogênio das TZDs (Fig. 29C). Portanto, a mutação V290M perturba a orientação e as propriedades dinâmicas da H12.

Figura 29 - Comparação das estruturas cristalográficas do mutante V290M PPAR γ LBD e da estrutura 2PRG (A). A valina V290 é importante para o correto posicionamento da H12 e faz interações hidrofóbicas com os resíduos L458, L469 e H466. A Y473 da H12 faz uma ligação de hidrogênio com a rosiglitazona, estabilizando a hélice na conformação ativa (B). A metionina M290 é um resíduo mais volumoso que a valina e causa impedimentos estéricos com a L469, deslocando a H12 e impedindo o seu fechamento (C). A H12 da estrutura 2PRG com o ligante rosiglitazona (pink, *stick ball*) está mostrada em vermelho e a H12 da estrutura do mutante V290 em azul. Os aminoácidos L469 e M290 estão mostrados como *dots*, representando os raios de Van der Waals.

O correto posicionamento da H12 é importante para formação do sítio de ligação do complexo coativador. Os coativadores do PPAR γ , como o *steroid receptor coactivator 1* (SRC1) e *CREB binding protein* (CBP), se ligam ao receptor por um motivo (*NRbox*) muito conservado LxxLL, onde x pode ser qualquer resíduo ¹. A ligação dos agonistas totais como TZDs ajudam a estabilizar a H12 na posição ativa por uma ligação de hidrogênio com a Y473, formando o sítio do coativador que consiste de uma cavidade hidrofóbica formada pelas H3, H4 e H5 onde o motivo LxxLL dos coativadores pode se ligar (Fig. 30A). A H12 na posição ativa também ajuda no posicionamento do coativador por interações diretas do resíduo E471 com o dipolo da hélice do coativador e o resíduo L468 (H12) também interage com o coativador. Além disso, o coativador também faz uma ligação de hidrogênio com a K301 (H3). A K301 e o E471 (H12) são conhecidos como *charge clamp*, por ajudarem a posicionar corretamente o coativador.

A mutação V290M desloca a H12 e impede a sua conformação ativa, prejudicando o correto posicionamento do coativador pelo rompimento das ligações de hidrogênio com o E471 e interação hidrofóbica com a L468. A H12 do mutante está deslocada aproximadamente 90° em relação a H12 da estrutura 2PRG e o posicionamento do coativador, conforme apresentado na figura 30A em amarelo, também causaria um impedimento estérico entre a lisina do coativador e a H12 do mutante em azul.

Para avaliar se a H12 do mutante V290M estaria assumindo uma conformação inativa, mais característica de antagonistas, essa estrutura foi sobreposta à estrutura cristalográfica do PPAR α cristalizada na presença do antagonista GW6471 e o peptídeo correpressor SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors*); (PDB: 1KKQ) ⁹. Nessa estrutura, o antagonista GW6471 impede o fechamento da H12 por um impedimento estérico com a Y473 e essa hélice apresenta-se desenovelada, ocupando uma posição inativa e permitindo que o peptídeo correpressor possa se ligar.

Os correpressores apresentam um motivo conservado formado por LxxxIxxxL/I (*CoRNR-box*) e podem se ligar aos receptores na ausência de ligantes ou presença de antagonistas, recrutando um complexo de histona desacetilases, o que resulta na repressão da transcrição de genes alvo ¹⁹⁰. A superfície de ligação dos motivos *CoRNR-boxes* e do motivo LxxLL dos coativadores se sobrepõem parcialmente, indicando que só é possível ligação do coativador ou do correpressor. A ligação do correpressor se estende por regiões usualmente ocupadas pela H12 na conformação ativa, portanto, a ligação do correpressor não pode ocorrer quando o LBD está em seu estado ativo.

Ao analisar-se a estrutura do PPAR α com o peptídeo correpressor SMRT (PDB 1KKQ), pode-se sugerir que a mutação V290M poderia estabilizar a ligação do correpressor, porque a V290 faz contato com a isoleucina do motivo SMRT e quando o resíduo 290 é substituído pela metionina, sua cadeia lateral maior proporciona mais contatos de Van der Waals, estabilizando melhor a interação com o correpressor. Ao comparar-se a posição da H12 do mutante V290M e do peptídeo correpressor da estrutura 1KKQ, observou-se que ocorreria um impedimento estérico entre ambos e que possivelmente, em solução, a H12 do mutante V290M adote uma conformação mais estendida semelhante a da estrutura 1KKQ (em verde, Fig. 30B).

Figura 30 - Comparação das estruturas cristalográficas do mutante V290M PPAR γ LBD, 2PRG e 1KKQ. (A) Sobreposição da estrutura cristalográfica do mutante V290M (H12 em azul) com a estrutura 2PRG, na qual o PPAR γ está complexado com rosiglitazona (rosa, *stick balls*) e o peptídeo coativador SRC1 (amarelo), mostrando que a H12 na conformação ativa (vermelho) é necessária para o correto posicionamento do coativador (amarelo) pela interação com o E471 e K301 (*charge clamp*). (B) Sobreposição da estrutura cristalográfica do mutante V290M com a 1KKQ, na qual o PPAR α está complexado ao GW6471 (amarelo, *stick balls*) e o peptídeo correpressor SMRT (magenta), mostrando que a H12 adota uma conformação inativa (verde). (C) Análise do empacotamento cristalino do mutante V290M mostrando que a conformação adotada pela H12 ocorre devido a ligações de hidrogênio entre a Q470 e a Y473 com a H12 da molécula simétrica. As moléculas de cada unidade assimétrica estão representadas em *cartoon*/superfície e com cores diferentes para evidenciar o empacotamento entre as cadeias.

Com as análises da posição da H12 em uma conformação ativa induzida pelo agonista total rosiglitazona (2PRG) e a posição da H12 adotada na presença do antagonista GW6471 (1KKQ), observou-se que a H12 do mutante na estrutura do V290M não adota conformações similares à ativa e nem à inativa. Foram analisados os empacotamentos cristalinos que demonstraram que a H12 do mutante V290M interage com a H12 da molécula simétrica por ligações de hidrogênio entre a cadeia lateral da Q470 e a cadeia principal da Y473 em ambas as moléculas (Fig. 30C).

Como não foi possível obter cristais dos outros mutantes F360L, P467L e R397C, os resíduos de aminoácidos foram mudados no programa Pymol utilizando-se como modelo a estrutura intacta do receptor PDB 3DZY ⁷ (Fig. 31A) para fazer uma predição das possíveis mudanças que as mutações poderiam causar na estrutura cristalográfica. Verificou-se que as mutações estão localizadas em diferentes regiões do LBD (Fig 31B) e nenhuma das posições mudadas faz interações diretas com o ligante, mas poderiam, hipoteticamente, afetar a estrutura global do PPAR γ , sugerindo que outros mecanismos possam estar envolvidos na diminuição da função do receptor.

A mutação P467L encontra-se no início da H12 e a mutação de uma prolina por uma leucina pode alterar a orientação e as propriedades dinâmicas da H12, prejudicando o seu correto posicionamento e a ligação de coativadores (Fig 31B). A fenilalanina F360 está situada na H7 e faz interações hidrofóbicas com o resíduo I456 (H11), F282 e A278 (H3), contribuindo para o empacotamento dessas hélices e estabilização dessa parte da estrutura (Fig. 31C). A mutação da fenilalanina para um resíduo também hidrofóbico mas menos volumoso, pode diminuir as interações hidrofóbicas na parte final da H3 e H11 e desestabilizar um pouco essa região.

