ALESSANDRO SILVA NASCIMENTO

Interações dos receptores nucleares com seus ligantes: Estudos estruturais do receptor de hormônio tireoidiano, do receptor de mineralocorticóide e do receptor ativado por proliferadores peroxissomais.

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

Área de Concentração: Física Aplicada –
Opção Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov

São Carlos

2009

RESUMO

NASCIMENTO, A.S. **Interação dos receptores nucleares com seus ligantes: Estudos estruturais do receptor de hormônio tireoidiano, do receptor de mineralocorticóide e do receptor ativado por proliferadores peroxissomais.** 2009. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, 2009.

Os receptores nucleares constituem uma superfamília de fatores de transcrição regulados pela interação com hormônios. Esta superfamília inclui, por exemplo, os receptores de hormônio tireoidiano, estrogênio, androgênio, glicocorticóide e mineralocorticóide. Neste trabalho, empregamos técnicas de biologia estrutura e bioinformática para estudar as interações entre alguns dos membros da família de receptores nucleares e seus respectivos ligantes. Para o receptor de hormônio tireoidiano, foi demonstrado, através da análise das estruturas cristalográficas das duas isoformas do receptor ligados aos tiromimético Triac, que os componentes entálpicos visíveis nas estruturas não explicam a seletividade do ligante. Dados de dinâmica molecular confirmaram que a seletividade do hormônio tem um importante componente entrópico. Empregando a técnica de dinâmica molecular, estudamos a ligação do receptor de mineralocorticóide humano à aldosterona, ao cortisol, à espironolactona e à cortisona e simulamos ainda o efeito da mutação S810L, conhecida por converter a atividade antagonista da cortisona e da espironolactona em agonista. A análise das simulações revelou um perfil de ligações de hidrogênio similar na ligação do receptor selvagem ao cortisol e à aldosterona. A cortisona perde, por conta da inserção de uma hidroxila na posição 11, uma ligação de hidrogênio importante com a Asn770 e, por isso, tem menor energia potencial de ligação. A espironolactona perde a mesma ligação de hidrogênio ao mesmo tempo em que aumenta o número de contatos de van der Waals pela inserção do grupo tioacetil na posição 7. A mutação S810L simulada no complexo com cortisona, cortisol e espironolactona não interfere no padrão de ligações de hidrogênio estabelecidas entre o receptor e os ligantes, mas altera a mobilidade de uma das regiões propostas como rota de dissociação. Propomos, portanto, que a mutação interfere na cinética de dissociação dos ligantes e não no padrão de interações estabelecidas no equilíbrio. Simulações de dissociação induzida do ligante confirmam esta proposição. Na última etapa, utilizamos os modelos experimentalmente determinados para o receptor ativado por proliferadores peroxissomais gama para a busca de novos ligantes através da técnica de docking molecular. Neste trabalho, utilizamos uma base de dados com aproximadamente um milhão de compostos. Destes, quatro foram selecionados após o docking molecular e testados experimentalmente. Um dos compostos testados se mostrou ativo neste receptor, apresentando uma atividade de 60-70% da atividade da rosiglitazona, conhecido agonista total do PPAR γ .

Palavras-chave: Receptores nucleares, cristalografia, dinâmica molecular, docking, ligantes.

Introdução

Receptores Farmacológicos

Todos os seres multicelulares dependem da mútua interação entre suas células e tecidos para a sua existência. Neste contexto, a sinalização celular, processo através do qual as células percebem e respondem corretamente ao seu microambiente e às suas variações, revela-se um processo de fundamental importância para a homeostase. Alguns exemplos de sinalização celular incluem a resposta celular à temperatura ou ainda à presença de moléculas pequenas, induzindo alguma mudança na célula-alvo.

Uma classe de moléculas de vital importância no contexto da sinalização celular são os hormônios. Estes são moléculas pequenas, usualmente hidrofóbicas, sintetizadas em órgãos específicos, denominados glândulas, e têm a função de transmitir um sinal de uma célula a outra ou ainda de um tecido a outro. No entanto, para que este sinal seja corretamente percebido e traduzido como uma resposta na célula-alvo, é necessário que haja um sistema de reconhecimento específico e eficiente. Estes sistemas de reconhecimento são usualmente encontrados nas células na forma de receptores farmacológicos, que são biomoléculas com a habilidade de reconhecer um sinal exógeno (presença de um hormônio ou ligante) e converter este sinal de forma a iniciar uma resposta celular. Os receptores farmacológicos podem ser formados por proteínas ou ácidos nucleicos, sendo a primeira constituição a mais comum. Estes sistemas são bastante específicos, sendo que cada célula que necessita responder a um

estímulo hormonal possui usualmente entre 2.000 e 100.000 diferentes receptores. Cada um destes responde, tipicamente, a um único hormônio (Guyton e Hall, 2000).

Vários receptores farmacológicos já foram identificados em humanos e classificados segundo seu mecanismo de ação. Dentre estes grupos podemos citar os receptores acoplados à proteína G, os canais iônicos, os receptores proteínas quinases e os fatores transcripcionais (Goodman, Hardman *et al.*, 2001), grupo que inclui uma família de proteínas chamadas de receptores nucleares e que serão abordadas em maiores detalhes nas seções seguintes. A Figura 1 mostra alguns dos receptores farmacológicos divididos por localização celular, bem como alguns exemplos de cada classe de receptor farmacológico.

Figura 1. Receptores farmacológicos separados por classes e alguns exemplos Adaptado de Goodman *et al.*, 2001.

Receptores Nucleares

Os receptores nucleares compreendem uma superfamília de receptores protéicos intracelulares relacionados estruturalmente e em seqüência, sendo inclusos na classe dos fatores transcricionais. Esta superfamília de proteínas inclui receptores para glicocorticóides, andrógenos, mineralocorticóides, progesterona, estrogênio, hormônios tireoidianos, vitamina D, ácido retinóico, ácido 9-*cis*-retinóico, ácidos graxos, além de outros ligantes, como o hormônio ecdisona, presente em insetos (Ribeiro, Kushner *et al.*, 1995).

Estrutura e Função

Quarenta e oito receptores nucleares foram identificados em humanos. Todos os membros desta família possuem a mesma organização modular, com um domínio N-terminal, um domínio central de interação com o DNA, um domínio curto de conexão e um domínio C-terminal, que é o responsável pelo reconhecimento e interação com o ligante (Figura 2).

Figura 2. Esquema da estrutura compartilhada entre todos os genes da família dos receptores nucleares.