A arginina R397 na (*loop* H8/H9) encontra-se em uma região muito conservada do receptor e faz uma ponte salina com o resíduo E324 (H4/H5), ajudando a estabilizar a H12 (Fig 31D). Nessa posição, o resíduo H323 presente na H4/5 faz uma interação importante com a rosiglitazona. Além disso, observou-se que a R397 posiciona o *loop* de tal forma que os resíduos G395, D396 e P398 desse *loop* ajudam a formar a superfície de heterodimerização com o RXR α (Fig. 31E). Portanto, a mutação de uma arginina por uma cisteína romperá a formação da ponte salina com o resíduo E324 tornando o *loop* H8/9, no qual esse resíduo está presente, mais móvel e prejudicando a heterodimerização com o RXR e consequentemente a ligação ao DNA. Além disso, talvez a H323 ficasse um pouco mais móvel e prejudicaria a interação com a rosiglitazona. Para testar essas hipóteses, seria interessante realizar simulações de dinâmica molecular.

Figura 31 - Análise estrutural das mutações F360L, P467L, V290M e R397C. (A) Estrutura intacta do PPAR γ (PDB 3DZY), com LBD (azul) e o DBD (ciano) formando heterodímero com o RXR (rosa) e na presença do peptídeo coativador (laranja) e rosiglitazona (vermelho, *stick ball*). (B) PPAR γ LBD mostrando a localização das mutações (rosa, esferas). (C) A F360 faz interações hidrofóbicas com os resíduos I456 (H11), F282 (H7) e A278 (H3), ajudando a estabilizar essa região. (D) A R397 faz uma ponte salina com o E324 e o resíduo H323 situado no lado oposto dessa hélice que interage com a rosiglitazona. (E) A R397 interagindo com o E324 ajuda a posicionar o loop entre a H8 e H9 de tal forma que ajuda a formar a superfície de heterodimerização com RXR.

5.4 DISCUSSÃO

Neste trabalho, nós investigamos o modo de ação da rosiglitazona na ativação dos mutantes F360L, P467L, R397C e V290M do PPAR γ envolvidos na Síndrome de Resistência aos Ligantes do PPAR γ através de ensaios funcionais e também pela resolução da estrutura cristalográfica de um desses mutantes, o V290M. Os ensaios de transativação celular realizados em células HeLa, usando uma construção quimérica do LBD do PPAR γ nativo e

mutantes e o DBD do GAL4 revelaram que o EC50 para a rosiglitazona possui um valor muito próximo entre os receptores nativo e mutantes, indicando que aparentemente a potência do fármaco para os mutantes é similar ao encontrado para o PPAR γ nativo nesse sistema testado. Porém, ao observar-se em qual concentração a rosiglitazona começa a causar ativação dos receptores, constatou-se que o PPAR γ nativo necessita de menores concentrações desse fármaco para causar a ativação do receptor (Fig. 25) .

A transcrição gênica mediada pelos receptores nucleares é um processo complexo que envolve primeiramente a ligação do ligante, o qual irá estabilizar algumas regiões da proteína causando mudanças conformacionais que facilitam o desligamento de correpressores e a ligação de coativadores, heterodimerização com RXR (ex: PPARs), formando complexos multiprotéicos, que irão reconhecer sequências alvo no DNA, descondensar a cromatina e promover a transcrição dos genes alvo ¹. Portanto, vários fatores podem interferir com o acontecimento desse processo.

As análises das estruturas cristalográficas dos LBDs dos receptores nucleares sugerem que os ligantes ao ativarem os receptores, ajudam a posicionar a H12 em uma conformação ativa que contribui para formação do sítio hidrofóbico de ligação (H3, H4 e H5) e recrutamento dos coativadores ⁸. A importância da H12 na sinalização dos receptores nucleares é enfatizada pelas observações que mutações naturais que ocorrem no PPAR γ , que podem desestabilizar a H12, resultam em severa resistência à insulina, diabetes mellitus tipo II e hipertensão ¹⁸¹.

A estrutura cristalográfica do mutante V290M apresentada neste trabalho demonstrou que a mutação de uma valina por metionina (H3) impede o fechamento da H12 e, portanto altera a sua orientação e dinâmica, prejudicando a formação do sítio de ligação e o correto posicionamento dos coativadores (Fig. 29). Da mesma forma, a mutação P467L, situada no início da H12, provavelmente impeça a H12 de adotar uma conformação ativa, resultando em recrutamento reduzido de coativadores e um fenótipo dominante negativo. As mutações V290M e P467L inibem a atividade transcrricional do receptor nativo de uma maneira dominante negativa, levam à liberação prejudicada do correpressor em resposta aos ligantes e, por reterem sua capacidade de ligação ao DNA, geram esses complexos estáveis do PPAR γ -correpressor que podem competir com o receptor nativo pela ligação ao DNA e inibir a regulação dos genes alvo do PPAR γ ¹⁸⁰.

Alguns estudos de anisotropia de fluorescência com um fluoróforo ligado ao C-terminal demonstraram que a H12 do mutante P467L é mais móvel que no receptor nativo e permanece móvel mesmo na presença de ligante e coativador e, portanto, essa região pode

estar desenovelada e não ser mais uma hélice ¹⁵⁷. Além disso, o mutante P467L exibiu deficiências no recrutamento do coativador CBP (*CREB binding protein*) em comparação com o PPAR γ nativo ¹⁵⁷.

Um alinhamento estrutural dos receptores nucleares revelou que a R397 faz parte de uma assinatura estrutural, que define os receptores nucleares que formam dímeros com o RXR (receptores classe II) na qual esta arginina está envolvida na formação de uma ponte salina conservada com um resíduo carregado negativamente na H4/5 (E324). Já os receptores homodiméricos de classe I não possuem essa arginina conservada e essa ponte salina interna. Jeninga e colaboradores demonstraram que esse mutante possui uma atividade transcricional reduzida comparado com o receptor nativo, que ocorre devido à uma diminuição da dimerização do receptor com o RXR em combinação com a redução da ligação do ligante e subsequentemente da ligação do coativador. O mutante R397C não inibiu o receptor nativo de maneira dominante negativa, sugerindo um mecanismo de haploinsuficiência pelo menos em alguns pacientes com FPLD3 ¹⁸⁰.

A lipodistrofia geral ou localizada do tecido adiposo está associada a distúrbios metabólicos como resistência à insulina, diabetes, dislipidemia e hipertensão, indicando que a distribuição e manutenção do tecido adiposo são importantes para a homeostase metabólica. A maioria das mutações raras heterozigóticas reportadas relacionadas à perda de função do PPAR γ estão associadas com um fenótipo clínico distinto, caracterizado por lipodistrofia parcial familiar do tipo 3 (FPLD3), na qual os indivíduos afetados manifestam perda da gordura distal dos membros. A combinação de estudos cristalográficos, celulares e investigações *in vivo* podem ajudar a desenhar abordagens farmacológicas mais racionais e ajudar no entendimento do processo da doença, revelando mecanismos que podem ser aplicados às condições comuns como resistência à insulina, diabetes tipo II e dislipidemia.

Salvador Dalí

CAPÍTULO 6

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CAPÍTULO 6

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho realizou-se ensaios de transativação celular com o PPAR γ e verificou-se que a luteolina pode ativar o receptor de maneira dose-dependente e quando testada na presença de rosiglitazona pode competir com esse agonista total. A resolução da estrutura cristalográfica permitiu identificar o modo de ligação da luteolina e os principais resíduos envolvidos nessa interação com o PPAR γ . Verificou-se também que ela está localizada entre a H3 e a folha β , que é uma região onde comumente são encontrados os agonistas parciais ¹⁴⁹.

A luteolina é um flavonóide amplamente encontrado em ervas medicinais e alimentos vegetais. A luteolina aumentou a expressão do transportador de glicose GLUT4 de forma similar à rosiglitazona e não aumentou a expressão de genes relacionados ao metabolismo e armazenamento de lipídios. Portanto, ela tem o potencial de ajudar a melhorar a resistência à insulina e poderia ser utilizada como um nutracêutico para o tratamento do diabetes tipo II. Além disso, ela inibiu a diferenciação de adipócitos promovida pela rosiglitazona e provavelmente não promove ganho de peso, como agonistas totais.

Também foi demonstrado que dois ligantes diferentes podem se ligar ao bolsão de ligação do PPAR γ . Isso pode ter efeitos fisiológicos importantes porque os ácidos graxos identificados estão presentes nas células e podem atuar sinergicamente com a luteolina na ativação do receptor. A estrutura cristalográfica do PPAR γ complexado com o ácido mirístico e a luteolina também permitirá que se desenhe novos agonistas, por exemplo, pela união dos dois ligantes. Este trabalho espera ter contribuído com o entendimento do modo de ligação da luteolina ao PPAR γ e porque ela é um agonista parcial.

Os AINEs são amplamente utilizados no tratamento de dor e inflamação e pela inibição das ciclooxigenases, porém tem sido demonstrado que eles podem se ligar a outros alvos, como o PPAR α e PPAR γ . Neste trabalho, foi demonstrado que os AINEs diclofenaco, ibuprofeno, indometacina e sulfeto de sulindaco ativam o PPAR γ de maneira dose-dependente. Além disso, o diclofenaco, o ibuprofeno e a indometacina promovem a diferenciação de adipócitos e isso pode resultar em efeitos adversos, como ganho de peso, em pacientes que fazem uso de altas doses desses medicamentos, como no caso do tratamento para artrite reumatóide.

O modo de ligação do diclofenaco, indometacina e sulfeto de sulindaco ao LBD foram elucidados neste trabalho e demonstrou-se que o diclofenaco se liga ao LBD na região entre a H3 a folha β , enquanto que o sulfeto de sulindaco e indometacina apresentam moléculas ligadas nessa região e também na região adjacente a H12, fazendo interações com essa hélice e mantendo-a na posição ativa.

Novos estudos devem ser realizados com os AINEs para melhor caracterizar os efeitos fisiológicos que eles podem causar pela ativação do PPAR γ , como a avaliação de sua capacidade de melhorar a sensibilidade à insulina e análises de expressão gênica para verificar se suprimem a produção de citocinas inflamatórias mediada por PPAR γ . Dessa forma, a elucidação das estruturas cristalográficas descritas neste trabalho e o entendimento do modo de ligação desses AINEs permite que se desenhem fármacos mais específicos, que possam se ligar ao PPAR γ sem ativar a COX, que poderiam combater a inflamação sem causar efeitos ulcerogênicos no trato gastro-intestinal causados pela inibição da COX1, por exemplo.

A Síndrome de Resistência ao Ligante está associada com algumas mutações no LBD do PPAR γ , que prejudicam a função do receptor, resultando em um fenótipo de lipodistrofia parcial, diabetes precoce, dislipidemia e hipertensão. Neste trabalho, foi resolvida a estrutura cristalográfica do mutante V290M, que demonstrou que uma única mutação pontual pode causar profundas mudanças estruturais no receptor. A troca de uma valina por metionina na posição 290 impede o correto posicionamento e fechamento da H12. Dessa forma, a mutação altera a dinâmica da H12 e prejudica a ligação complexo-coativador, que é necessária para a transcrição gênica. Esse estudo auxiliou no entendimento das bases moleculares dessa síndrome.

REFERÊNCIAS

- 1 ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. **Physiological Reviews**, v.81, n.3, p.1269-304, 2001. ISSN 0031-9333.

- 2 GRONEMEYER, H.; GUSTAFSSON, J. A.; LAUDET, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.3, n.11, p.950-64, 2004. ISSN 1474-1776.

- 3 BAYS, H.; STEIN, E. A. Pharmacotherapy for dyslipidaemia--current therapies and future agents. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v.4, n.11, p.1901-38, 2003. ISSN 1465-6566.

- 4 LAW, S. W. et al. Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. **Molecular Endocrinology**, v.6, n.12, p.2129-35, 1992. ISSN 0888-8809.

- 5 MARUYAMA, K. et al. The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily (review). **International Journal of Oncology**, v.12, n.6, p.1237-43, 1998. ISSN 1019-6439.

- 6 KRUST, A. et al. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. **EMBO Journal**, v.5, n.5, p.891-7, 1986. ISSN 0261-4189.

- 7 CHANDRA, V. et al. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR-alpha nuclear receptor complex on DNA. **Nature**, p.350-356, 2008. ISSN 1476-4687.

- 8 NOLTE, R. et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. **Nature**, v.395, n.6698, p.137-43, 1998. ISSN 0028-0836.

- 9 XU, H. E. et al. Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha. **Nature**, v.415, n.6873, p.813-7, 2002. ISSN 0028-0836.

- 10 DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. **Endocrine Reviews**, v.20, n.5, p.649-88, 1999. ISSN 0163-769X.

- 11 YEN, P. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. **Physiological Reviews**, v.81, n.3, p.1097-142, 2001. ISSN 0031-9333.

- 12 HEERY, D. M. et al. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. **Nature**, v.387, n.6634, p.733-6, 1997. ISSN 0028-0836.

- 13 JEYAKUMAR, M.; TANEN, M. R.; BAGCHI, M. K. Analysis of the functional role of steroid receptor coactivator-1 in ligand-induced transactivation by thyroid hormone receptor. **Molecular Endocrinology**, v.11, n.6, p.755-67, 1997. ISSN 0888-8809.
- 14 GLASS, C. K.; ROSE, D. W.; ROSENFELD, M. G. Nuclear receptor coactivators. **Current Opinion in Cell Biology**, v.9, n.2, p.222-32, 1997. ISSN 0955-0674.
- 15 FENG, W. et al. Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. **Science**, v.280, n.5370, p.1747-9, 1998. ISSN 0036-8075.
- 16 CHEN, Z. P. et al. Pure and functionally homogeneous recombinant retinoid X receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.41, p.25770-6, 1994. ISSN 0021-9258.
- 17 HÖRLEIN, A. J. et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. **Nature**, v.377, n.6548, p.397-404, 1995. ISSN 0028-0836.
- 18 MORAS, D.; GRONEMEYER, H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. **Current Opinion in Cell Biology**, v.10, n.3, p.384-91, 1998. ISSN 0955-0674.
- 19 ZOETE, V.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1771, n.8, p.915-25, 2007. ISSN 0006-3002.
- 20 LE DOUARIN, B. et al. A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. **EMBO Journal**, v.15, n.23, p.6701-15, 1996. ISSN 0261-4189.
- 21 VOEGEL, J. J. et al. The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. **EMBO JOURNAL**, v.17, n.2, p.507-19, 1998. ISSN 0261-4189.
- 22 NUNN, A. V.; BELL, J.; BARTER, P. The integration of lipid-sensing and anti-inflammatory effects: how the PPARs play a role in metabolic balance. **Nuclear Receptor**, v.5, n.1, p.1, 2007. ISSN 1478-1336.
- 23 KLIEWER, S. A. et al. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. **Nature**, v.355, n.6359, p.446-9, 1992. ISSN 0028-0836.
- 24 MUKHERJEE, R. et al. Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. **Nature**, v.386, n.6623, p.407-10, 1997. ISSN 0028-0836.

- 25 PETERS, G. A.; KHAN, S. A. Estrogen receptor domains E and F: role in dimerization and interaction with coactivator RIP-140. **Molecular Endocrinology**, v.13, n.2, p.286-96, 1999. ISSN 0888-8809.

- 26 ISSEMAN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, v.347, n.6294, p.645-50, 1990. ISSN 0028-0836.

- 27 MICHALIK, L. et al. PPAR expression and function during vertebrate development. **International Journal of Developmental Biology**, v.46, n.1, p.105-14, 2002. ISSN 0214-6282.

- 28 GILDE, A. J.; VAN BILSEN, M. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): regulators of gene expression in heart and skeletal muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.178, n.4, p.425-34, 2003. ISSN 0001-6772.

- 29 FORMAN, B.; CHEN, J.; EVANS, R. The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.804, p.266-75, 1996. ISSN 0077-8923.

- 30 KLIWER, S. et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.91, n.15, p.7355-9, 1994. ISSN 0027-8424.