Poucos estudos dedicaram-se o domínio N-terminal, de forma que sua função não é completamente conhecida. Sabe-se que é um domínio com tamanho bastante variável em

tamanho e com pouca conservação em sequência de aminoácidos. Sabe-se ainda que este domínio contém uma região de ativação autônoma, denominada AF-1. A região N-terminal também foi descrita recentemente como envolvida em uma interação com o domínio C-terminal do próprio receptor (interação N/C). Esta interação, já bem descrita para alguns receptores esteróides, aumenta a atividade transcricional de maneira ligante-dependente. Contudo, seu papel na fisiologia dos receptores nucleares ainda não foi completamente estabelecido (He, Lee *et al.*, 2002; Rogerson e Fuller, 2003).

O domínio central, usualmente denominado DBD (*DNA binding domain*), é um domínio curto, contendo usualmente menos que 100 aminoácidos, e bastante conservado em sequência entre os membros da superfamília de receptores nucleares. De forma geral, a conservação deste domínio na família é maior que 40%, sendo que, entre os membros de uma mesma subfamília, chega a ser maior que 85% (Laudet e Gronemeyer, 2002). A estrutura dos DBDs de vários receptores nucleares foi determinada por difração de raios-X e por ressonância magnética nuclear, revelando um domínio estruturado na forma de dois dedos de zinco capazes de reconhecer sequências específicas de DNA, denominadas *elementos responsivos* (Figura 3).

A maior parte dos receptores nucleares pode ser dividida em duas categorias: a subfamília de receptores esteróides e a subfamília dos receptores tireoidianos. O primeiro grupo reconhece, de forma geral, os elementos responsivos denominados *elementos responsivos* hormonais (HREs), que são repetições dos hexanucleotídeos AGGACA orientados como palíndromos e espaçados por três nucleotídeos. Já o segundo grupo, que inclui os receptores de vitamina D e ácido retinóico, reconhece elementos responsivos contendo a sequência AGGTCA, que pode estar disposta em diversas configurações, como repetições diretas, palíndromos, palíndromos invertidos e, possivelmente, de forma isolada. Este subgrupo reconhece estas sequências usualmente na forma de heterodímeros com o receptor

de ácido X retinóico (RXR), enquanto os receptores do primeiro grupo reconhecem seus HREs como homodímeros (Ribeiro, Kushner *et al.*, 1995).

Figura 3. Estrutura cristalográfica de um dímero de DBDs do receptor de glicocorticoide humano, representada em *cartoon*. Os átomos de zinco estão representados como esferas em cinza.

Entre o domínio central DBD e o domínio C-terminal, encontra-se um domínio curto e bastante flexível e, por isso, usualmente denominado *hinge* ou região de dobradiça. O nome do domínio remonta a uma hipótese de que esta região seria suficientemente flexível para permitir diferentes posicionamentos do domínio C-terminal (LBD) em relação ao domínio de ligação ao DNA (DBD). Uma vez que muitos receptores nucleares podem se ligar aos seus elementos responsivos como dímeros em repetições diretas, palindrômicas e ainda como palíndromos invertidos mantendo sempre uma mesma interface de dimerização no domínio C-terminal, foi proposto que a *hinge* serviria como o elo flexível entre os domínios LBD e DBD. No entanto, essa hipótese não pôde ser confirmada até então (Ribeiro, R.C.J. Dados não publicados). Sabe-se, no entanto, que mutações nesta região diminuem a interação entre o receptor tireoidiano e alguns elementos responsivos (Pissios, Tzarneli *et al.*, 2000; Miyamoto, Kakizawa *et al.*, 2001; Nascimento, Dias *et al.*, 2006).

O domínio C-terminal é provavelmente o domínio mais estudado dos receptores nucleares. Diversas estruturas foram determinadas por difração de raios-X para este domínio nos receptores de várias subfamílias, incluindo o receptor de estrógeno, o receptor de andrógeno, o receptor de glicocorticóide, o receptor de mineralocorticóide, o receptor de ácido retinóico, o receptor de ácido X retinóico, o receptor ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR) e o receptor de hormônio tireoidiano dentre outros. Todos estes domínios têm um enovelamento comum formado por um sanduíche de 12 hélices α , enumeradas de H1 a H12. Enterrada no centro do sanduíche encontra-se a cavidade do ligante, que, juntamente com as hélices H5, H6, H9 e H10, forma a camada central do sanduíche. As hélices H1, H2, H3 e H4 formam uma face externa do sanduíche, enquanto, na outra face, as hélices H7, H8, H11 e H12 completam a estrutura (Figura 4) (Wagner, Apriletti *et al.*, 1995). Na maioria dos receptores a cavidade do hormônio é composta por um grande número de resíduos hidrofóbicos com alguns resíduos polares que agem orientando os ligantes.

O domínio C-terminal, também chamado LBD (*ligand binding domain*), além de ser o responsável pela interação com o ligante, também participa do processo de dimerização dos receptores. Na realidade, a hélice H10 oferece uma superfície de interação hidrofóbica necessária para a formação de homo e heterodímeros. Outro papel importante na transativação dos receptores nucleares desempenhado pelos LBDs é o recrutamento de proteínas co-reguladoras, tanto ativadoras como repressoras. Estes co-reguladores ligam-se ao LBD do receptor em diferentes contextos, descritos sucintamente nas seções seguintes.

Recentemente foi publicada a primeira estrutura de um receptor nuclear completo (Chandra, Huang *et al.*, 2008). A estrutura, determinada por difração de raios-X a uma resolução de 3.10 Å, revelou a organização dos domínios LBD e DBD com relação ao DNA e o papel flexível da *hinge*. Individualmente, os domínios LBD e DBD mantêm preservados seus enovelamentos, como aqueles descritos acima.

Figura 4. Estrutura cristalográfica do receptor de mineralocorticóide humano (PDB 2AA2), representada em *cartoon*.

O domínio *hinge*, no entanto, foi modelado por completo pela primeira vez revelando-se uma conexão bastante flexível entre os domínios DBD e LBD sem a presença de uma estrutura secundária definida (Figura 5). Os domínios LBD e DBD assumem uma disposição assimétrica na estrutura deste heterodímero composto pelo receptor ativado por proliferadores peroxissomais gama (PPAR γ) e pelo receptor de ácido X retinóico alfa (RXR α), diferente daquilo que havia sido previamente proposto em estudos de baixa resolução (Figueira, Neto Mde *et al.*, 2007). Nesta estrutura, as fitas β do domínio LBD do receptor PPAR γ interagem

diretamente com o domínio DBD do receptor RXR α , mostrando que a interação entre os domínios também contribui para a estabilização do complexo, possibilitando uma maior atividade transcricional.

Figura 5. Estrutura cristalográfica do complexo formado pelos receptores PPAR γ (magenta) e RXR α (verde) completos (PDB 3DZY). Os domínios DBD e LBD estão indicados na figura e a *hinge* do PPAR γ aparece destacada à frente conectando os domínios DBD e LBD. Os átomos de zinco que compõe o dedo de zinco estão mostrados como esferas cinza e os ligantes em *sticks*.

Outro aspecto interessante mostrado nesta estrutura cristalográfica é o papel da *hinge* na interação com o DNA. Na estrutura, este domínio do receptor PPAR γ interage diretamente com o ácido nucléico envolvendo-o ao mesmo tempo em que estabelece uma conexão entre os domínios, dispostos em faces opostas do DNA, como mostrado na Figura 5.

Mecanismos Geral de Ativação

Os receptores nucleares em sua forma *apo*, isto é, não ligada, podem ser encontrados no citoplasma (receptores esteróides) ou ainda no núcleo celular, ligados ao DNA e reprimindo a transcrição de genes-alvo. No entanto, em ambos os casos são encontrados ligados a proteínas repressoras. Os receptores esteróides usualmente são encontrados ligados a proteínas de choque térmico (HSP90, HSP80 e HSP70 principalmente) (Couette, Jalaguier *et al.*, 1998; Agarwal e Mirshahi, 1999) enquanto os receptores da subfamília do receptor tireoidiano são usualmente encontrados ligados a proteínas co-repressoras específicas como SMRT e NCoR, por exemplo (Privalsky, 2004).

A interação com o ligante inicia um processo de modificações estruturais que culmina com a regulação da transcrição gênica. Os ligantes esteróides são suficientemente hidrofóbicos para difundirem-se livremente pela membrana plasmática e atingirem seus receptores no citoplasma celular. Já o hormônio tireoidiano, por exemplo, requer transportadores que o bombeiem ativamente para o interior celular. Dentre as proteínas que atuam no transporte dos hormônios tireoidianos encontram-se os transportadores de ânions orgânicos NTCP (*sodium taurocholate co-transporting peptide*) e OATP1 (*sodium independent organic anion co-transporting peptide 1*), os transportadores de aminoácidos do tipo L (LAT) e do tipo T (TAT) e a proteína MCT8 (Friesema, Jansen *et al.*, 2005).

Uma vez no interior celular, o ligante é reconhecido pelo seu receptor dando início a uma movimentação da hélice H12. Esta hélice passa a se estruturar junto ao corpo do LBD sobre a camada externa do sanduíche formada pelas hélices H2, H3, e H4, como indicado na Figura 6. A nova superfície hidrofóbica criada pelas hélices H12, H3 e H4 constitui o sítio de

ancoragem das proteínas co-ativadoras, região também denominada de região autônoma de ativação 2, ou AF-2 (Figura 6). Vários dos resíduos hidrofóbicos que formam a AF-2 são conservados em todos os receptores nucleares e formam um assinatura da família (Wurtz, Bourguet *et al.*, 1996).

Figura 6. Mudanças estruturais durante a ativação dos receptores nucleares pela interação com ligante. Adaptado de Aranda e Pascual (Aranda e Pascual, 2001).

Atualmente se reconhece que este mecanismo proposto para a ativação dos receptores nucleares é incompleto, uma vez que já foram determinadas estruturas cristalográficas de receptores em seu estado *apo* e com a H12 na conformação ativa, bem como receptores em estado *holo* com a H12 em conformações diferentes da conformação ativa. Exemplos dessa diversidade de conformações da H12 podem ser observados nas estruturas cristalográficas do receptor ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR) isoforma γ *apo*, PDB 1PRG (Nolte, Wisely *et al.*, 1998), que mantêm a H12 fechada sobre a H3;

no receptor de estrogênio (PDB 2R6W) ligado a ligantes agonistas seletivos que alteram a conformação da H12; e no receptor órfão, isto é, sem ligante endógeno conhecido, NGFI-B, PDB 1YJE (Flaig, Greschik *et al.*, 2005), que mantém a H12 fechada.

Uma vez ativados pelo ligante, os receptores nucleares recrutam proteínas co-ativadoras através da superfície criada pela H12. Várias proteínas co-ativadoras foram identificadas, com diferentes níveis de expressão em diferentes tecidos, conferindo certa seletividade de ação para cada receptor em tecidos específicos. Os termos ‘co-ativador’ e ‘co-repressor’ foram cunhados com base na habilidade destas proteínas de promover ou inibir a transcrição gênica.

Em função da interação com o ligante, os receptores nucleares sofrem dimerização, recrutam proteínas co-ativadoras e são translocados para o núcleo celular onde se ligam aos seus respectivos elementos responsivos. Uma vez formado o complexo composto pelo receptor nuclear dimérico, proteínas co-ativadoras e elemento responsivo no núcleo celular, a maquinaria basal de transcrição celular é recrutada, incluindo as proteínas TBP (*TATA box-binding protein*) e o fator de transcrição IIB (TFIIB). Foi demonstrado para o receptor de hormônio tireoidiano que o domínio N-terminal do receptor e o domínio C-terminal interagem diretamente com TFIIB. Já para os receptores de estrógeno e progesterona, demonstrou-se que os domínios N-terminal e LBD interagem diretamente com TFIIB e TBP (Ribeiro, Kushner *et al.*, 1995; Steinmetz, Renaud *et al.*, 2001). Este macro complexo é capaz de alterar a transcrição dos genes localizados nas adjacências dos elementos responsivos.

Proteínas co-ativadoras

De forma geral, os co-ativadores podem ser divididos em quatro grupos: i) chaperonas envolvidas na maturação e no tráfego do receptor, ii) enzimas modificadoras de histonas (por exemplo, histona acetiltransferase, HAT), iii) recrutadores de complexos que interagem com a maquinaria de transcrição basal (TRAP/DRIP) e iv) remodeladores de cromatina (SWI/SNF) (Wolf, Heitzer *et al.*, 2008). Mais de 200 co-ativadores já foram identificados e, devido à grande diversidade de seqüência e de tamanho, acredita-se que os mecanismos estruturais de interação com os receptores sejam diversos. No entanto, vários destes co-ativadores interagem conhecidamente com os receptores através de um motivo conservado, denominado *NR box*, formado por uma pequena hélice anfipática com o motivo LXXLL, onde L é um resíduo de leucina e X qualquer outro aminoácido (Xu, 2005; Lonard e O'malley, 2006).