- 31 MANDARD, S.; MÜLLER, M.; KERSTEN, S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.61, n.4, p.393-416, 2004. ISSN 1420-682X.

- 32 SCHOONJANS, K.; STAELS, B.; AUWERX, J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. **The Journal of Lipid Research**, v.37, n.5, p.907-25, 1996. ISSN 0022-2275.

- 33 _____. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1302, n.2, p.93-109, 1996. ISSN 0006-3002.

- 34 FORMAN, B. M.; CHEN, J.; EVANS, R. M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.94, n.9, p.4312-7, 1997. ISSN 0027-8424.

- 35 UNER, M. et al. Influence of surfactants on the physical stability of solid lipid nanoparticle (SLN) formulations. **Pharmazie**, v.59, n.4, p.331-2, 2004. ISSN 0031-7144.

- 36 KIM, H. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist treatment in a transgenic model of type 2 diabetes reverses the lipotoxic state and improves glucose homeostasis. **Diabetes**, v.52, n.7, p.1770-8, 2003. ISSN 0012-1797.
- 37 GUERRE-MILLO, M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.22, p.16638-42, 2000. ISSN 0021-9258.
- 38 TAN, N. et al. Critical roles of PPAR β/δ in keratinocyte response to inflammation. **Genes & Development**, v.15, n.24, p.3263-77, 2001. ISSN 0890-9369.
- 39 LIM, H.; DEY, S. PPAR δ functions as a prostacyclin receptor in blastocyst implantation. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.11, n.4, p.137-42, 2000. ISSN 1043-2760.
- 40 PETERS, J. et al. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor $\beta(\delta)$. **Molecular Cell Biology**, v.20, n.14, p.5119-28, 2000. ISSN 0270-7306.
- 41 SZNAIDMAN, M. L. et al. Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPAR δ)--synthesis and biological activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.13, n.9, p.1517-21, 2003. ISSN 0960-894X.
- 42 XU, H. E. et al. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. **Molecular Cell**, v.3, n.3, p.397-403, 1999. ISSN 1097-2765.
- 43 BERGER, J. et al. Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ and PPAR δ ligands produce distinct biological effects. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.10, p.6718-25, 1999. ISSN 0021-9258.
- 44 SHAW, N.; ELHOLM, M.; NOY, N. Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor β/δ . **Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.43, p.41589-92, 2003. ISSN 0021-9258.
- 45 GUPTA, D.; KONO, T.; EVANS-MOLINA, C. The role of peroxisome proliferator-activated receptor γ in pancreatic β cell function and survival: therapeutic implications for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.12, n.12, p.1036-47, 2010. ISSN 1463-1326.
- 46 STRAUS, D. S.; GLASS, C. K. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. **Trends in Immunology**, v.28, n.12, p.551-8, 2007. ISSN 1471-4906.

- 47 PICARD, F.; AUWERX, J. PPAR(gamma) and glucose homeostasis. **The Annual Review of Nutrition**, v.22, p.167-97, 2002. ISSN 0199-9885.
- 48 LEHRKE, M.; LAZAR, M. The many faces of PPARgamma. **Cell**, v.123, n.6, p.993-9, 2005. ISSN 0092-8674.
- 49 PASCUAL, G. et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. **Nature**, v.437, n.7059, p.759-63, 2005. ISSN 1476-4687.
- 50 MORAES, L. A.; PIQUERAS, L.; BISHOP-BAILEY, D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v.110, n.3, p.371-85, 2006. ISSN 0163-7258.
- 51 KOTA, B. P.; HUANG, T. H.; ROUFOGALIS, B. D. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacological Research**, v.51, n.2, p.85-94, 2005. ISSN 1043-6618.
- 52 SUNDVOLD, H.; LIEN, S. Identification of a novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma promoter in man and transactivation by the nuclear receptor RORalpha1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.287, n.2, p.383-90, 2001. ISSN 0006-291X.
- 53 TONTONOZ, P. et al. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. **Genes & Development**, v.8, n.10, p.1224-34, 1994. ISSN 0890-9369.
- 54 LEHMANN, J. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.6, p.3406-10, 1997. ISSN 0021-9258.
- 55 TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. **Cell**, v.79, n.7, p.1147-56, 1994. ISSN 0092-8674.
- 56 MUELLER, E. et al. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms. **Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.44, p.41925-30, 2002. ISSN 0021-9258.
- 57 OKUNO, A. et al. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. **Journal of Clinical Investigation**, v.101, n.6, p.1354-61, 1998. ISSN 0021-9738.
- 58 WU, Z.; BUCHER, N. L.; FARMER, S. R. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by

C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. **Molecular Cell Biology**, v.16, n.8, p.4128-36, 1996. ISSN 0270-7306.

59 WU, Z. et al. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. **Molecular Cell**, v.3, n.2, p.151-8, 1999. ISSN 1097-2765.

60 LEFTEROVA, M. I. et al. PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. **Genes & Development**, v.22, n.21, p.2941-52, 2008. ISSN 0890-9369.

61 SCHOONJANS, K. et al. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. **EMBO Journal**, v.15, n.19, p.5336-48, 1996. ISSN 0261-4189.

62 SCHOONJANS, K. et al. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.33, p.19269-76, 1995. ISSN 0021-9258.

63 MOTOJIMA, K. et al. Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.27, p.16710-4, 1998. ISSN 0021-9258.

64 AUWERX, J. PPARgamma, the ultimate thrifty gene. **Diabetologia**, v.42, n.9, p.1033-49, 1999. ISSN 0012-186X.

65 SCHOONJANS, K. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. **Current Opinion in Lipidology**, v.8, n.3, p.159-66, 1997. ISSN 0957-9672.

66 WALCZAK, R.; TONTONNOZ, P. PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPARgamma in the control of lipid metabolism. **Journal of Lipid Research**, v.43, n.2, p.177-86, 2002. ISSN 0022-2275.

67 GLASS, C. K. Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. **Journal of Clinical Investigation**, v.116, n.3, p.556-60, 2006. ISSN 0021-9738.

68 GAMPE, R. T. et al. Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. **Molecular Cell**, v.5, n.3, p.545-55, 2000. ISSN 1097-2765.

- 69 KLIEWER, S. A. et al. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. **Cell**, v.83, n.5, p.813-9, 1995. ISSN 0092-8674.

- 70 LEHMANN, J. et al. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). **Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.22, p.12953-6, 1995. ISSN 0021-9258.

- 71 LI, Y. et al. Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR gamma. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.15, n.8, p.865-7, 2008. ISSN 1545-9985.

- 72 RICOTE, M.; GLASS, C. K. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1771, n.8, p.926-35, 2007. ISSN 0006-3002.

- 73 FEIGE, J. N. et al. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. **Progress in Lipid Research**, v.45, n.2, p.120-59, 2006. ISSN 0163-7827.

- 74 HU, E. et al. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. **Science**, v.274, n.5295, p.2100-3, 1996. ISSN 0036-8075.

- 75 SHAO, D. et al. Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. **Nature**, v.396, n.6709, p.377-80, 1998. ISSN 0028-0836.

- 76 AMATO, A. A. et al. GQ-16, A novel PPAR γ ligand, promotes insulin sensitization without weight gain. **Journal of Biological Chemistry**, v.287, .33, p.28169-90, 2012. ISSN 1083-351X.

- 77 CHOI, J. H. et al. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5. **Nature**, v.466, n.7305, p.451-6, 2010. ISSN 1476-4687.

- 78 HAUSER, S. et al. Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.24, p.18527-33, 2000. ISSN 0021-9258.

- 79 YU, S.; REDDY, J. K. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1771, n.8, p.936-51, 2007. ISSN 0006-3002.

- 80 SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.87, n.1, p.4-14, 2010. ISSN 1872-8227.

81 GROSS, B.; STAELS, B. PPAR agonists: multimodal drugs for the treatment of type-2 diabetes. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.21, n.4, p.687-710, 2007. ISSN 1521-690X.