O *NR box* foi identificado através da análise das regiões de interação dos receptores nucleares com os co-ativadores pCIP, TIF-1 α , RIP-140, GRIP1 e SRC-1 (Savkur e Burris, 2004). Esses motivos podem estar presentes nos co-ativadores em uma única cópia ou em várias cópias na mesma proteína. Esta hélice anfipática interage com os receptores através de interações hidrofóbicas com as hélices H12 e H3 e através de interações polares com resíduos de lisina (H3) e glutamato (H12) conservados que orientam a hélice do *NR box*, como mostrado na Figura 7.

Figura 7. Esquema da interface de interação entre os receptores nucleares e o NR-box. Adaptado de Savkur e Burris, 2004.

Muitos dos co-ativadores funcionam como um complexo protéico que pode ser regulado por acetilação, metilação, ubiquitinação e sumoilação das proteínas que compõem o complexo. A família de co-ativadores SRC (*steroid receptor coactivator*), por exemplo, é formada por um complexo estável de 6 a 10 proteínas, sendo que outras proteínas podem associar-se mais fracamente (Lonard e O'malley, 2007). Uma importância deste nível de complexidade dos co-reguladores dos receptores nucleares é a possibilidade de regulação da transcrição gênica em vários níveis, o que se torna possível através da ação enzimática de várias das proteínas que constituem o complexo. Tal nível de regulação foi demonstrado recentemente para o co-ativador SRC-3 (Lonard e O'malley, 2007).

O papel desempenhado pelos co-ativadores durante a ativação dos receptores nucleares é abrangente e pode ser dividido a partir da formação de dois tipos de complexos. Os complexos do tipo I são formados por proteínas da família *p160* (que assistem no recrutamento da atividade histona acetilase de complexos formados pela proteína de ligação a *CREB/p300* (*CBP/p300*)), pelo fator associado a *p300/CBP* (*p/CAF*) e pelo promotor. Esse processo é seguido da descondensação local da cromatina. Os complexos do tipo II são formados pela proteína de interação com o receptor de vitamina D (*DRIP*) e pela proteína associada ao receptor de hormônio tireoidiano (*TRAP*), que ligam os receptores nucleares ao mediador SRB, associando com a holoenzima RNA polimerase II (Steinmetz, Renaud *et al.*, 2001). Acredita-se que a acetilação da *p160* pela *CBP* leva à dissociação do complexo do tipo I e à formação do complexo do tipo II. Mais ainda, a degradação de determinados componentes por proteólise por ubiquissomos garantiria a troca de co-ativadores (Steinmetz, Renaud *et al.*, 2001).

Lonard e O'Malley demonstraram de maneira inequívoca o papel biomédico dos co-reguladores dos receptores nucleares (Lonard, Lanz *et al.*, 2007). De 300 co-reguladores identificados, 102 estão envolvidos em doenças quando mutados, deletados, hiper-expressos ou hipo-expressos. A lista inclui síndromes metabólicas e cânceres em diversos tecidos.

Proteínas co-repressororas

Os primeiros co-repressores identificados em receptores nucleares foram a proteína *SMRT* (*Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptor*) e *N-CoR* (*Nuclear hormone receptor-Corepressor*), com similaridades funcionais entre elas (Privalsky, 2004). Essas proteínas agem de maneira oposta às co-ativadoras. Enquanto alguns co-ativadores possuem ou recrutam atividade histona acetiltransferase, *SMRT* e *N-CoR* recrutam histonas desacetilases, formando um complexo que inibe a iniciação da transcrição gênica (Privalsky, 2004).

Estudos de co-precipitação e duplos-híbridos demonstraram que as proteínas co-repressororas se ligam aos receptores nucleares utilizando a mesma superfície onde se ancoram as proteínas co-ativadoras. De fato, a estrutura cristalográfica do LBD do receptor ativado por proliferadores peroxissomais ligado a um peptídeo da proteína co-repressora *SMRT* (PDB 1KKQ) demonstrou que este fragmento da proteína também se estrutura como uma hélice anfipática capaz de se posicionar sobre a AF-2, de maneira semelhante àquela observada na associação com proteínas co-ativadoras (Xu, Stanley *et al.*, 2002). Curiosamente, foi demonstrado que o receptor de hormônios tireoidianos é capaz de interagir com proteínas co-repressororas tanto na ausência como na presença de ligantes, ou seja, em determinados contextos celulares, a interação ligante-receptor pode levar à formação de um complexo inibidor da transcrição gênica (Moore e Guy, 2005).

Interação com elementos responsivos

No processo de reconhecimento dos elementos responsivos pelos receptores ativados por ligante, o domínio central desempenha um papel fundamental. As primeiras estruturas reportadas para este domínio foram determinadas para os receptores de glicocorticóide e estrogênio. As estruturas revelaram um domínio enovelado em dois subdomínios contendo duas hélices anfipáticas dispostas em um ângulo reto e empacotadas em uma estrutura globular (Figura 3). Cada subdomínio contém um íon zinco coordenado com os átomos de enxofre de quatro cisteínas. As interações entre as hélices consistem basicamente em interações hidrofóbicas, enquanto uma rede de ligações de hidrogênio marca a interação entre as hélices e as bases nitrogenadas do elemento responsivo. Estas ligações envolvem diversas moléculas estruturadas de solvente mediando a interação entre a proteína e o ácido nucléico (Kumar e Thompson, 1999).

As estruturas cristalográficas do heterodímero formado pelos receptores RXR e TR, resolvidas posteriormente, demonstraram características estruturais bastante semelhantes (Rastinejad, Perlmann *et al.*, 1995; Rastinejad, Wagner *et al.*, 2000), mantendo interações polares e carregadas na superfície de interação com DNA e uma extensa rede de ligações de hidrogênio envolvendo, usualmente, moléculas de água. Nestas estruturas pode ser observado que a hélice N-terminal do domínio de interação com DNA adentra no sulco maior do elemento responsivo, dispondo-se a noventa graus do eixo da dupla hélice do DNA. Nesta hélice, é marcante a presença de resíduos carregados, como argininas e lisinas, que estabelecem a interação com o elemento responsivo.

Assim, estudos adicionais são necessários para melhor elucidar a interação dos receptores e seus elementos responsivos. Especialmente no reconhecimento de elementos

com diferentes espaçamentos (DR-3, DR-5). No entanto, as dificuldades na obtenção de cristais apropriados para a difração de raios-X são um fator limitante neste campo.

Perspectivas

Neste capítulo fizemos uma breve introdução sobre os receptores nucleares, sua estrutura, mecanismo de ativação, recrutamento de proteínas co-regulatórias e interação com os elementos responsivos. Nos próximos capítulos descreveremos com maiores detalhes os sistemas específicos que foram o foco dos estudos neste trabalho.

Uma explanação sistemática sobre a superfamília de receptores nucleares pode ser encontrada no livro-texto *The Nuclear Receptor Factsbook* (Laudet e Gronemeyer, 2002).

Conclusões gerais

Neste trabalho, diversos mecanismos envolvidos na interação dos receptores nucleares com ligantes naturais e sintéticos foram estudados empregando diferentes metodologias. De forma geral, é correto dizer, com base nos estudos realizados nesta tese, que as interações não específicas entre os receptores nucleares e seus ligantes, isto é, interações de van der Waals, são bastante relevantes. Este termo é bastante significativo quando computado quantitativamente em simulações de dinâmica molecular.

A entropia conformacional também foi destacada em um trabalho mostrado nesta tese como um mecanismo adicional que pode dirigir a seletividade de ligantes dos receptores nucleares. Até então, nenhum mecanismo similar havia sido descrito para esta família de proteínas e esta análise pode repercutir em novos modelos para o desenvolvimento de tiromiméticos β -seletivos.

Outro aspecto importante e que deve ser tomado em conta nos estudos da interação entre os receptores nucleares e seus ligantes é a cinética de interação entre o receptor e a proteína. A cristalografia, embora seja uma técnica poderosíssima no estudo das interações no nível atômico, não pode prover muitas informações sobre a cinética dos ligantes. Como a constante de equilíbrio é uma razão entre as constantes cinéticas de dissociação e associação, a alteração em uma das constantes pode levar a alterações na constante de equilíbrio sem necessariamente alterar as interações que são realizadas entre o ligante e o sítio ativo do receptor. Estudos realizados no Instituto de Física da USP em São Carlos e no Instituto de Química da UNICAMP, no grupo do professor Dr. Munir S. Skaf, têm demonstrado que os receptores nucleares têm mecanismos comuns de dissociação dos seus ligantes. Contudo, mais estudos focando este aspecto cinético ainda são necessários para trazer uma visão mais ampla

e mais completa deste comportamento na superfamília de proteínas e a técnica de dinâmica molecular mostra-se uma ferramenta bastante útil para este tipo de investigação.

Dada a história da biologia estrutural no Brasil, e os diversos sucessos já reportados na determinação de estruturas cristalográficas de proteínas que são conhecidos alvos-terapêuticos, especialmente para doenças tropicais, a técnica de *docking* molecular surge como uma ferramenta complementar à cristalografia de proteínas e que permite avançar na proposição de moléculas candidatas a ligantes agonistas ou antagonistas dos alvos em estudo. Embora o pequeno número de grupos de pesquisa em química orgânica sintética capazes de sintetizar moléculas com razoável complexidade, em escala para testes e com um grau de pureza analítico limite muitos estudos de desenvolvimento de novas drogas, uma abordagem complementar seria a utilização de esqueletos de moléculas já otimizadas (*lead-like*) em estudos exploratórios através da técnica de *docking*. Além disso, parcerias com indústrias farmoquímicas poderão fomentar a expansão desta técnica no país. Acreditamos que os resultados mostrados parcialmente nesta tese possam encorajar futuros estudos com esta metodologia.

Referências

ADAMS, P. D. *et al.* PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, v. 58, p. 1948-1954, 2002.

AGARWAL, M. K.; MIRSHAHI, M. General overview of mineralocorticoid hormone action. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 84, n. 3, p. 273-326, 1999.

ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews*, v. 81, n. 3, p. 1269-1304, 2001.

ARRIZA, J. L. *et al.* Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*, v. 237, n. 4812, p. 268-75, 1987.

BAILEY, S. The Ccp4 Suite - Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, v. 50, p. 760-763, 1994.

BALSERA, M. *et al.* Reconstructing potential energy functions from simulated force-induced unbinding processes. *Biophysical Journal*, v. 73, n. 3, p. 1281-1287, 1997.

BARRA, G. B. *et al.* [Molecular mechanism of thyroid hormone action]. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 48, n. 1, p. 25-39, 2004.

BAXTER, J. D. *et al.* Selective modulation of thyroid hormone receptor action. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 76, n. 1-5, p. 31-42, 2001.

_____. Towards selectively modulating mineralocorticoid receptor function: lessons from other systems. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 217, n. 1-2, p. 151-165, 2004.

BERGER, S. *et al.* Mineralocorticoid receptor knockout mice: Pathophysiology of Na⁺ metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, n. 16, p. 9424-9429, 1998.

BERKENSTAM, A. *et al.* The thyroid hormone mimetic compound KB2115 lowers plasma LDL cholesterol and stimulates bile acid synthesis without cardiac effects in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 2, p. 663-667, 2008.

BHARGAVA, A.; PEARCE, D. Mechanisms of mineralocorticoid action: determinants of receptor specificity and actions of regulated gene products. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 15, n. 4, p. 147-153, 2004.

BLEDSON, R. K. *et al.* A ligand-mediated hydrogen bond network required for the activation of the mineralocorticoid receptor. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 35, p. 31283-31293, 2005.

BLEICHER, L. *et al.* Structural basis of GC-1 selectivity for thyroid hormone receptor isoforms. *Bmc Structural Biology*, v. 8, p. -, 2008.

BORNGRAEBER, S. *et al.* Ligand selectivity by seeking hydrophobicity in thyroid hormone receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 26, p. 15358-15363, 2003.

BOURGUET, W. *et al.* Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *Nature*, v. 375, n. 6530, p. 377-82, 1995.

BRENT, G. A. *et al.* Capacity for Cooperative Binding of Thyroid-Hormone (T₃) Receptor Dimers Defines Wild Type-T₃ Response Elements. *Molecular Endocrinology*, v. 6, n. 4, p. 502-514, 1992.

BRUNING, J. B. *et al.* Partial agonists activate PPAR γ using a helix 12 independent mechanism. *Structure*, v. 15, n. 10, p. 1258-71, 2007.

BRYZGALOVA, G. *et al.* Anti-obesity, anti-diabetic, and lipid lowering effects of the thyroid receptor beta subtype selective agonist KB-141. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 111, n. 3-5, p. 262-267, 2008.

CASE, D. A. *et al.* The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry*, v. 26, n. 16, p. 1668-1688, 2005.

CHANDRA, V. *et al.* Structure of the intact PPAR- γ -RXR- α nuclear receptor complex on DNA. *Nature*, v., 2008.

CHIELLINI, G. *et al.* A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor. *Chemistry & Biology*, v. 5, n. 6, p. 299-306, 1998.