82 ARNER, P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.14, n.3, p.137-45, 2003. ISSN 1043-2760.

83 KAHN, C. R.; CHEN, L.; COHEN, S. E. Unraveling the mechanism of action of thiazolidinediones. **Journal of Clinical Investigation**, v.106, n.11, p.1305-7, 2000. ISSN 0021-9738.

84 BAUMANN, C. A. et al. Cloning and characterization of a functional peroxisome proliferator activator receptor-gamma-responsive element in the promoter of the CAP gene. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.13, p.9131-5, 2000. ISSN 0021-9258.

85 KRAMER, D. et al. Insulin-sensitizing effect of rosiglitazone (BRL-49653) by regulation of glucose transporters in muscle and fat of Zucker rats. **Metabolism**, v.50, n.11, p.1294-300, 2001. ISSN 0026-0495.

86 FERNÁNDEZ-REAL, J. M.; RICART, W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. **Endocrine Reviews**, v.24, n.3, p.278-301, 2003. ISSN 0163-769X.

87 DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends in Immunology**, v.25, n.1, p.4-7, 2004. ISSN 1471-4906.

88 TONTONNOZ, P.; SPIEGELMAN, B. M. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. **The Annual Review of Biochemistry**, v.77, p.289-312, 2008. ISSN 0066-4154.

89 CARIOU, B.; CHARBONNEL, B.; STAELS, B. Thiazolidinediones and PPAR γ agonists: time for a reassessment. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.23, n.5, p.205-15, 2012. ISSN 1879-3061.

90 BOUHLEL, M. A. et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. **Cell Metabolism**, v.6, n.2, p.137-43, 2007. ISSN 1550-4131.

91 STIENSTRA, R. et al. PPARs, Obesity, and Inflammation. **PPAR Research**, v.2007, p.95974, 2007. ISSN 1687-4757.

- 92 YAMAUCHI, T. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. **Nature Medicine**, v.7, n.8, p.941-6, 2001. ISSN 1078-8956.
- 93 SHIBUYA, A. et al. An autopsy case of troglitazone-induced fulminant hepatitis. **Diabetes Care**, v.21, n.12, p.2140-3, 1998. ISSN 0149-5992.
- 94 NISSEN, S. E.; WOLSKI, K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. **New England Journal of Medicine**, v.356, n.24, p.2457-71, 2007. ISSN 1533-4406.
- 95 LEWIS, J. D. et al. Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: interim report of a longitudinal cohort study. **Diabetes Care**, v.34, n.4, p.916-22, 2011. ISSN 1935-5548.
- 96 RUBENSTRUNK, A. et al. Safety issues and prospects for future generations of PPAR modulators. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1771, n.8, p.1065-81, 2007. ISSN 0006-3002.
- 97 KOSHIYAMA, H. et al. Rapid communication: inhibitory effect of pioglitazone on carotid arterial wall thickness in type 2 diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.86, n.7, p.3452-6, 2001. ISSN 0021-972X.
- 98 LEWIS, J. D. et al. An open-label trial of the PPAR-gamma ligand rosiglitazone for active ulcerative colitis. **The American Journal of Gastroenterology**, v.96, n.12, p.3323-8, 2001. ISSN 0002-9270.
- 99 SU, C. G.; LEWIS, J. D. Antineoplastic and anti-inflammatory effects of PPAR ligands in colitis. **Gastroenterology**, v.121, n.4, p.1019-21, 2001. ISSN 0016-5085.
- 100 WADA, K.; NAKAJIMA, A.; BLUMBERG, R. S. PPARgamma and inflammatory bowel disease: a new therapeutic target for ulcerative colitis and Crohn's disease. **Trends in Molecular Medicine**, v.7, n.8, p.329-31, 2001. ISSN 1471-4914.
- 101 GIAGINIS, C.; GIAGINI, A.; THEOCHARIS, S. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands as potential therapeutic agents to treat arthritis. **Pharmacological Research**, v.60, n.3, p.160-9, 2009. ISSN 1096-1186.
- 102 BORNIQUEL, S. et al. Nitrated oleic acid up-regulates PPARgamma and attenuates experimental inflammatory bowel disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v.48, n.4, p.499-505, 2010. ISSN 1873-4596.
- 103 RICOTE, M.; WELCH, J. S.; GLASS, C. K. Regulation of macrophage gene expression by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. **Hormone Research**, v.54, n.5-6, p.275-80, 2000. ISSN 0301-0163.

- 104 SARAYBA, M. A. et al. Inhibition of corneal neovascularization by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand. **Experimental Eye Research**, v.80, n.3, p.435-42, 2005. ISSN 0014-4835.
- 105 DELERIVE, P.; FRUCHART, J. C.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. **Journal of Endocrinology**, v.169, n.3, p.453-9, 2001. ISSN 0022-0795.
- 106 XIN, X. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.13, p.9116-21, 1999. ISSN 0021-9258.
- 107 PANIGRAHY, D. et al. PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v.110, n.7, p.923-32, 2002. ISSN 0021-9738.
- 108 SAIKA, S. et al. Effect of overexpression of PPARgamma on the healing process of corneal alkali burn in mice. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, v.293, n.1, p.C75-86, 2007. ISSN 0363-6143.
- 109 KIM, J.; OH, Y. S.; SHINN, S. H. Troglitazone reverses the inhibition of nitric oxide production by high glucose in cultured bovine retinal pericytes. **Experimental Eye Research**, v.81, n.1, p.65-70, 2005. ISSN 0014-4835.
- 110 LIBBY, P.; PLUTZKY, J. Inflammation in diabetes mellitus: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. **American Journal of Cardiology**, v.99, n.4A, p.27B-40B, 2007. ISSN 0002-9149.
- 111 DEVCHAND, P. R. et al. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. **Nature**, v.384, n.6604, p.39-43, 1996. ISSN 0028-0836.
- 112 RICOTE, M. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. **Nature**, v.391, n.6662, p.79-82, 1998. ISSN 0028-0836.
- 113 STAELS, B. et al. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. **Nature**, v.393, n.6687, p.790-3, 1998. ISSN 0028-0836.
- 114 BERGER, J. et al. Distinct properties and advantages of a novel peroxisome proliferator-activated protein [gamma] selective modulator. **Molecular Endocrinology**, v.17, n.4, p.662-76, 2003. ISSN 0888-8809.

- 115 RANGWALA, S.; LAZAR, M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.25, n.6, p.331-6, 2004. ISSN 0165-6147.
- 116 HIGGINS, L. S.; DEPAOLI, A. M. Selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) modulation as a strategy for safer therapeutic PPARgamma activation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.91, n.1, p.267S-272S, 2010. ISSN 1938-3207.
- 117 CHOI, J. H. et al. Antidiabetic actions of a non-agonist PPAR γ ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. **Nature**, 2011. ISSN 1476-4687.
- 118 NESTO, R. W. et al. Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v.27, n.1, p.256-63, 2004. ISSN 0149-5992.
- 119 ROCCHI, S. et al. A unique PPAR gamma ligand with potent insulin-sensitizing yet weak adipogenic activity. **Molecular Cell**, v.8, n.4, p.737-747, 2001. ISSN 1097-2765.
- 120 MINOURA, H. et al. Pharmacological characteristics of a novel nonthiazolidinedione insulin sensitizer, FK614. **European Journal of Pharmacology**, v.494, n.2-3, p.273-81, 2004. ISSN 0014-2999.
- 121 ACTON, J. J. et al. Benzoyl 2-methyl indoles as selective PPARgamma modulators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, n.2, p.357-62, 2005. ISSN 0960-894X.
- 122 MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v.52, n.4, p.673-751, 2000. ISSN 0031-6997.
- 123 LIN, Y. et al. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. **Current Cancer Drug Targets**, v.8, n.7, p.634-46, 2008. ISSN 1873-5576.
- 124 HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v.96, n.2-3, p.67-202, 2002. ISSN 0163-7258.
- 125 RAMOS, A. A.; PEREIRA-WILSON, C.; COLLINS, A. R. Protective effects of ursolic acid and luteolin against oxidative DNA damage include enhancement of DNA repair in Caco-2 cells. **Mutation Research**, v.692, n.1-2, p.6-11, 2010. ISSN 0027-5107.
- 126 CHOI, C. et al. Antioxidant constituents and a new triterpenoid glycoside from Flos Lonicerae. **Archives of Pharmacal Research**, v.30, n.1, p.1-7, 2007. ISSN 0253-6269.

127 XAGORARI, A. et al. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.296, n.1, p.181-7, 2001. ISSN 0022-3565.

128 MIYAZAWA, M.; HISAMA, M. Antimutagenic activity of flavonoids from *Chrysanthemum morifolium*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.67, n.10, p.2091-9, 2003. ISSN 0916-8451.

129 CASAGRANDE, F.; DARBON, J. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. **Biochemical Pharmacology**, v.61, n.10, p.1205-15, 2001. ISSN 0006-2952.

130 MATSUI, T. et al. Luteolin, a flavone, does not suppress postprandial glucose absorption through an inhibition of alpha-glucosidase action. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.66, n.3, p.689-92, 2002. ISSN 0916-8451.

131 ANDO, C. et al. Luteolin, a food-derived flavonoid, suppresses adipocyte-dependent activation of macrophages by inhibiting JNK activation. **FEBS Letters**, v.583, n.22, p.3649-54, 2009. ISSN 1873-3468.

132 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-54, 1976. ISSN 0003-2697.

133 MCPHERSON, A. Introduction to protein crystallization. **Methods**, v.34, n.3, p.254-65, 2004. ISSN 1046-2023.

134 GUIMARÃES, B. G. et al. The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS. **Journal of Synchrotron Radiation**, v.16, n.Pt 1, p.69-75, 2009. ISSN 0909-0495.

135 LESLIE, A. G. The integration of macromolecular diffraction data. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v.62, n.Pt 1, p.48-57, 2006. ISSN 0907-4449.

136 COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, N. M. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v.50, n.Pt 5, p.760-3, 1994. ISSN 0907-4449.

137 MURSHUDOV, G.; VAGIN, A.; DODSON, E. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v.53, n.Pt 3, p.240-55, 1997. ISSN 0907-4449.

- 138 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v.60, n.Pt 12 Pt 1, p.2126-32, 2004. ISSN 0907-4449.

- 139 ADAMS, P. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v.66, n.Pt 2, p.213-21, 2010. ISSN 1399-0047.

- 140 CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v.66, n.Pt 1, p.12-21, 2010. ISSN 1399-0047.

- 141 KLEMM, D. J. et al. Insulin-induced adipocyte differentiation. Activation of CREB rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.30, p.28430-5, 2001. ISSN 0021-9258.

- 142 LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-8, 2001. ISSN 1046-2023.

- 143 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983. ISSN 0022-1759.

- 144 MORRISON, R. F.; FARMER, S. R. Insights into the transcriptional control of adipocyte differentiation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.Suppl 32-33, p.59-67, 1999. ISSN 0730-2312.

- 145 LAPLANTE, M. et al. PPAR-gamma activation mediates adipose depot-specific effects on gene expression and lipoprotein lipase activity: mechanisms for modulation of postprandial lipemia and differential adipose accretion. **Diabetes**, v.52, n.2, p.291-9, 2003. ISSN 0012-1797.

- 146 ARMONI, M.; HAREL, C.; KARNIELI, E. Transcriptional regulation of the GLUT4 gene: from PPAR-gamma and FOXO1 to FFA and inflammation. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.18, n.3, p.100-7, 2007. ISSN 1043-2760.

- 147 CHUI, P. C. et al. PPARgamma regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1. **Journal of Clinical Investigation**, v.115, n.8, p.2244-56, 2005. ISSN 0021-9738.

- 148 ZEBISCH, K. et al. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. **Analytical Biochemistry**, v.425, n.1, p.88-90, 2012. ISSN 1096-0309.

- 149 BRUNING, J. B. et al. Partial agonists activate PPARgamma using a helix 12 independent mechanism. **Structure**, v.15, n.10, p.1258-71, 2007. ISSN 0969-2126.
- 150 WAKU, T. et al. Structural insight into PPARgamma activation through covalent modification with endogenous fatty acids. **Journal of Molecular Biology**, v.385, n.1, p.188-99, 2009. ISSN 1089-8638.
- 151 MOTANI, A. et al. INT131: a selective modulator of PPAR gamma. **Journal of Molecular Biology**, v.386, n.5, p.1301-11, 2009. ISSN 1089-8638.
- 152 ITOH, T. et al. Structural basis for the activation of PPARgamma by oxidized fatty acids. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.15, n.9, p.924-31, 2008. ISSN 1545-9993.
- 153 WAKU, T. et al. The nuclear receptor PPAR γ individually responds to serotonin- and fatty acid-metabolites. **EMBO Journal**, v.29, n.19, p.3395-407, 2010. ISSN 1460-2075.
- 154 EGEEA, P. et al. Crystal structure of the human RXRalpha ligand-binding domain bound to its natural ligand: 9-cis retinoic acid. **EMBO Journal**, v.19, n.11, p.2592-601, 2000. ISSN 0261-4189.
- 155 RENAUD, J. P. et al. Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. **Nature**, v.378, n.6558, p.681-9, 1995. ISSN 0028-0836.
- 156 HAMURO, Y. et al. Hydrogen/deuterium-exchange (H/D-Ex) of PPARgamma LBD in the presence of various modulators. **Protein Science**, v.15, n.8, p.1883-92, 2006. ISSN 0961-8368.
- 157 KALLENBERGER, B. C. et al. A dynamic mechanism of nuclear receptor activation and its perturbation in a human disease. **Nature Structural Biology**, v.10, n.2, p.136-40, 2003. ISSN 1072-8368.
- 158 LUO, L. et al. Hyperosmolar saline is a proinflammatory stress on the mouse ocular surface. **Eye Contact Lens**, v.31, n.5, p.186-93, 2005. ISSN 1542-2321.
- 159 LI, D. Q. et al. JNK and ERK MAP kinases mediate induction of IL-1beta, TNF-alpha and IL-8 following hyperosmolar stress in human limbal epithelial cells. **Experimental Eye Research**, v.82, n.4, p.588-96, 2006. ISSN 0014-4835.
- 160 LIU, K. et al. Selective PPARgamma modulators with improved pharmacological profiles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, n.10, p.2437-40, 2005. ISSN 0960-894X.

- 161 PARK, H. et al. Luteolin inhibits adipogenic differentiation by regulating PPARgamma activation. **Biofactors**, v.35, n.4, p.373-9, 2009. ISSN 1872-8081.
- 162 DING, L.; JIN, D.; CHEN, X. Luteolin enhances insulin sensitivity via activation of PPAR γ transcriptional activity in adipocytes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.21, n.10, p.941-7, 2010. ISSN 1873-4847.
- 163 DEQUIU, Z. et al. Luteolin inhibits inflammatory response and improves insulin sensitivity in the endothelium. **Biochimie**, v.93, n.3, p.506-12, 2011. ISSN 1638-6183.
- 164 AMBROSIO, A. L. et al. Ajulemic acid, a synthetic nonpsychoactive cannabinoid acid, bound to the ligand binding domain of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Journal of Biological Chemistry**, v.282, n.25, p.18625-33, 2007. ISSN 0021-9258.
- 165 HAVSTEEN, B. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v.96, n.2-3, p.67-202, 2002. ISSN 0163-7258.
- 166 SMITH, W. L.; MEADE, E. A.; DEWITT, D. L. Interactions of PGH synthase isozymes-1 and -2 with NSAIDs. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.744, p.50-7, 1994. ISSN 0077-8923.
- 167 VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.38, p.97-120, 1998. ISSN 0362-1642.
- 168 SMITH, W. L.; MEADE, E. A.; DEWITT, D. L. Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes-1 and -2. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.714, p.136-42, 1994. ISSN 0077-8923.
- 169 O'SULLIVAN, M. G. et al. Lipopolysaccharide priming of alveolar macrophages for enhanced synthesis of prostanoids involves induction of a novel prostaglandin H synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.21, p.14547-50, 1992. ISSN 0021-9258.
- 170 GILROY, D. W.; COLVILLE-NASH, P. R. New insights into the role of COX 2 in inflammation. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v.78, n.3, p.121-9, 2000. ISSN 0946-2716.
- 171 JARADAT, M. S. et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms and inhibition of prostaglandin H(2) synthases by ibuprofen, naproxen, and indomethacin. **Biochemical Pharmacology**, v.62, n.12, p.1587-95, 2001. ISSN 0006-2952.
- 172 KEISER, M. J. et al. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. **Nature Biotechnology**, v.25, n.2, p.197-206, 2007. ISSN 1087-0156.