COHEN, J. *et al.* Finding gas diffusion pathways in proteins: Application to O₂ and H₂ transport in Cpl [FeFe]-hydrogenase and the role of packing defects. *Structure*, v. 13, n. 9, p. 1321-1329, 2005.

COUETTE, B. *et al.* Folding requirements of the ligand-binding domain of the human mineralocorticoid receptor. *Molecular Endocrinology*, v. 12, n. 6, p. 855-863, 1998.

EINSTEIN, M. *et al.* The differential interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands with tyr473 is a physical basis for their unique biological activities. *Molecular Pharmacology*, v. 73, n. 1, p. 62-74, 2008.

ELBER, R.; KARPLUS, M. Multiple Conformational States of Proteins - a Molecular-Dynamics Analysis of Myoglobin. *Science*, v. 235, n. 4786, p. 318-321, 1987.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, v. 60, p. 2126-2132, 2004.

FAGART, J. *et al.* Crystal structure of a mutant mineralocorticoid receptor responsible for hypertension. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 12, n. 6, p. 554-555, 2005.

FARDELLA, C. E.; MILLER, W. L. Molecular biology of mineralocorticoid metabolism. *Annual Review of Nutrition*, v. 16, p. 443-470, 1996.

FDA. Food and Drug Administration.

New Safety Information on Diabetes Drug Rosiglitazone. v. 2008. n. 23 de setembro: Food and Drug Administration. Disponível em: <http://www.fda.gov/consumer/updates/avandia052507.html>, 2008a.

_____. Food and Drug Administration. Information for Healthcare Professionals - Rosiglitazone maleate (marketed as Avandia, Avandamet, and Avandaryl). v. 2008. n. 23 de setembro: Food and Drug Administration. Disponível em: <http://www.fda.gov/consumer/updates/avandia052507.html>, 2008b.

FERNANDES-ROSA, F. L.; ANTONINI, S. R. [Mineralocorticoid resistance: pseudohypoaldosteronism type 1]. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 51, n. 3, p. 373-81, 2007.

FIGUEIRA, A. C. *et al.* Low-resolution structures of thyroid hormone receptor dimers and tetramers in solution. *Biochemistry*, v. 46, n. 5, p. 1273-83, 2007.

FLAIG, R. *et al.* Structural basis for the cell-specific activities of the NGFI-B and the Nurr1 ligand-binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 19, p. 19250-19258, 2005.

FRIESEMA, E. C. H. *et al.* Thyroid hormone transporters. *Biochemical Society Transactions*, v. 33, p. 228-232, 2005.

FU, J. *et al.* Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- α . *Nature*, v. 425, n. 6953, p. 90-3, 2003.

FUNDER, J. W. Aldosterone and mineralocorticoid receptors: Orphan questions. *Kidney International*, v. 57, n. 4, p. 1358-1363, 2000a.

_____. Eplerenone, a New Mineralocorticoid Antagonist: in vitro and in vivo Studies. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, v. 7, p. 138-142, 2000b.

_____. The role of aldosterone and mineralocorticoid receptors in cardiovascular disease. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, v. 7, n. 3, p. 151-157, 2007.

_____. Reconsidering the Roles of the Mineralocorticoid Receptor. *Hypertension*, v., 2009.

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

GELLER, D. S. *et al.* Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. *Science*, v. 289, n. 5476, p. 119-23, 2000.

GILSON, M. K. *et al.* Calculating the Electrostatic Potential of Molecules in Solution - Method and Error Assessment. *Journal of Computational Chemistry*, v. 9, n. 4, p. 327-335, 1988.

GOODMAN, L. S. *et al.* *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 10th. ed. New York: McGraw-Hill, 2001.

GOUDA, H. *et al.* Free energy calculations for theophylline binding to an RNA aptamer: Comparison of MM-PBSA and thermodynamic integration methods. *Biopolymers*, v. 68, n. 1, p. 16-34, 2003.

GRAVES, A. P. *et al.* Decoys for docking. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, n. 11, p. 3714-3728, 2005.

GRIMALDI, P. A. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors as sensors of fatty acids and derivatives. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 64, n. 19-20, p. 2459-2464, 2007.

GROVER, G. J. *et al.* Effects of the thyroid hormone receptor agonist GC-1 on metabolic rate and cholesterol in rats and primates: selective actions relative to 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology*, v. 145, n. 4, p. 1656-61, 2004.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Textbook of medical physiology*. 10th. ed. Philadelphia: Saunders, 2000.

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

HELLAL-LEVY, C. *et al.* Mechanistic aspects of mineralocorticoid receptor activation. *Kidney International*, v. 57, n. 4, p. 1250-1255, 2000.

HIXSON, C. A.; WHEELER, R. A. Rigorous classical-mechanical derivation of a multiple-copy algorithm for sampling statistical mechanical ensembles. *Physical Review E*, v. 6402, n. 2, p. -, 2001.

HOFFMANN, C. A.; COLCA, J. R. New Oral Thiazolidinedione Antidiabetic Agents Act as Insulin Sensitizers. *Diabetes Care*, v. 15, p. 1075-1078, 1992.

HOLDGATE, G. A.; WARD, W. H. J. Measurements of binding thermodynamics in drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 10, n. 22, p. 1543-1550, 2005.

HOLST, D. *et al.* Nutritional regulation and role of peroxisome proliferator-activated receptor delta in fatty acid catabolism in skeletal muscle. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1633, n. 1, p. 43-50, 2003.

HORNAK, V. *et al.* Comparison of multiple amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, v. 65, n. 3, p. 712-725, 2006.

HOSTETLER, H. A. *et al.* Very-long-chain and branched-chain fatty acyl-CoAs are high affinity ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *Biochemistry*, v. 45, n. 24, p. 7669-81, 2006.

_____. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacts with high affinity and is conformationally responsive to endogenous ligands. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 19, p. 18667-18682, 2005.

_____. A Novel High-Throughput Screening Assay for Putative Antidiabetic Agents through PPAR alpha Interactions. *Journal of Biomolecular Screening*, v. 13, n. 9, p. 855-861, 2008.

HUANG, N. *et al.* Benchmarking sets for molecular docking. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, n. 23, p. 6789-6801, 2006.

HUYET, J. *et al.* Structural basis of spiro lactone recognition by the mineralocorticoid receptor. *Molecular Pharmacology*, v. 72, n. 3, p. 563-571, 2007.

IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC - A free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 45, n. 1, p. 177-182, 2005.

ISSEMAN, I. *et al.* The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Retinoid-X Receptor Heterodimer Is Activated by Fatty-Acids and Fibrate Hypolipemic Drugs. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 11, n. 1, p. 37-47, 1993.