173 TATONETTI, N. P.; LIU, T.; ALTMAN, R. B. Predicting drug side-effects by chemical systems biology. **Genome Biology**, v.10, n.9, p.238, 2009. ISSN 1465-6914.

174 YE, J. Challenges in Drug Discovery for Thiazolidinedione Substitute. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v.1, n.3, p.137-142, 2011.

175 POCHETTI, G. et al. Insights into the mechanism of partial agonism: crystal structures of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand-binding domain in the complex with two enantiomeric ligands. **Journal of Biological Chemistry**, v.282, n.23, p.17314-24, 2007. ISSN 0021-9258.

176 LIBERATO, M. V. et al. Medium chain fatty acids are selective peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) γ activators and pan-PPAR partial agonists. **PLoS One**, v.7, n.5, p.e36297, 2012. ISSN 1932-6203.

177 WAKU, T. et al. The nuclear receptor PPAR γ individually responds to serotonin- and fatty acid-metabolites. **EMBO Journal**, v.29, n.19, p.3395-407, 2010. ISSN 1460-2075.

178 SIMHA, V.; GARG, A. Lipodystrophy: lessons in lipid and energy metabolism. **Curr Opinion Lipidology**, v.17, n.2, p.162-9, 2006. ISSN 0957-9672.

179 CAPEAU, J. et al. Diseases of adipose tissue: genetic and acquired lipodystrophies. **Biochemical Society Transactions**, v.33, n.Pt 5, p.1073-7, 2005. ISSN 0300-5127.

180 JENINGA, E. H. et al. Impaired peroxisome proliferator-activated receptor gamma function through mutation of a conserved salt bridge (R425C) in familial partial lipodystrophy. **Molecular Endocrinology**, v.21, n.5, p.1049-65, 2007. ISSN 0888-8809.

181 SEMPLE, R. K.; CHATTERJEE, V. K.; O'RAHILLY, S. PPAR gamma and human metabolic disease. **Journal of Clinical Investigation**, v.116, n.3, p.581-9, 2006. ISSN 0021-9738.

182 BARROSO, I. et al. Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. **Nature**, v.402, n.6764, p.880-3, 1999. ISSN 0028-0836.

183 AGOSTINI, M. et al. Tyrosine agonists reverse the molecular defects associated with dominant-negative mutations in human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Endocrinology**, v.145, n.4, p.1527-38, 2004. ISSN 0013-7227.

184 AGARWAL, A. K.; GARG, A. A novel heterozygous mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in a patient with familial partial lipodystrophy. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.87, n.1, p.408-11, 2002. ISSN 0021-972X.

- 185 HEGELE, R. A. et al. PPARG F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. **Diabetes**, v.51, n.12, p.3586-90, 2002. ISSN 0012-1797.
- 186 SAVAGE, D. B. et al. Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. **Diabetes**, v.52, n.4, p.910-7, 2003. ISSN 0012-1797.
- 187 JENINGA, E. H. et al. Impaired peroxisome proliferator-activated receptor gamma function through mutation of a conserved salt bridge (R425C) in familial partial lipodystrophy. **Molecular Endocrinology**, v.21, n.5, p.1049-65, 2007. ISSN 0888-8809.
- 188 GURNELL, M.; CHATTERJEE, V. K. Nuclear receptors in disease: thyroid receptor beta, peroxisome-proliferator-activated receptor gamma and orphan receptors. **Essays in Biochemistry**, v.40, p.169-89, 2004. ISSN 0071-1365.
- 189 STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, v.41, n.1, p.207-34, 2005. ISSN 1046-5928.
- 190 YU, C. et al. The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity and repress 3T3-L1 adipogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.14, p.13600-5, 2005. ISSN 0021-9258.

ANEXOS

ARTIGOS PUBLICADOS

Mode of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Activation by Luteolin

Ana C. Puhl, Amanda Bernardes, Rodrigo L. Silveira, Jing Yuan, Jéssica L. O. Campos, Daniel M. Saidemberg, Mario S. Palma, Aleksandra Cvoro, Stephen D. Ayers, Paul Webb, Peter S. Reinach, Munir S. Skaf, and Igor Polikarpov

Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil (A.C.P., A.B., J.L.O.C., I.P.); Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil (R.L.S., M.S.S.); Department of Biological Sciences, College of Optometry, State University of New York, New York, New York (J.Y., P.S.R.); Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica, CEIS/Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil (D.M.S., M.S.P.); and Genomic Medicine, Methodist Hospital Research Institute, Houston, Texas (A.C., S.D.A., P.W.)

Received October 10, 2011; accepted March 5, 2012

ABSTRACT

The peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) is a target for treatment of type II diabetes and other conditions. PPAR γ full agonists, such as thiazolidinediones (TZDs), are effective insulin sensitizers and anti-inflammatory agents, but their use is limited by adverse side effects. Luteolin is a flavonoid with anti-inflammatory actions that binds PPAR γ but, unlike TZDs, does not promote adipocyte differentiation. However, previous reports suggested variously that luteolin is a PPAR γ agonist or an antagonist. We show that luteolin exhibits weak partial agonist/antagonist activity in transfections, inhibits several PPAR γ target genes in 3T3-L1 cells (*LPL*, *ORL1*, and *CEBP α*) and PPAR γ -dependent adipogenesis, but activates *GLUT4* to a similar degree as rosiglitazone, implying gene-specific partial agonism. The crystal structure of the PPAR γ ligand-binding domain (LBD) reveals that luteolin occupies a buried ligand-binding pocket (LBP) but

binds an inactive PPAR γ LBD conformer and occupies a space near the β -sheet region far from the activation helix (H12), consistent with partial agonist/antagonist actions. A single myristic acid molecule simultaneously binds the LBP, suggesting that luteolin may cooperate with other ligands to bind PPAR γ , and molecular dynamics simulations show that luteolin and myristic acid cooperate to stabilize the Ω -loop among H2', H3, and the β -sheet region. It is noteworthy that luteolin strongly suppresses hypertonicity-induced release of the pro-inflammatory interleukin-8 from human corneal epithelial cells and reverses reductions in transepithelial electrical resistance. This effect is PPAR γ -dependent. We propose that activities of luteolin are related to its singular binding mode, that anti-inflammatory activity does not require H12 stabilization, and that our structure can be useful in developing safe selective PPAR γ modulators.

Introduction

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are ligand-activated transcription factors of the nuclear receptor family. The three PPAR subtypes (PPAR α , PPAR β , and PPAR γ) have different ligand specificity and tissue distribu-

tion (Berger and Moller, 2002). PPAR γ is highly expressed in adipose tissue, macrophages, and cells of the vasculature (Tontonoz et al., 1994; Ricote et al., 1998), plays essential roles in adipogenesis and glucose and lipid homeostasis (Auerx, 1999; Lehrke and Lazar, 2005), and exhibits anti-inflammatory actions (Ricote and Glass, 2007). PPAR γ agonists such as the thiazolidinediones (TZDs) are efficient and clinically useful insulin sensitizers and are under investigation for the treatment of inflammation with potential applications in atherosclerosis (Koshiyama et al., 2001), inflammatory colitis (Lewis et al., 2001), arthritis (Giaginis et al., 2009), and bowel disease (Borniquel et al., 2010). PPAR may also be a useful target in ocular conditions. For example,

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [Grant 2007/58443-4 and 2010/08680-2] and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

The atomic coordinates and structure factors of the PPAR γ crystal structure reported here were deposited in the Protein Data Bank under code 3SZ1.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://molpharm.aspetjournals.org>.

<http://dx.doi.org/10.1124/mol.111.076216>.

ABBREVIATIONS: PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; TZD, thiazolidinedione; TEER, transepithelial electrical resistance; LBD, ligand-binding domain; LBP, ligand-binding pocket; FBS, fetal bovine serum; SPPAR γ M, selective PPAR γ modulator; HCEC, human corneal epithelial cell; IL-8, interleukin 8; CEBP α , CCAT enhancer binding protein α ; LPL, lipoprotein lipase; ORL1, oxidized LDL receptor 1; GAL4, regulator of gene expression for the galactose-induced genes; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; PCR, polymerase chain reaction; PDB, Protein Data Bank; MD, molecular dynamics; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; H, helix; GW9662, 2-chloro-5-nitro-*N*-4-phenylbenzamide.

Preparation and characterization of polymeric nanoparticles loaded with the flavonoid luteolin, by using factorial design

Ana Cristina Puhl¹, Michelle Fagundes¹, Karen Cristina dos Santos², Igor Polikarpov¹, Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva², João Batista Fernandes², Paulo Cezar Vieira², Moacir Rossi Forim^{2,*}

*Corresponding author:

Alaa Eldeen B.Yassin

¹Institute of Physic of São Carlos, University of São Paulo, Av. Trabalhador Sãocarlense, n.º 400, São Carlos-SP, Zip code 13.566-590, Brazil. Tel. +55(16)3373-9874, Fax: +55(16)3373-9881.

²Department of Chemistry, Federal University of São Carlos, Rod. Washington Luiz, Km 235, P.B. 676, São Carlos-SP, Zip code 13.565-905, Brazil. Tel. +55(16) 3351.8299, Fax: +55(16)3351-8350.

Abstract

Nanoparticles containing luteolin flavonoid were prepared by using interfacial polymer deposition following solvent displacement. The formulation was optimized using factorial design. The parameters studied were the type of polymer [poly(-caprolactone) and poly(lactic-co-glycolic acid)], nature oil (isodecyl oleate and oleic acid) and the quantity of luteolin. Nanocapsules and nanospheres were also prepared and evaluated. Colloidal suspensions were characterized by evaluating pH, the particle size, the zeta potential, the morphological aspect and the kinetic release. A new High Performance Liquid Chromatography method was developed and validated in order to quantify luteolin in colloidal suspension allowing the analyses of the absolute recovery, entrapment efficiency and the kinetic release. The luteolin-absolute recovery ranged from 61.6% to 95%; entrapment efficiency was nearly 100% in all formulations and the particle sizes were smaller than 185.5 nm. The nanoparticles prepared with isodecyl oleate show a negative zeta potential. On the other hand, when oleic acid was utilized, the zeta potential was positive. The nanoparticles prepared by using isodecyl oleate have a more perfect spherical shape with a regular surface and form, homogeneity, and lower size dispersion. Nanocapsules and nanospheres have a similar release mechanism of pure diffusion according with Korsmeyer-Peppas's model.

Keywords: Luteolin, polymeric nanoparticles, characterization, factorial design, release kinetics.

Introduction

Since the beginning of human civilization, herbs have been an integral part of a human diet and medicine, valued for their culinary and medicinal properties. However, with the development of patent pharmaceuticals in the first part of the twentieth century, herbal medicine lost ground to new synthetic products touted by scientists and physicians to be more effective and reliable [1]. Nowadays, a new and renovated interest toward herbal medicines is observed. Some of the reasons which justify this fact are: (i) the sale of herbal medicines and their secure use have considerably increased over the last 10 years; (ii) herbal medicines are used to treat a wide range of problems; (iii) the development of new diseases, with severe complications, for which there is still no appropriate treatment; (iv) the belief that herbal remedies are innocuous, in contrast to conventional drugs; (v) the idea that what is natural can only be good, *etc.*[2-3].

Among herbal medicines, extracts rich in flavonoids have elicited particular interest. Flavonoids are naturally-occurring plant polyphenols characterized by a diphenylpropane structure (C6-

C3-C6) found in abundance in vegetables, fruits, nuts, seeds, herbs, spices, flowers, red wine and tea. They possess a wide range of biological activities and could be used to prevent diseases. Research and application of flavonoids in functional foods and in nutraceutical and pharmaceutical industries have been areas of great interest especially because they demonstrate a remarkable array of biochemical and pharmacological actions including anti-inflammatory, anti-oxidant, cytostatic, apoptotic and estrogenic activities [4-5].

Among the flavonoids, luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) (Figure 1), found in a wide range of plants such as in celery, green pepper, perilla leaf, chamomile tea, broccoli, and carrots, exhibits several biochemical activities and capable of enhancing insulin sensitivity [6-8]. Furthermore, luteolin is permeable to the brain-blood barrier, making it applicable to the therapy of central nerve system diseases [9].

The effectiveness of nutraceutical products in preventing diseases depends on preserving the bioavailability of the active ingredients.

Nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona carregadas com hidrocortisona: preparação usando planejamento fatorial e sua avaliação

Nayara A. Cazo^a, Edenir R. Pereira-Filho^a, Maria F. G. Fernandes da Silva^a, João Batista Fernandes^a, Paulo Cezar Vieira^a, Ana C. Puhl^b, Igor Polikarpov^b, Moacir Rossi Forim^{a*}

^aDepartamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luiz, Km. 235, Caixa Postal 676, CEP 13.565-905, São Carlos, SP, Brasil

^bInstituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense, 400, CEP 13.566-590, São Carlos, SP, Brasil

Received: 30 January 2012; revised: 13 April 2012; accepted: 20 June 2012. Available online: 07 July 2012.

ABSTRACT: Polymeric-nanoparticle systems such as nanocapsules and nanospheres have a great potential in applications for nanoencapsulation of corticosteroids which show low solubility in water. The physicochemical characteristics of nanoparticle suspensions are important pre-requisites for the successful development of new dosage form. In this study, hydrocortisone-loaded poly- ϵ -caprolactone nanoparticles have been prepared by the interfacial deposition method. A 3-factor 2-level factorial design was used to study and optimize nanoparticles formulation. This factorial design was used to study the contrasts and effects of independent variables on particle size distribution, morphology, surface charge, drug content, entrapment efficiency and in vitro drug release profiles. The screened independent variables were: the concentration of hydrocortisone, poly- ϵ -caprolactone and isodecyl oleate. A High Performance Liquid Chromatography method was developed and validated for hydrocortisone quantification. Special attention was given to both absolute recovery and entrapment efficiency. The results of optimized formulations showed a narrow size distribution with a polydispersity index near to 0.200. The particle sizes were on average 109.2 and 236.5nm to nanospheres and nanocapsules, respectively. In the best formulations the zeta potential was higher than 30 mV (in module) and the absolute recovery and entrapment efficiency were higher 82% and nearly 60%, respectively. The main variables were the quantity of the polymer and of the oil. Nanoparticles observed by the Scanning Electron Microscope depicted extremely spherical shape. In vitro release studies were performed through dialysis with continuous stream. Nanocapsules and nanospheres showed a similar pure diffusion release mechanism according to Korsmeyer-Peppas's model.

Keywords: polymeric nanoparticles; hydrocortisone; factorial design; kinetic release

* Corresponding author. E-mail: mrforim@ufscar.br