JAKALIAN, A. *et al.* Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *Journal of Computational Chemistry*, v. 23, n. 16, p. 1623-1641, 2002.

JARZYNSKI, C. Targeted free energy perturbation. *Physical Review E*, v. 65, n. 4, p. -, 2002.

JOHANSSON, L. *et al.* Selective thyroid receptor modulation by GC-1 reduces serum lipids and stimulates steps of reverse cholesterol transport in euthyroid mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 29, p. 10297-10302, 2005.

KALIDINDI, S. R. *et al.* Drug Insight: aldosterone-receptor antagonists in heart failure - the journey continues. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, v. 4, n. 7, p. 368-378, 2007.

KLEYWEGT, G. J.; JONES, T. A. Detection, Delineation, Measurement and Display of Cavities in Macromolecular Structures. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, v. 50, p. 178-185, 1994.

KLIEWER, S. A. *et al.* Retinoid X-Receptor Interacts with Nuclear Receptors in Retinoic Acid, Thyroid-Hormone and Vitamin-D3 Signaling. *Nature*, v. 355, n. 6359, p. 446-449, 1992.

KOSZTIN, D. *et al.* Unbinding of retinoic acid from its receptor studied by steered molecular dynamics. *Biophysical Journal*, v. 76, n. 1, p. 188-197, 1999.

KUMAR, R.; THOMPSON, E. B. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*, v. 64, n. 5, p. 310-319, 1999.

LAUDET, V.; GRONEMEYER, H. *The Nuclear Receptor Factsbook*. San Diego: Academic Press, 2002.

LAZAR, M. A. Thyroid-Hormone Receptors - Multiple Forms, Multiple Possibilities. *Endocrine Reviews*, v. 14, n. 2, p. 184-193, 1993.

LAZAR, M. A.; CHIN, W. W. Nuclear Thyroid-Hormone Receptors. *Journal of Clinical Investigation*, v. 86, n. 6, p. 1777-1782, 1990.

LEACH, A. R. *Molecular Modelling Principles and Applications*. New York: Pearson Practice Hall, 2001.

LEMBERGER, T. *et al.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: A Nuclear Receptor Signaling Pathway in Lipid Physiology. *Annual Review of Cell Developmental Biology*, v. 12, p. 335-363, 1996.

_____. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 3, p. 1764-1769, 1996.

LESLIE, A. G. W. Recent Changes to the MOSFLM package for Processing Film and Image Plate Data. *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography*, v. 26, 1992.

LI, Y. *et al.* Structural and biochemical mechanisms for the specificity of hormone binding and coactivator assembly by mineralocorticoid receptor. *Molecular Cell*, v. 19, n. 3, p. 367-380, 2005.

LONARD, D. M. *et al.* Nuclear receptor coregulators and human disease. *Endocrine Reviews*, v. 28, n. 5, p. 575-587, 2007.

LONARD, D. M.; O'MALLEY, B. W. The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators. *Cell*, v. 125, n. 3, p. 411-4, 2006.

_____. Nuclear receptor coregulators: Judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Molecular Cell*, v. 27, n. 5, p. 691-700, 2007.

LU, H.; SCHULTEN, K. Steered molecular dynamics simulations of force-induced protein domain unfolding. *Proteins-Structure Function and Genetics*, v. 35, n. 4, p. 453-463, 1999.

MAHINDROO, N. *et al.* Indol-1-yl acetic acids as peroxisome proliferator-activated receptor agonists: Design, synthesis, structural biology, and molecular docking studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, n. 3, p. 1212-1216, 2006.

MARTINEZ, L. *et al.* Only subtle protein conformational adaptations are required for ligand binding to thyroid hormone receptors: Simulations using a novel multipoint steered molecular dynamics approach. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 112, n. 34, p. 10741-10751, 2008.

_____. Molecular dynamics simulations reveal multiple pathways of ligand dissociation from thyroid hormone receptors. *Biophysical Journal*, v. 89, n. 3, p. 2011-2023, 2005.

_____. Molecular dynamics simulations of ligand dissociation from thyroid hormone receptors: Evidence of the likeliest escape pathway and its implications for the design of novel ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, n. 1, p. 23-26, 2006.

MCCAMMON, J. A.; HARVEY, S. C. *Dynamics of Proteins and Nucleic Acids*. Trumpington Street, Cambridge, UK: Press Syndicate of the University of Cambridge, 1988.

MENG, E. C. *et al.* Automated Docking with Grid-Based Energy Evaluation. *Journal of Computational Chemistry*, v. 13, n. 4, p. 505-524, 1992.

MIYAMOTO, T. *et al.* The role of hinge domain in heterodimerization and specific DNA recognition by nuclear receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 181, n. 1-2, p. 229-238, 2001.

MOORE, J. M. R.; GUY, R. K. Coregulator interactions with the thyroid hormone receptor. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 4, n. 4, p. 475-482, 2005.

NASCIMENTO, A. S. AMBERENERGY. Disponível em: <http://code.google.com/p/amberenergy/>, 2008.

NASCIMENTO, A. S. *et al.* Structural rearrangements in the thyroid hormone receptor hinge domain and their putative role in the receptor function. *Journal of Molecular Biology*, v. 360, n. 3, p. 586-598, 2006.

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

OETTING, A.; YEN, P. M. New insights into thyroid hormone action. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 21, n. 2, p. 193-208, 2007.

OHTANI, T. *et al.* Elevated cardiac tissue level of aldosterone and mineralocorticoid receptor in diastolic heart failure: beneficial effects of mineralocorticoid receptor blocker. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 292, n. 2, p. R946-R954, 2007.

ONUFRIEV, A. *et al.* Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized born model. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, v. 55, n. 2, p. 383-394, 2004.

ORTLUND, E. A. *et al.* Crystal structure of an ancient protein: evolution by conformational epistasis. *Science*, v. 317, n. 5844, p. 1544-8, 2007.

PASCUAL-LE TALLEC, L.; LOMBES, M. The mineralocorticoid receptor: A journey exploring its diversity and specificity of action. *Molecular Endocrinology*, v. 19, n. 9, p. 2211-2221, 2005.

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

PHILLIPS, J. C. *et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, v. 26, n. 16, p. 1781-1802, 2005.

PISSIOS, P. *et al.* Dynamic stabilization of nuclear receptor ligand binding domains by hormone or corepressor binding. *Molecular Cell*, v. 6, n. 2, p. 245-253, 2000.

POIRIER, H. *et al.* Differential involvement of peroxisome-proliferator-activated receptors alpha and delta in fibrate and fatty-acid-mediated inductions of the gene encoding liver fatty-acid-binding protein in the liver and the small intestine. *Biochemical Journal*, v. 355, p. 481-488, 2001.

PRIVALSKY, M. L. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annual Review of Physiology*, v. 66, p. 315-360, 2004.

QIN, W. N. *et al.* Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure. *Circulation Research*, v. 93, n. 1, p. 69-76, 2003.

RAFESTIN-OBLIN, M. E. *et al.* The severe form of hypertension caused by the activating S810L mutation in the mineralocorticoid receptor is cortisone related. *Endocrinology*, v. 144, n. 2, p. 528-33, 2003.

RASTINEJAD, F. *et al.* Structural Determinants of Nuclear Receptor Assembly on DNA Direct Repeats. *Nature*, v. 375, n. 6528, p. 203-211, 1995.

_____. Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1. *Embo Journal*, v. 19, n. 5, p. 1045-1054, 2000.

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. 681-689, 1995.

RIBEIRO, R. C. J. *et al.* The Nuclear Hormone-Receptor Gene Superfamily. *Annual Review of Medicine*, v. 46, p. 443-453, 1995.

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

_____. Interdomain interactions in the mineralocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 200, n. 1-2, p. 45-55, 2003.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative Protein Modeling by Satisfaction of Spatial Restraints. *Journal of Molecular Biology*, v. 234, n. 3, p. 779-815, 1993.

SAP, J. *et al.* The C-Erb-a Protein Is a High-Affinity Receptor for Thyroid-Hormone. *Nature*, v. 324, n. 6098, p. 635-640, 1986.

SAVKUR, R. S.; BURRIS, T. P. The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *Journal of Peptide Research*, v. 63, n. 3, p. 207-212, 2004.

SCARSI, M. *et al.* Sulfonylureas and glinides exhibit peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity: A combined virtual screening and biological assay approach. *Molecular Pharmacology*, v. 71, n. 2, p. 398-406, 2007.

SCHUELER, P. A. *et al.* Binding of 3,5,3'-Triiodothyronine (T3) and Its Analogs to the Invitro Translational Products of C-Erba Protooncogenes - Differences in the Affinity of the Alpha-Forms and Beta-Forms for the Acetic-Acid Analog and Failure of the Human Testis and Kidney Alpha-2 Products to Bind T3. *Molecular Endocrinology*, v. 4, n. 2, p. 227-234, 1990.

SCHULTEN, K. Manipulating proteins by steered molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, v. 16, n. 4-6, p. 289-289, 1998.

SHARIFI, N. *et al.* A bifunctional colchicinoid that binds to the androgen receptor. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 6, n. 8, p. 2328-2336, 2007.

SHOICHET, B. K. *et al.* Molecular Docking Using Shape Descriptors. *Journal of Computational Chemistry*, v. 13, n. 3, p. 380-397, 1992.

SHOICHET, B. K.; KUNTZ, I. D. Protein Docking and Complementarity. *Journal of Molecular Biology*, v. 221, n. 1, p. 327-346, 1991.

_____. Matching Chemistry and Shape in Molecular Docking. *Protein Engineering*, v. 6, n. 7, p. 723-732, 1993.

SHOICHET, B. K. *et al.* Ligand solvation in molecular docking. *Proteins-Structure Function and Genetics*, v. 34, n. 1, p. 4-16, 1999.

SONODA, M. T. *et al.* Ligand dissociation from estrogen receptor is mediated by receptor dimerization: Evidence from molecular dynamics simulations. *Molecular Endocrinology*, v. 22, n. 7, p. 1565-1578, 2008.

STEINMETZ, A. C. U. *et al.* Binding of ligands and activation of transcription by nuclear receptors. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, v. 30, p. 329-359, 2001.

STILL, W. C. *et al.* Semianalytical Treatment of Solvation for Molecular Mechanics and Dynamics. *Journal of the American Chemical Society*, v. 112, n. 16, p. 6127-6129, 1990.

TEAGUE, S. J. *et al.* The design of leadlike combinatorial libraries. *Angewandte Chemie-International Edition*, v. 38, n. 24, p. 3743-3748, 1999.

TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Tumor-Necrosis-Factor, Other Cytokines and Disease. *Annual Review of Cell Biology*, v. 9, p. 317-343, 1993.

TROST, S. U. *et al.* The thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. *Endocrinology*, v. 141, n. 9, p. 3057-64, 2000.

TSUI, V.; CASE, D. A. Theory and applications of the generalized Born solvation model in macromolecular simulations. *Biopolymers*, v. 56, n. 4, p. 275-91, 2000.

VERLET, L. Computer Experiments on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Reviews*, v. 159, p. 98-103, 1967.

VILLICEV, C. M. *et al.* Thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 increases energy expenditure and prevents fat-mass accumulation in rats. *Journal of Endocrinology*, v. 193, n. 1, p. 21-29, 2007.

WAGNER, R. L. *et al.* A Structural Role for Hormone in the Thyroid-Hormone Receptor. *Nature*, v. 378, n. 6558, p. 690-697, 1995.

_____. Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. *Molecular Endocrinology*, v. 15, n. 3, p. 398-410, 2001.

WALDRON, T. T.; MURPHY, K. P. Stabilization of proteins by ligand binding: Application to drug screening and determination of unfolding energetics. *Biochemistry*, v. 42, n. 17, p. 5058-5064, 2003.

WANG, J. M. *et al.* Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, v. 25, n. 2, p. 247-260, 2006.

_____. Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry*, v. 25, n. 9, p. 1157-1174, 2004.

WEINBERGER, C. *et al.* The C-Erb-a Gene Encodes a Thyroid-Hormone Receptor. *Nature*, v. 324, n. 6098, p. 641-646, 1986.

WOLF, I. M. *et al.* Coactivators and nuclear receptor transactivation. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 104, n. 5, p. 1580-1586, 2008.

WURTZ, J. M. *et al.* A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature Structural Biology*, v. 3, n. 1, p. 87-94, 1996.

XIONG, H. *et al.* Free energy calculations with non-equilibrium methods: applications of the Jarzynski relationship. *Theoretical Chemistry Accounts*, v. 116, n. 1-3, p. 338-346, 2006.

XU, H. E. *et al.* Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPAR alpha. *Nature*, v. 415, n. 6873, p. 813-817, 2002.

XU, W. Nuclear receptor coactivators: the key to unlock chromatin. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire*, v. 83, n. 4, p. 418-428, 2005.

YE, L. *et al.* Thyroid receptor ligands. 1. Agonist ligands selective for the thyroid receptor beta(1). *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 9, p. 1580-1588, 2003.